فصلنامه انسان و محیط زیست، شماره ۴۹، تابستان ۹۸

مروری بر تولید زیست سوخت اتانول با استفاده از فرآوری زیستی[1] زیست توده[2]

حسین معتمدی[3]*

hhmotamedi@yahoo.com

ابوالقاسم هدایت خواه [4]

مصطفی عموپور بهنمیری [4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۰۱ **تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۰۳/۱۴**

چکیده

جهت حفظ منابع فسیلی به عنوان مهم‌ترین منبع تامین انرژی، بشر نیازمند یافتن منابع تجدیدپذیری برای این مواد است. از جمله گزینه‌های پیش رو زیست‌توده است که قابلیت تبدیل به زیست‌سوخت‌ها را دارد. از جمله مهم‌ترین زیست‌سوخت‌های تولید شده اتانول است که به عنوان بهترین جایگزین برای بنزین شناخته شده است. تبدیل زیست‌توده به زیست‌سوخت طی یکی از فرآیندهای زیست‌پالایی به نام تبدیل زیستی انجام می‌شود که در آن ابتدا محتوای کربوهیدراتی زیست‌توده به قندهای ساده تبدیل شده، سپس قندها به اتانول تخمیر شوند. با توجه به ساختار سخت تجزیه‌شونده مواد لیگنوسلولزی، انجام روش پیش‌تیمار ضروری به نظر می‌رسد که روش‌های متفاوتی از جمله تیمارهای فیزیکی و شیمیایی پیشنهاد شده است. در مرحله قندسازی، زیست‌توده تیمار شده تحت اثر آنزیم‌های تجزیه‌کننده قرار می‌گیرد که بسته به نوع آنزیم‌های استفاده شده قندهای ۵ یا ۶ کربنه یا هردونوع تولید می‌شود و بر این اساس نوع میکروارگانیسم تخمیر کننده انتخاب می‌شود. برای بالا بردن بازده نهایی تجزیه و تخمیر، معمولا این دو مرحله را به‌صورت هم‌زمان انجام می‌دهند. یکی از ابعاد مهم تحقیقات در زمینه تولید زیست‌سوخت‌ها به‌خصوص اتانول، معطوف به توسعه روش‌های تخمیری است تا بازده نهایی تولید را افزایش دهند که از مهم‌ترین این تحقیقات می‌توان به روش تخمیر دوفازی اشاره کرد.

کلمات کلیدی: زیست‌توده، زیست‌سوخت، اتانول، پیش‌تیمار، تخمیر.

1- Bioprocessing

2- Biomass

۳- استادگروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی ،دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران *(مسوول مکاتبات)

۴- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

Human & Environment., No. 49, Summer 2019

A review of Bioethanol production through biomass bioprocessing

Hossein Motamedi [1*] *(Corresponding Author)*
hhmotamedi@yahoo.com
Abolghasem Hedayatkhah [2]
Mostafa Amopour Bahnamiry [2]

Abstract

In order to preserve fossil fuel reservoirs, it is necessary to find renewable resources. One option is biomass that can be converted to biofuels. One of the most important biofuels is ethanol that has been regarded as the best substituent for benzene. Bioconversion is one of the bioremediation methods in which, biomass is converted to biofuel. In this process carbohydrate content is converted to simple sugars and then fermented to ethanol. With regard to the unique structure of lignocellusic materials the pretreatment is necessary that can be done by physical and chemical methods. In saccharification, the biomass is degraded to 5 and/or 6 carbon sugars and then the fermenter microorganism is selected based on the produced sugar. In order to improve final yeild, usually this two steps will be done simulatneously. One of the most important subjects in biofuel production is development of fermentation methods to reach maximum yield one of them is biphasic fermentation.

Key Words: Biomass, Biofuel, Ethanol, Pretreatment, Fermentation.

1 Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. **(Corresponding Author)*

2 MSc in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

مقدمه

انرژی کلید زندگی مدرن بشر و تولید و منابع تأمین آن یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های بشر امروزی است (۱). سوخت‌های فسیلی از مهم‌ترین منابع تولید انرژی در جهان هستند و نفت خام به عنوان منبع‌تامین آن‌ها اهمیت بسیار بیش‌تری از سوخت‌های مشتق دارد. کاهش منابع نفتی و به تبع آن سوخت‌های فسیلی حاصل از آن، افزایش تقاضای انرژی، بالا رفتن روز به روز قیمت آن و اثرات نامطلوب زیست محیطی ناشی از مصرف سوخت‌های فسیلی (۲-۴)، سبب تهییج دولت‌ها و موسسات علمی در احساس نیاز برای جایگزینی این منبع انرژی با منابعی دیگر است که امن، از لحاظ اقتصادی شدنی و به صرفه، تجدیدپذیر و دوست‌دار محیط زیست باشند. منابع تجدید پذیر زیستی[1]و سوخت‌های مشتق از آن‌ها می‌تواند وابستگی به مواد نفتی را کاهش داده، فرصت‌های شغلی بومی (داخلی) ایجاد کرده و کیفیت محیط زیست را بهبود بخشد (۳). زیست‌سوخت‌ها[2] دسته‌ای از انرژی‌های جایگزین[3]تجدیدپذیر[4]هستند که به کمک منابع تجدیدپذیر تولید می‌شوند(۴). اتانول، متانول، بوتانول، پروپانول، استون، بیوهیدروژن، بیوگاز و بیودیزل از جمله زیست سوخت‌ها هستند.

یکی از ابعاد مهم زیست‌پالایی انتخاب نوع ماده خام است. در گذشته گزینه‌های مختلفی‌به عنوان سوبسترای‌تولید زیست‌سوخت‌ها مورد بحث قرار گرفته و تولید آن‌ها از مواد اولیه لیگنوسلولزی به عنوان یکی از بهترین انتخاب‌ها مطرح شد، در نتیجه با جایگزین کردن غلات با مواد لیگنوسلولزی در تولید زیست‌سوخت‌ها می‌توان مشکل تداخل سوبسترای تولید با زنجیره غذایی انسانی و غذای دام را حل کرده و نیز جلوی افزایش قیمت این دسته از مواد را گرفت (۵). در فرآیند تبدیل زیستی[5]زیست‌توده به زیست‌سوخت‌ها عوامل مهمی اثر گذار است و نیازمند طی مراحل مختلفی است. برای تولید زیست‌سوخت‌هایی مانند اتانول و بوتانول از زیست‌توده انجام سه مرحله ضروری به نظر می‌رسد: پیش‌تیمار[6]ماده خام، تبدیل ماده خام به قندهای ساده قابل تخمیر و تخمیر این قندها به زیست‌سوخت مدنظر. یکی از چالش های اصلی در تولید بیواتانول از مواد لیگنوسلولزی، انتخاب یک تکنیک پیش تیمار مناسب و مقتضی است که نقش مهمی را در بالا بردن کیفیت و میزان قندسازی آنزیمی بازی می‌کند و به موجب آن تمام مراحل تولید از لحاظ اقتصادی مطلوب یا نامطلوب می‌شود. همچنین نوع روش قندسازی و تخمیر اثرات مهمی در بازده نهایی خواهد داشت (۶).

این مقاله سعی بر آن دارد تا با بیان اهمیت تولید زیست-سوخت‌ها از منابع زیست توده‌ای و بیان اهمیت بخش پیش تیمار زیست توده، مروری کوتاه بر مراحل مختلف این پروسه و انواع روش‌های مورد استفاده در هر مرحله مانند انواع روش‌های تیمار مواد لیگنوسلولزی داشته باشد و به مزایا و معایب هر کدام بپردازد.

زیست‌پالایی و نیاز به سوخت‌های زیستی

منابع مورد نیاز بشر انواع گوناگونی دارد که اجزای ساده یک غذا تا مواد کامپوزیتی بسیار پیچیده صنعتی را شامل می-شود. انرژی و منابع تامین آن یکی از ابعاد زندگی بشر است که نقشی حیاتی و تعیین کننده دارد (۷). منابع و میزان تولید انرژی و حاملان آن در زندگی سیاسی کشورها، تعادل قدرت و جغرافیای سیاسی- اقتصادی آن‌ها اثرگذار است. منابع انرژی را می‌توان به سه دسته منابع فسیلی[7]،منابع تجدیدپذیر[8]و منابع قابل انشقاق[9](ناپاک)[10]تقسیم بندی کرد(۷) .منابع فسیلی شامل، نفت خام، قیر، ذغال سنگ، گاز طبیعی و غیره است.

1- Biorenewable resources
2- Biofuel
3- Alternative Energy
4- Renewable energy
5- Bioconversion
6- Pretreatment
7- Fossil
8- Renewable
9- Fissile
10- Not Clear

منابع انرژی تجدیدپذیر زیادی وجود دارند از جمله خورشید، باد، زمین گرمایی، امواج دریایی- اقیانوسی، زیست‌توده و غیره که البته زیست‌توده یکی از مهم‌ترین آن‌ها است. مهم‌ترین منبع انرژی انشقاقی اورانیوم و توریوم است (۴ و ۷). ٪۸۰ کل مطالبه انرژی در دنیا مربوط به نفت، گاز و ذغال سنگ است (۸). این حاملین انرژی نتیجه میلیون‌ها سال انباشته شدن رسوبات موجودات است که در مقیاس زمان ژئولوژیکی، انسان فقط در چشم بر هم زدنی این منبع گران‌بها را مصرف نموده است. هرچند در مقیاس‌های زمانی طولانی این فرآیند تکرار پذیر است، اما در مقیاس زمانی زندگی بشر و نیز با توجه به حجم مصرف بسیار بالای این مواد توسط انسان، فرصت کافی برای بازتولید این مواد وجود ندارد. به عبارت دیگر تجدیدناپذیرند (۴و ۷). Campbell و Laherrère (۱۹۹۸) تخمین زدند که قبل از سال ۲۰۱۰ تولید جهانی نفت کاهش پیدا خواهد کرد و تولید سالانه ۲۵ میلیارد بشکه در سال ۱۹۹۸ به ۵ میلیارد در سال ۲۰۵۰ می‌رسد (۲). هرچند پس از سال ۲۰۱۰ میزان تولید چندان کاهشی پیدا نکرد و حتی بعضی کشورهای اُپک[1] افزایش تولید داشته‌اند، اما کاهش میزان تولید که خود نشان از کاهش منابع و ذخایر نفت خام است امری دور از ذهن و واقعیت نیست. علاوه بر این تولید مقادیر بالای دی‌اکسیدکربن، اکسیدهای نیتروژن و اکسیدهای گوگرد طی مصرف سوخت-های فسیلی اثرات نامطلوب زیست محیطی برجای می‌گذارد. (۴و ۷). همه این موارد دست به دست هم می‌دهد تا انسان به‌دنبال پیدا کردن یک منبع جایگزین برای سوخت‌های فسیلی باشد. سوخت‌هایی که هم تجدیدپذیر باشند و هم اثرات نامطلوب بر محیط زیست نداشته باشند و علاوه بر پایداری، قابلیت دسترسی و میزان تولید مطلوبی داشته باشند. در همین راستا منابع تجدیدشونده و پاکی همچون هیدروژن، زیست‌توده، خورشید، زمین گرمایی، امواج و باد مورد توجه محققان قرار گرفت (۷). این‌که کدام‌یک از این منابع تجدیدپذیر نقش اصلی در زندگی آینده ما بازی می‌کند به روشنی مشخص نیست و به عواملی مانند میزان زمین مورد نیاز و در دسترس در آینده، نوآوری‌های فنی آینده، سیاست‌های محیطی تنظیم انتشار گازهای گلخانه‌ای، کمک‌های مالی دولتی برای استخراج و پردازش منابع غیر فسیلی و پشتیبانی مردمی از سوخت‌های جایگزین، وابسته است (۴).

زیست‌پالایی مجموعه‌ای از پردازش‌های زیستی، شیمیایی و فیزیکی است که طی آن محصولات مورد نیاز بشر از منابع زیستی تهیه می‌شوند. معنی تحت اللفظی این واژه پالایشگاه زیستی است. همان‌گونه که در یک پالایشگاه مواد نفتی، نفت برای تولید سوخت، پلاستیک و ترکیبات شیمیایی-نفتی فرآوری می‌شود، در زیست‌پالایی، مواد خام کشاورزی، محصولات ثانویه و پسماندهای زیستی برای تولید محصولات گوناگونی مانند ترکیبات غذایی، ترکیبات دارویی و زیست سوخت‌ها فرآوری می‌شوند؛ بسیاری از سوخت‌های حاصل از زیست‌توده تنها زمانی صرفه‌ی اقتصادی دارند که یک محصول جانبی[2] ارزشمند نیز طی فرآوری آن‌ها قابل بازیافت باشد و کنترل کارآمد انرژی به‌کار برده شود. زیست‌توده قدیمی‌ترین منبع تامین انرژی برای انسان بوده است. این محصول حامل انرژی، به صورت پیوسته و مداوم (تجدیدپذیر) انرژی خورشید را در خود ذخیره می‌کند و می‌تواند به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم به سوخت‌های مایع تبدیل شود (۹). تبدیل زیست‌توده به سوخت می‌تواند هم تولید کننده سوخت‌های مایع مانند سوخت‌های پایه الکلی و بیودیزل، که جانشین‌های مناسبی برای سوخت‌هایی مانند بنزین هستند (۴، ۱۰-۱۳)، و هم سوخت‌های گازی شکل مانند بیوگاز و بیوهیدروژن باشد (۴، ۱۱، ۱۴-۱۷) و یا آن‌که در حالت جامد به عنوان سوخت مصرف شوند که همان شکل کهن سوزاندن مواد چوبی است. به عبارت دیگر، تنوع بالا در شکل‌های تولید، ذخیره و مصرف وجود دارد. در حالت دیگر زیست‌توده می‌تواند به صورت مستقیم یا غیر مستقیم به انرژی الکتریکی تبدیل شود (۴، ۱۱، ۱۴، ۱۸). مشتق‌سازی از زیست‌توده به زیست‌سوخت می‌تواند

1- OPEC

2- Coproduct

هم از زیست‌توده با مصرف خوراکی و هم از زیست‌توده غیر خوراکی انجام شود (۷). بعضی زیست‌سوخت‌ها مانند انواع روغن که از گیاهان و جلبک‌ها استخراج می‌شود، محصول مستقیم فتوسنتز است، بعضی‌ها مانند اتانول تولید شده توسط مخمرها و باکتری‌ها، حاصل مشتق سازی و تبدیل زیست‌توده است و بعضی دیگر مانند هیدروژن می‌تواند از هر دو مسیر تولید شود. جدول ۱ میزان انرژی سوخت‌های معمول را نشان می‌دهد (۴).

جدول ۱- مقدار چگالی انرژی سوخت‌های معمول(۴)

نوع سوخت	چگالی انرژی (kJ/g)	چگالی (kg/m3)	محتوای انرژی (GJ/m3)
هیدروژن	۱۴۳/۰	۰/۰۸۹۸	۰/۰۱۲۸
متان(گاز طبیعی)	۵۴/۰	۰/۷۱۶۷	۰/۰۳۸۷
دیزل شماره ۲	۴۶/۰	۸۵۰	۳۹/۱
بنزین	۴۴/۰	۷۴۰	۳۲/۶
بیودیزل	۴۰/۲	۸۸۵	۳۵/۶
ذغال سنگ	۳۵/۰	۸۰۰	۲۸/۰
اتانول	۲۹/۶	۷۹۴	۲۳/۵
متانول	۲۲/۳	۷۹۰	۱۷/۶
نرم چوب‌ها	۲۰/۴	۲۷۰	۵/۵
باگاس	۱۷/۵	۱۶۰	۲/۸
سبوس برنج	۱۶/۲	۱۳۰	۱/۲
نفت تجزیه شده با حرارت	۸/۳	۱۲۸۰	۱۰/۶

اتانول یا اتیل الکل، یکی از منابع جایگزین و امید بخش سوخت‌های فسیلی است که بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این ماده از معمول‌ترین الکل‌ها است و به راحتی می‌توان آن‌را طی فرآیند تخمیر از غلات (نشاسته)، آب‌میوه‌ها و هر منبع دیگری که بتوان قند آن را در اختیار میکروارگانیسم تخمیرگر قرار داد، تولید کرد (۴، ۱۱). اتانول که توسط هنری فورد "سوخت آینده" نام گرفت، به چند دلیل معمول‌ترین سوخت الکلی شده است (۱۱):سمیت آن از سایر الکل‌ها کم‌تر است و نیز محصولات ثانویه حاصل از اکسیداسیون ناقص اتانول (استیک اسید و استالدئید) سمیت کم‌تری از محصولات ثانویه حاصل از اکسیداسیون ناقص سایر الکل‌ها دارد. در هر غلظتی در آب حل می‌شود. می‌توان آن‌را از محصولات کشاورزی (گیاهی) تجدیدپذیر (شکر، ملاس، ذرت، لیگنوسلولز و ...) تولید کرد. در نتیجه بر محصولات نفتی تجدیدناپذیر ارجح است. از لحاظ قابلیت تجاری سازی و صرفه اقتصادی، اتانول (و پس از آن متانول) قابلیت پویایی برای مصرف به عنوان سوخت را دارند. در حال حاضر آمریکا و برزیل بیش‌ترین تولید اتانول زیستی را دارند (۱۹). می‌توان آن‌را به‌صورت مستقیم و یا در حالت‌های مخلوط[1] با بنزین در موتورهای احتراقی مصرف کرد. هرچند متانول و بوتانول نیز قابلیت افزودن به بنزین را دارند، اما اتانول انتخاب رایج است. معمول‌ترین حالت‌های ترکیبی اتانول و بنزین سوخت‌های E10 و

1-Blend

E85 هستند که به ترتیب دارای نسبت‌های ۱۰٪ اتانول :۹۰٪ بنزین و ۸۵ ٪ اتانول : ۱۵٪ بنزین می‌باشند (۱۱، ۱۹). در سال-های اخیر اتانول به عنوان سوخت در سلول‌های سوختی اتانولی مستقیم و سلول‌های زیست سوختی[1] پیشنهاد شده است.

سوبسترای تولید اتانول

تولید اتانول به روش زیستی به واسطه تخمیر بسیاری از قندهای ساده امکان پذیر است. به این ترتیب هر ماده قندی یا هر ماده ای که از هیدرولیز آن بتوان قند تولید کرد می‌تواند ماده خام یا همان سوبسترای تولید اتانول باشد. یکی از مشکلات تولید اتانول در دسترس بودن سوبسترای تولید است (۲۰). قیمت این سوبستراها، تجدیدپذیر بودن آن‌ها و مشکلات اجتماعی نیز نقش مهمی در انتخاب نوع سوبسترای تولید دارد (۴). مواد خام در سه دسته طبقه بندی می‌شود: الف- مواد خام محتوی قند مانند نیشکر، چغندر، سورگوم شیرین و میوه‌ها؛ ب- مواد خام نشاسته‌ای مانند ذرت، گندم، برنج، سیب‌زمینی و ج- مواد خام لیگنوسلولزی (۱۹، ۲۰).

تولید اتانول از زیست‌توده لیگنوسلولزی به نام نسل دوم تولید[2] شناخته می‌شود و نسبت به تولید آن از قندها و نشاسته (نسل اول تولید[3]) دارای مزایای انرژتیک، اقتصادی، محیطی و حتی سیاسی- اجتماعی بیش‌تری است و با توجه به مزایای قابل توجه مواد لیگنوسلولزی، تمرکز محققان و شرکت‌ها به سمت استفاده از زیست‌توده لیگنوسلولزی معطوف شده است(۱۴، ۲۱).

در ایران پسماندهای زیست‌توده‌ای کشاورزی و صنعتی فراوانی وجود دارد مانند کاه برنج، کاه گندم، باگاس نیشکر، ملاس نیشکر، پسماند صنایع تولید کاغذ، کاه حبوبات و غیره. اما باگاس نیشکر وکاه برنج از جمله مواد لیگنوسلولزی پسماندی، تجدید شونده و فراوان در دنیا و از مهم‌ترین پسماندهای کشاورزی ایران هستند که بیش‌تر مقادیر آن‌ها بدون هیچ استفاده‌ای سوزانده می‌شود. این مواد دارای مقدار بالایی سلولز و همی‌سلولزاند که می‌توانند به آسانی به قند تخمیرشونده، تجزیه شوند (۶، ۲۲).

ساختمان زیست‌توده

ساختار چوب

در دیواره سلولی بسیاری از گیاهان الیاف سلولزی در میان ماده ای زمینه‌ای و غیر بلورین از دو بیوپلیمر دیگر به نام لیگنین و همی‌سلولز، محصور شده است (شکل ۱) و ترکیبی به نام لیگنوسلولز را می‌سازند که بیش از ۹۰ ٪ وزن خشک سلول گیاهی را به خود اختصاص می‌دهد. سلولز و همی‌سلولز قابلیت تبدیل شدن به اتانول را دارند و لیگنین را می‌توان به عنوان نوعی زیست‌سوخت مصرف کرد. جدول شماره‌ی۲ بیان‌گر درصد سلولز و همی‌سلولز و میزان تولید اتانول از لحاظ نظری در بعضی غلات است.

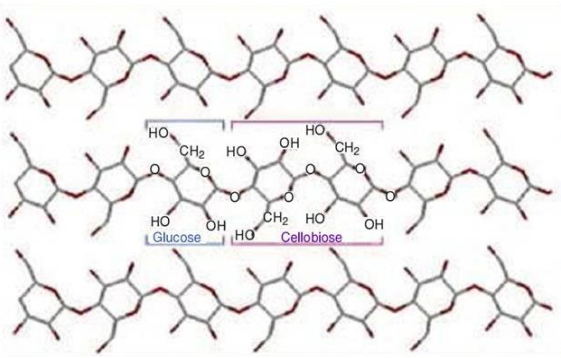
1- Biofuel Cell
2- Second generation
3- First generation

جدول ۲- درصد سلولز و همی‌سلولز در بعضی غلات و میزان نظری تولید اتانول (۴)

سوبسترا	درصد سلولز	درصد همی‌سلولز	مقدار تولید اتانول (L/Kg)
علوفه ذرت	۳۶/۹	۲۱/۳	۰/۴۳
باگاس	۳۹/۱	۲۲/۵	۰/۴۵
کاه گندم	۳۹/۶	۲۶/۴	۰/۴۸
کاه برنج	۳۸/۶	۱۹/۷	۰/۴۲

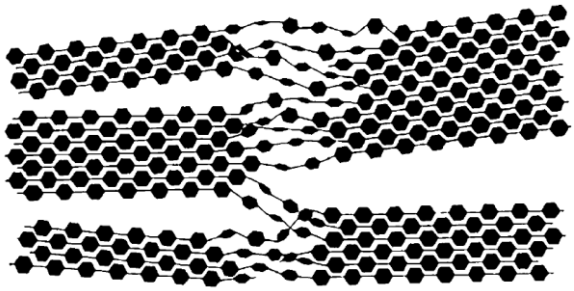
سلولز

سلولز جزء اصلی ساختار دیواره اولیه در سلول‌های گیاهی و فراوان‌ترین پلیمر بیوسفر است که به‌طور معمول بین ۲۰ تا ۴۵ ٪ از وزن خشک سلول‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد (۲۳، ۲۴). پلی‌ساکاریدی رشته‌ای خطی از واحدهای D-گلوکز با اتصال گلیکوزیدی $\beta(1\rightarrow4)$ است (۲۳، ۲۵-۲۷) که ساختار آن در شکل ۱ نشان داده شده است. فیبریل‌های سلولزی در دیواره سلول‌های گیاهی به دو شکل بسیار منظم و با اتصالات مستحکم به نام نواحی بلورین[1] و دیگری شکل غیر منظم[2] به نام نواحی غیربلورین وجود دارند (شکل ۲). ساختار بلورین نسبت به ساختار غیر بلورین در برابر تجزیه بسیار مقاوم‌تر و سخت تجزیه‌شونده‌تر است و یکی از موانع مهم در فرآیند تولید زیست سوخت‌ها می‌باشد، چرا که این نوع گردهم‌آیی ساختار مقاومی در برابر نفوذ آنزیم‌ها و حتی مولکول‌های بسیار کوچکی مانند آب ایجاد می‌کند(۲۳، ۲۵).



شکل۱- ساختار سلولز. در شکل سه رشته از یک فیبر سلولزی نشان داده شده است که در زنجیره وسط یک واحد گلوکز تکرار شوند سلوبیوز مشخص شده است(۲۶)

1- Crystalline
2- Amorphous



شکل۲- ساختار کریستالی و بدون شکل فیبر سلولز (۲۸ ,۲۳)

همی سلولز

پس از سلولز، همی‌سلولز مهم‌ترین نقش را در ساختار دیواره سلولی سلول‌های گیاهی ایفا می‌کند و در واقع رابط اتصالی بین سلولز و لیگنین است. این ترکیب برخلاف سلولز، هتروپلیمر و خطی است(۲۵). قندهای پنتوزی، قندهای غالب در آن هستند که مهم‌ترین آن‌ها زایلان می‌باشد. زایلان توسط مخمرهای معمول تولیدکننده اتانول مانند *Saccharomyces cerevisiae* قابل تخمیر نیست، ولی توسط بعضی دیگر مثل جنس Pichia قابل مصرف و تخمیر به اتانول است (۶، ۲۷). همی‌سلولز ساختاری غیربلورین دارد و به صورت جزئی در آب حل می‌شود و اگرچه نسبت به سلولز بسیار سریع‌تر تجزیه می‌شود، اما حضور آن یک عامل مهم برای مقاومت سلولز در برابر تجزیه است (۲۴، ۲۵).

لیگنین

این ماده شبکه پیچیده سه بعدی و آبگریز است که از کنار هم قرارگرفتن تصادفی واحدهای فنول پروپانوئید با ساختاری نامنظم تشکیل شده و نسبت به سلولز سخت‌تر تجزیه می‌شود. این ماده می‌تواند به عنوان زیست‌سوخت استفاده شود. دارای اثر مهارکنندگی بر روی آنزیم‌های تجزیه‌کننده کربوهیدرات‌ها است؛ بدین‌صورت که آنزیم‌ها به صورت غیر قابل بازگشت به آن پیوند شده و در نتیجه بازده کلی فعالیت هیدرولیز آنزیمی را کاهش می‌دهد (۶، ۲۳، ۲۵، ۲۹).

سایر ترکیبات

به‌جز سه ترکیب اصلی ذکر شده در ساختار دیواره سلول گیاهی ترکیبات دیگری نیز وجود دارند مانند مونو و دی‌ساکاریدهای آزاد (پیوند نشده) در کمپلکس دیواره، اسیدهای چرب، موم الکل‌ها و غیره . علاوه بر این‌ها باقی‌مانده زیست‌توده پس از سوزاندن در دمای $575 \pm 30^{\circ}C$ نیز تحت عنوان خاکستر موجود در زیست‌توده شناخته می‌شود (۳۰).

تبدیل زیست‌توده لیگنوسلولزی به زیست سوخت

همان‌گونه که قبلا ذکر شد برای تبدیل مواد لیگنوسلولزی به زیست سوخت سه مرحله ضروری وجود دارد که در ادامه توضیح داده خواهند شد.

تیمار

در فرآیند تبدیل زیستی زیست‌توده به زیست سوخت‌ها عوامل مهمی اثر گذار است که پیش تیمار گام مهم و اول است. با استفاده از یک روش تیمار مناسب می‌توان زیست‌توده را به مواد قندی قابل مصرف برای میکروارگانیسم تبدیل کرد تا میکروارگانیسم تخمیرگر با مصرف این قندها زیست‌سوخت مورد نظر را تولید کند (۴). از آن‌جا که زیست‌توده گیاهی از ترکیبات پلیمری کربوهیدرات‌های نامتجانس[۱] تشکیل شده است و سلولز و همی‌سلولز به صورت متراکمی توسط لایه‌هایی از لیگنین بسته‌بندی شده است تا از هیدرولیز آنزیمی حفاظت شوند، داشتن یک پیش تیمار برای شکستن سد لیگنینی، کاهش درصد کریستاله بودن سلولز و یا متخلخل کردن زیست‌توده با حذف بخشی از ترکیبات تشکیل دهنده غیر از سلولز، به منظور در معرض قرار گرفتن سلولز و همی‌سلولز، برای فعالیت آنزیمی ضروری به نظر می‌رسد. فرآیندهای تیماری تغییر دهنده ویژگی‌های فیزیکی (افزایش سطح، ظرفیت جذب، افزایش تخلخل، قابلیت دسترسی سلولاز به سلولز با افزایش سطح در دسترس سوبسترا) و شیمیایی (تغییر در محتوای کربوهیدرات، لیگنین، تبلور، درجه پلیمریزاسیون یا میزان کریستاله بودن سلولز) زیست‌توده است که این واقعه خود می‌تواند سبب ایجاد تغییرات مثبت (مثل بهبود عملکرد آنزیم‌ها، افزایش سطح و میزان دسترسی آنزیم به سوبسترا، کاهش مهارگرها، افزایش بازده نهایی تولید و ...) و یا تغییرات منفی (افزایش هزینه، تولید مهارگر و ...)

۱ Heterogeneous

در فرآیند تولید بیواتانول شود (۶، ۲۲، ۲۵). در واقع هدف اصلی تیمار زیست‌توده افزایش سطح در دسترس کربوهیدات‌ها به‌خصوص سلولز برای آنزیم‌های تجزیه کننده است و بسته به نوع آن اثرات ویژه‌ای بر اجزای لیگنینی، همی‌سلولزی و سلولزی دارد. تیمارها شامل روش‌های فیزیکی، شیمیایی و حرارتی یا ترکیبی از این‌ها می‌باشد و تیمار یکی از مراحل فرآوری بسیار گران در فرآیند تبدیل زیست‌توده‌های سلولزی به قندهای قابل تخمیر است. در نتیجه باید متناسب با مرحله بعدی تیمار، تجزیه آنزیمی و تخمیر و اهداف آن‌ها یک فرآیند تیماری پیشرفته و به صرفه از لحاظ اقتصادی را انتخاب کرد (۲۱). عوامل کلیدی که برای انتخاب نوع تیمار باید به همه یا بخش زیادی از آن‌ها دقت شود عبارتند از:

مواد جامد تیمار شده باقی مانده با قابلیت تجزیه پذیری بالا، عدم تجزیه قابل توجه کربوهیدرات‌های ساختاری به‌خصوص سلولز (در بعضی تیمارها هدف تیمار حذف همی‌سلولزاست)، حداقل تولید ترکیبات سمی و مهارکننده، ، بازده بالا برای انواع علوفه‌ها و پسماندهای گیاهی و زمان‌های برداشت محصول، قابلیت بازیافت لیگنین، حداقل مصرف انرژی (حرارت و انرژی) و غیره (۲۱).تیمار زیست‌توده به روش‌های گوناگونی انجام می‌شود که به‌طور کلی شامل موارد زیر است:

تیمار فیزیکی

این تیمار سطح سوبسترای در دسترس و اندازه منافذ را افزایش داده و میزان کریستالیزه بودن و درجه پلیمریزه بودن را کاهش می‌دهد.

الف- خرد کردن و آسیاب کردن

معمولا این مرحله، مرحله ابتدایی از تیمار برای هر زیست‌توده است که اندازه‌ی اجزای آن را کاهش می‌دهد. این روش تا حد زیادی سبب کاهش درجه کریستالیزه بودن سلولز می‌شود.

ب- تابش پرتو الکترونی[1]

بخش‌های سلولزی مواد لیگنوسلولزی می‌توانند تحت تاثیر پرتوافکنی به فیبرهای شکننده، الیگوساکاریدهایی با وزن مولکولی کم و سلوبیوز تبدیل شوند. روش پرتوافکنی بسیار گران قیمت و با مصرف انرژی بسیار بالا و مشکلاتی در کاربردهای صنعتی همراه است. Jin و همکاران روی کاه خشک و آسیاب شده برنج، تیمار فیزیکی تابش پرتوالکترونی را انجام دادند که نتایج آن در فرآیند هیدرولیز بعد از ۱۳۲ ساعت، معادل تولید ۵۲/۱ ٪ گلوکز است، در حالی‌که از هیدرولیز کاه برنج خالص ۲۲/۶٪ گلوکز حاصل شده است. از آن‌جایی که در این روش از حرارت بالا استفاده نمی‌شود، از تولید مواد مهارکننده‌ای که طی تیمار اسیدی یا قلیایی در دمای بالا تولید می‌شوند، دوری شده و یا تولید آن‌ها به حداقل می‌رسد(۶).

ج- تیمار با امواج مایکروویو

پرتوافکنی مایکروویو فراساختار سلولز را به هم می‌ریزد، لیگنین و همی‌سلولز را می‌شکند و قابلیت آنزیم پذیری مواد لیگنوسلولزی را افزایش می‌دهد. هیدرولیز آنزیمی کاه برنج، به‌واسطه تیمار با امواج مایکروویو و در حضور آب و نیز در حضور محیط گلیسرین با میزان آب کم‌تر می‌تواند افزایش پیدا کند (۶) این روش نیز بسیار انرژی‌بر است.

تیمار شیمیایی

آنزیم‌ها نمی‌توانند بدون تیمار شیمیایی، مواد لیگنوسلولزی را به‌طور موثری به قندهای قابل تخمیر تبدیل نمایند.

الف- تیمار قلیایی

تیمار قلیایی شامل کاربرد محلول‌های بازی مثل NaOH ، KOH و یا آمونیاک برای حذف لیگنین و مقداری از همی‌سلولز است و به‌طور کارآمدی قابلیت دسترسی آنزیم به سلولز را افزایش می‌دهد. تیمار قلیایی روش بسیار موثری برای شکستن پیوندهای استری میان لیگنین، همی‌سلولز و سلولز می‌باشد و نیز سبب مهار تکه تکه شدن پلیمر همی‌سلولزی شود. اثر اصلی تیمار NaOH بر زیست‌توده لیگنوسلولزی، لیگنین‌زدایی آن با شکستن پیوندهای استری عامل اتصالات

---

۱ Electron beam irradiation

عرضی لیگنین و زایلان و در نتیجه افـزایش تخلخـل سوبسـترا می‌باشد. در تیمار با آمونیاک، لیگنین‌زدایی بدون باقی گذاشتن اثر قابـل تـوجهی بـر روی محتـوی کربوهیـدراتی رخ می‌دهـد. ایـن روش یـک تیمـار بسـیار مـوثر اسـت بـه‌خصـوص بـرای سوبستراهایی که مقدار لیگنین کمی دارنـد ماننـد پسـماندهای کشاورزی و ذخایر علوفـه‌ای(۳۱-۳۵). آمونیـاک در مقایسـه بـا سایر قلیاها مثل هیدروکسید سدیم و یا آهک تمایل بـیش‌تـری برای حذف لیگنین دارد و لیگنین تولید شـده در آن بـر خـلاف اکثر روش‌های قلیایی فاقد سولفور و سود اسـت؛ آمونیـاک اثـر تورمی[1]قابل توجهی بر مواد لیگنوسـلولزی دارد و همچنـین بـه سبب فراریت بالای آن، بازیابی آن بسیار آسـان اسـت (۳۲). دو روش تیمار آمونیـاکی در دسـترس اسـت، یکـی روش[2]ARP و دیگـری روش SSA[3] مـی‌باشـد(۳۱، ۳۶، ۳۷)، اولـی فرآینـدی تیماری با شدت و حدت بالا و مدت زمان کم است و دومـی بـا شدت پایین ولی مدت زمان انجام بیش‌تر است. فرآیند جریـان-دار که بازچرخه تراوش آمونیاک نامیده می‌شود (ARP) [4]بـرای پیش تیمار توسعه یافته است. در این فرآیند آمونیـاک از میـان بستری از زیست‌توده که در ۱۷۰ درجـه سـانتی‌گـراد نگـه‌داری می‌شود، پمپ می‌گردد. با این روش ۸۵٪ لیگنین حذف می‌شود و تقریبا از لحاظ نظری بازده تولید گلوکز در فرآینـد هیـدرولیز آنزیمی افزایش پیدا می‌کند (۴). خیسـاندن در آمونیـاک آبـدار (SAA) [5]و تیمار در دمـای ملایـم در طیـف دمـایی ۴۰ تـا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، و مدت زمان واکـنش طـولانی‌تـر، مـی‌توانـد سبب حفظ پلیمرهای گلوکان و زایلان بیش‌تـری در نمونـه‌هـا شود که متعاقباً در فرآیند قندسـازی و تخمیـر همزمـان مـورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان موثر بودن روش SSA بـه میـزان بالایی وابسته به دمای تیمار است (۳۱-۳۳). تیمارSAA هنـوز یـک روش جدیـد اسـت و میـزان اثـر آن بـرای بسـیاری از سوبستراهای لیگنوسلولزی بـا کـاربرد صـنعتی، هنـوز آزمـایش نشده است (۶). از جمله سایر مطالعات روی این روش می‌تـوان به مطالعات Kim و همکاران (۲۰۰۹)، Li و همکـاران (۲۰۱۰) و هدایت‌خواه و همکاران (۲۰۱۱) بر روی مـواد مختلفـی ماننـد کـاه بـرنج، باگـاس و علوفـه ذرت اشـاره کـرد کـه بـازده هـای گوناگونی از ۶۰ تا بـیش از ۹۰ ٪ در تجزیـه آنزیمـی را گـزارش داده‌انـد (۴۰- ۳۸). یـک روش دیگـر تیمـار قلیـایی روش AFEX[6] است که از آمونیاک بدون آب به‌جای آمونیـاک آبـدار استفاده می‌کند. مشـابه روش ARP و روش SAA، آمونیـاک مصرف شده در روش AFEX می‌تواند به علت فرار بودن بالای آن بازیابی شده و به چرخه باز گردد. بخار خروجی مخلـوطی از گاز شامل آمونیاک و بخار آب است. همه ترکیبات زیسـت‌تـوده در ماده تیمار شده جامد، باقی مـی‌مانـد. در نتیجـه هـیچ جـزء کربوهیـدراتی از دسـت نمـی‌رود. پـس از تبخیـر کـردن همـه آمونیاک، هیچ نیازی برای تنظیم pH نمی‌باشـد و مـواد تیمـار شده می‌توانند متعاقباً تحـت هیـدرولیز آنزیمـی و سـپس تخمیـر اتـانولی قـرار بگیرنـد. هیـدرولیز آنزیمـی سوبسـترا پـس از تیمـار AFEX می‌تواند سبب بازده نظـری ۹۰ ٪ در تولیـد گلـوکز و تـا ۸۰ ٪ زایلوز شود. در این واکنش هیچ ماده مهاری تولید نمـی‌شـود (۴). AFEX به عنوان یک روش موثر در تیمار کاه برنج، با اتـلاف ۳٪ قند، گزارش شـده اسـت (۴۱). ایـن روش دارای محـدودیت-هایی است که از آن جمله می‌توان به مصرف شدن آمونیـاک طـی واکنش با لیگنین و خنثی شدن آن طی واکنش با اسـتات و دیگـر بافرهای شناخته شده موجود در زیست‌تـوده اشـاره کـرد. هرچنـد مقدار زیادی از آمونیاک وارد شده به فرآینـد تیمـار قابـل بازیافـت اسـت امـا میزانـی از آمونیـاک (معـادل ۲ تـا ۵ ٪ از زیسـت‌تـوده خشک)، به صورت غیر قابـل بازگشـتی طـی ایـن فرآینـد مصـرف می‌شـود. مشـکل دیگـر قابلیـت خورنـدگی اسـت. آمونیـاک یـک خورنـده ملایـم (معتـدل) اسـت، امـا خورنـدگی آن از اسیدسولفوریک در دمـای بـالا بسـیار کـم‌تـر اسـت و در مجمـوع مشکل فنی مهمی بـرای طراحـی و اجـرای یـک فرآینـد تیمـاری ایجاد نمی‌کند(۳۳).

1 Swelling effect
2 Ammonia Recycle Percolation
3-Simultaneous Saccharification and Amonification
4- Ammonia recycling procedure
5- Soaking in aqueous amonia
6 Ammonia Fiber/Freeze Explosion/Expansion

ب- تیمار اسیدی

تیمار اسیدی مواد لیگنوسلولزی در دمای محدود سبب افزایش تجزیه پذیری بی‌هوازی آن می‌شود. تیمار اسیدی سبب محلول شدن همی‌سلولز می‌شود و به این وسیله سلولز را بهتر در دسترس آنزیم قرار می‌دهد و معمولا با اسیدهای معدنی مثل اسید کلریدریک و یا اسید سولفوریک انجام می‌شود. به دنبال تیمار با اسید رقیق، آنزیم‌های سلولازی برای هیدرولیز باقی‌مانده‌های کربوهیدرات در زیست‌توده‌های تیمار شده، مورد نیاز می‌باشند. این تیمار می‌تواند در یک مرحله ساده با غلظت مناسب از اسید سولفوریک رقیق و در یک دمای مناسب و طی یک دوره زمانی انجام شود. برای کاهش دادن میزان آنزیم مورد نیاز برای تجزیه، یک روش دو مرحله‌ای نیز در NERL در گُلدن‌کُلرادو[1] توسعه یافته است(۶، ۱۹، ۲۲، ۳۸).

ج) تیمار با عوامل اکسید کننده

این تیمار شامل اضافه کردن یک ترکیب اکسید کننده مثل هیدروژن پراکسید یا پراستیک اسید به زیست‌توده مخلوط شده با آب است. این روش همی‌سلولز و لیگنین را حذف می‌کند تا سلولز در دسترس قرار بگیرد. تیمار با پراکسید هیدروژن از لیگنین زدایی اکسیداتیو استفاده می‌کند تا لیگنین را جدا و حل نماید و سبب سست و شل شدن ماتریکس لیگنوسلولزی شود تا در نتیجه آن تجزیه پذیری آنزیمی را بهبود بخشد (۶ ، ۲۵).

تیمار با حلال‌های آلی[2]

این تیمار میزان تجزیه پذیری آنزیمی را عمدتاً به واسطه لیگنین‌زدایی، حذف همی‌سلولز و ماندن بقایای غنی از سلولز افزایش می‌دهد که این سلولز می‌تواند تا درصد بالایی با آنزیم هیدرولیز شود؛ همچنین سبب افزایش بازده نظری تولید گلوکز می‌شود. کاهش درجه کریستاله بودن سلولز با این تیمار هنوز به روشنی مشخص نیست، اما این مشخص شده که میزان تورم سلولز شدیدا وابسته به نوع حلال آلی، غلظت و دمای آن است. این تیمار از حلال‌های آلی داغ مانند اتانول با pH اسیدی برای تجزیه ترکیب زیست‌توده‌ای استفاده می‌کند. از جمله مشکلات آن‌گران‌تر بودن آن است اما جداسازی و بازیافت حلال به کار رفته می‌تواند هزینه‌های عملیاتی فرآیند را پایین آورد. حذف حلال از سلولز تیمار شده نیز معمولا لازم است، چرا که ممکن است سبب مهار فرآیند تجزیه یا تخمیر و یا تجزیه و هضم مواد حاصل از هیدرولیز شود (۶). شاید مهم‌ترین عامل مطلوب این فرآیند تیماری باقی ماندن لیگنین حذف شده تقریبا خالص باشد (مانند تیمار آمونیاکی)(۲۱).

تیمار زیستی

اکثر روش‌های تیماری زیستی بر روی لیگنین‌زدایی متمرکز شده است. این تیمار مزایای مهمی مانند مصرف کم انرژی و مواد شیمیایی را ارایه می‌کند، اما یک سیستم کنترلی و به اندازه کافی سریع برای این روش پیدا نشده است. مهم‌ترین مزایای بازتیمار[3] زیستی عبارت است از مصرف کم مواد شیمیایی و انرژی. از معایب تیمارهای شیمیایی نیاز به تجهیزات مقاوم به خوردگی، نیاز به شستن بسیار وسیع در آن و دفع مناسب زباله‌های شیمیایی است؛ در حالی‌که تیمار زیستی یک روش امن و سازگار با محیط زیست برای حذف لیگنین از مواد لیگنوسلولزی است. میکروارگانیسم‌های بسیار امید بخش در این زمینه، قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید و به‌خصوص بازیدیومایست‌ها هستند. بررسی‌هایی در این زمینه انجام شده که از گونه‌های مخمر Saccharomyces به عنوان عامل تخمیری استفاده کرده‌اند و به بازده بالایی از تولید اتانول دست پیدا کرده‌اند (۶ ، ۲۱).

تیمار مرکب

اکثر روش‌های تیماری که در حال حاضر به کار گرفته می‌شوند، ترکیبی از روش‌های ذکر شده در بالا هستند؛ به عنوان مثال ترکیب تیمار فیزیکی با تیمار آمونیاکی (۳۸، ۴۲)، ترکیب تیمار

1- Golden Colorado

۲ Organosolvent pretreatment

۳ Retreatment

فیزیکی و اسیدی(۲۲)، ترکیب تیمار آمونیاکی، حلال آلی و فیزیکی(۳۸) و بسیاری از ترکیب‌های ممکن دیگر.

تجزیه آنزیمی

هیدرولیز آنزیمی دومین مرحله در تولید اتانول از مواد لیگنوسلولزی است که شامل شکستن پلیمر سلولزی و همی سلولزی توسط آنزیم‌ها است (۶). فرآیند تیماری انجام یافته بر روی سوبسترای خام در بازده نهایی فرآیند تجزیه آنزیمی بسیار موثر است. ساختار سلولز و همی‌سلولز به اندازه‌ای پیچیده است که یک نوع آنزیم به تنهایی نمی‌تواند تجزیه مناسبی را داشته باشد؛ به همین دلیل در فرآیند تجزیه آنزیمی مواد لیگنوسلولزی از چند نوع آنزیم استفاده می‌شود که هر کدام بر سوبسترای اختصاصی خود اثرگذار است (۲۵). سه گروه عمده آنزیمی برای تجزیه کربوهیدرات‌های موجود در زیست‌توده استفاده می‌شود: سلولازها، بتاگلوکوزیدازها و زایلانازها.

همی‌سلولز پلیمری از چندین قند شامل گلوکان، زایلان، گالاکتان، مانان و آرابینان است که تا حدودی توسط آنزیم‌های سلولازی و بتاگلوکوزیدازی شکسته می‌شود، اما برای تجزیه بهتر این پلی‌ساکارید باید از آنزیم زایلاناز استفاده کرد. سلولز پلیمری خطی از گلوکز با پیوند بتا (۱،۴) است، در نتیجه به تبع محصول اصلی هیدرولیز سلولز، گلوکز است که برای انجام این هیدرولیز از آنزیم‌های سلولاز و بتاگلوکوزیداز استفاده می‌شود؛ در حالی‌که محصولات تجزیه همی‌سلولز چندین نوع قند پنتوزی و هگزوزی است. محصول اصلی تجزیه سلولز، گلوکز یا سلوبیوز و سلودکسترین‌ها است که نهایتا به گلوکز تجزیه می‌شود (۴۳). حضور همی‌سلولز یک عامل مهم برای مقاومت سلولز در برابر تجزیه است و آنزیم زایلاناز خارجی اضافه شده به عنوان مکمل، افزایش قابل توجهی در تجزیه آنزیم سوبسترای لیگنوسلولزی تیمار شده و دارای همی‌سلولز دارد، اما محصولات تجزیه‌ای همی‌سلولز خود می‌تواند اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم سلولاز داشته باشد (۲۵). میزان بالای لیگنین، دسترسی آنزیم به سوبسترا را محدود می‌کند و باعث مهار تولید محصول نهایی و کاهش سرعت و بازده هیدرولیز می‌شود. سلوبیوز و گلوکز که خود محصولات تجزیه کربوهیدرات‌ها به‌خصوص سلولز هستند، مهارگران قوی آنزیم-های سلولازی هستند (۶). به‌طور کلی عوامل زیر، عوامل محدود کننده فرآیند تجزیه آنزیمی هستند (۲۱):

* درجه کریستاله بودن سلولز: هر چه درجه کریستاله بودن و پلیمریزاسیون بیش‌تر باشد بازده کلی آنزیم را کم‌تر خواهد کرد، چرا که مرحله اول تجزیه آنزیم طولانی‌تر خواهد شد. البته به تنهایی عامل موثر نیست چرا که آنزیم‌هایی وجود دارند که حتی در درجه پلیمریزاسیون بالا بازده تجزیه‌ای مطلوبی دارند (مانند سلولازوم‌ها).

* درجه پلیمریزه بودن سلولز (تعداد باقی‌مانده‌های گلیکوزیلی به ازای هر رشته سلولز): به درجه‌ی کریستاله بودن وابسته است. حذف زایلان‌ها در کاهش آن اثر بیش‌تری دارد تا حذف لیگنین.

* منطقه سطحی در دسترس سوبسترا: از عوامل اصلی موثر بر تجزیه سوبسترا است و هدف اصلی بسیاری از تیمارها افزایش میزان آن است.

* مانع لیگنینی (مقدار و نحوه توزیع): حضور لیگنین و همی-سلولز دسترسی آنزیم به سوبسترای سلولزی را سخت می‌کند. لیگنین علاوه بر این‌که مانع فیزیکی است، می‌تواند به آنزیم متصل شده و در نتیجه سبب پیوند غیر مولد (بدون تولید محصول) آنزیم شود. امروزه تحقیقات به این سو گراییده است که نه تنها لیگنین از سوبسترای لیگنوسلولزی حذف شود، بلکه به دنبال بازیافت آن در زیست‌پالایی برای مصارف دیگر (مانند زیست سوخت) هستند.

*محتوای همی سلولزی: حذف همی سلولز سبب افزایش تخلخل و در نتیجه افزایش دسترس‌پذیری به سلولز است. همچنین بازیافت و تجزیه همی‌سلولز عامل افزایش بازده بازیافت قند و به دنبال آن افزایش بازده تولید اتانول از روش تخمیری مطلوب و میکروارگانیسم تخمیرگر مناسب است. از سوی دیگر درجه استیلاسیون همی‌سلولز فاکتور موثر دیگر است چرا که لیگنین و همی‌سلولز با گروه‌های استیل به هم متصل شده‌اند.

۱-کمپلکس‌های آنزیمی تجزیه کننده سلولز که در میکروارگانیسم-های بی‌هوازی تجزیه کننده سلولز وجود دارند مانند رومینوکوکوس‌ها یا کلستریدیوم‌ها

*اندازه اجزای سوبسترا: بر سطح در دسترس آنزیم اثر گذار است.

* تخلخل: هرچه بیش‌تر باشد قابلیت دسترسی آنزیم به سوبسترا بیش‌تر است.

تجزیه سلولز

سلولز توسط مولتی آنزیمی به نام سلولاز تجزیه می‌شود که این آنزیم‌ها به صورت سینرژیسم تجزیه سلولز را انجام می‌دهند. برای تجزیه سلولز بلورین به گلوکز به سه نوع اصلی از آنزیم‌ها نیاز است که عبارتند از :

* اندوگلوکونازها[۱] این آنزیم‌ها به طور تصادفی به زنجیره سلولز حمله برده، پیوندهای $\beta(1\rightarrow4)$ گلیکوزیدی را می‌شکنند. این آنزیم در تجزیه سلولز بلورین چندان موفق نیست. اندوگلوکاناز اولین حمله کننده به سلولز برای کاهش درجه پلیمریزه شدن آن است که با شکست درونی اتصالات سلولز در ناحیه بدون شکل (غیر بلورین) انتهاهای دیگری را که مستعد فعالیت اگزوگلوکاناز است، ایجاد می‌کند.

*اگزوگلوکونازها[۲] یا سلوبیوهیدرولازها[۳] این آنزیم‌ها واحدهای گلوکز یا سلوبیوز را (اغلب) از انتهای احیا و غیر احیای زنجیره های سلولز آزاد می‌کنند. فعالیت این آنزیم برای تجزیه سلولز بلورین ضروری است. سلوبیوز فرآورده اصلی فعالیت این آنزیم، اثر مهاری بر فعالیت سلوبیوهیدرولازی و اندوگلوکانازی دارد.

* بتاگلوکوزیدازها[۴] یا سلوبیازها[۵] این آنزیم ها سلوبیوز و سایر سلودکسترین‌های محلول در آب را به گلوکز تبدیل می‌کنند (۲۳).

در مجموع تجزیه سلولز از دو مرحله تشکیل شده است ؛ طی یک مرحله سلولز توسط یک رشته از آنزیم‌ها به سلودکسترین‌ها و سلوبیوز تبدیل می‌شود و طی مرحله دوم به کمک آنزیمی دیگر، سلوبیوز به گلوکز تبدیل می‌شود. مرحله اول مرحله کند واکنش است، درحالی که بخش دوم سریع‌تر انجام می‌شود.

تجزیه همی‌سلولز

بیش‌تر فرآیند تجزیه این ماده بر روی تجزیه زایلان متمرکز شده است که بیش‌ترین جزء تشکیل دهنده همی‌سلولز است. به دلیل فراوانی زیاد زایلان در لیگنوسلولز تبدیل اقتصادی این ماده در بعضی از فرآیندها بسیار مهم است، مثل فرآیند تولید الکل. تجزیه زایلان یک مرحله‌ی مهم در تولید اتانول از لیگنوسلولز است که سبب افزایش بازده تولید قند از لیگنوسلولز و به تبع افزایش بازده تولید محصول مورد نظر است. دو دلیل مهم دیگر در بررسی تجزیه زایلان، یکی در فناوری تهیه کاغذ است که طی تهیه خمیر کاغذ از چوب و عمل‌آوری خمیر کاغذ پسابی تولید می‌شود که دارای درصد بالایی از زایلان‌ها می‌باشد، از سوی دیگر این پساب‌ها وارد آب نهرها و رودخانه‌ها شده و سبب آلودگی آن‌ها می‌شود. موضوع دیگر آن‌که پسماندهای کشاورزی نیز دارای مقادیر قابل توجهی زایلان هستند. تجزیه زایلان نیز مانند سلولز فرآیند پیچیده‌ای است ولی نسبت به سلولز راحت‌تر است. تجزیه زیستی کامل این ماده به عملکرد هماهنگ چندین آنزیم از اندو و اگزوآنزیم‌ها نیاز دارد مانند: $\beta(1\rightarrow4)$ زایلاناز، βگزیلوزیداز، استیل زایلان استراز و غیره(۲۳).

در مرحله قندسازی از ترکیبی از بتاگلوکوزیدازها و گلوکاناز استفاده می‌شود. اثر مقادیر و ترکیبات متفاوتی از این آنزیم‌ها توسط محققان زیادی بررسی شده‌اند اما آزمایشگاه ملی انرژی آمریکا که تعداد زیادی پروتکل آزمایشگاهی در تولید انرژی ارایه داده است، مقادیر ۳۰ تا ۶۰ واحد آنزیمی (FPU) از آنزیم سلولاز (گلوکانازها) و ۱۵ تا ۳۰ واحد (CBU) از بتاگلوکوزیدازها به ازای هر گرم سوبسترا پیشنهاد داده است. در تست تجزیه آنزیمی معمولا برای جلوگیری از آلودگی محیط با رشد باکتری ها و قارچ‌ها از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند تتراسایکلین

---

۱ Endoglucanase

۲ Exoglucanase

۳ Cellobiohydrolase

۴ β-Glucosidase

۵ Cellobiase

و سیکلوهگزامید استفاده می‌شود (۱۹، ۴۴، ۴۵). البته هر چه مقدار آنزیم‌ها به ازای گرم سوبسترا اضافه شود، مقدار قند بیش‌تری آزاد می‌شود و در نتیجه به بازده‌های بالاتری از تجزیه می‌توان دست پیدا کرد؛ اما از آن‌جا که آنزیم‌ها بسیار گران قیمت هستند از لحاظ اقتصادی این عمل به صرفه نیست. در نتیجه در مقیاس تجاری پیشنهاد می‌شود که آنزیم‌ها در بیوراکتورهای جداگانه‌ای تولید شوند. برای این امر مطالعات گوناگون و میکروارگانیسم‌های متفاوت از نیچ‌های اکولوژیک متفاوت مانند دریا، دستگاه گوارش حشراتی مانند موریانه و نیز جنگل‌ها شناسایی شده‌اند که می‌توانند مقادیر مطلوبی از این آنزیم‌ها را تولید نمایند (۷، ۱۱، ۲۷، ۴۶-۴۸).

تخمیر

اجزای سلولزی مواد لیگنوسلولزی می‌توانند پس از تجزیه آنزیمی توسط میکروارگانیسم‌های تخمیر کننده مورد استفاده قرار گرفته و در شرایط مناسب، اتانول تولید نمایند. طی فرآیندهای تجزیه‌ای کربوهیدرات‌های لیگنوسلولزی، گلوکز و زایلوز به عنوان بیش‌ترین قندها تولید می‌شوند، اما قندهایی مانند مانوز، گالاکتوز و آرابینوز نیز تولید می‌شوند. از لحاظ نظری هر کیلوگرم گلوکز و زایلوز تولید شده قابلیت تولید ۵۱۰ گرم اتانول و ۴۹۰ گرم دی‌اکسید کربن را دارد (۱۹). قندهای حاصل از تجزیه آنزیمی می‌توانند طی مراحل هم‌زمان قندسازی و تخمیر(SSF[1]) به اتانول تبدیل شوند یا در دو مرحله جدای قندسازی (تجزیه‌ی آنزیمی) و تخمیر (SHF[2]). به دلیل پتانسیل هزینه‌ای کم‌تر، SSF بیش‌تر مورد توجه است (۲۲). فرآیند SSF نوعی فناوری تجزیه و تخمیر است که به علت هم‌زمان بودن قندسازی و تخمیر نسبت به مهار فرآیند مقاوم‌تر است، درحالی که در SHF تفاوت دمایی میان هیدرولیز آنزیمی و تخمیر وجود دارد. بسیاری از مقالات دمای بهینه برای تجزیه‌ی آنزیمی را در ۵۰-۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ذکر کرده‌اند، این در حالی است که میکروارگانیسم‌هایی که تولید و بازده خوبی از اتانول را دارند قادر به تحمل این دما نمی‌باشند. این مشکل می‌تواند با استفاده از میکروارگانیسم‌های تحمل کننده گرما مثل *Kluyveromyces marxianus*، *Candida lusitaniae*، *Zymomonas mobilis* یا استفاده از کشت مخلوط بعضی از میکروارگانیسم‌ها مثل *Brettanomyces clausenii* و *Saccharomyces cerevisiae* برطرف شود (۶). راه دیگر استفاده از یک مرحله پیش‌تیمار است، به عنوان مثال در ۵۰ درجهی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت که با اضافه کردن میکروارگانیسم‌ها در دمای پایین مناسب ادامه می‌یابد که به این فرآیند SSF ناهم‌دما گفته می‌شود (NSSF[3]) (۲۲).

فرآیند هیدرولیز و تخمیر مجزا

در این فرآیند عمل تجزیه آنزیمی جدای از تخمیر انجام می‌شود، در نتیجه می‌توان شرایط مناسب برای تجزیه‌ی بهینه توسط آنزیم را فراهم کرد سپس محصول تجزیه‌ای را برداشت کرده، سمیت‌زدایی کرده و در اختیار میکروارگانیسم تخمیرگر قرار داد (هر دو گروه قندهای ۵ و ۶ کربنه در یک بیوراکتور تخمیر می‌شوند). برای تخمیر می‌توان از یک میکروارگانیسم یا از چند میکروارگانیسم (کنسرسیوم) استفاده کرد. در فرآیندهایی که از کنسیرسیوم میکروارگانیسمی استفاده شده است، هدف اصلی تخمیر هر دو نوع قندهای ۶ کربنه و ۵ کربنه بوده است.

فرآیند تخمیر را می‌توان در دو مرحله انجام داد؛ در مرحله اول محصول تجزیه‌ای وارد بیوراکتور تخمیر کننده گلوکز می‌شود و پس از پایان تخمیر، اتانول از آن تقطیر می‌شود. سپس باقی‌مانده به بیوراکتور تخمیرگر زایلوز منتقل شده و در آنجا زایلوز به اتانول تبدیل شده و در نهایت اتانول تولید شده را برداشت می‌کنند. اولین مزیت SHF این است که تجزیه و تخمیر در شرایط بهینه خود انجام می‌شوند اما عیب این حالت این است که از آن‌جایی که سلولازها توسط محصول نهایی خود (سلوبیوز و گلوکز) مهار می‌شوند، در نتیجه بازده هیدرولیز سلولز به‌طور

۱ SimultaneousSaccharification and Fermentation

۲ Separated Hydrolysis and Fermentation

۳ Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation

پیش‌رونده‌ای طی تجمع گلوکز و سلوبیوز کاهش می‌یابد(۴، ۶، ۱۹).

فرآیند قند سازی و تخمیر هم‌زمان

در این فرآیند در زمانی که تجزیه آنزیمی در حال وقوع است، میکروارگانیسم‌های تخمیرگر نیز در محیط وجود دارند و با مصرف قندهای تولید شده طی فرآیند تجزیه‌ای اثر منفی محصول (گلوکز، سلوبیوز و زایلوز) بر آنزیم را رفع می‌کنند (۱۹). مشکل مهار آنزیم توسط محصول در هیدرولیز آنزیمی همان که در روش SHF نمود دارد با روش SSF برطرف شده ولی خود SSF مشکل دیگری دارد و آن این‌که در این روش سرعت واکنش تخمیر به واسطه سرعت هیدرولیز آنزیمی محدود می‌شود (۴۹). با این حال فرآیند SSF بازده بالاتری از SHF دارد. از دیگر مزایای آن می‌توان به این موارد اشاره کرد: این افزایش بازده با استفاده از دمای بهینه ۳۷ درجه سانتی‌گراد است؛ از آن‌جا که اثر مهاری محصولات تجزیه‌ای بر آنزیم‌ها به حداقل رسیده است در نتیجه بارگذاری کم‌تری از آنزیم برای این فرآیند نیاز است؛ خود این‌ها عاملی برای صرفه جویی اقتصادی است (۱۹). مزایای اصلی SSF را این‌گونه گزارش داده‌اند: افزایش نرخ تجزیه با تبدیل قندهایی که اثر مهاری برآنزیم‌ها دارند، نیازمندی به مقادیرکم‌ترآنزیم، بازده محصول بالاتر، نیازمندی کم‌تر برای شرایط استریل، زمان کم‌تر در فرآیند، احتیاج به بیوراکتورهای کم‌تر (از لحاظ حجمی، حجم نیازمندی تقریبا به نصف کاهش می‌یابد).

از آن‌جا که SSF معمول‌تر ازSHF است این روش دچار تحولات شده و در مطالعات گوناگون به دنبال افزایش کیفیت این روش بوده‌اند. در نتیجه علاوه بر روش عمومی SSF، سه روش از این روش مشتق شده‌اند:

الف- فرآیند قند سازی و تخمیر هم‌زمان ناهم دما: این روش به نوعی ترکیبی از SHF و SSF است. در این روش در مرحله اول سوبسترا به مدت ۲۴ ساعت در دمای بهینه آنزیمی در معرض آنزیم‌ها قرار می‌گیرد. پس از این مدت محیط به دمای بهینه تخمیر رسانیده می‌شود و سپس میکروارگانیسم تخمیرگر به محیط اضافه می‌گردد. از آن‌جا که ۲۴ ساعت اول مهم‌ترین زمان در تجزیه آنزیمی است، مزیت این روش این است که این مرحله ۲۴ ساعت آنزیم در شرایط بهینه خود فعالیت می‌کند، درنتیجه بازده اولیه آنزیم دریافت شده است، سپس با مصرف قندهای تولید شده توسط میکروارگانیسم تخمیرکننده آنزیم‌ها دوباره فعالیت کرده و در نتیجه مقدار بیش‌تری قند نسبت به روش SSF تولید می‌کنند (۵۰، ۵۱).

ب) SSCF[1]: در این روش تجزیه و تخمیر علاوه بر آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز از تجزیه‌کنندگان همی‌سلولز مانند زایلانازها نیز استفاده می‌شود و برای تخمیر، هم‌زمان با کمک دو میکروارگانیسم انجام می‌شود. یکی از میکروارگانیسم‌ها قندهای ۵ کربنه را مصرف نموده آن‌ها را به زیست‌سوخت مورد نظر تبدیل می‌کند؛ در مورد اتانول از سویه‌هایی مانند *Escherichia coli* KO11 و یا گونه‌های *Pichia stipitis* استفاده می‌شود. هم‌زمان با این فرآیند قندهای ۶کربنه توسط میکروارگانیسم دیگری مانند *Saccharomyces cerevisiae* تبدیل به اتانول می‌شوند. در نتیجه طی این فرآیند هم‌زمان هر دو گروه قندهای ۶ کربنه و ۵ کربنه تولیدشده در تجریه آنزیمی برای تولید اتانول مصرف می‌شوند (۱۹).

ج- فرآیند دو مرحله‌ای قند سازی و تخمیر هم‌زمان (**TPSSF**)[2]: این روش به نوعی روش تغییر یافته SSCF است. منتهی در این روش تخمیر قندهای ۵ کربنه و ۶ کربنه در دو مرحله یا فاز متفاوت انجام می‌شود. در فاز اول یک گروه از آنزیم‌های تجزیه‌کننده - سلولازها یا همی‌سلولازها- و میکروارگانیسم مطلوب آن به محیط اضافه می‌شود. پس از ۴۸ تا ۹۶ ساعت، گروه دوم آنزیمی و میکروارگانیسم تخمیرگر مطلوب اضافه می‌شود. این روش نسبت به روش SSF و

1- Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation

۲ Two Phase Simultaneous Saccharification and Fermentation

SSCF بـازده بـالاتری دارد. خـود ایـن روش مجـددا دچـار تغییراتی شد و تحت عنوان SSF آبشاری -CSSF[1]- برای تولید اتانول ارتقا داده شد. فرآینـد TPSSF یـا SSF دوفـازی توسط Li و همکاران انجام یافت که طی آن ابتدا باکتری *E. coli* دست‌ورزی شده برای تخمیر ۵ کربنـه‌هـا در محـیط تلقـیح شـده و پـس از پایـان مـدت تخمیـر (۷۲سـاعت) مخمـر ساکارومایسز که در تخمیر ۶ کربنه‌ها بسیار قدرتمنـد اسـت، بـه محیط تلقیح شد (به مدت ۷۲ ساعت). Li و همکـاران گـزارش داده‌اند کـه تولیـد در فرآینـدهای تخمیـر دوفـازی از تخمیـر بـا یک میکروارگانیسم بازده بالاتری دارد (۲۹, ۵۲).

میکروارگانیسم‌ها

برای فرآیند تخمیر اتانولی می‌تـوان از سـویه‌هـای گونـاگون مولـد اتانول[2]با ویژگی‌های متفاوت استفاده کرد، اما برای تولیـد اتـانول از قندهای ۶ کربنـه *S. cerevisiae* از بهتـرین گزینـه‌هاسـت کـه علاوه بر بازده بالای تولید، مقاومت خوبی نیز به محصول (اتـانول) و نیز مهارکننده‌ها دارد. مطالعات بسیاری بر روی ایـن مخمـر انجـام شد که مهم‌ترین اهداف آن‌ها عبارت بوده‌اند از: بهینه‌سـازی دمـای تخمیر، بهینه‌سازی شرایط اکسـیژن، بهینه‌سـازی و افـزایش بـازده تولید اتانول، بالابردن تحمل مخمر به اتانول، بالابردن تـوان تحمـل مخمر به مهارکننده‌های تخمیر مانند فورفورال. از میان بـاکتری‌هـا نیز *E. coli* دست‌ورزی شده ژنتیکـی، *Klebsiella oxytoca* و *Zymomonas mobilis* امیدوار کننده‌ترین گونه‌ها در مقیـاس-های صنعتی هستند. باکتری *Z. mobilis* به‌خاطر تولید سـریع و کارآمد اتانول و نیز ۵ ٪ بازده تولید بـالاتر نسـبت بـه سـویه هـای سنتی مولد اتانول به خوبی شـناخته شـده اسـت بـه گونـه‌ای کـه توانایی تولید اتانول بالای ۱۲ ٪ وزنی/حجمـی، معـادل ۹۷٪ بـازده نظری را داراست. البته اسـتفاده از ایـن میکروارگانیسـم مشـکلاتی دارد که مهم‌ترین آن تولید محصـولات ثانویـه فـراوان و بـا مقـادیر نسبتاً بالاتر در مقایسه با سایر سویه‌های صنعتی است. امروزه بـرای تولید مقادیر بالاتر، مصرف قنـدهای ۵ کربنـه، مقاومـت بـالاتر بـه مهارکننده‌ها و نیز غلظت اتانول، فرآیندهای مهندسی ژنتیک زیادی صورت گرفته اسـت از جملـه در NREL[3] وزارت انـرژی آمریکـا و FCRC[4]دانشگاه فلوریدا (۱۹).

میکروارگانیسم‌های مولد اتانول را می‌توان بر اساس سازگاری‌ها و نیازمندی‌های تخمیر آن‌ها نیز شرح داد از جمله طیف دمـای تخمیر، pH مورد نیاز و طیف تحمـل، اختصاصـیت (قنـد و ...)، مقاومت به اتانول، مقاومت به مهارگرهـا، تـوان تولیـد، سـرعت رشد، نیازمندی‌های اکسـیژن، بـازده تولیـد، مقاومـت اسـمزی، پایدرای ژنتیکی، محصولات ثانویه و میزان تولید آن‌ها.

اکثر میکروارگانیسـم‌هـای دسـت‌ورزی شـده ژنتیکـی مزوفیـل هستند. بسیاری از سویه‌های صنعتی نیز مزوفیل هستند. گونه-های Saccharomysces و گونه‌هـای *E. coli* دسـت‌ورزی شده بهترین رشد را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارنـد (۱۹) درحالی‌که مصرف کنندگان قندهای ۵ کربنه ماننـد گونـه‌هـای Pichia در دماهای زیر ۳۵ درجـه سـانتی‌گـراد تولیـد بهتـری دارند. وقتی که هدف استفاده از کشت همراه[5]باشد نیـز معمـولا از دماهای بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سـانتی‌گـراد اسـتفاده می‌شـود؛ امروزه بیش‌تر تخمیرهـای کشـت همـراه در دمـای ۳۰ درجـه سانتی‌گراد انجام می‌شود. از آن‌جای که pH برابر ۵، pH بهینه بـرای تخمیـر همـراه توسـط سـویه‌هـای *S. cerevisiae* و *P. stipitis* است اکثر تخمیرهای همراه را در ایـن pH انجـام مـی‌دهنـد و ایـن pH معمـولا بـا اسـتفاده از هیـدرات سـدیم، هیـدرات پتاسـیم، یـا کلریـد هیـدروژن در ۷/۵-۴/۵ کنتـرل می‌شود؛ این برای زمانی است که هر دو سویه تخمیرگر، مخمـر باشند، اما زمانی که از باکتری‌ها در کشت همراه اسـتفاده شـود معمولا pH در ۶ تا ۷ کنترل و نگه‌داری می‌شود (۵۳).

بعضی از فرآیندهای تخمیری از سویه‌هـای ترموفیـل اسـتفاده می‌کنند، باکتری *Clostridium thermocellum* از سـویه-های ترموفیل تولید کننده اتانول است که دمـای بهینـه تولیـد

۱ Cascade Simultaneous Saccharification and Fermentation
۲ Ethanologen
۳ National Renewable Resources Laboratory
۴ Florida Center for Renewable Chemicals and Fuels
۵ Co-Culture

برای این باکتری ۶۰ درجه سانتی‌گراد است (۲۳، ۲۷، ۵۳). این سویه علاوه بر قابلیت تولید اتانول قادر به تولید سلولازها نیز هست که فعالیت سلولازی مایع رویی حاصل از کشت این سویه در محیط‌های سلولزی برابر فعالیت سلولازی قارچ *Trichoderma reesei*[1] است (۲۳، ۲۷). باکتری‌ها اکثراً در طیف pH برابر ۶/۵ تا ۷/۵ تولید بهتری دارند، در حالی که قارچ‌ها و مخمرها تحمل کننده طیف pH بین ۳/۵ تا ۵ هستند و سویه‌هایی مانند ساکارومایسز در pH معادل ۵/۵ بهترین تولید را دارند (۱۹).

یکی دیگر از عوامل موثر در فرآیند تخمیر میزان اکسیژن مورد نیاز محیط است. اگر اکسیژنی در محیط نباشد، مخمر قادر به رشد و بازسازی دیواره خود نیست، در نتیجه اگر مقدار تلقیح اولیه کم باشد، میزان تولید بسیار کم خواهد بود اما اگر تلقیح به اندازه‌ای باشد که مخمر بدون رشد هم بتواند میزان تولید مناسبی داشته باشد، یا باکتری به اندازه مطلوب رشد کرده باشد، وجود یا ادامه دادن شرایط هوازی سبب مصرف قند از سازوکارهای هوازی تولید انرژی می‌شود، در نتیجه قندها وارد سازوکار تخمیر اتانولی نخواهند شد و به تبع تولید اتانولی نیز صورت نمی‌گیرد. اگر هدف مصرف قندهای ۵ کربنه باشد مشکل دوچندان می‌شود، چرا که اکثر مسیرهای جذب قندهای ۵ کربنه از محیط نیازمند مصرف اکسیژن است و از سوی دیگر در صورت وجود اکسیژن بالا اتانول تولیدی توسط سویه‌های مولد مصرف می‌شود به‌خصوص در گونه‌های Pichia، و اگر هم اکسیژن در محیط نباشد جذب قندی و در نتیجه تولید اتانول انجام نمی‌شود. لذا برای مخمرهای تولید کننده اتانول از قندهای ۵ کربنه معمولا شرایط میکروآئروفیل در نظر گرفته می‌شود که یا در بیوراکتورهای بسته با تنظیم میزان اکسیژن وارد شده به محیط این عمل انجام می‌شود و یا در بیوراکتورهای درباز مانند ارلن (پوشیده شده با پنبه) فرآیند تخمیر انجام می‌شود که در این حالت شیکر در دور پایین مورد استفاده قرار می‌گیرد (بین ۵۰ تا ۷۰ دور در دقیقه) که این حالت سبب ایجاد شرایط میکروآئروفیل برای مخمر می‌شود. در حالت دیگر می‌توان درصد حجم مورد استفاده از ظرف تخمیر را بالا برد و از همان شرایط هوادهی و شیک معمول استفاده کرد، مثلا به جای بارگذاری ۱۰۰ میلی‌لیتر در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، حجم ۱۵۰ میلی‌لیتربارگذاری محیط انجام شود که در این حالت نیز تقریبا شرایط میکروآئروفیل برای مخمر فراهم می‌شود (۵۳-۵۵).

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه زیست‌پالایی زیست‌توده لیگنوسلولزی به زیست‌سوخت‌ها به‌صورت روزافزونی مورد توجه قرار گرفته است. اتانول از جمله مهم‌ترین این زیست‌سوخت‌ها و بهترین جایگزین برای بنزین است که مورد استقبال جهانی قرار گرفته است. تولید آن از منابع زیست‌توده‌ای طی فرآیندهای تبدیل زیستی انجام می‌شود و نیازمند مراحل گوناگونی است که هم باید از لحاظ هزینه‌ای مقرون به‌صرفه باشد و هم اثرات نامطلوب زیست‌محیطی نداشته باشد. لیگنوسلولز را می‌توان طی فرآیند تجزیه آنزیمی کربوهیدرات‌ها و متعاقب آن تخمیر قندها به بیواتانول تبدیل کرد. اما لیگنوسلولز دارای ساختاری مقاوم به تجزیه است، لذا انواع روش‌های تیماری برای بالا بردن سطح دسترسی آنزیم‌ها به محتوای کربوهیدراتی سوبسترا پیشنهاد شده که هر کدام مزایا و معایب خود را دارند. انتخاب روش تیماری مناسب می‌تواند موجب افزایش بازده تولید قند و به دنبال آن افزایش تولید الکل گردد. این امر با توجه به منابع در دسترس انتخاب می‌شود که البته تیمارهای شیمیایی کاربردی‌تر از سایر تیمارها هستند و به‌خصوص اگر سیستم تیمار به گونه‌ای طراحی شود که ماده استفاده شده قابلیت بازیافت داشته باشد، هزینه تولید کاهش خواهد یافت. تیمار آمونیاکی در ایران از جمله تیمارهای کاربردی است که بازده بالا و از نظر هزینه‌ها مقرون به صرفه است. از آن‌جا که محتوای کربوهیدراتی در لیگنوسلولز ترکیبی از قندهای ۵ کربنه و ۶ کربنه است، استفاده از روش‌های تجزیه و تخمیر

۱- این قارچ در حال حاضر از مهم‌ترین تولید کنندگان آنزیم سلولاز در مقیاس‌های صنعتی است.

مقتضی برای رسیدن به حداکثر بازده ممکن ضروری است. نـوع آنزیم‌های مورد استفاده و نوع میکروارگانیسم تخمیرگر از مهم-ترین عوامل در بازده نهایی تولید اتانول، به‌خصـوص در مقیـاس تجاری است.

منابع

1. Sonnenenergie DGf, ECOFYS., 2005. Planning and Installing Bioenergy Systems: A Guide for Installers, Architects, and Engineers, 2 ed, vol. 1. Earthscan, UK
2. Campbell, CJ., Laherrère, JH., 1998. The end of cheap oil. Scientific American, Vol. 278, pp.5-6
3. Isci, A., 2008. Cellulosic ethanol production via aqueous ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation. Ph.D. 3316217. Iowa State University, United States, Iowa
4. Drapcho, CM., Nhuan, NP., Walker, TH., 2008. Biofuels. Engineering Process Technology. 1 ed. McGraw-Hill, United States. pp. 50-169
5. Kim, Y., 2007. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for ethanol production without foreign genes. Ph.D. 3299343. University of Florida, United States, Florida.
6. Binod, P., Sindhu, R., Singhania, RR., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, RK., Pandey, A., 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresource Technology, Vol. 101, pp.4767-4774
7. Demirbas, A., 2009. Biofuels securing the planet's future energy needs, 1 ed. Springer Verlag, London.
8. Goldemberg, J., 2007. Ethanol for a Sustainable Energy Future. Science, Vol. 315, pp.808-810.
9. Teymouri, F., 2003. Ammonia fiber explosion (AFEX) treatment of corn stover and effects of AFEX treatment on plant-produced heterologous cellulase. Ph.D. 3100510. Michigan State University, United States, Michigan.
10. NREL., 2006. Handbook for Handling Storing and Dispensing E85, p. 31. U.S. Department of Energy
11. Minteer, S., 2006. Alcoholic Fuels illustrated ed. CRC/Taylor & Francis, BosaRoca.
12. Nagy, M., 2009. Biofuels from lignin and novel biodiesel analysis. Ph.D. 3394437. Georgia Institute of Technology, United States, Georgia
13. Prasad, S., Singh, A., Joshi, HC., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling, Vol. 50, pp.1-39.
14. Balat, M., 2009. Political, economic and environmental impacts of biomass-based hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 34, pp.3589-3603.
15. Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 85, pp.849-860.
16. Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, AB., Kongjan, P., Angelidaki, I., 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. Bioresource Technology, Vol. 100, pp.2562-2568.
17. Nguyen, T-AD., Kim, K-R., Kim, MS., Sim, SJ., 2010. Thermophilic hydrogen fermentation from Korean rice straw by *Thermotoga neapolitana*.

International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 35, pp. 13392- 13398

18. Deng, L., Shang, L., Wen, D., Zhai, J., Dong, S., 2010. A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage. Biosens Bioelectron, Vol. 26, pp.70-73.
19. Balat, M., Balat, H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, Vol. 34, pp.551-573.
20. Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management, Vol. 52, pp.858-875.
21. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, MJ., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, Vol. 101, pp.4851-4861.
22. Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, MJ., 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with Mucor indicus, Rhizopus oryzae, and Saccharomyces cerevisiae. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 40, pp.138-144.
23. Lynd, LR., Weimer, PJ., van Zyl, WH., Pretorius, IS., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 66, pp.506-577.
24. Agbogbo, FK., Wenger, KS., 2007. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Vol. 34, pp.723-727.
25. Gupta, R., 2008. Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis. Ph.D. 3317316. Auburn University, United States, Alabama.
26. Nelson, DL., 2008. Lehninger Principles of Biochemistry. W H Freeman & Co.
27. Hedayatkhah, A., 2008. Cellulose Degradation, Microorganisms, Usage, B.Sc., Shahid Chamran University of Ahvaz-SCU, Ahvaz, Iran
28. Prescott, LM., Harley, JP., Klein, DA., 2002. Microbiology. McGraw-Hill
29. Li, X., 2010. Bioethanol production from lignocellulosic feedstock using aqueous ammonia pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation (SSF): process development and optimization. M.S. 1480111. Iowa State University, United States, Iowa
30. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005. Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42622
31. Kim, TH., Kim, JS., Sunwoo, C., Lee, YY., 2003. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. Bioresource Technology, Vol. 90, pp.39-47.
32. Kim, T., Lee, Y., 2007. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 137-140, pp.81-92.

33. Kim, TH., Gupta, R., Lee, YY., 2009. Pretreatment of biomass by aqueous ammonia for bioethanol production, pp. 79-91. In Mielenz JR (ed.), Biofuels, Methods and Protocols. Humana Press
34. Hedayatkhah, A., Motamedi, H., Varzi, HN., Ghezelbash, G., Karimi, K., Amopour Bahnamiry, M., 2012. Applying soaking in aqueous ammonia (SAA) pretreatment on sugarcane bagasse and rice straw inorder to produce bioethanol, p. 39 The 5 th Croatian Congress of Microbiology, Croatia, Croatia
35. Hedayatkhah, A., Motamedi, H., Najafzadeh, Varzi HN., Ghezelbash, G., Amopour Bahnamiry, M., Karimi, K., 2013. Improvement of hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse by soaking in aqueous ammonia and methanolic ammonia. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol.77, pp.1379-1383.
36. Kim, TH., 2004. Bioconversion of lignocellulosic material into ethanol: Pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanol fermentation. Ph.D. 3154820. Auburn University, United States, Alabama
37. Kim, TH., Lee, YY., 2005. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. Bioresource Technology, Vol. 96, pp.2007-2013.
38. Hedayatkhah, A., 2011. Biofuel ethanol production from lignocellulosic material. Master degree thesis. Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran - Ahvaz
39. Li, X., Kim, TH., Nghiem, NP., 2010. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). Bioresource Technology, Vol. 101, pp.5910-5916.
40. Kim, TH., Gupta, R, Lee, YY., 2009. Pretreatment of biomass by aqueous ammonia for bioethanol production. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) , Vol. 581, pp.79-91.
41. Zhong, C., Lau, M., Balan, V., Dale, B., Yuan, Y-J., 2009. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 84, pp.667-676.
42. Kim, T., Nghiem, N., Hicks, K., 2009. Pretreatment and fractionation of corn stover by soaking in ethanol and aqueous ammonia. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 153, pp.171-179.
43. Taherzadeh, M., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 9, pp.1621-1651.
44. Dowe, N., McMillan, J., 2001. SSF Experimental protocols lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42630
45. Selig, M., Weiss, N., Ji Y., 2008. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42629
46. Tsao, GT., 1999. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. Springer Verlag

47. Pour Ramezan, Z., Ghezelbash, GR., Romani, B., Ziaei, S., Hedayatkhah, A., 2012. Screening and identificationof newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite Microcerotermes diversus (Silvestri). Microbiology, Vol. 81, pp.736-742.
48. Ko, JK., Bak, JS., Jung, MW., Lee, HJ., Choi, I-G., Kim, TH., Kim, KH., 2009. Ethanol production from rice straw usingoptimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. Bioresource Technology, Vol. 100, pp.4374-4380.
49. Kerstetter, JD., Lyons, JK., Trade, WO., Development E, Program WCEE, Publications WSLES. 2001. Wheat straw for ethanol production in Washington: A resource, technical, and economic assessment. Washington State University, Cooperative Extension Energy Program
50. Wu, Z., Lee, Y., 1998. Non-isothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 70, pp.479-492.
51. Axelsson, J., 2011. Separate hydrolysis and fermentation of pretreated Spruce. Linköping
52. Li, X., Kim, TH., 2012. Bioconversion of corn stover derived pentoseand hexose to ethanol using cascade simultaneous saccharification and fermentation (CSSF). Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol. 35, pp.99-104.
53. Yue, G., Yu, J., Zhang, X., Tan, T., The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentratedsweet sorghum juice. Biomass and Bioenergy, Vol. 39, pp.48-52.
54. Merida Figueroa, F., 2010. Kinetics and modeling of batch bioethanol production using Suspended Co-Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* in glucose-xylose media. M.S. 1487551. University of Puerto Rico, Mayaguez (Puerto Rico), United States, Puerto Rico
55. Yu, Z., Zhang, H., 2003. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology, Vol. 90, pp.95-100.