# مشابه‌سازی فرآیند بازیافت و چرخه دوباره آنزیم سلولاز با استفاده از مدل قطعه کوچک‌شونده

کامیار موقر نژاد[*1] ، افسانه راز[1]

۱. گروه مهندسی شیمی ، دانشکدهٔ فنی ، دانشگاه مازندران، بابل ، صندوق پستی ۴۸۴

Movagharnejad@yahoo.com

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

## چکیده

**یکی از اصلی‌ترین راهکارهای کاهش هزینه فرآیند هیدرولیز آنزیمی سلولز استفاده مجدد از آنزیم‌های باقیمانده در محیط واکنش می‌باشد.. در این مقاله ضمن ارائه روش عملی برای بازیافت آنزیم‌های آزاد موجود در محیط واکنش توانایی مدل قطعه کوچک‌شونده در مورد مشابه‌سازی فرآیند بازیافت مورد بررسی قرار می‌گیرد. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد استفاده از عمل بازیافت پیشرفت قابل توجه‌ای در فرآیند هیدرولیز آنزیمی ایجاد می‌کند. در همانحال مقایسه داده‌های تجربی با پیش‌بینی‌های نظری، وجود همخوانی خوبی میان آن دو را نشان داد.**

**کلمات کلیدی** : آنزیم، بازیافت، چرخه دوباره ،هیدرولیز، سلولاز، سلولز

## مقدمه

یکی از راههای تبدیل سلولز به گلوکز هیدرولیز آنزیمی آن می‌باشد. برای کسب درصد تبدیل‌های بالا نیاز به مقدارآنزیم بالاتری نیز است که این موضوع افزایش هزینه های تولید را بهمراه دارد. بنابراین فرآوری، استخراج و استفاده بهینه از آنزیم مرحله تعیین کنندهٔ این فرآیند است. از آنجایی که در این فرآیند همیشه مقداری آنزیم در محیط عمل بلااستفاده باقی می‌ماند، روشهای بازیافت و استفادهٔ مجدد از این آنزیم باقیمانده توسط بسیاری از محققین مورد بررسی قرار گرفته است.

ساده‌ترین راه برای بازیابی آنزیمهای محلول در محیط واکنش، تماس آنها با مواد سلولزی تازه است. لیکن برای جذب آنزیمهای جذب شده روی سلولز نمی‌توان منتظر شد که واکنش بطور طبیعی کامل شود، زیرا اولا این مرحله بسیار کند است و ثانیا در مراحل پایانی اغلب، آنزیم غیر فعال تولید می‌گردد و هیدرولیز سلولز پیشرفت قابل ملاحظه‌ای نمی‌کند. بنابراین بهتر است عمل هیدرولیز را در مرحله‌ای متوقف کنیم که هنوز مقدار زیادی آنزیم فعال جذب شده بر روی ذرات سلولزی وجود دارند. جذب دوبارهٔ این آنزیمهای فعال از روی ذرات سلولزی نیمه هیدرولیز شده مشکل تر از جذب آنزیمهای آزاد است و محققان بسیاری برروی روشهایی که بتوان آسانتر وکاملتر این آنزیمهای جذب شدهٔ فعال را مورد استفادهٔ مجدد قرار داد، کار کرده‌اند. دفع آنزیم فعال از روی مواد سلولزی نیمه هیدرولیز شده مرحلهٔ اساسی تمامی این روشها است.

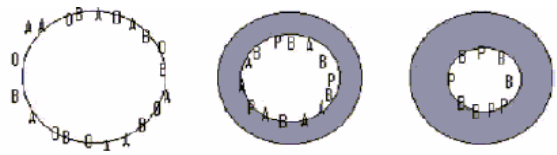
طراحی عملی فرآیند هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی طبیعی که شامل چرخه دوباره و بازیافت مواد نیز گردد، نیازمند وجود مدل ریاضی کارآمدی است که توانایی پیشبینی میزان پیشرفت این فرآیند بسیار پیچیده را داشته باشد. مدل‌های ریاضی معدودی تا کنون توانایی پیشبینی و توصیف این فرآیند پیچیده را داشته‌اند. در این تحقیق می‌خواهیم مدل قطعه کوچک‌شونده که پیش از این با موفقیت در مورد هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی خالص و طبیعی بکار رفت را در این مورد نیز بیازماییم.

## مدل قطعهٔ کوچک شونده برای هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی

تجزیهٔ آنزیمی سلولز فرآیندی بسیار پیچیده است و عوامل زیادی در آن دخیل هستند. بطور خلاصه فرآیند هیدرولیز آنزیمی سلولز نامحلول به عوامل زیادی چون اشکال ساختاری سلولز و اثر مواد غیر سلولزی همانند همی سلولز و لیگنین ، طبیعت و نوع سیستم آنزیم بکار رفته، طرز برخورد و تماس میان آنزیم سلولاز و سلولز، انتقال جرم، جذب و دفع آنزیم، سطح واکنش، اثر ممانعت محصولات و حتی اندازه ذرات سلولزی بستگی دارد که می‌بایست در مدل های سینتیکی مورد توجه قرار بگیرند و تا حد امکان نتایج تجربی با مدلهای حاصل مطابقت کند. یک گروه پژوهشی ایرانی [۱-۳] با ارائه مدل قطعه کوچک‌شونده که قابل استفاده در مورد سلولز طبیعی و ناخالص نیز هست ، نتایج شایان توجهی را بدست آورد. این مدل بر فرضیات اولیه زیر استوار می‌باشد :

۱. جذب سریع قسمتی از آنزیمهای موجود در محلول توسط سلولز و صورت نگرفتن هیچگونه واکنش قابل ملاحظه‌ای در جریان این جذب. [۴]
۲. اشغال شدن بعضی از مکان های موجود بر سطح ذرات توسط مواد غیر سلولزی.
۳. تعداد مکان های موجود بر سطح ذرات سلولزی قابل جذب توسط آنزیمهای سلولازی متناسب با سطح خارجی ذرات سلولزی است. [۵]
۴. انتقال آنزیم ها ازتوده سیال به سطح خارجی سلولز در مقایسه با واکنش شیمیایی سریع است.
۵. کاهش فعالیت آنزیمی بر اثر ممانعت مواد تولیدی در جریان واکنش.
۶. توزیع تصادفی قسمتهای سلولزی و غیر سلولزی بطور بر روی ذرات.
۷. کوچک شدن جرم سلولزی درون ذرات در طول فرآیند واکنش و بدون تغییر باقی ماندن مواد غیر سلولزی.

سینتیک هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی طبیعی در دو مرحله مورد مطالعه قرار می‌گیرد؛ در مرحلهٔ ابتدایی واکنش، آنزیم ها بسرعت بر روی مکان های خالی (اشغال نشده) موجود بر سطح خارجی مؤثر ذرات جذب می‌شوند. قطعهٔ واکنشگر کوچک می‌شود و در نتیجه تعداد مکانهای اشغال نشده کاهش می‌یابد. این موضوع تا زمانی ادامه دارد که هیچ مکان خالی دیگری موجود نباشد و همهٔ قطعهٔ واکنشگر توسط کمپلکسهای فعال و کمپلکس سلولز- آنزیم محصول پوشیده می‌شود. در مرحلهٔ دوم واکنش، بعلت کوچک شدن قطعهٔ واکنشگر، مقداری از آنزیمهای جذب شده بر روی مادهٔ اولیه، آزاد شده و به محیط واکنش بر می‌گردند و نهایتا بدون آنکه قطعهٔ واکنشگر بطور کامل هیدرولیز شده باشد، واکنش پایان می‌یابد. شکل (۱) این مدل را بصورت نموداری نشان می‌دهد:




**شکل۱- نمایش تصویری مدل قطعهٔ کوچک شونده [۳]**

رنگ سفید: قطعهٔ واکنشگر، رنگ تیره: جرم واکنش نشدهٔ غیر سلولزی

A: کمپلکس فعال، O : مکانهای خالی، B : مناطق مسدود شده، P : کمپلکس محصول

چگونگی دستیابی به معادلات ریاضی این مدل در مراجع دیگری ارائه شده‌اند و نیازی به تکرار آن در اینجا نیست [۱-۳ ] لیکن معادلات مدل معمولی که براساس فرض صفر بودن غلظت محصول هیدرولیز برپا شده‌اند، به دلیل وجود غلظت قابل ملاحظه مواد تولیدی در جریان بازیافت قابل استفاده نیستند . بر همین اساس معادلات مربوط به مدل قطعه کوچک‌شونده به گونه‌ای تصحیح شده‌اند تا اثر ممانعت‌کننده غلظت اولیه مواد

تولیدی نیز در آنها درنظر گرفته شود. جزئیات مربوط بدین مدل تصحیح شده را نیز می‌توان در مرجع دیگری ملاحظه کرد [ ۶ ] ولی نتیجه نهایی در اینجا ارائه می‌گردد.

معادله پیشرفت فرآیند بر اساس مدل قطعه کوچک شونده با درنظر گرفتن ممانعت اولیه مواد تولیدی :

مرحله اول :

$$\frac{-K_b}{K'_{eq}}t = (1-y)+\left[\frac{1}{K'_{eq}}+a(q_0-g)+P'_0\right]\ln\left[\frac{y-1+a(q_0-g)}{a(q_0-g)}\right] \qquad (۱)$$

که $\gamma$ جزء مواد غیرسلولزی در مواد سلولزی طبیعی، $P'_0$ مشخص‌کننده غلظت اولیه محصول، $\theta_0$ پارامتر مشخص کننده مقدار جذب آنزیم، $y$ مشخص کننده نسبت غلظت ماده سلولزی در هر لحظه به ماده سلولزی اولی، $t$ زمان و $K_b$ و $K'_{eq}$ پارامترهای مدل می‌باشند.

مرحله دوم:

$$-\frac{K'_{eq}}{3}(Z^3-Z_1^3)+a\frac{K'_{eq}}{2}(Z^2-z_1^2)-a^2K'_{eq}(Z-Z_1)+$$
$$\left[1+K'_{eq}(1+P'_0)-K'_{eq}(1+ag)+a^3K'_{eq}\right]I_2+aK'_{eq}(1+ag)I_1- \qquad (۲)$$
$$a^2K'_{eq}(1+ag)I_0=\frac{-K_b}{3}(t-t_1)$$

$$Z=y^{1/3} \qquad (۳)$$

که $I_1$ ، $I_2$ و $I_3$ توابع مدل می‌باشند که برحسب مقادیر سایر پارامترها محاسبه می‌شوند و جزئیات مربوط بدانها در سایر مراجع آمده است و $t_1$ زمان پایان یافتن مرحله اول می‌باشد.

## شرح آزمایشهای انجام شده

برای کلیهٔ آزمایشها از سبوس برنج بعنوان ماده اولیه استفاده شد. میزان مواد تشکیل دهنده سبوس برنج بوسیله آزمایش تعیین شدند که در جدول یک موجود است.

**جدول ۱**

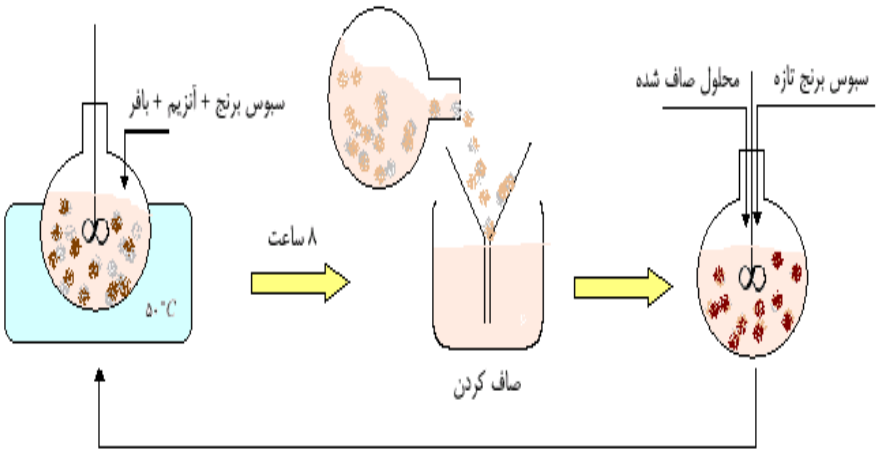
| سلولز | همی سلولز | لیگنین |
|---|---|---|
| 49.5% | 31.5% | 19% |

استفاده از این ماده به آن علت است که سبوس برنج در مقادیر زیاد در دسترس بوده، همچنین با انجام آزمایش ثابت شده است که این ماده بازدهٔ خوبی در تولید قندهای محلول داشته است. آنزیمهای مورد

استفاده عبارت بودند از Celluclast CC/85-4 و Novozyme 188 DCN 003/87-11 اهدایی شرکت NOVO دانمارک با فعالیت آنزیمی به مقدار۱۷ واحد FPU.

نمونه های سلولز در طول شب بطور کامل در دمای $90\ ^{\circ}C$ خشک می‌شدند. مقادیر مشخصی سلولز را به نیم لیتر بافر استات با PH =5 و دارای مقادیر معینی آنزیم افزوده می‌شد. دمای واکنش توسط حمام آب گرم دارای کنترل گرمایی در ۵۰ درجهٔ سانتیگراد ثابت می‌ماند. محتویات ظرف واکنش با قراردادن همزن مکانیکی که با سرعت ۵ ± ۲۱۰ دور در دقیقه حرکت می‌کرد، کاملا معلق نگاه داشته می‌شدند، در زمانهای معین (هر یکساعت) نمونه هایی به مقدار $5\ cm^3$ از ظرف واکنش برداشته می‌شد و لوله های آزمایش محتوی نمونه ها در همان لحظه به مدت ۱۵ دقیقه در ظرف آب جوش قرار می‌گرفت تا از فعالیت آنزیمی باقیمانده در نمونه ها جلوگیری شود. سلولز را بوسیلهٔ کاغذ صافی از محلول جدا کرده وسپس محلولهای حاصل را با آب مقطر رقیق کرده تا به حجم معینی برسند و میزان کل قند های احیاء شده در هر نمونه بوسیلهٔ روش استاندارد دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) اندازه گیری گردید. [۷]

در این روش کاری پس از یک دورهٔ ۸ ساعته محتویات مخلوط هیدرولیز را توسط صافی جدا کرده و جامد آن را دور ریخته و در محلول باقیمانده مقدار معینی از سلولز ریخته و مجددا مدت زمان ۸ ساعت در تحت شرایط که در بالا ذکر شد ، شکل (۲) شمای کلی آزمایش‌های بازیافت آنزیم را نمایان می‌سازد.




**شکل ۲**

مشخصات آزمایش‌ها در جدول (۲) آمده است.

**جدول ۲**

| شماره آزمایش | غلظت ماده اولیه ( گرم در لیتر) | میزان آنزیم اضافه شده به نیم لیتر محلول واکنش( سانتی متر مکعب) | |
|---|---|---|---|
| | | Novozym | Celluclast |
| ۱ | ۶۰ | ۳ | ۱۵ |
| ۲ | ۴۰ | ۳ | ۱۵ |
| ۳ | ۴۰ | ۶ | ۳۰ |

## نتیجه گیری

پارامترهای مدل قطعه کوچک‌شونده با استفاده از روش بهینه‌سازی مونت‌کارلو تعیین‌شدند . نتایج آزمایشی با پیشبینی‌های مدل نظری مورد مقایسه قرار گرفتند، در هر مورد همخوانی خوبی میان داده‌های تجربی و پیشبینی‌های مدل نظری وجود داشت. پارامترهای مدل و میانگین خطای مطلق نسبی آزمایش‌ها در جدول (۳) خلاصه‌شده‌اند.

**جدول ۳**

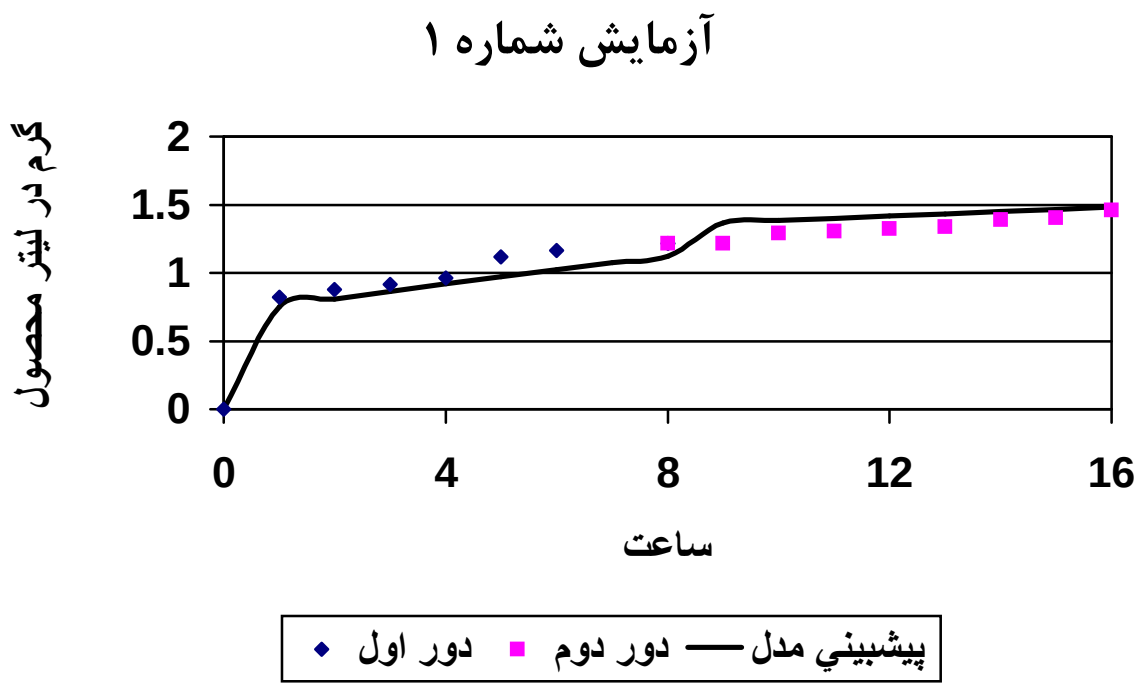
| پارامتر | تمامی آزمایش‌ها | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $\alpha$ | 0.59703 | | | | | |
| $K_b$ | 0.78911 | | | | | |
| $K_{eq}$ | 1.74711 | | | | | |
| شماره آزمایش | 1 | | 2 | | 3 | |
| میانگین خطای مطلق نسبی | 6.52% | | 5.23% | | 4.07% | |
| شماره دوره ۸ ساعته هیدرولیز | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| $\theta_0$ | 0.724 | 0.571 | 0.724 | 0.571 | 0.854 | 0.666 |

نتایج تجربی در شکل‌های ۳ الی ۵ نیز با پیشبینی‌های مدل نظری مقایسه شده‌اند. همانطوریکه در این شکل‌ها ملاحظه می‌شود، بازیافت آنزیم توسط مواد سلولزی تازه سبب پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در فرآیند هیدرولیز می‌گردد و از طرف دیگر همخوانی بسیار خوبی میان داده‌های تجربی و پیشبینی‌های نظری وجود دارد . براین اساس می‌توان موارد زیر را از این تحقیق نتیجه گرفت:

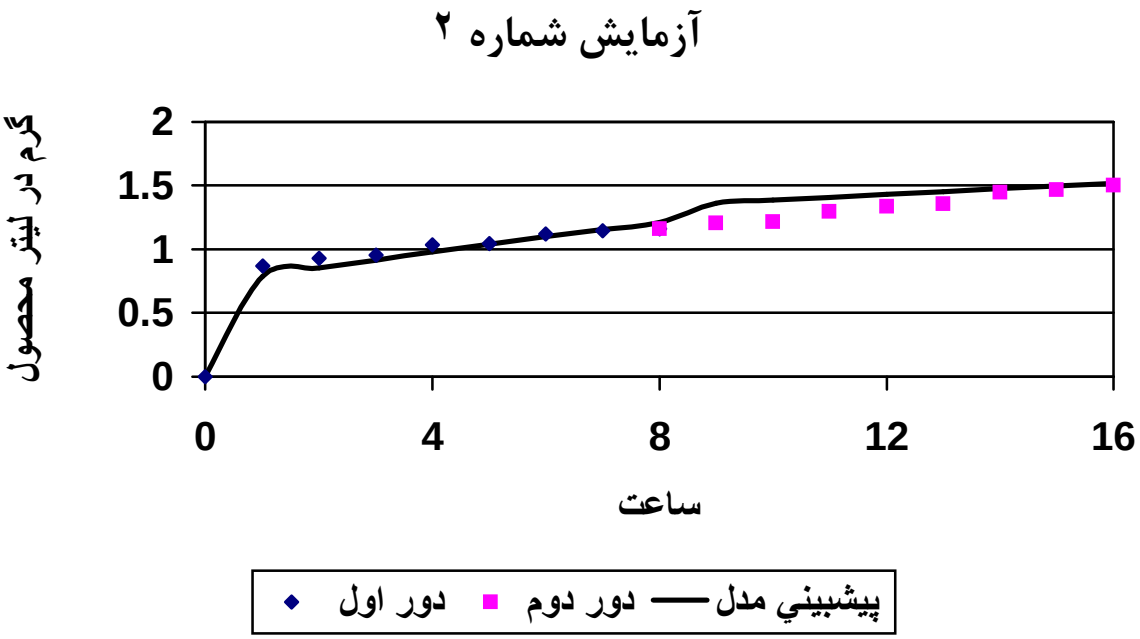
۱- مدل قطعه کوچک‌شونده اصلاح شده توانایی توصیف فرآیند چرخه دوباره و بازیافت آنزیم را دارا است .

۲- با جذب دوباره آنزیم‌های آزاد در محیط واکنش می‌توان پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در فرآیند هیدرولیز آنزیمی سبوس برنج ایجاد کرد.

۳- ممانعت مواد تولیدکننده اثر مهمی روی فرآیند بازیافت آنزیم‌ها باقی می‌گذارد.

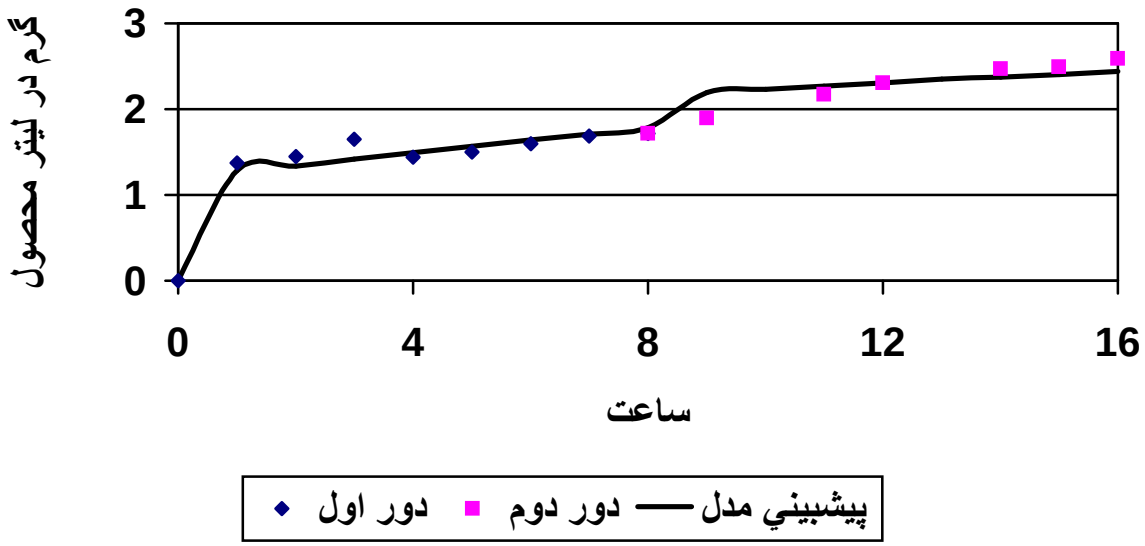

آزمایش شماره ۱
گرم در لیتر محصول
2
1.5
1
0.5
0
0
4
8
12
16
ساعت
پیشبینی مدل
دور دوم
دور اول

شکل ۳


آزمایش شماره ۲
گرم در لیتر محصول
2
1.5
1
0.5
0
0
4
8
12
16
ساعت
پیشبینی مدل
دور دوم
دور اول

شکل ۴

## آزمایش شماره ۳




شکل ۵

## مناع و مراجع

۱. موقرنژاد، کامیار، بررسی الگوی ریاضی آبکافت ( هیدرولیز) آنزیمی سلولز در محیط ناهمگن، رسالهٔ دورهٔ دکتری، دانشکدهٔ مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر.

2. Movagharnejad et. Al. " A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems" , Biochemical Engineering Journal, 4(2000), 197-206.

3. Movagharnejad, K., Sohrabi M., "A model for the rate of enzymatic hydrolysis of some cellulosic waste materials in heterogeneous solid-liquid systems" Biochemical Engineering Journal, 2003, 14, 1-8.

4. Tanaka, M., Nakamura, H., Tangiuchi, T., Morita, R., Matsuno, T, Kanikubo , Appl. Microbial Biotechnol., " Elucidations of adsorption processes of cellulases during hydrolysis" , 23,1986, 263-268.

5. Stuart, J.Y., Ristorph, D.L., " Analysis of of cellulose-cellulase adsorption data : A fundamental approach" , Biotechnol. Bioeng., 27, 1985, 1056-1059.

6.Movagharnejad, K. " Modified shrinking particle model for the rate of enzymatic hydrolysis of impure cellulosic waste materials with initial concenteration of the product" , Paper Submitted to Biochemical Engineering Journal.

7. Miller, G.L., " Use of Dinitrosalysilic Acid reagent for determination of reducing sugar", Analytical Chemistry, 31, 1959, 426-428.