

بازیافت و چرخه آنزیم در واکنش هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی طبیعی

افسانه راز^۱، کامیار موقر نژاد^{۱*}

۱- دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۳

چکیده

در این مطالعه یک راه عملی ساده برای بازیافت آنزیم‌های آزاد در محیط هیدرولیز مواد سلولزی طبیعی معرفی و بررسی شده است. آزمایش‌های انجام شده روی سبوس برنج نشان می‌دهد که می‌توان با افزودن ماده اولیه تازه مقداری از آنزیم‌های آزاد موجود در محیط واکنش را دوباره فعال ساخت. همچنین برای مقایسه نتایج تجربی با تئوری واکنش، از مدل قطعه کوچک شونده استفاده شده که همخوانی خوبی میان نتایج تجربی و پیشبینی‌های نظری وجود داشته است.

واژه‌های کلیدی: بازیافت آنزیم، هیدرولیز آنزیمی، سلولاز، سلولز

۱- مقدمه

این آنزیم باقیمانده توسط بسیاری از محققین مورد بررسی قرار گرفته است.

در این بررسی ضمن معرفی یک روش عملی ساده و کارآمد برای بازیابی آنزیم سلولزی آزاد در محیط واکنش یا انجام یک سری آزمایش به بررسی و تعیین میزان بازیابی آنزیم از درون محتویات واکنش پرداخته شده است. طراحی عملی یک فرآیند هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی طبیعی که شامل چرخه دوباره و بازیافت مواد نیز باشد، نیازمند وجود مدل ریاضی کارآمدی است که توانایی پیش‌بینی میزان پیشرفت این فرآیند بسیار پیچیده را داشته باشد. مدل‌های ریاضی معدودی تاکنون توانایی پیش‌بینی و توصیف این فرآیند پیچیده را داشته‌اند. در این تحقیق مدل قطعه کوچک‌شونده که پیش از این با موفقیت در مورد هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی خالص و طبیعی به کار رفت.

یکی از راه‌های تبدیل سلولز به گلوکز هیدرولیز آنزیمی آن می‌باشد. برای کسب درصد تبدیل‌های بالا به مقدار آنزیم بالاتری نیاز است که این موضوع افزایش هزینه‌های تولید را به همراه دارد. بنابراین فرآوری، استخراج و استفاده بهینه از آنزیم عوامل تعیین‌کننده این فرآیند است و از آنجایی که مواد اولیه این واکنش بی‌ارزش و کم هزینه هستند، استفاده بهتر از آنزیم به اقتصاد فرآیند کمک شایانی خواهد کرد.

محققان بسیاری می‌کوشند تا با ارائه روش‌ها و طراحی‌های کارآمدتر و پیچیده‌تر از هزینه‌های جاری و ثابت فرآیند تجزیه آنزیمی بکهند و آن را اقتصادی سازند. از آنجایی که در این فرآیند همیشه مقداری آنزیم در محیط عمل بلااستفاده باقی می‌ماند، روش‌های بازیافت و استفاده مجدد از

۱- نویسنده مکاتبه کننده، استادیار

Email : movagharnjad@yahoo.com

۲- مدل مبتنی بر نظریه قطعه کوچک شونده برای هیدرولیز آنزیمی سلولز طبیعی نامحلول

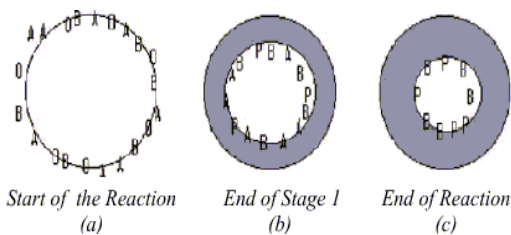
تجزیه آنزیمی سلولز فرآیندی بسیار پیچیده است و عوامل زیادی در آن دخیل هستند. به طور خلاصه سینتیک‌های هیدرولیز آنزیمی سلولز نامحلول به عوامل زیادی چون اشکال ساختاری سلولز و اثر مواد غیر سلولزی همانند همی سلولز و لیگنین، طبیعت و نوع سیستم آنزیم به کار رفته، طرز برخورد و تماس میان آنزیم سلولاز و سلولز، انتقال جرم، جذب و دفع آنزیم، سطح واکنش، اثر ممانعت محصولات و حتی اندازه ذرات سلولزی بستگی دارد که می‌بایست در مدل‌های سینتیکی مورد توجه قرار بگیرند و تا حد امکان نتایج تجربی با مدل‌های حاصل مطابقت کند. نخستین مدل‌های ارائه شده برای شبیه سازی این فرآیند هیچ گونه پایه نظری در بر نداشته و تنها نوعی معادله ریاضی بودند که براساس مشاهدات ظاهری از سرعت تجزیه سلولز برپا گشتند. در سال‌های اخیر مدل‌های ریاضی بسیار پیشرفته‌تری برای پیش‌بینی هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی مطرح شده است اما شمار اندکی از آنها قابل کاربرد برای مواد سلولزی طبیعی و ناخالص بوده‌اند. از آنجا که فرآیند چرخه دوباره و بازیافت آنزیم دارای محدودیت‌های بیشتری همانند ممانعت مواد تولیدی نیرومند اولیه می‌باشند، مدل‌های ریاضی اندکی قابلیت پیش‌بینی و مشابه‌سازی آن را دارند.

یک گروه پژوهشی [۱-۲] با ارائه مدل قطعه کوچک شونده 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 هیچ گونه واکنش قابل ملاحظه‌ای در جریان این جذب [۳]
۲. اشغال شدن بعضی از مکان‌های موجود بر سطح ذرات توسط مواد غیر سلولزی.
۳. تعداد مکان‌های موجود بر سطح ذرات سلولزی قابل جذب توسط آنزیم‌های سلولازی متناسب با سطح خارجی ذرات سلولزی است [۴]
۴. انتقال آنزیم‌ها از توده 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 بر روی ذرات.
۷. کوچک شدن جرم سلولزی درون ذرات در طول فرآیند واکنش و بدون تغییر باقی ماندن مواد غیر سلولزی.

قابل ذکر است که به دلیل کند بودن مرحله هیدرولیز کلیه مقاومت‌های انتقال جرمی ناچیز فرض شده‌همچنین در صورتی که سرعت همزن بیش از ۲۰۰ دور در دقیقه باشد، قابل صرف‌نظر کردن می‌باشند [۵-۶]. سینتیک هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی طبیعی باید در دو مرحله مورد مطالعه قرار گیرد؛ در مرحله ابتدایی واکنش، آنزیم‌ها به سرعت بر روی مکان‌های خالی (اشغال نشده) موجود بر سطح خارجی مؤثر ذرات جذب می‌شوند. قطعه 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 همه قطعه واکنش‌گر توسط کمپلکس‌های فعال و کمپلکس سلولز- آنزیم محصول پوشیده می‌شود. در مرحله دوم واکنش، به علت کوچک شدن قطعه واکنش‌گر، بعضی از آنزیم‌های جذب شده بر روی ماده اولیه، آزاد شده و به محیط واکنش بر می‌گردند و نهایتاً بدون آنکه قطعه واکنش‌گر بطور کامل هیدرولیز شده باشد، واکنش پایان می‌یابد. شکل ۱ این پدیده را نشان می‌دهد:



رنگ سفید: قطعه واکنش‌گر،

رنگ تیره: جرم واکنش نشده غیر سلولزی

A: کمپلکس فعال، O: مکان‌های خالی،

B: مناطق مسدود شده، P: کمپلکس محصول

شکل ۱- نمایش تصویری مدل قطعه کوچک شونده [۲]

قسمت (a)، شروع واکنش یعنی زمانی که هیچ کمپلکسی موجود نمی‌باشد و سطح ذره سلولزی با مکان‌های خالی و فعال

$$N_{S,eff} = \frac{N_c}{1-\gamma} \quad (۴)$$

از ترکیب دو معادله قبل داریم:

$$-\frac{dC_{s,eff}}{dt} = \left(\frac{K_a K_e}{\rho_s (1-\gamma)} \right) C_{S,eff} \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} \theta_a \quad (۵)$$

که γ جزء مواد غیر سلولزی در ذرات طبیعی واکنش نکرده می‌باشد که مقدار γ به طبیعت مواد سلولزی بستگی دارد.

تعداد مکانهای فعال موجود بر سطح خارجی قطعه کوچک شونده مؤثر که اشغال یا توسط مواد غیر سلولزی مسدود شده‌اند، برابر است با:

$$K_e V_{reactor} C_{S,eff} \left(\frac{1}{\rho_s} \right) \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} \theta_b \quad (۶)$$

که $\theta_b =$ کسر مکان‌های فعال بر سطح خارجی قطعه کوچک شونده مؤثر است که در برابر حمله آنزیم اضافی مسدود شده است. اگر فرض کنیم که سرعت تولید این آنزیم‌های مسدود شده با میزان کمپلکس‌های فعال آنزیم- سلولز متناسب باشد، خواهیم داشت:

$$\frac{d}{dt} \left(C_{s,eff} \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} \theta_b \right) = K_b \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} C_{s,eff} \theta_a \quad (۷)$$

با حل همزمان معادلات دیفرانسیل بدست آمده و ارائه مکانیزمی برای ممانعت مواد اولیه معادلات نهایی سرعت پیشرفت واکنش هیدرولیز آنزیمی بدست می‌آید که در اینجا شرح داده شده‌اند. برای مرحله اول داریم:

$$(1-y) + \left(\alpha(\theta_0 - \gamma) + \frac{1}{K'_{eq}} \right) \times \ln \left(\frac{\alpha(\theta_0 - \gamma) + y - 1}{\alpha(\theta_0 - \gamma)} \right) = \left(\frac{-K_b}{K'_{eq}} \right) t \quad (۸)$$

که $y = \frac{C_{s,eff}}{C_{s,eff0}}$ و K'_{eq} ثابت تعادل ممانعت مواد تولیدی است.

پوشیده شده است، را نشان می‌دهد. در قسمت (b)، پایان مرحله اول واکنش دیده می‌شود. تا این موقع سطح خارجی مؤثر بطور کامل توسط آنزیم‌های فعال یا مواد غیر سلولزی پر شده است و مکان خالی دیگری موجود نمی‌باشد و در قسمت (c)، پایان واکنش یعنی زمانیکه تمام سطح خارجی توسط کمپلکس‌های سلولز - آنزیم - محصول یا مواد غیر سلولزی پر شده است، مشاهده می‌شود.

کل سطح خارجی مؤثر ذرات:

$$S_{T,eff} = V_{reactor} C_{S,eff} \left(\frac{1}{\rho_s} \right) \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} \quad (۱)$$

که در آن:

$C_{s,eff}$ = غلظت ذرات سلولزی در محلول،

$V_{reactor}$ = حجم ظرف واکنش،

$\left(\frac{S}{V} \right)_{eff}$ = نسبت سطح مؤثر خارجی به حجم قطعه

واکنشگر و

ρ_s = دانسیته قطعه واکنشگر می‌باشد.

تعداد کل مکانهای فعال بر روی سطح خارجی قطعه کوچک شونده برابر است با:

$$K_e V_{reactor} C_{S,eff} \left(\frac{1}{\rho_s} \right) \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} \theta_a \quad (۲)$$

که $\theta_a =$ نسبت کمپلکس‌های فعال به تعداد کل مکانهای موجود و K_e ثابت تناسب می‌باشد.

فرض می‌شود که سرعت هیدرولیز آنزیمی مواد سلولزی متناسب با تعداد کمپلکس‌های فعال تشکیل شده بر روی سطح خارجی قطعه واکنشگر باشد، لذا:

$$-\frac{dN_c}{dt} = \left(\frac{K_a K_e}{\rho_s} \right) V_{reactor} C_{S,eff} \left(\frac{S}{V} \right)_{eff} \theta_a \quad (۳)$$

که $K_a =$ ثابت سرعت درجه اول و $N_c =$ جرم مواد سلولزی می‌باشد.

میزان نسبی سلولز در قسمت واکنش نکرده برابر است با:

برای مرحله دوم خواهیم داشت:

که $A \pm B\sqrt{-1}$ و X_s جواب‌های معادله درجه سه $Z^3 + \alpha Z^2 - (\alpha\gamma + 1) = 0$ می‌باشند.

در صورتی که $\alpha^3 > \frac{27}{4}(1 + \alpha\gamma)$ باشد، آنگاه:

$$I_0 = \frac{\ln\left(\frac{(Z_1 - X_1)}{(Z - X_1)}\right)}{3X_1^2 + 2\alpha X_1} + \frac{\ln\left(\frac{(Z_1 - X_2)}{(Z - X_2)}\right)}{3X_2^2 + 2\alpha X_2} + \frac{\ln\left(\frac{(Z_1 - X_3)}{(Z - X_3)}\right)}{3X_3^2 + 2\alpha X_3} \quad (13)$$

$$I_1 = \frac{\ln\left(\frac{(Z_1 - X_1)}{(Z - X_1)}\right)}{3X_1^2 + 2\alpha X_1} + \frac{\ln\left(\frac{(Z_1 - X_2)}{(Z - X_2)}\right)}{3X_2^2 + 2\alpha X_2} + \frac{\ln\left(\frac{(Z_1 - X_3)}{(Z - X_3)}\right)}{3X_3^2 + 2\alpha X_3} \quad (14)$$

که X_1, X_2 و X_3 جوابهای معادله درجه سه $Z^3 + \alpha Z^2 - (\alpha\gamma + 1) = 0$ می‌باشند.

۳- بازیابی و چرخه دوباره آنزیم در فرآیند هیدرولیز آنزیمی سلولز

آنزیم‌های سلولازی به سرعت به وسیله ذرات سلولزی جذب می‌شوند و سپس تا مدت زمان طولانی هیچگونه جذب یا دفع دیگری صورت نمی‌گیرد. تنها آنزیم‌هایی که در مرحله نخست جذب می‌شوند در هیدرولیز آنزیمی نقش دارند و سپس در مراحل پایانی فرآیند این آنزیم‌ها به میزان محدودی دوباره از روی ذرات سلولزی جدا شده و به محیط عمل باز می‌گردند. البته همیشه مقداری از آنزیم به صورت جذب دائمی با سلولز باقی می‌ماند و دستیابی به فعالیت آنزیمی اولیه ممکن نیست. اگر واکنش هیدرولیز آنزیمی سلولز را تا مراحل پایانی ادامه دهیم، ممکن است آنزیم بیشتری از سلولز جدا گردد و به محیط عمل وارد شود، لیکن از آنجایی که واکنش هیدرولیز آنزیمی در مراحل پایانی بسیار کند می‌شود، ادامه فرآیند تا آن مرحله ممکن است اقتصادی نباشد.

$$\left(\frac{K_b}{3}\right)(t - t_1) = K'_{eq} \left[\left(\frac{-1}{3}\right)(Z_1^3 - Z^3) + \left(\frac{\alpha}{2}\right)(Z_1^2 - Z^2) - \alpha^2(Z_1 - Z) \right] + (1 + \alpha K'_{eq}(\alpha^2 - \gamma))I_2 + \alpha K'_{eq}(1 + \alpha\gamma)I_1 - \alpha^2 K'_{eq}(1 + \alpha\gamma)I_0 \quad (9)$$

که در آن $Z = \left(\frac{C_{s, eff}}{C_{s0}}\right)^{1/3}$ می‌باشد. بنابراین:

$$Z_1 = \left(\frac{C_{s1, eff}}{C_{s0}}\right)^{1/3} = (\theta_0 - \gamma)^{1/2} \quad (10)$$

مقادیر I_0 و I_1 بسته به شرایط مسئله فرق خواهد کرد.

در صورتی که $\alpha^3 < \frac{27}{4}(1 + \alpha\gamma)$ باشد، بنابراین:

$$I_0 = \frac{1}{3X_s^2 + 2\alpha X_s} \times \left\{ \ln\left(\frac{Z_1 - X_s}{Z - X_s}\right) - \frac{1}{2} \ln\left[\frac{(Z_1 - A)^2 + B^2}{(Z - A)^2 + B^2}\right] + \frac{A - X_s}{B} \times \left[\arctg\left(\frac{Z_1 - A}{B}\right) - \arctg\left(\frac{Z - A}{B}\right) \right] \right\} \quad (11)$$

$$I_1 = \frac{1}{3X_s + 2\alpha X_s} \times \left\{ X_s \ln\left(\frac{Z_1 - X_s}{Z - X_s}\right) - \frac{1}{2} X_s \ln\left[\frac{(Z_1 - A)^2 + B^2}{(Z - A)^2 + B^2}\right] + \left(\frac{A^2 - AX_s + B^2}{B}\right) \times \left[\arctg\left(\frac{Z_1 - A}{B}\right) - \arctg\left(\frac{Z - A}{B}\right) \right] \right\} \quad (12)$$

آنزیم بوسیله مواد اولیه تازه سلولزی است [۸] که در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفته است.

۴- شرح آزمایش‌ها

برای کلیه آزمایش‌ها از سبوس برنج به عنوان ماده اولیه استفاده شد. 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 بازده خوبی در تولید قندهای محلول داشته است. آنزیم‌های مورد استفاده عبارت بودند از Celluclast CC/85-4 و Novozyme 188 و DCN 003/87-11 مربوط به شرکت NOVO دانمارک. فعالیت آنزیمی مقدار ۱۷ واحد FPU بود.

نمونه‌های سلولز در طول شب کاملاً در دمای 90°C خشک می‌شدند. مقادیر مشخصی سلولز را به نیم لیتر بافر استات با $\text{PH}=5$ و حاوی مقادیر معینی آنزیم افزوده می‌شد. دمای واکنش توسط حمام آب گرم دارای کنترل گرمایی در 50°C ثابت می‌ماند. محتویات ظرف واکنش با قراردادن همزن مکانیکی که با سرعت 210 ± 5 دور در دقیقه حرکت می‌کرد، کاملاً معلق نگاه داشته می‌شدند، در زمان‌های معین (هر یک ساعت) نمونه‌هایی به مقدار 5cm^3 از ظرف واکنش برداشته می‌شد و لوله‌های آزمایش محتوی نمونه‌ها در همان لحظه به مدت ۱۵ دقیقه در ظرف آب‌جوش قرار می‌گرفت تا از فعالیت آنزیمی باقیمانده در نمونه‌ها جلوگیری شود. سلولز را به وسیله کاغذ صافی از محلول جدا و سپس محلول‌های حاصل را با آب مقطر رقیق کرده تا به حجم معینی برسند. میزان کل قندهای احیاء شده در هر نمونه به وسیله روش استاندارد دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری می‌شد [۹]. در این روش، پس از یک دوره ۸ ساعته محتویات مخلوط هیدرولیز را توسط صافی جدا کرده و جامد آن را جدا کرده و در محلول باقیمانده مقدار معینی از سلولز ریخته و مجدداً مدت زمان ۸ ساعت در تحت شرایط که در بالا ذکر شد، بدان حرارت داده شد. پس از پایان ۸ ساعت دوم مجدداً مخلوط را صاف کردیم و در محلول باقیمانده، سلولز تازه ریختیم و دوباره ۸ ساعت زمان داده شد، یعنی یک دوره ۲۴ ساعته با ۳ مرحله ۸ ساعته. لیکن در مرحله سوم فعالیت آنزیمی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. نحوه کلی انجام آزمایش‌ها در شکل ۲ نشان

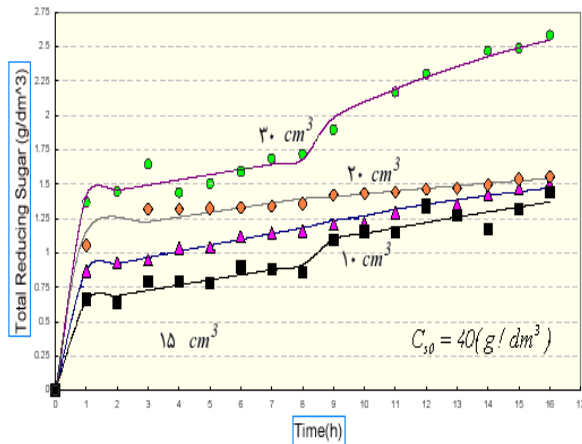
ساده‌ترین راه برای بازیابی آنزیم‌های محلول در محیط واکنش، تماس آنها با مواد سلولزی تازه است. لیکن برای جذب آنزیم‌های جذب شده روی سلولز نمی‌توان منتظر شد که واکنش به طور طبیعی کامل شود، زیرا اولاً این مرحله بسیار کند است و ثانیاً اغلب در مراحل پایانی، آنزیم غیرفعال تولید می‌گردد و همچنین بر اثر ممانعت مواد تولیدی، هیدرولیز سلولز پیشرفت قابل ملاحظه‌ای نمی‌کند [۷]. 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 دوباره این آنزیم‌های فعال از روی ذرات سلولزی نیمه هیدرولیز شده مشکل تر از جذب آنزیم‌های آزاد است و محققان بسیاری بر روی روش‌هایی که بتوان آسان تر و کامل تر این آنزیم‌های جذب شده فعال را مورد استفاده مجدد قرار داد، کار کرده‌اند. دفع آنزیم فعال از روی مواد سلولزی نیمه هیدرولیز شده مرحله اساسی تمامی این روش‌ها است.

یکی دیگر از مشکلات و مسائل مهم در فرآیند تجزیه آنزیمی سلولز که حتماً باید در نظر گرفته شود، مسئله ممانعت مواد تولیدی و اثر منفی محصولات حاصل از واکنش بر روی سرعت پیشرفت کلی فرآیند است. ممانعت مواد تولیدی که محققان بسیاری به آن اشاره کرده‌اند از جمله مواردی است که در نظر نگرفتن آن ممکن است اثر نامطلوبی روی بهینه‌سازی پارامترهای عملیاتی داشته باشد. از آنجا که ممانعت مواد تولیدی سبب کند شدن هر چه بیشتر واکنش هیدرولیز در مراحل پایانی می‌شود، دنبال کردن واکنش هیدرولیز تا حد نهایی تجزیه سلولز توجیه محکمی ندارد و عمل هیدرولیز را باید تا حدی که توجیه اقتصادی داشته باشد و به کم شدن مقدار تولید و یا زیاد شدن حجم راکتور نیانجامد، متوقف ساخت.

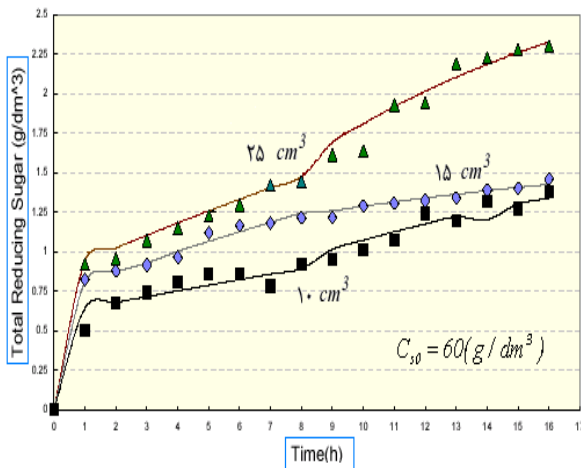
هزینه تولید و مصرف بالای آنزیم‌های سلولازی سهم اصلی را در هزینه کلی هیدرولیز مواد سلولزی طبیعی دارد. بنابراین اگر بتوان مصرف آنزیم در این فرآیند را پایین آورد، از هزینه کل فرآیند به میزان قابل ملاحظه‌ای کاسته می‌شود. یکی از راه‌های کاستن از میزان مصرفی بازیابی و استفاده دوباره از آنزیم‌های هیدرولیز کننده است. بیشترین تحقیق در این زمینه به صورت بازیابی آنزیم و وارد ساختن آنزیم بازیابی شده به چرخه واکنش از طریق جذب دوباره

خوبی جواب می‌دهد ولی پس از آن مزیت قابل توجه‌ای ندارد.

۳- انجام عمل بازیابی مجدد فعالیت آنزیمی آزاد موجود در محیط واکنش از لحاظ عملی ممکن بوده و طراحی واحدهای عملی در مقیاس صنعتی یا نیمه صنعتی با این روش ممکن می‌باشد.



شکل ۳- نتایج تجربی و پیشبینی های مدل قطعه کوچک شونده برای غلظت ۴۰ گرم در لیتر سبوس برنج (اعداد روی منحنی‌ها نشان دهنده میزان آنزیم مصرفی اولیه می‌باشند)

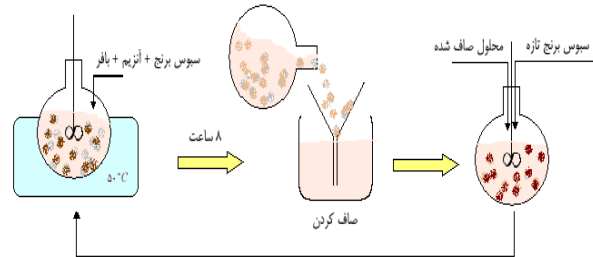


شکل ۴- نتایج تجربی و پیشبینی های مدل قطعه کوچک شونده برای غلظت ۶۰ گرم در لیتر سبوس برنج (اعداد روی منحنی‌ها نشان دهنده میزان آنزیم مصرفی اولیه می‌باشند)

مراجع

1. K. Movagharnejad, M. Sohrabi, T. Kaghazchi, F. Vahabzadeh, "A model for the

داده شده است. پس از یک دور هیدرولیز به مدت ۸ ساعت، مواد اولیه نیمه هیدرولیز شده، جدا شده و سبوس تازه برای جذب آنزیم‌های آزاد اضافه می‌گردد. سپس عمل هیدرولیز به مدت ۸ ساعت دیگر ادامه می‌یابد.



شکل ۲- نحوه کلی روش بازیافت آنزیم و انجام آزمایش‌ها

۵- نتایج

پس از انجام آزمایش‌ها، برای تعیین میزان دقت و کارایی عمل، نتایج تجربی را با مقادیر تئوری حاصل از مدل مبتنی بر قطعه کوچک شونده مقایسه می‌کنیم. این نتایج برای دو چرخه اول و دوم در شکل‌های ۳ و ۴ در دو غلظت ماده اولیه (سبوس برنج) متفاوت ۴۰ و ۶۰ گرم در لیتر و نسبت‌های آنزیمی مختلف نشان داده شده‌اند که در تمامی آنها میزان خطای میانگین نسبی میان داده‌های آزمایشی کمتر از ۵ درصد بوده است.

همچنین انجام این آزمایش‌ها نشان داد که چرخه دوباره و جذب آنزیم‌های آزاد موجود در محلول توسط مواد سلولزی تازه اثر قابل ملاحظه‌ای در پیشرفت هیدرولیز آنزیمی داشته است.

۶- نتیجه گیری

از روی این آزمایش‌ها و همخوانی خوبی که میان مدل نظری و نتایج آزمایشی بدست آمده است، می‌توان نتایج کلی زیر را مطرح نمود:

- ۱- مدل قطعه کوچک شونده توانایی شبیه‌سازی و توصیف ریاضی فرآیند چرخه دوباره مواد سلولزی را دارا می‌باشد.
- ۲- چرخه دوباره آنزیم بوسیله مواد سلولزی تازه به روشی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، تا چرخه دوم به

- rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in hetrogenous solid-liquid systems", *Biochemical Engineering J.*, Vol. 4, (2000) 197-206
2. K. Movagharnejad, M. Sohrabi, "A model for the rate of enzymatic hydrolysis of some cellulosic waste materials in hetrogeneous solid-liquid systems", *Biochemical Engineering J.*, Vol. 14, (2003)1-8.
 3. M. Tanaka, M. Nakamura, T. Taniguchi, T. Morita, R. Matsuno, R. Kamikubo, T. Kamikubo, *Appl. Microbiol. Biotech.*, "Elucidations of adsorption processes of cellulases during hydrolysis", No. 23, (1986) 263-268.
 4. J.Y. Stuart, D.L. Ristroph, *Biotechnol. Bioeng.*, "Analysis of cellulose-cellulase adsorption data", Vol. 27, (1985) 1056-1059.
 5. B.H. Van Dyke Jr., Ph.D. Dissertation, M.I.T., Cambridge, (1972).
 6. A.A. Huang, *Biotechnol. Bioeng.*, "Kinetic studies on insoluble cellulase-cellulose system", Vol. 17, (1975a) 1421-1433.
 7. L.T. Fan, Lee Y-H., "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose", *Biotechnol. Bioeng.*, 25, (1983) 939-966.
 8. L.P. Ramos, C. Breuil, J.N. Saddler, "The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases", *Enzyme Microb. Technol.*, 15, (1993) 19-25.
 9. G.L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, Vol.31, (1959) 426-428.

