

آماده انتشار

مدل سازی تلفیقی با استفاده از منطق فازی و سطح پاسخ در پیش بینی و بهینه سازی شرایط تولید بیواتانول

امید احمدی^{۱*}، رضا بیگ زاده^۲

۱ - نویسنده عهده دار مکاتبات - استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه کردستان، ایران، رایانامه:

o.ahmadi@uok.ac.ir

۲ - دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه کردستان، ایران، رایانامه: r.beigzadeh@uok.ac.ir

چکیده:

سابقه و هدف: یکی از چالش های مهم در تولید بیواتانول، بهینه سازی شرایط فرایند تخمیر است. در این زمینه، مدل سازی و پیش بینی دقیق فرایندها با استفاده از روش های مدرن، امری ضروری محسوب می شود. **شیره توت قرمز (Morus rubra, Red mulberry)** به عنوان منبع غنی قندهای طبیعی، می تواند به عنوان ماده خام برای تولید بیواتانول استفاده شود. *Saccharomyces cerevisia* به عنوان مخمر صنعتی اصلی برای تخمیر قندها و تولید بیواتانول شناخته می شود. مطالعه حاضر، پس از مرور ادبیات و پیش زمینه های مربوط، شامل مراحل تولید بیواتانول از **شیره رقیق شده توت قرمز**، بهینه سازی شرایط عملیاتی برای تولید بیواتانول با خلوص بالا، جداسازی و **خالص سازی** بیواتانول با درصد خلوص بالا، و مقایسه بین دو روش طراحی تجربی (**روش سطح پاسخ (RSM) و منطق فازی**) برای پیش بینی نتایج خروجی است. **مواد و روش ها:** مواد خام استفاده شده برای تولید بیواتانول، آبمیوه توت قرمز با ارزش بریکس برابر با ۷۸ بود که از بازارهای محلی سنندج تهیه شد، مخمر *Saccharomyces cerevisia* با کد PTCC 5269، از مؤسسه پاستور ایران تهیه و فعال سازی شد. **شیره توت قرمز** با آب مقطر تا بریکس برابر با ۱۰ رقیق شد. محلول تهیه شده با pH اسیدی ۴/۷۵ تنظیم شد (که مقدار بهینه رشد برای مخمر استفاده شده است). غلظت مخمر به مقدار ۰/۳۷۵ g/L اضافه شد و مخلوط در شیکر انکوباتور با شرایط سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و ۳۰ °C قرار گرفت. مقادیر ثابت شامل حجم تلقیح ۱۵۰ mL و حجم خوراک اولیه ۳۵۰ mL با غلظت بریکس برابر با ۱۰ بود. طراحی آزمایشی برای بهینه سازی pH، مدت زمان و دمای فرایند تولید بیواتانول به منظور **حداکثر سازی** بازده تولید بیواتانول انجام شد.

یافته‌ها: برای اعتبارسنجی متغیرهای مستقل در طراحی آزمایش، از آستانه مقدار p -value برابر با ۰/۰۵ به‌طور مشابه روش‌ها استفاده شد. برای متغیرهای مستقل (دما، مدت فرایند و pH)، اثرات خطی متغیرهای مستقل (دما، زمان و pH) بر غلظت اتانول معنی‌دار بودند؛ مقدار p برای آن‌ها به ترتیب ۰/۰۰۹، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۹ بود. مقدار R^2 مدل برابر با ۹۶/۹۳٪ بود که نشان‌دهنده برازش مناسب و توان پیش‌بینی بالای مدل است. نقطه بهینه که از طراحی آزمایشی شناسایی شد، تقریباً برابر با ۶۶ ساعت زمان فرایند در دمای ۳۰/۶۵ °C و pH برابر با ۵/۱۸ است، که با استفاده از شیر توت قرمز، بازده تولید اتانول حدود ۱۴/۸۶٪ خواهد بود. بیواتانولی که در این مطالعه تولید شد، خلوص نسبتاً پایینی داشت و بازده بهینه برابر با ۱۴/۶۲٪ بود؛ این کاهش خلوص به وجود ترکیبات معلق و نامحلول مانند اسیدها، قندها، پروتئین‌ها و فرآورده‌های جانبی نسبت داده می‌شود. جداسازی اتانول از محلول بهینه از طریق تقطیر انجام شد. پس از ۱۲ ساعت تقطیر، محصول پالایش‌شده و توسط آنالیز رفاکتومتری تجزیه و تحلیل شد و خلوص ۹۰/۳۹٪ به‌دست آمد. سپس چندین تابع عضویت (مثلی، دوزنقه‌ای، زنگ‌دیس تعمیم‌یافته، گاوسی، گاوسی ترکیبی و II شکل) برای طراحی مدل فازی ارزیابی شدند. درنهایت، مدل بهینه شامل ۳، ۳ و ۳ تابع عضویت برای سه پارامتر ورودی و ۳۶ قانون فازی انتخاب شد. مدل فازی عملکرد مناسبی داشت و میانگین خطای نسبی آن ۸/۵۱٪ بود.

نتیجه‌گیری: شیر توت قرمز پتانسیل بالایی برای تولید بیواتانول نشان داد. مخمر *Saccharomyces cerevisia* نشان‌دهنده توان مقاوم در تولید بیواتانول بود و تحلیل‌ها نشان داد که این عامل به‌طور معناداری بر بازده اتانول تأثیر می‌گذارد. ویژگی‌های محصول نهایی نشان‌دهنده محتوای اتانول مناسب با تیرگی کم و رنگ مناسب بود. فرایند تقطیر منجر به تولید بیواتانولی با خلوص بالاتر و مقدار بریکس پایین‌تر نسبت به نمونه اولیه گردید.

واژه‌های کلیدی: بیواتانول، *Saccharomyces cerevisiae*، شیر توت قرمز، بهینه‌سازی، منطق فازی، پاسخ سطح، تقطیر

۱- مقدمه

با افزایش نگرانی‌های جهانی درباره تغییرات اقلیمی و آلودگی‌های ناشی از سوخت‌های فسیلی، توجه به منابع انرژی تجدیدپذیر بیش از پیش ضرورت یافته است [۱]. بیواتانول به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و پایدارترین منابع انرژی تجدیدپذیر شناخته می‌شود. بیواتانول به‌عنوان یک سوخت زیستی در نظر گرفته‌شده که از تخمیر قندها تولید می‌شود با توجه به اینکه بیواتانول به‌صورت عمده از منابعی مانند گیاهان تولید می‌شود، افزایش تولید آن در راستای رسیدن به اهداف توسعه پایدار بسیار حیاتی است [۲]. یکی از مهم‌ترین جوانب تولید بیواتانول، بهینه‌سازی شرایط فرایند تخمیر است و در این راستا، می‌توان به مدل‌سازی و پیش‌بینی دقیق فرایندها با استفاده از روش‌های نوین اشاره کرد [۳].

شیره توت قرمز (*Morus rubra*) به‌دلیل دارا بودن قندهای طبیعی فراوان، می‌تواند به‌عنوان ماده اولیه مناسبی برای تولید بیواتانول مورد استفاده قرار گیرد. شیره توت قرمز غنی از قندهای قابل تخمیر مانند گلوکز و فروکتوز است که به‌کارگیری ماده حاضر به‌عنوان منبع قند در تولید بیواتانول نه تنها می‌تواند به بهبود بازده تخمیر کمک کند بلکه منجر به کاهش هزینه‌های تولید نیز خواهد

شد [۴]. همچنین استفاده از منابع محلی مانند توت قرمز می‌تواند به توسعه پایدار و کاهش وابستگی به منابع قندی از دیگر گیاهان کمک کند [۵].

مخمر *Saccharomyces cerevisia*^۱ یکی از میکروارگانیسم‌های اصلی و مؤثر در فرآیند تخمیر قندها و تولید بیواتانول است [۶]. این مخمر به دلیل توانایی بالا در تحمل شرایط سخت و تبدیل منابع قندی به الکل، به‌ویژه در فرآیندهای صنعتی بسیار موردتوجه قرار گرفته است. *Saccharomyces cerevisia* می‌تواند به‌خوبی در محیط‌های مختلف رشد کند و در دماها و pH های متفاوتی عمل کند، که این ویژگی‌ها آن را برای کاربردهای صنعتی به یک کاندیدای ایده‌آل تبدیل می‌کند [۷].

با توجه به شرایط خاص تخمیر، بهینه‌سازی پارامترهایی چون دما، pH، زمان تخمیر، غلظت مخمر و غلظت شیر توت قرمز می‌تواند تأثیر بسزایی بر عملکرد و بازده تولید بیواتانول داشته باشد. به‌عنوان مثال، دما یکی از متغیرهای مهم است که می‌تواند حداکثر فعالیت مخمر و در نتیجه میزان و غلظت تولید بیواتانول را تحت تأثیر قرار دهد [۸]. در شرایطی که دما پایین باشد، فرآیند تخمیر به‌کندی پیش می‌رود و در شرایط با دماهای بالا، ممکن است فعالیت مخمر کاهش یابد و حتی موجب از بین رفتن آن شود. بنابراین، شناخت دمای بهینه برای فرآیند تخمیر با توجه به نوع مخمر و منبع قند، از اهمیت بالایی برخوردار است [۹]. مقدار pH نیز از عوامل کلیدی و تعیین‌کننده در کارایی فرآیند تخمیر است. مقدار pH مناسب می‌تواند به حفظ فعالیت آنزیم‌ها و جلوگیری از تولید مواد سمی کمک کند. از دیگر عوامل مهم در فرآیند تولید بیواتانول، زمان تخمیر است. زمان تخمیر نامناسب می‌تواند به عدم دستیابی به حداکثر تولید الکل منجر شود. برای تعیین زمان بهینه تخمیر، انجام آزمایش‌های دقیق و تحلیل‌های آماری ضروری است. همچنین، غلظت مخمر و غلظت شیر توت قرمز نیز می‌توانند اثرات قابل‌توجهی بر روی نرخ تخمیر و بازده تولید بیواتانول داشته باشند. انتخاب مقدار بهینه‌ای از این دو متغیر می‌تواند به افزایش کارایی فرآیند کمک کند [۱۰].

منطق فازی به‌عنوان یکی از روش‌های کاربردی در حوزه هوش مصنوعی، توانایی بالایی در مدل‌سازی و پیش‌بینی سیستم‌های پیچیده دارد. در این روش، مجموعه‌های فازی با مرزهای مشخص تعریف می‌شوند که امکان عضویت جزئی عناصر را فراهم می‌کنند. تابع عضویت، سیگنال‌های ورودی را به مقادیر عضویت بین ۰ و ۱ تبدیل می‌کند. دو نوع اصلی سیستم استنتاج فازی، شامل مدل‌های سوگنو و ممدانی به‌طور گسترده در کاربردهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند.

دستیابی به شرایط بهینه تولید بیواتانول مستلزم بررسی جامع اثر متغیرهای فرایندی بر واکنش تخمیر است. به‌کارگیری روش‌های مختلف مدل‌سازی و شبیه‌سازی می‌تواند به فهم بهتر روابط بین این متغیرها و پیدا کردن شرایط بهینه کمک نماید. از آنجاکه متغیرهای فرایندی اغلب دارای اثرات متقابل و غیرخطی هستند، استفاده از روش‌های پیشرفته مدل‌سازی برای تحلیل داده‌ها ضروری است [۱۱]. در پژوهش حاضر، به بررسی و مقایسه دو روش مدل‌سازی شامل منطق فازی و پاسخ سطح، در پیش‌بینی بهینه‌سازی شرایط تولید بیواتانول با استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisia* و شیر توت قرمز پرداخته شده است. این دو روش، به‌عنوان رویکردهای متنوع در مدل‌سازی سیستم‌های غیرخطی و پیچیده، می‌توانند با بررسی و تحلیل داده‌ها، بهترین شرایط برای تولید بیواتانول را شناسایی نمود. استفاده از منطق فازی، به‌عنوان یک رویکرد غیرخطی و انعطاف‌پذیر، می‌تواند عدم

¹ *Saccharomyces cerevisiae*

قطعیت‌ها و ابهامات موجود در داده‌های تجربی را مدیریت نمود. این روش، به‌ویژه در شرایطی که اطلاعات دقیق و کامل در دسترس نیست، بسیار کارآمد و مفید است [۱۲]. از سوی دیگر، روش پاسخ سطح نیز قابلیت بررسی و تحلیل تأثیرات متقابل متغیرهای مختلف بر روی فرآیند تولید بیواتانول را دارد و می‌تواند در شناسایی نقاط بهینه برای تولید بیشتر و باکیفیت‌تر مفید عمل نماید [۱۳، ۱۴].

تحقیق حاضر پس از مطالعه منابع مشابه و پیشینه تحقیق شامل: تولید بیواتانول با استفاده از شیرۀ رقیق‌شده توت قرمز، بهینه‌سازی شرایط عملیاتی تولید بیواتانول با درصد بالا، جداسازی بیواتانول از محلول نهایی و خالص‌سازی آن با درصد خلوص بالا و مقایسه دو روش طراحی آزمایش پاسخ سطح و منطق فازی در جهت پیش‌بینی نتایج خروجی انجام شد. نوآوری این پژوهش در استفاده ترکیبی از شیرۀ رقیق‌شده توت قرمز به‌عنوان یک ماده اولیه کم‌هزینه و قابل‌دسترس است. مطالعه می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای توسعه فرآیندهای پایدار و اقتصادی در تولید سوخت‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

در تحقیق حاضر جهت تولید بیواتانول ماده اولیه مورد استفاده شیرۀ توت قرمز با بریکس ۷۸ بوده که از بازارهای محلی سنجیدگی تهیه گردید. مخمر مورد استفاده *Saccharomyces cerevisia* PTCC 5269 از انستیتو پاستور ایران تهیه و فعال‌سازی گردید. آب دوبار مقطر و دیونیزه محصول شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان خریداری گردید. جهت تنظیم میزان pH شرایط تخمیر از اسید فسفریک (H_3PO_4)، اسید استیک (CH_3COOH) و باز سدیم هیدروکسید (NaOH) خریداری‌شده از شرکت مرک آلمان استفاده گردید. از کودهای اوره و فسفات تهیه‌شده از شرکت بازرگان کالا ایران استفاده گردید.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۲- آماده‌سازی مایه تلقیح

با توجه به اینکه شیرۀ توت قرمز مورد استفاده غلظت و بریکس بالایی داشته، فرآیند رقیق‌سازی با آب مقطر انجام‌گرفته و مقدار آن به درجه بریکس ۱۰ رسانیده شد، به نمونه رقیق‌شده به‌طور جداگانه ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب کودهای اوره و فسفات اضافه گردید و محلول تهیه‌شده در pH اسیدی ۴/۷۵ (مقدار بهینه رشد مخمر مورد استفاده) آماده شد. مقدار ۰/۳۷۵ گرم بر لیتر مخمر *Saccharomyces cerevisia* اضافه گردیده و در انکوباتور همزن دار با سرعت همزدن ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۲-۲-۲- تولید بیواتانول و طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ

در تولید بیواتانول از شیرۀ توت قرمز به‌عنوان ماده اولیه، پارامترهای ثابت تولید شامل حجم مایه تلقیح ۱۵۰ میلی‌لیتر، حجم و غلظت خوراک اولیه ۳۵۰ میلی‌لیتر با غلظت و درجه بریکس ۱۰ و متغیرهای موردنظر در طراحی آزمایش سه متغیر به‌طورکلی که

دو متغیر عملیاتی دما و زمان که دمای فرآیند (محدوده ۲۵ الی ۳۵ درجه سانتی گراد) و زمان فرآیند تولید بیواتانول (محدوده ۲۴ الی ۹۶ ساعت)، و یک متغیر شدتی pH (محدوده ۳ الی ۷) در نظر گرفته شد که در کل تعداد ۲۰ آزمایش انجام گرفت که در هر ظرف به میزان یکسانی مایه تلقیح و شیر توت قرمز رقیق شده مطابق مقادیر بیان شده اضافه گردید. جهت تعیین خصوصیات نهایی بیواتانول تولید شده، بررسی اثر pH، دما و زمان فرآیند بر روی تولید بیواتانول مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند. برای سه متغیر (میزان pH، دما و زمان فرآیند تولید بیواتانول) تعداد آزمایش ها جهت بهینه سازی با این روش ۲۰ آزمایش بود که نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شده ۶ بار تکرار شد و برای طراحی آزمایش از سیستم غیرکد استفاده شد. مزیت ۶ بار تکرار آزمایش نقطه مرکزی، جهت تکرارپذیر بودن و دست یافتن به نتیجه قطعی در آزمایش می باشد. برای طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ از روش طرح مرکب مرکزی^۲ (CCD) استفاده شد. معادله کلی که در آن Y پاسخ یا خروجی همان متغیرهای وابسته (درصد تولید بیواتانول) به صورت رابطه (۱) می باشد و مقادیر X مربوط به متغیرهای مستقل (X₁: دمای فرآیند و X₂: زمان فرآیند و X₃: میزان pH) می باشد.

رابطه (۱)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

در رابطه (۱)، ضریب β_0 ضریب ثابت، ضرایب β_1 ، β_2 و β_3 اثرات خطی (درجه اول)، β_{11} ، β_{22} و β_{33} اثرات مربعی (درجه دوم) و در انتها β_{12} ، β_{13} و β_{23} اثرات متقابل یا برهمکنش دما و زمان، دما و pH و زمان و pH انتخاب شده می باشد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از روش آنالیز واریانس^۳ (ANOVA) و از روش آماری متداول t-test جهت مقایسه داده ها استفاده گردید. در این مدل $P < 0.05$ به عنوان مقادیر آماری معنی دار در نظر گرفته می شود و جملاتی که دارای $P > 0.05$ باشند به عنوان نتایج بی معنی و غیر اثرگذار تلقی شدند. مقدار R^2 برای ارزیابی مناسب بودن یک مدل در نظر گرفته شد.

۲-۲-۳- اندازه گیری درصد الکل تولید شده

جهت ارزیابی و اندازه گیری میزان غلظت بیواتانول تولید شده از دستگاه هیدرومتر (رفراکتومتر الکل سنج) استفاده گردید که جهت انجام اندازه گیری میزان غلظت بیواتانول با استفاده از روش بکار برده شده توسط شقاقی مقدم و همکاران استفاده گردید [۱۵].

۲-۲-۴- اندازه گیری میزان رنگ

² Central Composite Design

³ Analysis of Variance

پس از تولید بیواتانول با شرایط بیان‌شده، اندازه‌گیری رنگ توسط آنالیز UV-Vis با استفاده از روش ICUMSA^۴ در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر توسط رابطه (۲) مطابق با پژوهش احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۸ و هاشمی لر و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام گرفت [۱۶، ۱۷].

$$ICUMSA = \left(\frac{A}{bC}\right) \times 1000 \quad \text{رابطه (۲)}$$

که در رابطه بیان‌شده پارامترهای A، b و C به ترتیب مربوط میزان جذب در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر با واحد جذب (a.u.)، ضخامت محفظه دستگاه آنالیز UV-Vis (ضخامت سل)، غلظت اولیه نمونه می‌باشد.

۲-۲-۵- جداسازی و خالص‌سازی الکل

پس از تولید بیواتانول به‌وسیله فرآیند تخمیر با حالت بی‌هوازی، نیاز به جداسازی الکل و خالص‌سازی نهایی آن می‌باشد. به همین خاطر با استفاده از فرآیند تقطیر، الکل تولیدشده جداسازی گردیده و با استفاده از دستگاه رفراکتومتر و محاسبه ضریب شکست، به اندازه‌گیری درصد الکل موجود پرداخته شد.

۲-۳- آنالیز بیواتانول

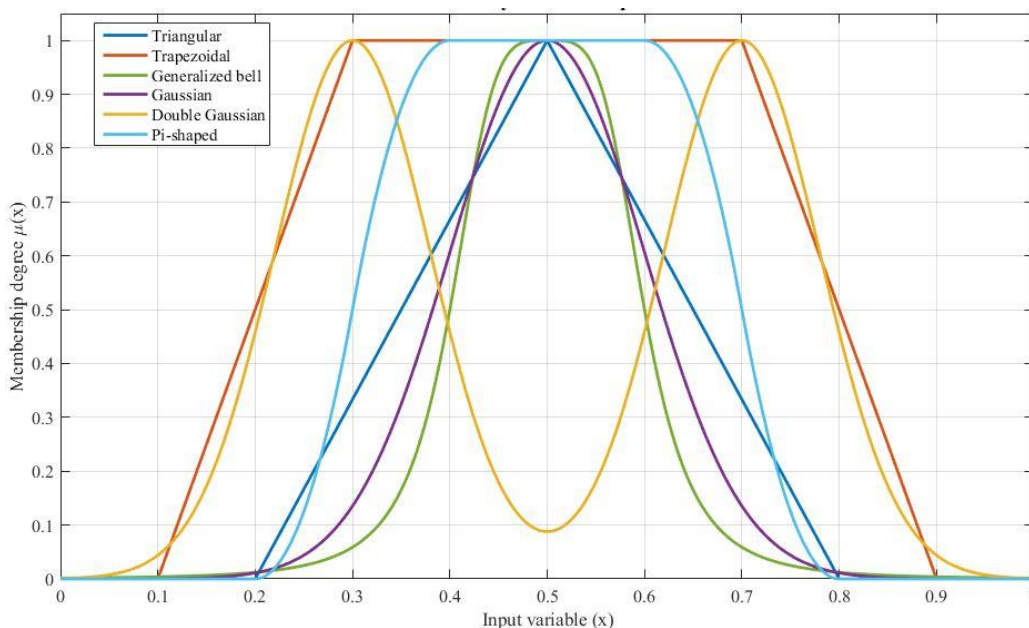
میزان جذب نمونه نهایی بیواتانول تولید شده حاصل از بهینه‌سازی با روش طیف‌سنجی نور مرئی-فرابنفش UV-Vis^۵ با دستگاه (UV-Vis T80+ شرکت PG) در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر جهت ارزیابی رنگ انجام گردید. جهت تعیین و تنظیم pH از دستگاه pH متر مدل Metrohm 827 سوئیس و جهت بررسی بریکس نمونه نهایی از دستگاه رفراکتومتر مدل Atago ژاپن استفاده گردید.

۲-۴- مدل‌سازی منطق فازی

با استفاده از نرم‌افزار MATLAB، یک مدل فازی برای پیش‌بینی غلظت بیواتانول تولیدی در سیستم مورد مطالعه توسعه داده شد. پارامترهای ورودی شامل دما، زمان فرآیند و pH بودند. در این مطالعه، انواع توابع عضویت شامل مثلثی، دوزنقه‌ای، زنگدیس تعمیم‌یافته، گاوسی، ترکیبی و II شکل مورد بررسی قرار گرفتند [۱۸]. نمودار توابع عضویت مورد استفاده در شکل ۱ برای درک و مقایسه بهتر نمایش داده شده است.

⁴ International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis

⁵ Ultraviolet-visible



شکل ۱ - شکل توابع عضویت مورد استفاده در این مطالعه شامل مثلثی، ذوزنقه‌ای، زنگ‌دیس تعمیم‌یافته، گاوسی، گاوسی ترکیبی و II-شکل.

Figure 1- Shapes of the membership functions used in this study, including triangular, trapezoidal, generalized bell, Gaussian, double Gaussian, and Pi-shaped types.

در این پژوهش، از سیستم استنتاج فازی سوگنو به‌عنوان چارچوب اصلی برای مدل‌سازی و پیش‌بینی استفاده شده است. در این سیستم، قوانین استنتاج به‌گونه‌ای طراحی می‌شوند که بر اساس شرایط ورودی، خروجی مناسب را تولید کنند. به‌طور خاص، هر قانون به این شکل تعریف می‌شود که اگر ورودی‌های x و y به ترتیب متعلق به مجموعه‌های فازی A و B باشند، آنگاه خروجی F به‌صورت ترکیبی خطی از این ورودی‌ها محاسبه می‌شود. در این سیستم، پارامترهای خطی در طول فرایند آموزش بهینه می‌شوند تا بهترین تطابق با داده‌ها را ایجاد کنند.

در ساختار منطق فازی، دو دسته پارامتر اصلی و ثانویه وجود دارد. پارامترهای اصلی به توابع عضویت ورودی‌ها مرتبط هستند، درحالی‌که پارامترهای ثانویه ضرایب معادلات را توصیف می‌کنند. بهینه‌سازی این پارامترها در دو مرحله انجام می‌شود: ابتدا پارامترهای ثانویه با روش حداقل مربعات محاسبه می‌شوند و سپس پارامترهای اصلی با استفاده از الگوریتم نزول گرادینت به‌روزرسانی می‌شوند. این ترکیب از روش‌ها به‌عنوان فرایند یادگیری ترکیبی شناخته می‌شود. پس از رسیدن به مقدار مطلوب تابع خطا، فرایند آموزش متوقف شده و مدل فازی نهایی حاصل می‌شود. در نهایت، مرحله غیرفازی‌سازی انجام می‌گیرد که در آن مجموعه‌های فازی به مقادیر منفرد تبدیل می‌شوند. در این پژوهش، با توجه به استفاده از مدل فازی نوع سوگنو، فرایند غیرفازی‌سازی بر اساس روش میانگین وزن‌دار (Weighted Average) انجام گرفته است [۱۹].

برای انتخاب بهترین تابع عضویت و تعداد قوانین، از روش آزمون و خطا استفاده شد. همچنین، فرایند یادگیری ترکیبی که شامل روش‌های نزول گرادینت و حداقل مربعات است، برای بهینه‌سازی پارامترها به کار گرفته شد [۲۰]. برای ارزیابی دقت مدل، از

شاخص میانگین درصد خطای مطلق (Mean Absolute Percentage Error, MAPE) استفاده شد که بیانگر میانگین قدر مطلق اختلاف نسبی بین مقادیر پیش‌بینی‌شده و مقادیر واقعی است. مقدار کمتر این شاخص نشان‌دهنده دقت بالاتر مدل در پیش‌بینی داده‌ها می‌باشد [۲۱].

$$MAPE = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{\hat{y}_i - y_i}{y_i} \right|$$

رابطه

که در آن $\hat{y}_i$ مقدار پیش‌بینی‌شده، y_i مقدار واقعی و n تعداد کل داده‌ها است.

علاوه بر MAPE، دو شاخص خطای دیگر برای ارزیابی مدل محاسبه شد. RMSE میانگین مربعات خطاها را نشان می‌دهد و با فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}$$

رابطه

MAE میانگین قدر مطلق خطاها است و از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$MAE = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n |\hat{y}_i - y_i|$$

رابطه

برای تعیین تعداد بهینه قوانین و انتخاب مناسب‌ترین توابع عضویت، از روش آزمون و خطا استفاده شد. دقت مدل‌های توسعه‌یافته با استفاده از معیار انحراف استاندارد ارزیابی گردید. در این راستا، از ۱۵ داده تجربی موجود، ۳ داده به صورت تصادفی به عنوان داده‌های آزمایشی (اعتبارسنجی) انتخاب شدند که در فرآیند آموزش مدل استفاده نشدند. این داده‌ها صرفاً برای ارزیابی اعتبار مدل به کار رفتند.

۳- بحث و نتایج

در پژوهش حاضر هدف اصلی، بهینه‌سازی شرایط عملیاتی تولید بیواتانول از شیر توت قرمز بوده که پس از بدست آوردن نقطه بهینه، خواص بیواتانول تولیدشده مورد ارزیابی قرار گرفت، در بخش‌های زیر نتایج حاصل از طراحی آزمایش، پاسخ‌های مربوط به هر کدام، تأثیرگذاری متغیرهای انتخاب‌شده گزارش شده است. پس از بهینه‌سازی انجام‌گرفته میزان رنگ و کدورت، درصد تولید الکلی و بریکس مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳-۱- مدل پاسخ سطح

با توجه به در نظر گرفتن سه متغیر مستقل در طراحی آزمایش بر اساس طرح مرکب مرکزی و پاسخ سطح که شامل pH محلول اولیه، دما و زمان فرآیند، ۲۰ آزمایش انجام گرفته به همراه نتایج آن به صورت عملی و مقایسه آن با نتایج بدست آمده از مدل پیش‌بینی شده در جدول ۱ گزارش شده است. در ادامه اثر هر کدام از متغیرهای مستقل در نظر گرفته شده بر روی متغیر وابسته درصد الکل تولید شده می‌باشد، به طور کامل شرح داده خواهد شد.

جدول ۱- نتایج مربوط به هر کدام از متغیرهای مستقل به همراه نتایج پیش‌بینی شده توسط مدل

Table 1- The results for each of the independent variables along with the results predicted by the model

متغیرهای وابسته		متغیرهای مستقل			
Dependent variables		Independent variables			
غلظت بیواتانول (%)		pH	زمان فرآیند (ساعت)	دمای فرآیند (درجه سانتی‌گراد)	
Bioethanol concentration			Process time	Process temperature	
مدل	آزمایشگاهی				
Model	Experimental				
14.54	15	5	60	30	1
6.81	8	5	60	25	2
9.90	11	5	96	30	3
3.81	4	3	60	30	4
14.54	15	5	60	30	5
5.24	5	3.75	38	33	6
6.70	8	7	60	30	7
5.62	6	5	24	30	8
6.07	6	3.75	81	27	9
7.79	7	6.25	81	27	10
10.01	9	6.25	81	33	11
14.54	14	5	60	30	12
5.24	5	6.25	38	27	13
14.54	14	5	60	30	14
4.02	4	3.75	38	27	15
7.79	7	3.75	81	33	16
14.54	15	5	60	30	17
6.96	6	6.25	38	33	18
14.54	14	5	60	30	19
9.70	11	5	60	35	20

جهت اعتبارسنجی متغیرهای مستقل در نظر گرفته شده مورد استفاده در طراحی آزمایش از اصطلاح p-value استفاده خواهد شد که مطابق با توضیحات ارائه شده در بخش طراحی آزمایش، این مقدار ۰/۰۵ در نظر گرفته شده که نتایج نشان داده شده در جدول ۲ نشان می‌دهد، برای متغیرهای مستقل (دما و زمان فرآیند و pH) در نظر گرفته شده اثرات درجه اول برای متغیر وابسته درصد بیواتانول تولید شده معنی‌دار بود. نتایج حاضر نشان می‌دهد متغیرهای در نظر گرفته شده به درستی انتخاب شده‌اند، اثرات درجه دوم برای متغیر وابسته غلظت بیواتانول تولید شده برای تمامی متغیرها معنی‌دار بود. اثرات متقابل با مقدار p-value برابر با ۰/۷۲۶ و برای تمامی متغیرهای مستقل معنی‌دار نبود.

جدول ۲- مقادیر p-value مربوط به تولید بیواتانول (اثرات خطی، درجه دوم و برهم کنش)

Table 2- p-values related to bioethanol production (linear, quadratic, and interaction effects)

غلظت بیواتانول (%)		ضرایب
Bioethanol concentration		
Y	متغیرهای مستقل	اثرات
p-value	Independent variables	Effects
0.009	دما (X_1)	اثرات درجه اول (خطی) First-order (linear) effects
0.001	زمان (X_2)	
0.009	pH (X_3)	
0.000	X_1^2	اثرات درجه دوم Second-order effects
0.000	X_2^2	
0.000	X_3^2	
0.726	X_1X_2	اثرات متقابل (برهمکنش) Interaction effects
0.726	X_1X_3	
0.726	X_2X_3	

یکی از اهداف کلی در انجام گرفته، بدست کلی جهت ارتباط نظر گرفته شده متغیر

متغیرهای مستقل در نظر گرفته می باشد. که تحت ثوابت معادله کلی درجه دوم بدست خواهد آمد که نتایج آن در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۳- ضرایب چندجمله ای درجه دوم همراه با ضرایب برازشی برای هر متغیر وابسته در تولید بیواتانول

Table 3- Quadratic polynomial coefficients along with fitting coefficients for each dependent variable in bioethanol production

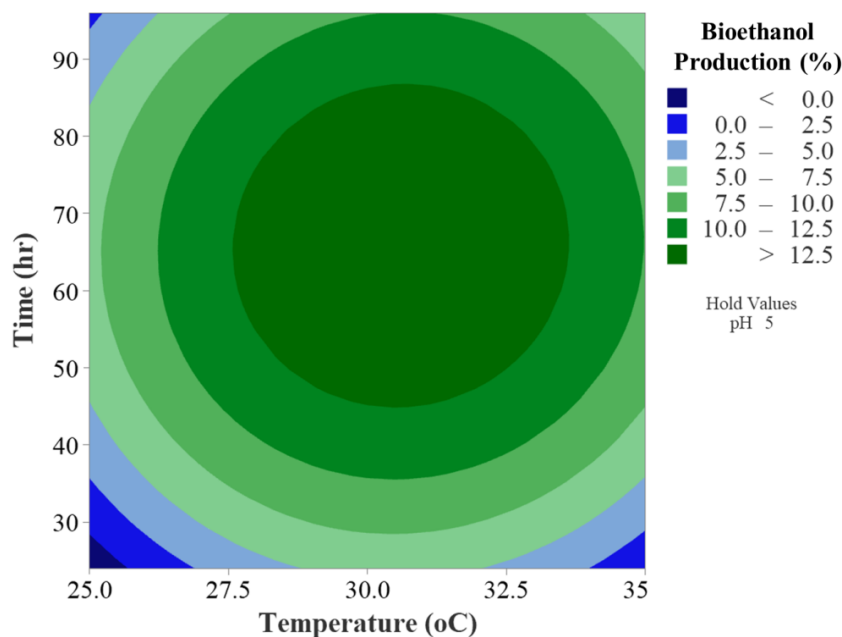
Bioethanol concentration	Coefficients
Y	
36.39	ثابت (β_0)
	Constants
3.24	اثرات درجه اول
4.81	
3.24	خطی ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$)
	First-order (linear)
-8.60	
-9.29	درجه دوم ($\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$)
-12.71	Second-order
0.36	
0.36	اثرات متقابل (برهمکنش) ($\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$)
0.36	Interaction
%96.93	R-square

پس از بدست آمدن ضرایب بدست آمده β (ضرایب ثابت، درجه اول، دوم و اثرات متقابل) و قرار دادن آن‌ها در رابطه (۱)، به راحتی می‌توان ارتباط بین متغیرهای مستقل و وابسته را ایجاد کرد و از طریق معادلات بدست آمده به پیش‌بینی خروجی و اعداد مربوط به متغیر وابسته دست یافت، اما اطمینان از نتایج بدست آمده وابسته به عبارت R^2 داشته که هرچه قدر این عبارت نزدیک به ۱ و یا به بیانی دیگر نزدیک به ۱۰۰٪ باشد، نتیجه حاصل شده اطمینان بیشتری خواهد داشت [۲۲، ۲۳]. عبارت مربوط به R^2 نیز در جدول ۳ گزارش شده است که برای مدل بدست آمده این عبارت عدد مناسبی بوده و برای متغیر وابسته غلظت بیواتانول برابر با ۹۶/۹۳٪ بدست آمد است که نشان می‌دهد مدل بدست آمده پیش‌بینی نسبتاً دقیقی از خروجی خواهد داشت.

پس از بدست آمدن نقاط و بازه‌های تأثیرگذار و یافتن ضریب تأثیر هرکدام به صورت جداگانه، نمودارهای خروجی مختلف که شامل متغیرهای تعیین شده در طراحی آزمایش به صورت جداگانه رسم شد و در ادامه به توضیحات آن‌ها پرداخته شد.

۳-۳-۱- اثرات دما و زمان فرآیند بر روی غلظت بیواتانول تولیدشده توسط شیره توت قرمز

با توجه به انتخاب متغیرهای مستقل دما و زمان فرآیند جهت تولید بیواتانول و اثر آن‌ها بر روی متغیر وابسته غلظت یا درصد تولیدشده، هر کدام از متغیرهای مستقل به طور جداگانه اثرگذاری مختلفی داشته و در افزایش درصد تولیدشده و یا کاهش آن نقش خواهند داشت. با توجه به اینکه محصول تولیدشده هرچقدر درصد بیشتری داشته باشد، بهتر و مناسب‌تر است، به همین خاطر در تحقیق حاضر متغیر وابسته اصلی در نظر گرفته به درصد ماده تولیدی اختصاص داده شده است. در بخش حاضر اثرات دو متغیر مستقل در نظر گرفته شده به صورت هم‌زمان بر روی متغیر وابسته گزارش شده است که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲ - نمودار سطح پاسخ غلظت بیواتانول تولیدشده بر اساس تغییرات دما و زمان فرآیند

Figure 2- Response surface diagram of the concentration of bioethanol produced based on changes in temperature and process time.

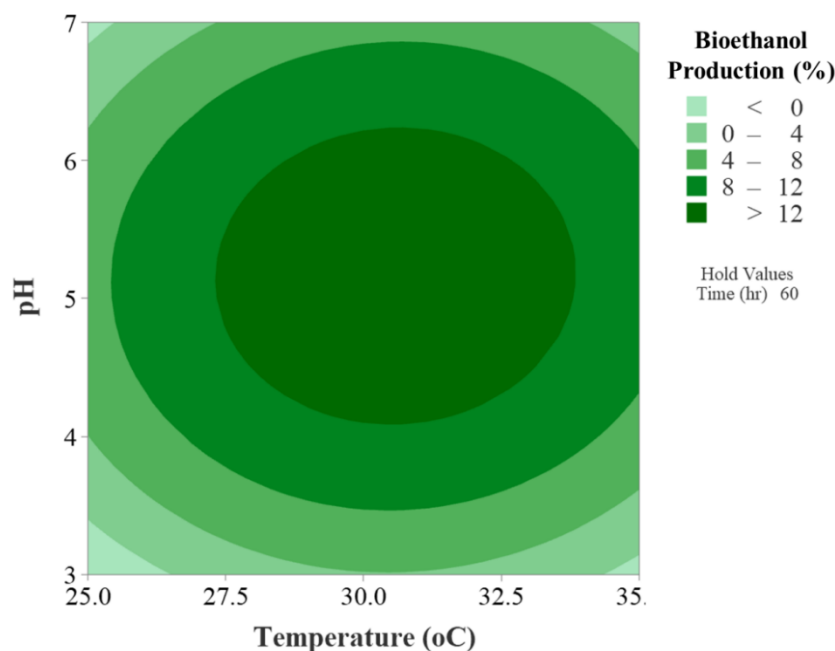
با توجه به نتایج حاصل از شکل ۱ درصد بیواتانول تولیدشده در بازه‌های زمانی و دمایی مختلف و متنوع فرآیند تولید بیواتانول متفاوت می‌باشد. در مقادیر ثابت و پایین دمای اعمال شده، با افزایش زمان فرآیند، درصد بیواتانول تولیدشده ابتدا افزایش یافته و سپس دچار مرحله کاهشی خواهد شد، روند حاضر در مقادیر بالا و ثابت دما نیز قابل مشاهده می‌باشد، به عبارتی با افزایش زمان فرآیند تولید، درصد بیواتانول تولیدشده افزایش پیدا کرده و در نقاط انتهایی زمان فرآیند کاهش پیدا خواهد کرد، به نظر می‌رسد در زمان‌های بالای فرآیند به دلایل سمیت الکل تولیدشده، تغییر شرایط محیطی، مصرف کامل قند موجود در شیره توت قرمز و تولید

برخی متابولیت های مضر برای مخمر این کاهش تولید بیواتانول اتفاق خواهد افتاد. به عنوان مثال در سمیت الکل با افزایش غلظت اتانول در محیط تخمیر، مخمرها ممکن است تحت تأثیر قرار بگیرند و از فعالیت آن ها کاسته شود. این امر می تواند منجر به کاهش سرعت تخمیر و تولید الکل شود یا در اثر مصرف قند موجود در شیر توت قرمز، دیگر قندهای موجود ممکن است دیگر برای مخمر قابل دسترس نباشند. در نتیجه، فرآیند تخمیر متوقف می شود و درصد الکل تولیدی کاهش می یابد. در مقادیر ثابت و پایین زمان فرآیند، افزایش دمای فرآیند ابتدا باعث افزایش تولید بیواتانول گشته و در انتها روند کاهشی بدست خواهد آمد که روند حاضر در زمان های بالا نیز مشاهده می شود، به طوری که در زمان های بالا و ثابت فرآیند تولید، با افزایش دمای فرآیند، ابتدا روند افزایشی و سپس کاهشی در تولید بیواتانول مشاهده گردید. این رفتار دوگانه اثرگذاری دما به این صورت بوده که در ابتدا، با افزایش دما، فعالیت آنزیم ها و متابولیسم مخمرها افزایش می یابد. دماهای بالاتر معمولاً سبب افزایش نرخ تخمیر و تولید بیواتانول می شود، چون فعالیت آنزیم های ضروری برای تبدیل قند به الکل بیشتر می شود. اما این افزایش دما تنها تا حدی مؤثر است، زیرا دماهای بالا می توانند به طور منفی بر فعالیت مخمرها تأثیر بگذارند. پس از رسیدن به یک نقطه بحرانی (که معمولاً در بازه دمای مناسب برای مخمرها است)، با افزایش بیشتر دما، کاهش تولید بیواتانول رخ داده که این کاهش می تواند به دلایل مختلفی از جمله جلوگیری از فعالیت مخمر، تنش های محیطی حرارتی و تولید مهارکننده ها باشد.

همچنین در شکل ۲ بیشینه و کمینه مقدار محصول تولید شده را نشان می دهد که در شکل حاضر نقاط بیشینه درصد تولید شده بیواتانول (به عنوان عامل مطلوب) با مقدار بیشتر از ۱۲/۵٪ با رنگ سبز پررنگ (محدوده تقریبی زمان فرآیند ۴۵ الی ۸۵ ساعت و دمای فرآیند ۲۷ الی ۳۳ درجه سانتی گراد) نشان داده شده است، همچنین کمترین درصد بیواتانول تولید شده با حالت آبی پررنگ مربوط به کمترین زمان و دمای فرآیند و یا بیشترین زمان و دمای فرآیند می باشد. به نظر می رسد در زمان و دماهای پایین مخمر فرصت کامل و فعالیت به اندازه کافی فعالیت پیدا نکرده و کمترین میزان بیواتانول تولیدی را به دنبال خواهد داشت و یا در بیشترین دما و زمان فرآیند، اثرات نامطلوبی بر فعالیت مخمر برجای گذاشته که در نهایت فعالیت آن کاهش یافته و بیواتانول تولید شده کاهش می یابد. در محدوده بیان شده که بیشترین درصد بیواتانول تولید شده را به دنبال خواهد داشت، حالت بهینه ای از فعالیت مخمر مورد استفاده بوده که تمامی شرایط لازم جهت انجام فعالیت را داشته و عوامل مزاحم و محدودکننده ای هم وجود ندارد که باعث کاهش غلظت بیواتانول گردد.

۳-۳-۲- اثرات دما و pH بر روی غلظت بیواتانول تولید شده توسط شیر توت قرمز

در بررسی دیگری از اثرات متغیرهای مستقل انتخاب شده بر روی متغیر مستقل غلظت بیواتانول تولید شده، دو متغیر مستقل دما و pH در نظر گرفته شده که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳ - نمودار سطح پاسخ غلظت بیواتانول تولیدشده بر اساس تغییرات دما و pH

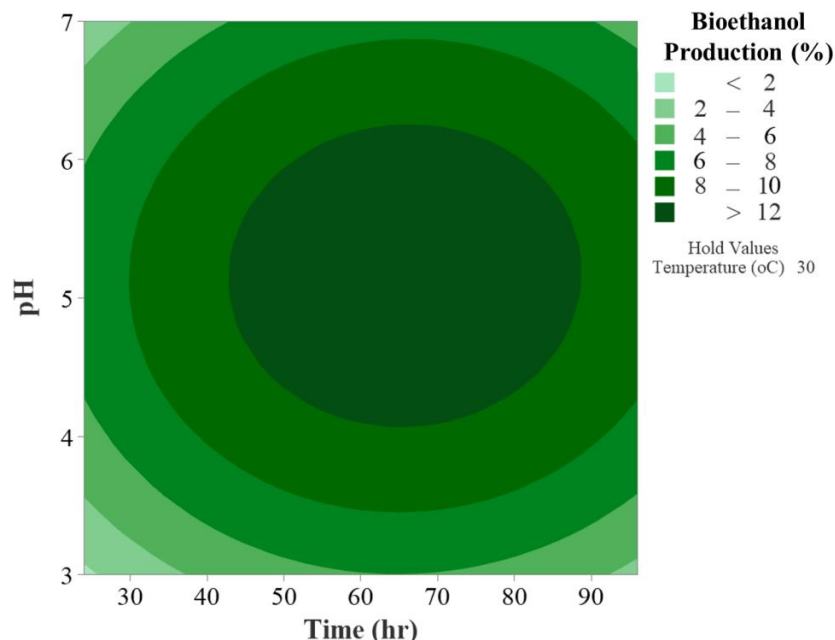
Figure 3- Response surface diagram of the concentration of bioethanol produced based on changes in temperature and pH

با توجه به نتایج حاصل از شکل ۳ در مقادیر ثابت و پایین دمای اعمال شده، با افزایش pH، درصد بیواتانول تولیدشده ابتدا افزایش یافته و سپس کاهش یافته است. روند حاضر در مقادیر بالا و ثابت دما نیز قابل مشاهده می‌باشد، به عبارتی با افزایش pH درصد بیواتانول تولیدشده افزایش پیدا کرده و سپس روند کاهشی را نتیجه داده است. به نظر می‌رسد در محدوده مناسبی از pH (معمولاً بین ۴ تا ۶ برای مخمر تحقیق حاضر) می‌تواند به بهبود فعالیت آنزیم‌ها که در فرآیند تخمیر نقش دارند، کمک نمایند و pH مناسب موجب بهینه شدن کارایی آنزیم‌های گلیکولیتیک و الکلی می‌شود و در نتیجه مقدار بیشتری از قندها به بیواتانول تبدیل می‌شوند. اما با افزایش بیشتر آن به موجب دنا تراسیون پروتئین‌ها، تخریب غشای سلولی مخمر و تولید مواد اسیدی، منجر به کاهش کارایی مخمر گردیده و در نهایت تولید بیواتانول کاهش یابد. در مقادیر ثابت و پایین pH، افزایش دمای فرآیند ابتدا باعث افزایش تولید بیواتانول گشته و در انتها روند کاهشی بدست آمده است که روند حاضر در زمان‌های بالا نیز مشاهده می‌شود، به طوری که در pHهای بالا و ثابت، با افزایش دمای فرآیند، ابتدا روند افزایشی و سپس کاهشی در تولید بیواتانول مشاهده گردید. این رفتار دوگانه اثرگذاری دما مشابه با حالت قبل بوده که در نهایت بایستی بهترین محدوده دمایی انتخاب گردد.

همچنین در شکل ۳ بیشینه و کمینه غلظت بیواتانول تولیدشده نشان داده شده است که در شکل حاضر نقاط بیشینه درصد تولیدشده بیواتانول با مقدار بیشتر از ۱۲٪ با رنگ سبز پررنگ (محدوده تقریبی دمای فرآیند ۲۷ الی ۳۳ درجه سانتی‌گراد و pH در محدوده ۴ الی ۶) نشان داده شده است، همچنین کمترین درصد بیواتانول تولیدشده با حالت سبز کم‌رنگ مربوط به کمترین pH و زمان فرآیند و یا بیشترین حالت دو متغیر مستقل انتخاب شده می‌باشد.

۳-۳-۳- اثرات زمان و pH بر روی غلظت بیواتانول تولیدشده توسط شیر توت قرمز

در نهایت با بررسی اثرات متغیرهای مستقل انتخاب شده بر روی متغیر مستقل غلظت بیواتانول تولیدشده، دو متغیر مستقل زمان فرآیند و pH در نظر گرفته شده که نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴- نمودار سطح پاسخ غلظت بیواتانول تولیدشده بر اساس تغییرات زمان و pH

Figure 4- Response surface diagram of the concentration of bioethanol produced based on changes in time and pH

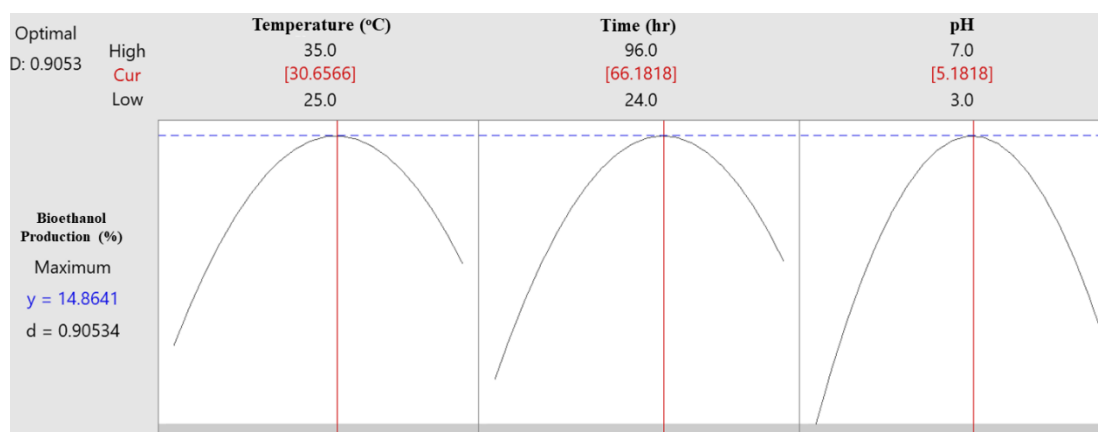
همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد، در زمان‌های پایین و ثابت فرآیند تولید، افزایش pH در محدوده (۴ الی ۶) باعث افزایش بیواتانول تولیدی گشته و در بازه‌های بالاتر و بیشتر میزان pH این روند کاهش یافته است، در زمان‌های بالا و ثابت فرآیند نیز با افزایش pH روند تولید بیواتانول کاملاً مشابه بازمان پایین می‌باشد که در بخش قبل اثر pH و افزایش آن شرح داده شد که برای مخمر انتخاب شده بهترین ناحیه بایستی در نظر گرفته شود تا عملکرد بهینه‌ای در جهت تولید هرچه بیشتر بیواتانول ارائه نماید. همچنین در pH ثابت و پایین، با افزایش زمان تولید بیواتانول و تعامل مابین مخمر و ماده اولیه (شیره توت قرمز رقیق شده) در محدوده‌ای از زمان فرآیند، بیواتانول تولیدشده روندی افزایشی و در زمان‌های بالاتر روند کاملاً کاهشی دارد. که در مقادیر pH ثابت و بالا نیز همین روند مشاهده گردید، که هرچقدر زمان فرآیند افزایش یابد، در محدوده‌ای باعث افزایش غلظت بیواتانول تولیدشده و در محدوده بالاتر زمان فرآیند، باعث کاهش تولید بیواتانول گردیده است. به نظر می‌رسد در مراحل اولیه تخمیر، مخمر به‌طور مؤثر قندهای موجود را به الکل و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌کند. با افزایش زمان تخمیر، مقدار بیشتری از قندها به بیواتانول تبدیل می‌شود. این به دلیل فعالیت مداوم آنزیم‌های مخمر است که به تجزیه قندها ادامه می‌دهند. همچنین در زمان‌های اولیه تخمیر، تعداد سلول‌های مخمر ممکن است افزایش یابد و فعالیت آن‌ها در تولید بیواتانول در حال رشد است. به همین دلیل،

با افزایش زمان، تولید بیواتانول افزایش می‌یابد. اما در زمان‌های بیشتر فرآیند، به دلایل متعددی شامل خستگی مخمر، تولید مواد سمی، استرس اکسیژن، کاهش بیواتانول رخ خواهد داد.

در شکل ۴ مشابه با دو حالت قبل، بیشترین و کمترین غلظت بیواتانول تولیدشده نشان داده شده است که نقاط بیشینه درصد تولیدشده بیواتانول با مقدار بیشتر از ۱۲٪ با رنگ سبز پررنگ (محدوده تقریبی زمان فرآیند ۴۵ الی ۸۵ ساعت و pH ۳ الی ۶) نشان داده شده است، همچنین کمترین درصد بیواتانول تولیدشده با حالت سبز پررنگ مربوط به کمترین زمان و دمای فرآیند و بیشترین مقدار متغیرهای مستقل در نظر گرفته شده می‌باشد.

۳-۴- بهینه‌سازی پارامترهای انتخاب شده جهت تولید بیواتانول

پس از انجام طراحی آزمایش، بررسی آماری و تحلیل‌های انجام گرفته از اثرات متغیرهای مستقل (دما و زمان فرآیند و میزان pH) بر روی متغیر وابسته درصد بیواتانول تولیدشده، بهینه‌سازی عددی انجام گرفت که در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- مقادیر بهینه (بهینه‌سازی عددی) شرایط تولید بیواتانول

Figure 5- Optimal values (numerical optimization) of bioethanol production conditions

همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، نقطه بهینه بدست آمده از طراحی آزمایش مذکور مربوط به دمای تقریبی ۶۶ درجه سانتی‌گراد با زمان فرآیند ۳۰/۶۵ ساعت و میزان pH برابر با ۵/۱۸ می‌باشد که در این حالت اگر فرآیند تولید بیواتانول از شیر توت قرمز انجام شود منجر به درصد تولیدی نهایی ۱۴/۸۶٪ خواهد شد که بایستی این نتایج راستی آزمایی شده و صحت‌سنجی شوند. با یافتن نقاط بهینه بدست آمده از بهینه‌سازی عددی، در شرایط بهینه حاصل از طراحی آزمایش صحت‌سنجی انجام شد که در بخش حاضر، فرآیند تولید بیواتانول انجام گردیده و مقادیر مربوط به متغیر وابسته درصد غلظت بیواتانول مورد تحلیل و ارزیابی قرار گرفت. پس از انجام آزمایشات مربوط به راستی آزمایی طراحی آزمایش، نتایج حاکی از آن بود که با مقایسه نتایج پیش‌بینی شده و نتایج حاصل از انجام آزمایشات، اختلاف معناداری بین داده‌های مدل پیش‌بینی با نتایج آزمایشگاهی وجود نداشت، به‌طوری‌که درصد غلظت بیواتانول تولیدشده ۱۴/۶۲٪ بدست آمد که دارای خطای کمتر از ۲٪ (معادل ۱/۶۱٪) با مقدار

پیش‌بینی‌شده از طراحی آزمایش داشت. پس بنابراین مدل‌های استخراج‌شده تأیید شده و به‌درستی توانسته‌اند اثرات متغیرهای مستقل را بر روی متغیر وابسته در محدوده موردنظر مشخص نمایند.

۳-۵- غلظت بیواتانول جداسازی و خالص‌سازی شده

بیواتانول تولیدشده در تحقیق حاضر دارای خلوص پایینی بوده که در نقطه بهینه میزان ۱۴/۶۲٪ بدست آمد، و ناخالصی‌های مختلف به علت وجود مواد معلق یا ناخالصی‌های غیر حل شونده مانند اسیدها، قندها، و پروتئین‌ها می‌باشد یا ممکن است چندین محصول جانبی دیگر بر اساس نوع و شرایط تخمیر تولید شوند، که می‌توانند موجب ناخالصی شوند. در بخش حاضر با استفاده از فرآیند تقطیر به جداسازی بیواتانول از محلول بهینه پرداخته شد و پس از انجام فرآیند به مدت ۱۲ ساعت، محصول تولیدشده خالص‌سازی گردیده و با آنالیز ضریب شکست توسط رفراکتومتر با خلوص ۹۰/۳۹٪ بدست آمد.

۳-۶- بررسی خواص بیواتانول تولیدشده در شرایط بهینه

پس از تولید بیواتانول با حالت بهینه در مرحله تخمیر و جداسازی و خالص‌سازی آن در مرحله تقطیر، جهت بررسی خواص و ویژگی‌های مختلف دو نمونه بدست آمده در بخش‌های زیر نتایج آنالیزهای متنوعی انجام‌شده که به‌تفصیل توضیح داده‌شده است.

۳-۶-۱- آنالیز طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش جهت ارزیابی رنگ

با ارزیابی شدت رنگ محصول تولیدشده در نقطه بهینه توسط دستگاه طیف‌سنجی مرئی فرابنفش UV-Vis در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر نتایج نشان داد که بیواتانول تولیدشده در نقطه بهینه قبل از خالص‌سازی دارای شدت رنگ ۳۴/۷۱ IU و پس از عملیات خالص‌سازی دارای شدت رنگ ۱۲/۴۵ IU می‌باشد، که عدد بدست آمده برای دو نمونه نشان‌دهنده رنگ قابل‌قبول و مناسبی برای محصول تولیدشده می‌باشد.

۳-۶-۲- آنالیز بریکس

. نمونه بهینه حاصل‌شده در مرحله تولید توسط تخمیر دارای بریکس بالاتری نسبت به نمونه خالص‌سازی شده با درصد الکل بالا بوده و به ترتیب مقادیر °Bx ۵/۱ و ۳/۷ بدست آمد. به نظر می‌رسد نمونه بهینه حاصل از فرآیند تخمیر و قبل از خالص‌سازی به دلیل وجود برخی از مواد معلق در ساختار خود، بریکس بیشتری داشته و نسبت به ماده نهایی خالص‌سازی شده غلیظ‌تر می‌باشد اما با حذف این مواد و تولید بیواتانول با خلوص بالا، بریکس کاهش جزئی پیدا کرده و از لحاظ خواص فیزیکی مناسب‌تر و کاربردی‌تر می‌باشد.

۳-۴- نتایج مدل سازی منطق فازی

داده های مورد استفاده برای توسعه مدل از جدول (۱) استخراج شدند. مدل سازی دقیق این پاسخ می تواند در بهینه سازی فرآیندهای صنعتی مرتبط با تولید محصولات غذایی و دارویی بسیار مفید باشد. منطق فازی با قابلیت تشخیص روابط غیرخطی پیچیده بین متغیرها، ابزاری قدرتمند برای این منظور محسوب می شود.

نتایج مربوط به خطای مدل های آموزش داده شده در جدول (۴) ارائه شده است. پس از ارزیابی های انجام شده، مدلی که دارای مدل با ۳، ۴ و ۳ تابع عضویت برای پارامترهای ورودی اول، دوم و سوم و ۳۶ قانون فازی بود، به عنوان مدل بهینه انتخاب شد. این مدل با میانگین خطای نسبی ۸/۵۱ درصد، عملکرد قابل قبولی از خود نشان داد. این مدل از توابع عضویت مثلثی برای متغیرهای ورودی استفاده می کند که پارامترهای آن در جدول (۵) ارائه شده اند. تابع عضویت مثلثی به صورتی تعریف می شود که در آن a و c به ترتیب کران پایین و بالای تابع و b نقطه مرکزی آن است. نتایج نشان می دهد که مدل توسعه یافته قادر است با دقت مناسبی پاسخ خروجی را پیش بینی کند، که این امر می تواند در بهینه سازی فرآیندهای صنعتی و کاهش هزینه ها مؤثر باشد. همچنین، استفاده از توابع عضویت مثلثی سادگی و کارایی مدل را افزایش داده است.

جدول ۴- مقایسه خطای MAPE مدل بر اساس تعداد مختلف توابع عضویت ورودی.

Table 4- Comparison of model error based on different numbers of input membership functions.

شماره ساختار	شماره قانون فازی	No. of MFs	No. of fuzzy rules	MF type					پی شکل II- shaped
Structure				مثلثی Triangular	ذوزنقه ای Trapezoidal	زنگ تعمیم یافته Generalized bell	گاوسی Gaussian	گاوسی ترکیبی Combination gaussian	
number									
1		2.2.2	8	418.32	34.35	46.16	66.21	50.46	31.30
2		3.2.2	12	134.65	104.16	133.27	138.66	118.48	34.19
3		2.3.2	12	65.03	58.47	41.90	45.38	56.72	57.78
4		2.2.3	12	155.28	149.01	131.48	137.34	145.47	179.72
5		2.3.3	18	26.04	63.14	28.14	30.12	40.88	67.81
6		3.2.3	18	69.67	67.77	70.12	74.69	70.40	75.06
7		3.3.2	18	44.61	61.88	50.18	49.99	65.66	72.54
8		3.3.3	27	13.75	67.57	25.01	15.06	70.67	88.80
9		4.3.3	36	8.51	56.64	10.66	10.42	40.83	64.03
10		3.4.3	36	41.63	68.50	48.82	42.57	84.19	75.67
11		3.3.4	36	38.22	67.08	49.55	42.98	83.88	69.42

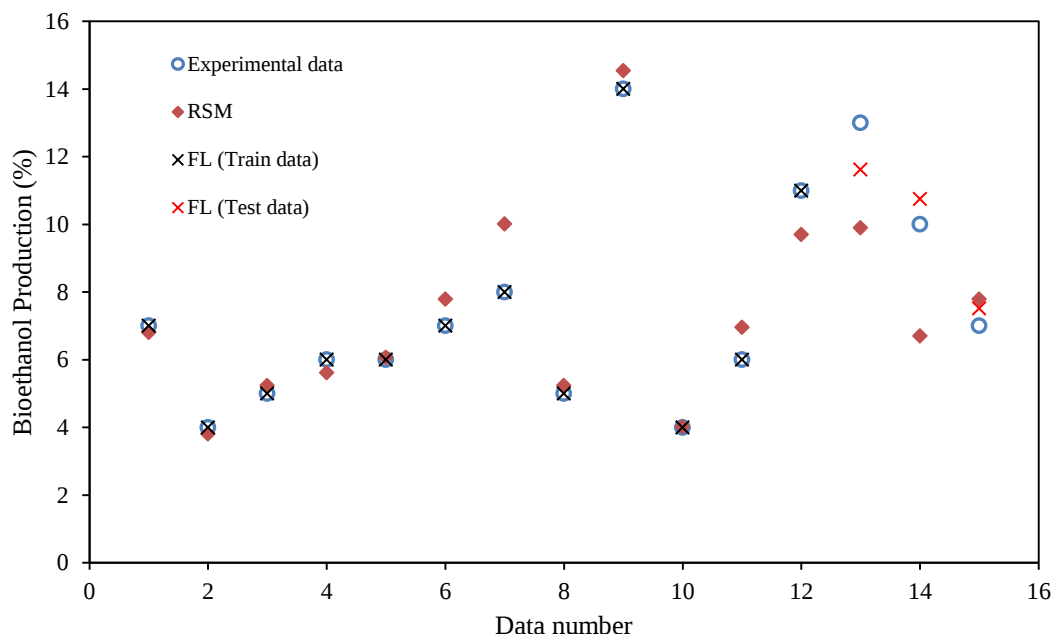
جدول ۵- پارامترهای تابع عضویت مثلثی.

Table 5- Parameters of the triangular membership function.

تابع عضویت Membership function	پارامترها Parameters	ورودی ۱ Input 1	ورودی ۲ Input 2	ورودی ۳ Input 3
MF1	a	21.67	-4.5	1.5
	b	25	24	3
	c	28.33	52.5	4.5
MF2	a	25	24	2.99
	b	28.33	52.5	4.49
	c	31.67	81	5.99
MF3	a	28.33	52.5	4.5
	b	31.67	81	6
	c	35	109.5	7.5
MF4	a	31.67		
	b	35		
	c	38.33		

برای ارزیابی عملکرد مدل، خطاهای پیش‌بینی برای داده‌های آموزشی و آزمایشی محاسبه شد. نتایج نشان داد که مدل توسعه‌یافته توانایی بالایی در پیش‌بینی دقیق پاسخ خروجی دارد. شکل (۵) میزان تطابق بین مقادیر پیش‌بینی‌شده و مقادیر آزمایشی را برای هر دو مجموعه داده نشان می‌دهد. در این جدول نتایج مربوط به پیش‌بینی مدل حاصل از طراحی آزمایش نیز ارائه شده است. دقت بالا در پیش‌بینی داده‌های آزمایشی، که در فرآیند آموزش مدل نقشی نداشتند، نشان‌دهنده قابلیت بالای مدل منطق فازی در تعمیم‌پذیری و دقت است. جدول ۶ شاخص‌های خطای مدل‌ها را برای داده‌های آموزشی و اعتبارسنجی نشان می‌دهد. مدل فازی بر اساس کمینه مقدار MAPE به‌عنوان بهترین مدل انتخاب شد و سایر شاخص‌ها (RMSE و MAE) برای ارزیابی کامل‌تر عملکرد مدل ارائه شده‌اند.

در نهایت، قوانین فازی و پارامترهای بهینه‌شده مدل در جدول (۶) ارائه شده‌اند. این پارامترها به‌صورت بهینه‌شده در مدل گنجانده شده‌اند تا دقت پیش‌بینی را به حداکثر برسانند. ساختار ارائه‌شده در این پژوهش در واقع می‌تواند به‌عنوان هسته اصلی یک کنترل‌کننده فازی در فرآیندهای صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. شبیه‌سازی چنین کنترل‌کننده‌هایی در فرآیندهای غذایی، مشابه کاری است که در پژوهش صباغی و همکاران (۲۰۲۱) برای کنترل فازی دما در فرآیند بلانچینگ و خشک‌کردن برشی سیب به روش گرمایش مادون قرمز انجام شده است [۲۴].



شکل ۵- مقایسه مقادیر پیش‌بینی‌شده و آزمایشی برای داده‌های آموزشی و ارزیابی همراه با نتایج مدل طراحی آزمایش.

Figure 5- Compare predicted and experimental values for training and evaluation data along with the results of the design of experiment model.

جدول ۶- شاخص‌های خطای مدل‌های فازی و RSM برای داده‌های آموزشی و ارزیابی.

Table 6- Error Metrics (MAPE, RMSE, MAE) of Fuzzy and RSM Models for Training and Evaluation Data.

Data Type	مدل فازی Fuzzy Model			مدل RSM RSM Model		
	MAPE (%)	RMSE	MAE	MAPE (%)	RMSE	MAE
Training	0	0	0	7.776	0.812	0.579
Evaluation	8.467	0.953	0.88	22.711	2.654	2.397

جدول ۶- قوانین فازی.

Table 6- Fuzzy rules.

شماره قانون Law Number	شرح قانون Law Description
1	if (T is T MF1) and (t is t MF1) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.0203×T-0.02858×t-0.003008×pH-0.000752)
2	if (T is T MF1) and (t is t MF1) and (pH is pH MF2) then (BP=-0.04061×T-0.05715×t-0.006016×pH-0.001504)
3	if (T is T MF1) and (t is t MF1) and (pH is pH MF3) then (BP=-0.002485×T-0.003497-0.000552×pH-9.202×10 ⁻⁵)
4	if (T is T MF1) and (t is t MF2) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.0196×T-0.02759-0.002904×pH-0.0007261)

5	if (T is T MF1) and (t is t MF2) and (pH is pH MF2) then (BP=0.03859×T+0.1315×t+0.009752×pH+0.00166)
6	if (T is T MF1) and (t is t MF2) and (pH is pH MF3) then (BP=0.0365×T+0.08999×t+0.007247×pH+0.001467)
7	if (T is T MF1) and (t is t MF3) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.00133 ×T-0.00399×t-0.000197×pH-4.924×10 ⁻⁵)
8	if (T is T MF1) and (t is t MF3) and (pH is pH MF2) then (BP=0.02513×T+0.05871×t+0.005163×pH+0.001013)
9	if (T is T MF1) and (t is t MF3) and (pH is pH MF3) then (BP=0.02078×T+0.05401×t+0.004309×pH+0.0008109)
10	if (T is T MF2) and (t is t MF1) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.03046×T-0.04287×t+0.004512×pH-0.001128)
11	if (T is T MF2) and (t is t MF1) and (pH is pH MF2) then (BP=0.1451×T+0.07909×t+0.02531×pH+0.004611)
12	if (T is T MF2) and (t is t MF1) and (pH is pH MF3) then (BP=0.09929×T+0.07717×t+0.01634×pH+0.003296)
13	if (T is T MF2) and (t is t MF2) and (pH is pH MF1) then (BP=0.02211×T+0.06165×t+0.0007954×pH+0.000629)
14	if (T is T MF2) and (t is t MF2) and (pH is pH MF2) then (BP=0.1049×T+0.2446×t+0.01857×pH+0.003278)
15	if (T is T MF2) and (t is t MF2) and (pH is pH MF3) then (BP=0.07824×T+0.1586×t+0.01284×pH+0.002595)
16	if (T is T MF2) and (t is t MF3) and (pH is pH MF1) then (BP=0.01641×T+0.03082×t+0.001545×pH+0.0005395)
17	if (T is T MF2) and (t is t MF3) and (pH is pH MF2) then (BP=0.05447×T+0.1049×t+0.009152×pH+0.001801)
18	if (T is T MF2) and (t is t MF3) and (pH is pH MF3) then (BP=0.03956×T+0.08945×t+0.007168×pH+0.001357)
19	if (T is T MF3) and (t is t MF1) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.03206×T-0.03692×t-0.003886×pH-0.0009715)
20	if (T is T MF3) and (t is t MF1) and (pH is pH MF2) then (BP=0.1419×T+0.09099×t+0.02657×pH+0.004925)
21	if (T is T MF3) and (t is t MF1) and (pH is pH MF3) then (BP=0.1031×T+0.08249×t+0.01718×pH+0.003436)
22	if (T is T MF3) and (t is t MF2) and (pH is pH MF1) then (BP=0.02057×T+0.0674×t+0.0014×pH+0.0007793)
23	if (T is T MF3) and (t is t MF2) and (pH is pH MF2) then (BP=0.1018×T+0.2561×t+0.01978×pH+0.00358)
24	if (T is T MF3) and (t is t MF2) and (pH is pH MF3) then (BP=0.08191 ×T+0.1638×t+0.01365×pH+0.00273)
25	if (T is T MF3) and (t is t MF3) and (pH is pH MF1) then (BP=0.0184×T+0.0368×t+0.00184×pH+0.0006133)
26	if (T is T MF3) and (t is t MF3) and (pH is pH MF2) then (BP=0.05846×T+0.1169×t+0.009743×pH+0.001949)
27	if (T is T MF3) and (t is t MF3) and (pH is pH MF3) then (BP=0.04357×T+0.09365×t+0.007478×pH+0.001409)
28	if (T is T MF4) and (t is t MF1) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.02137×T-0.02461×t-0.002591×pH-0.0006477)
29	if (T is T MF4) and (t is t MF2) and (pH is pH MF2) then (BP=-0.04275×T-0.04922×t-0.005181×pH-0.001295)
30	if (T is T MF4) and (t is t MF1) and (pH is pH MF3) then (BP=0.00004868×T+0.332×t+2.091×pH+1.475×10 ⁻⁶)
31	if (T is T MF4) and (t is t MF2) and (pH is pH MF1) then (BP=-0.02064×T-0.02376×t-0.002501×pH-0.0006253)
32	if (T is T MF4) and (t is t MF2) and (pH is pH MF2) then BP=0.09387×T+0.1841×t+0.0143×pH+0.002611)
33	if (T is T MF4) and (t is t MF2) and (pH is pH MF3) then (BP=0.06762×T+0.1159×t+0.009662×pH+0.001932)
34	if (T is T MF4) and (t is t MF3) and (pH is pH MF1) then (BP=0)
35	if (T is T MF4) and (t is t MF3) and (pH is pH MF2) then (BP=0.04827×T+0.08274×t+0.006895×pH+0.001379)
36	if (T is T MF4) and (t is t MF3) and (pH is pH MF3) then (BP=0.03369×T+0.06483×t+0.005185×pH+0.0009792)

۴- نتیجه گیری

تحقیق حاضر شامل بخش‌های مختلفی از جمله تولید بیواتانول از شیره توت قرمز، طراحی آزمایش و بهینه‌سازی متغیرهای مستقل شامل pH، دما و زمان فرآیند تولید، جداسازی و خالص‌سازی محصول نهایی بیواتانول با خلوص بالا بوده و نتایج مختلفی بدست آمد که می‌توان بیان کرد شیره توت قرمز پتانسیل بالایی جهت تولید بیواتانول دارند. روش سطح پاسخ به‌عنوان یکی از روش‌های طراحی آزمایش و آنالیز آماری به‌عنوان روشی مناسب در کاهش تعداد آزمایش‌ها و همچنین یافتن نقاط بهینه عملیاتی در فرآیند

تولید بیواتانول عمل می‌کند. مخمر *Saccharomyces cerevisia* توانایی مناسبی در تولید بیواتانول از خود نشان داد که با توجه به آنالیزهای انجام‌گرفته، این عامل در درصد الکل تولیدشده اثرگذار بود و ویژگی‌های نهایی محصول تولیدشده دارای درصد مناسب و کدورت و رنگ پایین خواهد شد. جداسازی و خالص‌سازی بیواتانول با فرآیند تقطیر، منجر به تولید محصولی با خلوص بالاتر و بریکس پایین‌تری نسبت به نمونه قبل از خالص‌سازی خواهد گردید. پیشنهاداتی که برای سایر پژوهشگران می‌توان ارائه داد این است که با بررسی سایر مواد با پتانسیل تولید بیواتانول پژوهش حاضر را تکرار نموده و نتایج بدست آمده را مقایسه نمایند.

در این مطالعه، علاوه بر بهینه‌سازی فرآیند تولید بیواتانول از شیر توت قرمز، از مدل‌سازی منطق فازی نیز برای پیش‌بینی پاسخ خروجی به‌عنوان تابعی از پارامترهای ورودی (دما، زمان فرآیند و pH) استفاده شد. نتایج نشان داد که مدل منطق فازی توسعه‌یافته با دقت مناسبی قادر به پیش‌بینی پاسخ خروجی است و می‌تواند به‌عنوان ابزاری قدرتمند در بهینه‌سازی فرآیندهای صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از توابع عضویت مثلثی و انتخاب ساختار بهینه مدل با ۳۶ قانون فازی، کارایی و دقت مدل را به میزان قابل‌توجهی افزایش داد. این مدل‌سازی نه‌تنها در کاهش هزینه‌ها مؤثر است، بلکه امکان پیش‌بینی دقیق‌تر و تصمیم‌گیری بهینه در فرآیندهای تولیدی را فراهم می‌کند.

References

1. Ward, O.P. and Singh, A. (2002). Bioethanol technology: developments and perspectives. *Advances in applied microbiology*. 51: 53-80.
2. Sofokleous, M., Christofi, A., Malamis, D., Mai, S., and Barampouti, E. (2022). Bioethanol and biogas production: An alternative valorisation pathway for green waste. *Chemosphere*. 296: 133970.
3. Tenkolu, G.A., Kuffi, K.D., and Gindaba, G.T. (2024). Optimization of fermentation condition in bioethanol production from waste potato and product characterization. *Biomass Conversion Biorefinery*. 14(4): 5205-5223.
4. Kasaeian, A., Fereidooni, L., Ahmadbeigi, A., Kahedi, S., Koohshoori, M.S., Ghafarian, S., Tajmousavilangerudi, A., and Salaripoor, H. (2025). Review on Bioethanol Production from Fruit Peels. *Waste Biomass Valorization*: 1-23.
5. Taherzadeh Fini, A. and Fattahi, A. (2021). Bioethanol production from wastes: An experimental evaluating study for Iran. *Journal of Renewable Energy Environmental Research*. 8(3): 86-93.
6. Zhang, H., Zhang, P., Wu, T., and Ruan, H. (2023). Bioethanol production based on *Saccharomyces cerevisiae*: opportunities and challenges. *Fermentation*. 9(8): 709.
7. Jhariya, U., Dafale, N.A., Srivastava, S., Bhende, R.S., Kapley, A., and Purohit, H.J. (2021). Understanding ethanol tolerance mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the bioethanol production: Current and future prospects. *BioEnergy Research*. 14: 670-688.
8. Ryšavý, J., Jaroch, M., Horák, J., Krpec, K., Molchanov, O., Bury, M., and Kuo, J.-K. (2024). Bioethanol burner operating parameters optimization: Effects of burner opening area modulation on heat output and flue gas composition. *Energy Conversion Management*: X. 23: 100616.
9. Fatima, N., Malik, A.Y., Shah, M.A., and Khan, H. (2024). The effect of glucose, temperature and pH on bioethanol production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Population Therapeutics Clinical Pharmacology*. 31(1): 656-667.
10. Tse, T.J., Wiens, D.J., and Reaney, M.J. (2021). Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*. 7(4): 268.
11. Alalyani, S.R.S., Lakkimsetty, N.R., Shaik, F., and Varghese, M. (2023). Modeling and optimization of bioethanol production yield from corn starch using response surface methodology. *Environment, Development Sustainability*: 1-18.
12. Oliveira, A.F., Santos, F.R., and Fonseca, R.R. (2022). Fuzzy logic based plantwide control applied to ethanol production from potato starch. *The Journal of Engineering Exact Sciences*. 8(1): 13650-01-16e.
13. Ahmadi, O., Sayyar, Z., and Jafarizadeh Malmiri, H. (2023). Optimization of Processing Time, Temperature, and Stirring Rate to Synthesize the Ag Nanoparticles Using Oregano Extract. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 42(10).
14. Shayan, S., Hajihajikolai, D., Ghazale, F., Gharahdaghigharahtappeh, F., Faghih, A., Ahmadi, O., and Behbudi, G. (2024). Optimization of green synthesis formulation of selenium nanoparticles (SeNPs) using peach tree leaf extract and investigating its properties and stability. *Iranian Journal of Biotechnology*. 22(3): e3786.
15. Shaghaghi-Moghaddam, R., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mehdikhani, P., Alijanianzadeh, R., and Jalalian, S. (2019). Optimization of submerged fermentation conditions to overproduce bioethanol using two industrial and traditional *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Green Processing Synthesis*. 8(1): 157-162.
16. Ahmadi, O., Jafarizadeh-Malmiri, H., and Jodeiri, N. (2018). Eco-friendly microwave-enhanced green synthesis of silver nanoparticles using Aloe vera leaf extract and their physico-chemical and antibacterial studies. *Green Processing Synthesis*. 7(3): 231-240.
17. Hashemilar, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Ahmadi, O., and Jodeiri, N. (2023). Enzymatically preparation of starch nanoparticles using freeze drying technique—gelatinization, optimization and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 237: 124137.

18. Ali, O.A.M., Ali, A.Y., and Sumait, B.S. (2015). Comparison between the effects of different types of membership functions on fuzzy logic controller performance. *International Journal*. 76: 76-83.
19. حسن صباغی، محمدامان ضیایی فر (۱۳۹۸). منطق فازی در صنایع غذایی. ۱۳۹۸: انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
20. Jang, J.-S. J.I.t.o.s., man, and cybernetics. (1993). ANFIS: adaptive-network-based fuzzy inference system. 23(3): 665-685.
21. Sabbaghi, H., Ziaiiifar, A.M., and Kashaninejad, M. (2019). Design of fuzzy system for sensory evaluation of dried apple slices using infrared radiation. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*. 50(1): 77-89.
22. Ahmadi, O. and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). Intensification and optimization of the process for thyme oil in water nanoemulsions preparation using subcritical water and xanthan gum. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 235(5): 629-648.
23. Eshghi, M., Kamali-Shojaei, A., Vaghari, H., Najian, Y., Mohebian, Z., Ahmadi, O., and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). Corylus avellana leaf extract-mediated green synthesis of antifungal silver nanoparticles using microwave irradiation and assessment of their properties. *Green Processing and Synthesis*. 10(1): 606-613.
24. Sabbaghi, H., Kashaninejad, M., and Ziaiiifar, A.M. (2020). Simulation of temperature fuzzy controller during infrared dry blanching and dehydration of apple slices by intermittent heating method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 16(6): 133-150.

Integrated modeling using fuzzy logic and response surface in predicting and optimizing bioethanol production conditions

~~Integrated Modeling Using Fuzzy Logic and Response Surface Methodology for Prediction and Optimization of Bioethanol Production Conditions~~

Integrated modeling using fuzzy logic and response surface in predicting and optimizing bioethanol production conditions

The phrase “Comparison of Modeling with ... Methods” is grammatically incorrect. It should be revised to “Comparison between ... Methods” >>>>Comparative Modeling of Fuzzy Logic and Response Surface Methodology for Prediction and Optimization of Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* and Red Mulberry Juice

>>>or, considering your methodology, “Integrated Modeling Using ...” is more accurate and professional

Background and Objective: One of the most important aspects of bioethanol production is the optimization of fermentation process conditions. In this regard, modeling and accurate prediction of processes using modern methods are essential. Red mulberry juice, as a rich source of natural sugars, can be used as a raw material for bioethanol production. *Saccharomyces cerevisiae* is a key microorganism in the fermentation of sugars for bioethanol production. The present study, after reviewing related literature and background, includes: bioethanol production using diluted mulberry juice, optimization of operating conditions for high-purity bioethanol production, separation and purification of bioethanol to a high purity level, and a comparison between two experimental design methods—response surface methodology (RSM) and fuzzy logic—for predicting the output results.

Materials and Methods: The raw material used for bioethanol production was red mulberry juice with a Brix of 78, obtained from local markets in Sanandaj. *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5269 was obtained and activated from the Pasteur Institute of Iran. The mulberry juice was diluted with distilled water to a Brix of 10. The prepared solution was adjusted to an acidic pH of 4.75 (the optimal growth value for the yeast used). A yeast dosage of 0.375 g/L was added and the mixture was placed in a stirred incubator at 200 rpm and 30°C. Fixed values included an inoculum volume of 150 mL, and an initial feed volume of 350 mL with a Brix concentration of 10. An experimental design was conducted to optimize the pH, duration, and temperature of the bioethanol production process to maximize ethanol yield.

Results: To validate the independent variables in the experimental design, the p-value threshold of 0.05 was used as described in the methods. For the independent variables (temperature, process time, and pH), the first-order effects on the dependent variable (ethanol concentration) were significant, with p-values of 0.009, 0.001, and 0.009, respectively. The determination coefficient (R^2) of the fitted model was 96.93%, indicating a good predictive capability. The optimum point identified from the experimental design corresponds to approximately 66 hours of process time at 30.65°C with a pH of 5.18, which would yield an ethanol production of about 14.86% when using red mulberry juice. The ethanol produced in this study exhibited relatively low purity, with an optimum yield of 14.62%; impurities are attributed to suspended and insoluble matter (acids, sugars, proteins) and other by-products that can form under specific

fermentation conditions. Separation of ethanol from the optimum solution was performed via distillation. After 12 hours of distillation, the product was purified and analyzed by refractometry, achieving a purity of 90.39%. Subsequently, multiple membership functions were evaluated for designing the fuzzy model. After evaluation, the model with 4, 3, and 3 membership functions for the first, second, and third input parameters and 36 fuzzy rules was selected as optimal. This model demonstrated acceptable performance with an average relative error of 8.51%.

Conclusion: Red mulberry juice shows strong potential for bioethanol production. Response surface methodology (RSM) is an effective experimental design and statistical analysis tool for reducing the number of experiments. *Saccharomyces cerevisiae* demonstrated a robust ability to produce bioethanol, and analyses indicated that this factor significantly influenced ethanol yield. The final product characteristics showed good ethanol content with low turbidity and color. Distillation for separation and purification led to higher-purity ethanol with a lower Brix than the starting material. For future work, researchers are encouraged to repeat the study with other substrates capable of producing bioethanol and to compare results across different materials and conditions.

Keywords: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, red berry juice, optimization, fuzzy logic, response surface, distillation ~~*Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol, red mulberry juice, optimization, distillation~~