مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۱۷۶-۱۶۴

Original Article

مطالعه کینتیکی هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و تولید اتانول با استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*

مسعود حاتمی منش*[۱]، موسی نظری[۲]

[۱]دانشجوی دکتری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، همدان، [۲]دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از فرآیندهای بیولوژیکی و بهنیه سازی آنها به منظور تولید سوخت های زیستی نظیر اتانول و به دلیل مسایل اقتصادی و محیط زیستی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. به همین دلیل در مطالعه حاضر به بررسی مدل کینتیکی فرآیند هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و تولید اتانول با استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* پرداخته شد.

مواد و روش ها: این مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی انجام گرفت. در این مطالعه، تاثیر پارامترهایی مانند pH و دما بر روی فرآیند هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای بررسی مدل کینتیکی فرآیند هیدرولیز آنزیمی از مدل کینتیکی میکائلیس–منتن استفاده گردید. به منظور تولید اتانول از نشاسته هیدرولیز شده از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و pH ٤/٥ استفاده شد. برای اندازه گیری غلظت اتانول تولیدی از دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاد گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که pH ٥ و دمای ۳۵ درجه سلیسیوس بیشترین تاثیر را بر روی تولید گلوکز توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* دارند. همچنین بررسی مدل کینتیکی و ثابت های مدل، به ترتیب V_{max} و K_m برابر ۱۰/٤۱ و ۷۳/۲۳ را نشان دادند. مقایسه دادهای تجربی با داده های مدل به دست آمده، همبستگی بالای داده های تجربی و داده های مدل کینتیکی را تایید نمود(R^2= ۰/۹۳). نتایج تولید اتانول توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* از محیط کشت هیدرولیز شده با غلظت گلوکز اولیه به میزان ۳۲ گرم بر لیتر نشان داد که بیشترین میزان اتانول تولیدی و وزن خشک سلولی آن به ترتیب برابر ۱۰/٤۰ و ۳/۰۸ گرم بر لیتر می باشد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که مدل کینتیکی میکائلیس–منتن قادر به پیش بینی هیدرولیز آنزیمی نشاسته می باشد. نشاسته هیدرولیز شده می تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب برای تولید اتانول به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: اتانول، مدل کینتیک میکائلیس–منتن، *آسپرژیلوس نایجر*، هیدرولیز آنزیمی، *ساکارومایسس سرویسیه*.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹٦ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹٦

مقدمه

با توجه به کاهش منابع سوخت‌های فسیلی و آلودگی‌های محیط زیستی ناشی از تولید و مصرف آنها نیاز به تولید انرژی‌های تجدیدپذیر، مناسب، غیر سمی و ارزان قیمت که آلودگی کمتری نسبت سوخت‌های فسیلی داشته باشند، احساس می‌شود (۱ و ۲). با این وجود در میان گزینه های مختلف جایگزین (انرژی باد، زی‌توده، آب و ...) انرژی تولید شده از زی‌توده (بیومس) به دلایلی همچون فراوانی، در دسترس بودن و قیمت ارزان می‌تواند راه حل مناسب تری باشد (۳). زی‌توده یک منبع تجدیدپذیر انرژی است که از مواد زیستی، شامل موجودات زنده یا بقایای آنها به دست می‌آید.

*) آدرس برای مکاتبه: همدان، ملایر، دانشگاه ملایر، گروه محیط زیست.
تلفن: ۰۹۳٦۲۱٥٥۳٤۹ پست الکترونیک: masoud_hatami68@yahoo.com

بنابراین می‌تواند از طریق مسیرهای ترموشیمیایی و بیولوژیکی به سوخت‌های زیستی، جامد، مایع و گاز مانند اتانول، بیودیزل، هیدروژن و متان تبدیل گردد (٤).

در میان این سوخت‌ها اتانول به دلایلی همچون سادگی تولید، وجود منابع ارزان قیمت و مناسب بیشترین توجه را به خود جلب کرده است. این الکل به دلیل داشتن عدد اکتان بالا و همچنین وجود اکسیژن در ساختار شیمیایی خود می‌تواند به تنهایی به بجای MTBE در بنزین به کار رود و محتوی اکسیژن آن را افزایش دهد. در نتیجه موجب اکسیداسیون بهتر سوخت و کاهش گازهای خروجی از اتومبیل گردد (٥).

اصولاً اتانول می‌تواند از ترکیبات و مواد مختلفی ماند گلوکز، نشاسته، مواد سلولزی و لیگنوسلولزی (پوست درختان، ضایعات کشاورزی، علف و ...) و زی‌توده جلبک‌ها طی فرآیند تخمیر تولید شود. تخمیر اتانول یک فرایند زیستی است که در آن مواد آلی توسط میکروارگانیسم ها به ترکیبات ساده‌تر مانند قندها تبدیل می‌شوند. سپس قندهای تولید شده، طی فرآیند تخمیر به کمک میکروارگانیسم های مناسب به اتانول و CO_2 تبدیل می‌گردند (٦).

با توجه به اهمیت تولید اتانول به عنوان یک سوخت سازگار با محیط زیست، امروزه محققان زیادی به بررسی و تولید آن از مواد مختلف پرداخته اند. از این میان می‌توان به مطالعه ورما (Verma) و همکاران (٧) که به بررسی تولید اتانول از نشاسته هیدرولیز نشده، طالب نیا (Talebnia) و همکاران (٨) که به بررسی تولید اتانول از کاه برنج و همچنین سبایانگ (Sebayang) و همکاران (٩) که به مطالعه تولید اتانول از دانه‌های سورگوم پرداختند، می توان اشاره نمود.

به طور کلی در طول فرآیند تخمیر اتانول، دو گروه از میکروارگانیسم‌ها دخالت دارند. گروه اول شامل میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم های کاتالیز کننده (مانند آنزیم گلیکوآمیلاز) هستند که در واقع واکنش شیمیایی تجزیه سوبسترا به ترکیبات ساده‌تر مانند گلوکز را کاتالیز می‌کنند. گروه دوم میکروارگانیسم‌های هستند که سوبستراهای تخمیرپذیر را به اتانول تبدیل می‌کنند (١٠).

از آنجایی که میکروارگانیسم اصلی تولید کننده اتانول یعنی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) قادر به هیدرولیز مواد پلی ساکاریدی مانند نشاسته نمی‌باشد. بنابراین فرایند تولید اتانول از مواد پلی ساکاریدی یک فرآیند دو مرحله‌ای است. مرحله اول فرآیند ساکاریفیکاسیون (هیدرولیز نشاسته) نام دارد که در آن نشاسته به کمک آنزیم یا اسید به قندهای ساده‌تر مانند گلوکز تبدیل می‌گردد. سپس در مرحله دوم قندهای حاصل از فرآیند ساکاریفیکاسیون توسط میگروارگانیسم‌های مناسب به اتانول (فرآیند تخمیر) تبدیل می‌گردد (١١ و ١٢).

در همین راستا از میان میکروگانیسم‌های مختلف مورد استفاده در صنعت تولید اتانول قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) به دلیل توانایی بالا در تولید آنزیم های هیدرولیز کننده مواد پلی ساکاریدی مانند آنزیم گلیکوآمیلاز و مخمربه *ساکارومایسس سرویسه* بیشترین کاربرد را دارند (١٣).

اصولاً مواد پلی‌ساکاریدی مانند نشاسته، فاضلاب تولید شده از واحدهای صنعتی، کشاورزی و خانگی تولیدکننده یا مصرف کننده آنها (ترکیبات پلی‌ساکاریدی) مانند پساب و ضایعات برنج دارای سوبستراهای مناسب و ارزان قیمت برای تولید اتانول هستند (٧). اما عدم توانایی میکروارگانیسم‌های تولید کننده اتانول در تجزیه و تخمیر این ترکیباب موجب ضروری بودن فرآینده هیدرولیز این ترکیبات با استفاده از فرآیندهای شیمیایی یا بیولوژیکی شده است.

در همین راستا یکی از رایج‌ترین روش‌های که برای تجزیه ساختار مواد نشاسته‌ای و دیگر مواد پلی‌ساکاریدی به منظور تولید قندهای قابل احیا جهت تولید اتانول مورد استفاده قرار می‌گیرد، فرایند هیدرولیز آنزیمی این مواد توسط میکروارگانیسم‌ها به ویژه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* می‌باشد.

آنزیم‌ها در واقع کاتالیزورهای زیستی مهمی هستند که باعث افزایش سرعت تبدیل مواد پلیمری به واحدهای سازنده آنها می‌شوند (٣). این ویژگی آنزیم‌ها به همراه ویژگی های دیگری مانند انتخابی و اختصاصی بودن و کنترل دقیق سرعت واکنش‌های شیمیایی به کمک مجموعه‌ای از بازخوردهای مثبت

و منفی، علاوه بر مسایل اقتصادی و محیط زیستی آنها باعث شده که محققان زیادی به بررسی تولید آنها و ارائه مدل‌های کینتیکی آنها در کنار شناسایی و پرورش میکرواگانیسم های تولید کننده آنها بپردازند. از نمونه این مطالعات می‌توان به مطالعه ادریمی (Aderemi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ و حاتمی‌منش (Hatamimanesh) و همکاران در سال ۲۰۱۵ اشاره کرد. این محققان به ترتیب به بررسی مدل کینتیکی هیدرولیز آنزیمی کاه برنج و هیدرولیز آنزیمی پساب برنج توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* پرداختند (۱٤ و ۱۵).

اصولاً مطالعه کینتیک آنزیمی به منظور اندازه‌گیری کمی سرعت واکنش‌های آنزیمی و مطالعه عوامل موثر بر سرعت آن بسیار مهم و اساسی است. از مدل‌های کینتیکی مهم که در فرآیند هیدرولیز آنزیمی مواد نشاسته‌ای کاربرد فراوانی دارد می‌توان به مدل کینتیکی میکایلیس–منتن اشاره کرد. این مدل به بررسی رابطه بین سرعت واکنش هیدرولیز آنزیمی و غلظت سوبسترا می‌پردازد. در واقع به کمک این مدل می‌توان سرعت واکنش آنزیمی را در هر غلظتی از سوبسترا به دست آورد.

بنابراین با توجه به مطالب یاد شده در مطالعه حاضر به بررسی فرآیند هیدرولیز آنزیمی نشاسته و مدل کینتیکی آن با استفاده از مدل میکائلیس–منتن توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به منظور تولید گلوکز پرداخته شد. همچنین مراحل و میزان اتانول تولیدی از نشاسته هیدرولیز شده توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* بررسی شد.

مواد وروش ها

الف) مخمر و محیط کشت: در این مطالعه ابتدا میکروارگانیسم‌های مورد استفاده شامل قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (DSMZ 823) و مخمر *ساکارمایسیس سرویسیه* PTCC 5269 از وزارت علوم وتحقیقات فناوری، سازمان پژوهشی‌های علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی وعفونی) به صورت پودر لیوفلیزه در ویال های سترون تهیه شد و سپس در محیط کشت استریل، کشت گردید.

ب) هیدرولیز آنزیمی:

۱– محیط کشت اولیه و ذخیره آسپرژیلوس نایجر: به منظور تهیه محیط‌های کشت اولیه و ذخیره *آسپرژیلوس نایجر*، از محیط کشت آگار در تشتک‌های استریل یکبار مصرف و کشت‌های شیب‌دار استفاده شد. ابتدا یک سوسپانسیون از پودر لیوفلیزه آسپرژیلوس *نایجر* در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه گردید. از این سوسپانسون به عنوان مایه تلقی برای تهیه کشت‌های خیره استفاده شد. تشتک‌ها و محیط های شیب دار تلقیح شده در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۸ ساعت قرار داده شدند. به طوری که پس از ۲٤ ساعت، رشد رشته‌های رویشی سفید قارچ بر روی سطح آگار مشاهده شد. اسپورهای سیاه رنگ پس از ٤۸ ساعت ظاهر شدند. در ادامه محیط های شیب دار در دمای ۲۰– درجه سلیسیوس ذخیره شدند. تشتک‌ها به عنوان کشت‌های اولیه و مصرفی برای استفاده در مراحل بعدی در دمای ٤ درجه سلیسیوس نگهداری شدند (۱٦).

۲– آماده سازی محیط کشت رشد: برای آماده سازی محیط کشت تکثیر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از ترکیبات (گرم بر لیتر) شامل: ساکاروز ۳۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر ۱، پتاسیم هیدروژن فسفات ۱/۵، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۱، منیزیم سولفات ۲/۵، آمونیوم سولفات ۹، سولفات آهن ۰/۰۰۵، سولفات منگنز ۰/۰۱٦، کلرید کبالت ۹/۲ و سولفات روی ۰/۰۰۱٤ (مرک و سیگما) استفاده شد. پس از آماده‌سازی، محیط کشت در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. عمل تلقیح قارچ موجود در محیط کشت اولیه با استفاده از لوپ آزمایشگاهی استریل شده به آن انجام پذیرفت. سپس محیط کشت حاوی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در انکوباتور در دمای ۳۰ سلیسیوس و pH ۵ به مدت ۵ روز تا رسیدن به مرحله نمایی رشد (٤۸ ساعت اولیه پس از تلقیح) و تزریق به محیط کشت حاوی نشاسته نگهداری شد. همچنین در طول مراحل آزمون، تنظیم pH با اسید سولفوریک (H_2SO_4) ۱ مولار و سود (NaOH) ۱ مولار (مرک، آلمان) صورت پذیرفت (۱۷).

۳– *هیدرولیز آنزیمی:* به منظور انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی

نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* ابتدا محیط کشت حاوی نشاسته آماده (۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی نشاسته در ارلن‌های با حجم ۵۰۰ میلی لیتر ریخته شد) و پس از استریل شدن عمل تلقیح قارچ به نسبت ۵ درصد محیط کشت نشاسته صورت گرفت (۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی قارچ). باتوجه به رشته ای بودن قارچ آسپرژیلوس *نایجر* در مرحله تلقیح به محیط کشت حاوی نشاسته جهت محاسبه نسبت ۵ درصد، میزان ۵ درصد از میزان حجم محیط کشتی که باید قارچ به آن افزوده شود محاسبه گردید. به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت حاوی نشاسته، ۵ میلی لیتر از محیط کشت رشد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به استفاده از سرنگ برداشته شد و به محیط کشت نشاسته به منظور هیدرولیز و تولید تزریق گردید. سپس برای بررسی مراحل تولید گلوکز در طی مدت ۸٤ ساعت، و از زمان صفر (لحظه انجام عمل تلقیح قارچ به محیط کشت) تا مدت زمان ۸٤ ساعت پس از تقلیح آن؛ هر ۱۲ ساعت یک نمونه (حجم ۲ میلی‌لیتر) از محیط کشت برای اندازه گیری قند تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* برداشت شد. طراحی آزمون شامل ۲ سری آزمایش و با غلظت نشاسته ٤۰ گرم بر لیتر به منظور مطالعه تاثیر گستره pH (٤/۵، ۵ و ۵/۵) و دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤۰ درجه سلیسیوس) بر روی توانایی قارچ *آسپیژیلوس نایجر* در هیدولیز آنزیمی نشاسته و در نتیجه انتخاب pH و دمای بهینه جهت تولید گلوکز می‌باشند.

ج) مدل کینتیکی هیدرولیز آنزیمی تولید گلوکز توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر: پس از دست یابی به شرایط بهینه رشد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به منظور بررسی مدل کینتیکی هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط آن از مدل کینتیکی میکائلیس–منتن استفاده شد. به منظور بررسی مدل، یک سری آزمایش با غلظت‌های مختلف نشاسته شامل غلظت های ۱۵، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ (گرم بر لیتر) در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و pH ۵ طراحی شد. در هر آزمایش ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی نشاسته با غلظت مشخص در ارلن‌های با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد و از زمان صفر(زمان تلقیح قارچ به محیط کشت) تا مدت زمان ۸٤ ساعت پس از تلقیح هر ۱۲ ساعت ۱ نمونه از محیط کشت برای اندازه‌گیری قند تولیدی توسط قارچ گرفته شد. همچنین به منظور بررسی مدل کینتیکی هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلویس نایجر* با استفاده از مدل میکائلیس–منتن از نمودار سرعت واکنش در مقابل غلظت سوبسترا استفاده شد (معادله ۱) (۱٤).

$$V = \frac{V \max Cs}{Km + Cs} \qquad (۱)$$

در این معادله V سرعت واکنش، V_{max} حداکثر نرخ سرعت واکنش، K_m ثابت سرعت واکنش و C_s غلظت سوبسترا می‌باشد. اصولاً تعیین و اندازه‌گیری مستقیم V_{max} و K_m در رابطه میکائلیس– منتن نیاز به غلظت های بالای سوبسترا دارد که برای رسیدن به شرایط اشباع غیر عملی است (۱۸). زیرا افزایش غلظت سوبسترا ممکن است موجب ایجاد شرایط نامناسب برای انجام فرآیند (واکنش هیدرولیز آنزیمی) از روش تغییر عواملی مانند pH گردد. به عنوان نمونه افزایش قابل توجه غلظت سوبسترا می‌تواند موجب حذف مهار کننده رقابتی (مهارکننده های که برای اتصال به آنزیم آزاد با سوبسترا رقابت می‌کنند) گردد. در این حالت V_{max} ثابت می‌ماند، اما K_m افزایش می‌یابد. این امر موجب کاهش سرعت یا متوقف شدن واکنش آنزیمی می‌گردد (۱۹).

از طرف دیگر شواهد نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، سرعت واکنش افزایش می‌یابد تا اینکه تمام مولکول های آنزیم اشباع شوند. پس از آن، افزایش غلظت دیگر اثری بر روی سرعت ندارد و سرعت مستقل از غلظت عمل می‌کند. بنابراین تخمین V_{max} با استفاده از معادله ۱ مشکل می باشد. به همین دلیل برای تعیین این پارامترها نیاز به شکل خطی این معادله می‌باشد. که می‌تواند با استفاده از نمودارهای مختلفی مانند lineweaver-Burk و Eadie-Hofstee مقدار این پارامترها را تعیین نماید. در این مطالعه به منظور تعیین مقدار V_{max} و Km از روش Line weaver –Burk، به دلیل اینکه رابطه بین متغیرهای مستقل و وابسته را نسبت به سایر نمودارها بهتر نشان می‌دهد، استفاده شد (معادله ۲).

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V} + \frac{Km}{Vm}\frac{1}{Cs} \qquad (۲)$$

در این روش با رسم نمودار تغییرات عکس سرعت واکنش (1/V) در مقابل عکس غلظت سوبسترا (S/1) یک خط مستقیم به دست می‌آید. به طوری که محل برخورد این خط با محور عرض ها نقطه 1/V و شیب آن برابر با Km/V_{max} می‌باشد. در نتیجه با جایگزینی مقادیر به دست آمده (عرض از مبدا و شیب خط) محاسبه V_{max} و K_m بر اساس این معادله امکان‌پذیر خواهد بود (۱۸).

د) فرآیند تخمیر: محیط کشت تکثیر مخمر ساکارومایسس سرویسیه حاوی ترکیبات (گرم بر لیتر): گلوکز ۱۵، عصاره مخمر ۱، پتاسیم هیدروژن فسفات۱۰، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۵، منیزیم سولفات ۲/۵ و آمونیوم سولفات ۹ آماده شده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. پس از استریل کردن محیط کشت و سرد شدن در دمای محیط در شرایط کاملاً استریل و در نزدیک شعله عمل تلقیح مخمر با استفاده از لوپ آزمایشگاهی سترون از روی محیط رشد آگار برداشته و به محیط کشت مایع (رشد) انجام پذیرفت (۲۰). پس انجام عمل تلقیح، محیط کشت حاوی مخمر در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و pH ٤/٥ در فاز تاخیری تا مرحله نمایی رشد مخمر، و تزریق به محیط کشت به دست آمده از مرحله هیدرولیز آنزیمی نگهداری شد. پس از دست یابی به شرایط بهینه تولید گلوکز توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، نشاسته در شرایط بهینه هیدرولیز گردید. پس از تعیین میزان گلوکز آن، ۱۵۰ میلی لیتر از آن در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری به منظور تولید اتانول ریخته شد. پس از اتوکلاو نشاسته هیدرولیز شده، عمل تلقیح مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* به نسبت ۳ درصد (۱۵ میلی‌لیتر) حجم محیط کشت (نشایسته هیدرولیز شده) در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری قند کل، اتانول تولیدی و غلظت زی توده در طول فرآیند تخمیر از زمان صفر تا ٢٤ ساعت هر ٤ ساعت ۳ نمونه از محیط کشت گرفته شد. است در این مطالعه به منظورتولید اتانول از پساب هیدرولیز شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از غلظت گلوکز اولیه ۲۷ گرم بر لیتر استفاده شد (۲۰ و ۲۱).

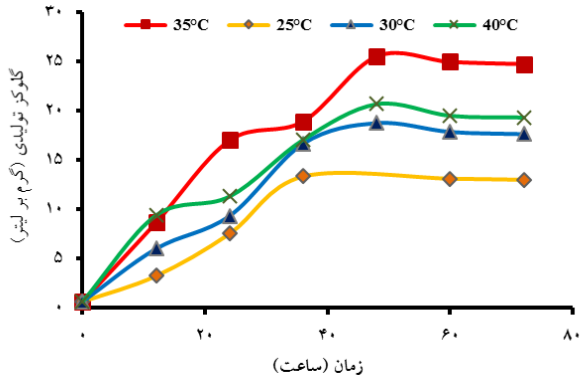
ه) اندازه‌گیری قند، اتانول تولیدی و غلظت بیومس: در این مطالعه برای تعیین غلظت قند تولید شده توسط قارچ *آسپیرژیلوس نایجر* و همچنین قند مصرف شده توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* از روش DNS استفاده شد. برای تهیه محلول DNS (3 و 5–دی نیتروسالیسیلیک‌اسید) ابتدا ۲۰ گرم از سود (سدیم هیدرواکسید) در آب یون زدایی شده حل شد. پس از سرد شدن، در بالن حجمی به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از آن ۱۰ گرم از DNS به ۲۰۰ میلی‌لیتر از سود ۲ مولار اضافه گردید. ترکیب به دست آمده بر روی هیتر گذاشته و یک مگنت برای هم زدن محلول درون آن قرار داده شد تا زمانی که نمک کاملاً حل شود. همزمان با این عمل ۳۰۰ گرم پتاسیم سدیم تارتارات (ساخت شرکت شارلو) به طور جداگانه در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب یون زدایی شده ریخته و تا حل شدن کامل گرم شد. سپس دو محلول به دست آمده در شرایطی که هر دو داغ هستند به هم اضافه شدند. این مرحله باید بدون تاخیر انجام شود تا از رسوب محلول جلوگیری شود. پس از سرد شدن در یک ارلن حجمی ۱ لیتری ریخته و با آب یون زدایی شده به حجم رسانده شد. به منظور تعیین غلظت قندها در طول فرایند آزمون ابتدا منحنی کالیبراسیون آنها رسم گردید (۲۲). در نهایت بر اساس منحنی مورد نظر میزان قند محلول (تولیدی یا مصرفی) مطابق با روش موجود اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون ۱ میلی‌لیتر از گلوکز با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤، ۰/٥، ۰/٦، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ و ۱ (گرم بر لیتر) در ۱۰ سری لوله آزمایش تهیه شدند. سپس به هر یک از آن‌ها ۱ میلی‌لیتر معرف DNS اضافه گردید. همین کار با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان نمونه شاهد نیز انجام شد. محلول‌های بالا به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و پس از این مدت بلافاصله به حمام آب یخ منتقل گردیدند (برای متوقف کردن سریع واکنش). پس از سرد شدن ۸ میلی‌لیتر آب مقطر به هر یک از آن‌ها اضافه شد و میزان جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway 6305, UK) و در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت گردید (۲۲).

برای تعیین زی‌توده سلولی یکی از نمونه های گرفته شده ۳ بار رقیق شد و میزان جذب آن در طول موج ٦٢٠ نـانـومـتـر بـا اسپکتروفتومتر (JENWAY, 6305, UK) تعیین شد. سپس وزن خشک سلولی با استفاده از نمودار کالیبراسیون (میزان جذب بـه دست آمده در ٦٢٠ نانومتر درمقابل وزن خشک سـلـولـی) بـه دست آمد. همچنین به منظور اندازه‌گیری غلظت اتانول تولیـدی به مدت ٢٤ ساعت هر ٤ ساعت یکبار از محیط کشـت حـاوی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* یک نمونه (به حجم ۳ میلی‌لیتر) برداشت شد. پس از سانتریفیوژ کردن آن، نمونه مستقیـمـاً بـه دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. در این مطالعه بـرای اندازه‌گیری غلظت اتانول از دستگاه کـروماتـوگـرافـی گـازی Philips PU 4400, England مجهز به آشکارساز FID و نـرم افزار (Clarity 402, Data Apex, Czech Republic) اسـتـفـاده گـردیـد. هـمـچـنـیـن از سـتـون شـیـشـه‌ای پـرشـده (USA ،PEG20M philips) به طول ۵/۱ متر و و قطر داخـلـی ۸/۱ میلی‌متر با گاز حامل نـیـتـروژن بـا جـریـان ۳۰ ml/min استفاده شد (۲۱).

و) آزمون آماری: به منظور انجام محاسبات، رسم نمـودارهـا و بررسی مدل رگرسیونی کینتیک هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مقایسه همبستگـی بـیـن داده‌هـای تجربی با مدل مورد نظر از نرم‌افزار مایکروسافت آفیس ۲۰۱۰ استفاده گردید.

یافته‌ها

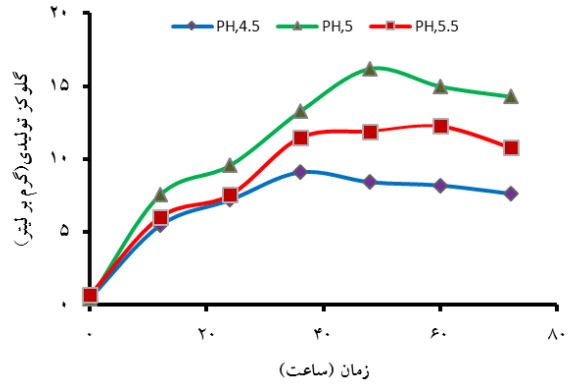
الف) اثر دما و pH بر روی میزان تولید گلوکز تـوسـط قـارچ آسپرژیلوس نایجر: نتایج بررسی اثر دماهای مختلف بـر روی فعالیت و توانایی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در هیدرولیز نشاسته جهت تولید گلوکز در نمودار ۱ نشان داده شده اسـت. هـمـان طور که مشاهده می‌شود بالاترین و کمترین مـقـدار گـلـوکـز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در طول دوره زمانی ٣٦ تا ٤٨ ساعت پس از تلقیح قارچ به ترتیب در دمای ۳۵ و ۲۵ درجه سلسیوس به میزان ۲۷ و ٤/١٣ گرم بر لیتر به دست آمد. همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر pH اولیه محیط کشـت بـر



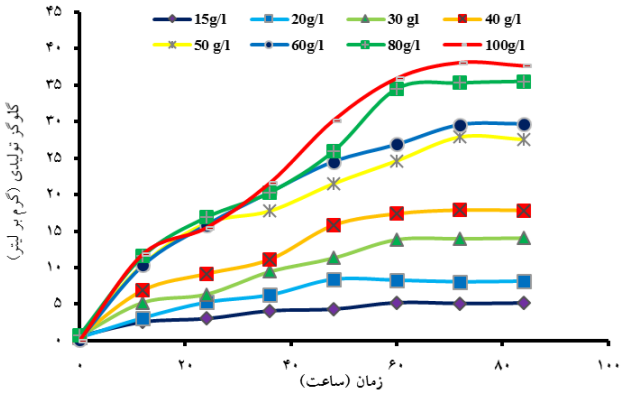
نمودار ۱: تاثیردماهای مختلف بر روی میزان گلوکز تولید شده توسط قـارچ *آسپرژیلوس نایجر* (گرم بر لیتر).

روی فعالیت و توانایی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در هیـدرولـیـز نشاسته جهت تولید گلوکز در نمودار ۲ نشان داده شده اسـت. همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود بالاترین میزان گلوکـز تولیدی در مدت زمان ٣٦ تا ٤٨ ساعت پس از تلقیح در pH ۵ به میزان ١٦/٢ گرم بر لیتر به دست آمد.

ب) مدل کینتیکی هیدرولیز آنزیمی تولید گلوکز توسط قـارچ آسپرژیلوس نایجر: میزان گلـوکـز تـولـیـدی تـوسـط قـارچ *آسپرژیلوس نایجر* در غلظت‌های مختلف نشاسته در نمودار ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افـزایـش غلظت نشاسته محیط کشت میزان گلوکز تولیدی افزایش یافـتـه است. به طوری که بیشترین و کمترین میزان گلوکز تولیدی بـه ترتیب در غلظت ۱۰۰ و ۱۵ گرم بر لیتر در مدت زمان ٤٨ تـا



نمودار ۲: تاثیر گستره های مختلف pH بر روی میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (گرم بر لیتر).

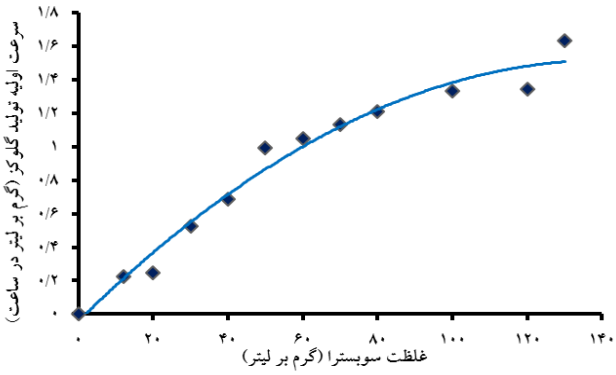


نمودار ۳: میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در غلظت های مختلف برحسب (گرم بر لیتر).

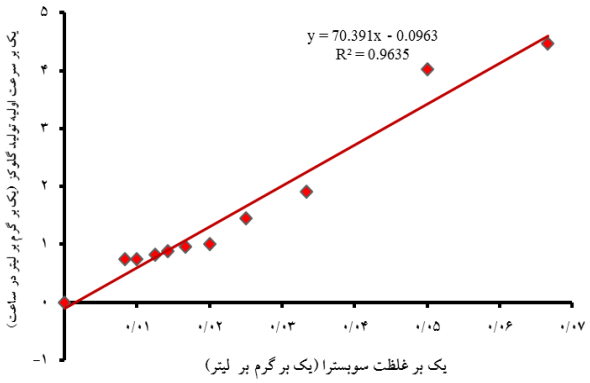
۶۰ ساعت پس از شروع واکنش به دست آمده است. به منظور بررسی مدل کینتیکی هیدرولیز آنزیمی با استفاده از مدل کینتیکی میکائلیس–منتن از نمودار میزان سرعت اولیه تولید گلوکز در مقابل غلظت سوبسترا استفاده شد (نمودار ٤).

همچنین به منظور تعیین پارامترهای مدل از نمودار Line Burk–weaver استفاده شد. که در واقع این نمودار به شکل یک خط راست با عرض از مبدا $1/V_{max}$ و شیب خط برابر K_m/V_{max} می باشد (نمودار ۵).

با توجه به این نمودارمعادله میکائلیس–منتن V_{max} و K_m به ترتیب برابر ۱۰/٤۱ و ۷۳/۲۳ به دست آمد. مقایسه همبستگی بین داده‌های تجربی با مدل نشان از همبستگی R^2= ۰/۹۲ بالای این دادها با مدل مورد مطالعه می‌باشد. نتایج بررسی کینتیک هیدرولیز آنزیمی با استفاده از معادله ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سوبسترا سرعت واکنش و در نتیجه میزان



نمودار ٤: هیدرولیز آنزیمی به صورت تابعی از غلظت های مختلف سوبسترا به کمک مدل میکائلیس – منتن.



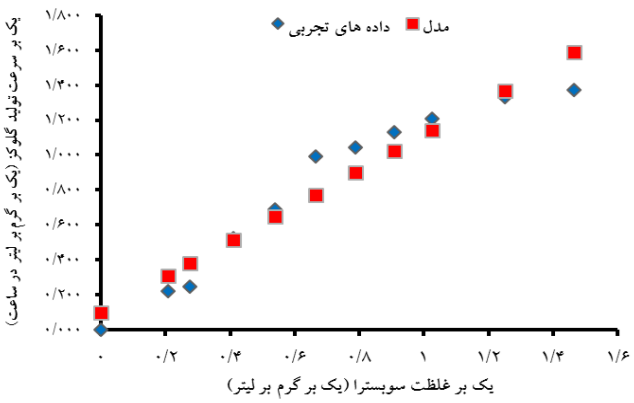
نمودار ۵: نمودار Line weaver–Burk معادله میکائلیس–منتن.

گلوکز تولیدی افزایش می یابد. اما این افزایش به صورت خطی نبوده و در غلظت‌های بالاتر اثر بازدارندگی ایجاد می‌کند.

$$V = \frac{10.41 \times Cs}{733.23 \times Cs} \qquad (۳)$$

به منظور ارزیابی و تجزیه و تحلیل دقیق مدل، از رگرسیون خطی استفاده شد. نتایج رگرسیون و پارامترهای مدل که در آن V سرعت هیدرولیز یا سرعت گلوکز تولیدی برحسب (گرم بر لیتر در ساعت)، V_{max} حداکثر نرخ سرعت واکنش، K_m ثابت سرعت واکنش و C_S غلظت سوبسترا برحسب (گرم بر لیتر) می‌باشد. نتایج نشان داد که میزان همبستگی (R^2) داده‌های آزمایشی با مدل ۰/۹۳ می‌باشد. همچنین مقادیر بالای F-value برابر ۱۰٤/٦۸ و کم بودن p-value بیانگر معنی‌دار بودن و همبستگی بالای داده‌های تجربی با مدل می‌باشد (نمودار ٦).

ج) بررسی میزان بیومس و اتانول تولیدی به وسیله مخمر ساکارومایسس سرویسیه از پساب هیدرولیز شده توسط قارچ



نمودار ٦: مقایسه بین سرعت پیش بینی شده توسط مدل و داده های تجربی به دست آمده از آزمایشات.

آسپرژیلوس نایجر: براساس مطالعات صورت گرفته یک گرم گلوکز از نظر تئوریکی می‌تواند ۰/۵۱ گرم اتانول تولید کند. بنابراین ۵۱ درصد گلوکز می‌تواند به اتانول تبدیل شود. همان طور که در نمودار ۷ مشاهده می‌شود، میزان تولید اتانول ابتدا با یک فاز تاخیری شروع شده و پس از ٤ الی ٦ ساعت وارد فاز رشد نمایی می گردد. پس از گذشتن از فاز رشد نمایی به یک میزان ثابت می‌رسد. به طوری که در غلظت های بالا این مراحل با وضوح بیشتری دیده می‌شود.

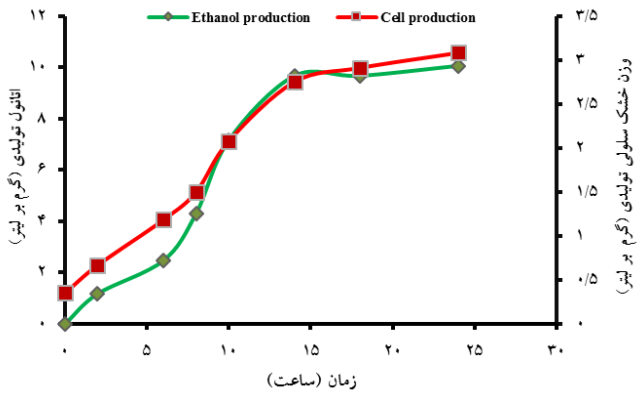
نتایج حاصل از بررسی میزان اتانول تولیدی از پساب هیدرولیز شده با غلظت گلوگز ۳۲ (گرم بر لیتر) نشان داد که بیشترین میزان اتانول تولیدی و همچنین بیشترین میزان بازده تولیدی آن به ترتیب ۱۰/۰۵ (گرم اتانول بر گرم کلوکز) و ۰/۳۸ g ethanol/g total sugar (گرم اتانول بر میزان قند کل) می‌باشد. همچنین یافته‌های حاصل از بررسی رشد مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* در فرآیند تخمیر نشان داد (نمودار ۷) که مخمر در ساعت های اولیه پس از تلقیح در مرحله فاز تاخیری رشد قرار دارد و پس از آن وارد مرحله نمایی رشد می‌شود و تا زمان ١٤ الی ١٦ ساعت به حداکثر رشد خود می‌رسد. پس از آن نهایتاً وارد فاز مرگ می‌شود. همان طور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان تولید بیومس ۳/۰۸ گرم بیوماس و همچنین بیشترین بازده وزن خشک سلولی ۰/١٤ g CDW/g total sugar بود.

د) چگونگی تغییرات میزان قند پساب در فرایند تخمیر: همان طور که در نمودار ۸ مشاهده می‌شود، میزان گلوکز موجود در محیط کشت با شروع فرآیند تخمیر توسط سلول های مخمر به مصرف رسیده و کاهش می یابد. همچنین هماهنگی بین کاهش میزان غلظت گلوکز کل با تولید اتانول بیانگر مصرف قند توسط مخمر و تولید اتانول می‌باشد.

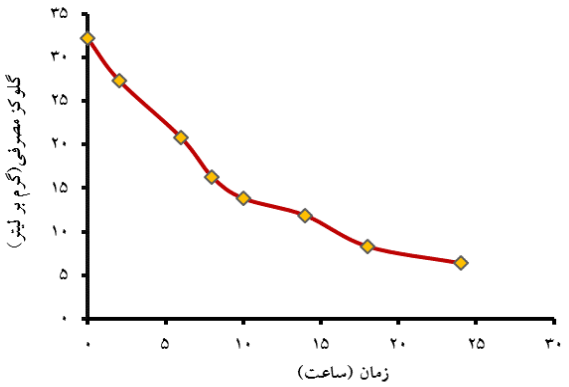
بحث

امروزه اتانول رایج‌ترین سوخت زیستی موجود در جهان است که می‌تواند از مواد مختلف قندی، نشاسته‌ای، سلولزی و دیگر مواد کربوهیدراتی تولید شود. این سوخت بسته به نوع سوبسترای اولیه می‌تواند به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم از طریق فرآیندهایی مانند هیدرولیز و تخمیر به دو روش جداگانه یا همزمان از مواد مختلف به کمک میکروارگانیسم‌های گوناگون تولید گردد (۲۳).

فرآیند هیدرولیز آنزیمی و تخمیر جداگانه توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* یکی از مهمترین فرآیندهای تولید اتانول است. کینتیک هیدرولیز آنزیمی با بررسی سرعت واکنش‌های آنزیمی و اینکه چگونه تحت تاثیر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مختلف قرار می‌گیرند، اطلاعاتی در مورد مکانیسم های اساسی واکنش آنزیمی در اختیار قرار می‌دهد. همچنین با محاسبه سرعت واکنش های آنزیمی می‌توان به اطلاعاتی مانند زمان واکنش، بازده تولیدی و نحوه بهینه سازی شرایط واکنش (در طراحی



نمودار ۷: منحنی تغییرات میزان زی توده و اتانول تولیدی توسط مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* طی فرآیند تخمیر بر حسب (گرم بر لیتر).



نمودار ۸: منحنی کاهش میزان گلوکز (گرم بر لیتر) محیط کشت توسط مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* در طول فرآیند تخمیر.

راکتورهای زیستی بسیار مهم است)، دست یافت (۲٤).

نتایج بررسی ثابت‌های کینتیکی مدل میکائلیس–منتن با استفاده از نمودار Lineweaver–Burk نشان داد که V_{max} و K_m به ترتیب برابر ۱۰/۰٤ و ۷۳/۳٤ می‌باشد. گروس (Grous) و همکاران به بررسی کینتیک هیدرولیز آنزیمی سلوبیوز به منظور تولید گلوکز با استفاده از آنزیم سلوبیاز تولیدی توسط دو قارچ *تریکودرما تیسیه* و *آسپرژیلوس نایجر* با غلظت اولیه سوبیاز ۲۷ mmol/l به کمک مدل کینتیکی میکائلیس–منتن پرداختند. نتایج آنها نشان داد که ثابت‌های کینتیکی Vmax و Km به ترتیب برابر ۱۳/۰٤ و٤۷۲ می‌باشند (۲۵). میزان K_m پایین در مقایسه با مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از استفاده همزمان دو آنزیم باشد که در واقع اثر ترکیبی آنها بیشتر از زمانی است که به صورت تنها هستند.

از میان عوامل موثر بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها، دما و pH از اهمیت زیادی برخوردار هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که در بین دماهای مختلف، دمای ۳۵ درجه سلسیوس بیشترین تاثیر را بر میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* می‌گذارد. به‌گونه‌ای که در دماهای بالاتر و پایین تر از ۳۵ درجه سلسیوس میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ کاهش می‌یابد.

اصولاً اکثر میکروارگانیسم‌ها و آنزیم های تولیدی توسط آنها در محدوده خاصی از دما و pH فعال هستند. به طوری که دماهای بالاتر یا پایین‌تر از این حد موجب کاهش شدید واکنش آنزیمی شده است. زیرا افزایش دما با شکستن پیوندهای یونی و هیدروژنی ساختار پروتئینی آنزیم‌ها را تخریب می‌کند. در نتیجه موجب کاهش واکنش آنزیمی می‌گردد. همچنین بررسی اثر گستره pH بر روی توانایی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در هیدرولیز نشاسته نشان داد که pH ۵ بیشترین اثر را بر روی میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس دارد. نتایج حاصل از این آزمایش با مطالعه سوهایل (Sohail) و همکاران در سال ۲۰۰۹ که به بررسی اثر pH و دماهای مختلف بر توانایی و رشد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در تولید آنزیم سلولاز پرداختند، مطابقت دارد (۲٦).

پدرسون (Pedersen) و همکاران در سال ۱۹۹۹ اثر pH های مختلف (گستره ۲/۵ تا ٦) را بر روی رشد و تولید آنزیم گلیکوآمیلاز مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که تغییرات pH تاثیر چندانی بر روی رشد و توانایی تولید آنزیم گلیکوآمیلاز ندارد. با این حال، نتایج آنها حاکی از آن بود که بیشترین مقدار آنزیم تولیدی در گستره pH ٤ تا ۵/۵ به دست آمده است. به طوری که بیشترین مقدار آنزیم تولیدی در pH ۵ مشاهده شد که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد (۲۷).

هرچند اکثر قارچ‌ها در دامنه pH ٤ تا ٦ فعال هستند، اما برای افزایش راندمان فعالیت آنها لازم است که pH مناسب آنها بهینه سازی شود. زیرا تغییرات pH، ترکیب پروتئین‌های دیواره سلولی را تغییر می دهد. به طوری که با کاهش آن، اسیدهای چرب غشا به فرم های اشباع‌تر تبدیل می‌شود. این امر محکم‌تر شدن و غیر قابل نفوذتر شدن آن و در نتیجه کاهش رشد و فعالیت میکروارگانیسم را به همراه دارد.

به طور کلی نتایج بررسی میزان زی‌توده و اتانول تولیدی به وسیله مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* از نشاسته هیدرولیز شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نشان داد که با افزایش غلظت گلوکز پساب هیدرولیز شده میزان اتانول تولیدی افزایش یافته است. به‌گونه ای که بیشترین میزان اتانول و بازده تولیدی آن (اتانول) به ترتیب ۱۰/۰۵ گرم بر لیتر و ۰/۳۸ (گرم اتانول بر میزان قند کل) به دست آمد. کریمی(Karimi) و بیگی (Beagi) در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثر ۳ عامل دما، pH و غلظت سوبسترا بر روی بازده اتانول تولیدی و گلیسرول به عنوان مهمترین محصول جانبی فرآیند تخمیر توسط قارچ *موکور ایندیکس* پرداختند (۲۸). یافته‌های آنها نشان داد که در شرایط بهینه مقدار پیشینه بازده اتانول و گلیسرول به ترتیب ۰/٤۳ گرم بر گرم و ۰/۸۹ میلی گرم بر گرم گلوکز بوده است.

ساها (Saha) و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مقایسه میزان اتانول تولیدی از کاه گندم با استفاده از فرآیند هیدرولیز و تخمیر به دو صورت همزمان و جداگانه توسط سویه نوترکیب *اشریشیا کلی* FBR5 پرداختند. در پایان اتانول به ترتیب به

میزان ۲۱/۹ و ۲٤/۹ گرم بر لیتر در هر فرآیند به دست آمد(۲۹). اصولاً میزان کربوهیدرات موجود در محیط کشت یکی از ترکیبات اساسی محیط کشت است که بر رشد و متابولسم مخمر بسیار تاثیر گذار است. زیرا در غلظت‌های پایین قند، مخمر دچار گرسنگی شده و بهره‌دهی آن به شدت کاهش می یابد. در حالی که در غلظت‌های بالای سوبسترا، بازدارندگی قند مانع از عمل آنزیم‌ها شده و سرعت تبدیل قند به اتانول کاهش می‌یابد (۲۰).

با توجه به عدم توانایی کامل هیدرولیز پساب توسط قارچ *آسپیرژیلوس نایجر* و در نتیجه میزان گلوکز پایین محیط کشت تخمیر می‌توان این احتمال را داد که میزان پایین اتانول تولیدی ناشی از پایین بودن میزان قند محیط کشت نسبت به مطالعات مشابه صورت گرفته باشد.

همچنین در این مطالعه میزان مصرف قند سوبسترا و رشد سلولی در طول فرایند تخمیر نشاسته توسط مخمر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش زمان میزان رشد سلولی افزایش می‌یابد. به طوری که بیشترین وزن خشک سلولی و بازده وزن خشک سلولی به ترتیب به میزان ۳/۰۸ گرم زی توده و ۰/۱٤ (گرم وزن خشک سلولی بر میزان کل گلوکز) به دست آمد. در همین راستا یافته‌ها نشان داد که فرآیند تخمیر نشاسته هیدرولیز شده توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* با کاهش قند کل همراه بوده و پس از پایان فاز رشد نمایی مخمر میزان قند سوبسترای تخمیر به میزان زیادی کاهش یافته است. بنابراین می‌توان بیان کرد که مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* به عنوان میکروارگانیسم اصلی تولید کننده اتانول قادر است قندهای موجود در نشاسته هیدرولیز شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* را به عنوان منبع کربنی مناسب جهت تولید اتانول استفاده نماید.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی فرآیند هیدرولیز آنزیمی نشاسته توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مدل کینتیکی آن با استفاده از مدل میکائلیس–منتن به منظور تولید گلوکز به منظور تولید اتانول پرداخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان نتیجه گیری کرد که قارچ *آسپرژیلوس نایجز* قادر به هیدرولیز آنزیمی نشاسته می‌باشد. مدل هیدرولیز آنزیمی بررسی شده قادر به پیش‌بینی داده‌های تجربی فرآیند یاد شده می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از فرآیند تخمیر نشاسته هیدرولیز شده می‌توان بیان کرد که مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* می‌تواند از قندهای موجود در نشاسته هیدرولیز شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به عنوان منبع کربنی مناسب به منظور تولید اتانول استفاده نماید. اما از طرفی پایین بودن میزان اتانول تولیدی و بازده آن می‌تواند ناشی از عواملی مانند کم بودن میزان گلوکز تولیدی در محیط تخمیر به دلیل عدم توانایی کامل قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در هیدرولیز کامل نشاسته و یا وجود عوامل بازنداره رشد مخمر شامل ترکیباتی مانند لاکتیک اسید و نمک های معدنی در محیط کشت باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقایان محسن میرزایی و سعید رحیمیان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Keller MW, Lipscomb GL, Nguyen DM, Crowley AT, Schut GJ, Scott I, Kelly RM, Adams MW. Ethanol production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by expression of bacterial bifunctional alcohol dehydrogenases. Microb Biotechnol. 2017; 3. DOI: 10.1111/1751-7915.12486.
2. Lavudi S, Oberoi HS, Mangamoori LN. Ethanol production from sweet sorghum bagasse through process optimization using response surface methodology. Biotech. 2017; 7: 233.

3. Hatami M, Younesi H, Bahramifar N. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of rice cooker wastewater by using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. J Appl Res Water Wastewater. 2015; 2(1): 103-107.

4. Liu, Z, Inokuma K, Shih-Hsin H, Riaanden H, Willem H Tomohisa H, Akihiko K. Improvement of ethanol production from crystalline cellulose via optimizing cellulase ratios in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng. 2017; 114: 1201-1207.

5. Moshi AP, Hosea KM, Elisante E, Mamo G, Mattiasson B. High temperature simultaneous saccharification and fermentation of starch from inedible wild cassava (*Manihot glaziovii*) to bioethanol using *Caloramator boliviensis*. Bioresour Technol. 2015; 180: 128-136.

6. Okonkwo CC, Azam MM, Ezeji TC, Qureshi N. Enhancing ethanol production from cellulosic sugars using *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. Bioprocess Biosyst Eng. 2016; 39(7): 1023-1032.

7. Verma G, Nigam P, Singh D, Chaudhary K. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. Bioresour Technol. 2000; 72(3): 261-266.

8. Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresour Technol. 2010; 101(13): 4744-4753.

9. Sebayang AH, Masjuki HH, Ong HC, Silitonga AS, Kusumo F, Milano J. Optimization of bioethanol production from sorghum grains using artificial neural networks integrated with ant colony. Ind Crops Prod. 2017; 97(2): 146-155

10. Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 69(6): 627-642.

11. Oberoi HS, Vadlani PV, Brijwani K, Bhargav VK, Patil RT. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. Process Biochem. 2010; 45(8): 1299-1306.

12. Sakthi SS, Saranraj P, Rajasekar M. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using paddy straw as substrate. Int J Adv Sci Tech Res. 2011; 1: 68-85.

13. Liu K, Zhang J, Bao J. Two stage hydrolysis of corn stover at high solids content for mixing power saving and scale-up applications. Bioresour Technol. 2015; 196 (2): 716-720.

14. Aderemi BO, Abu E, Highina BK. The kinetics of glucose production from rice straw by *Aspergillus niger*. Afr J Biotechnol. 2008; 7(11): 1745-1752.

15. Hatamimanesh M, Younesi H, Bahramifar N. The production of glucose used in ethanol production through an enzymatic hydrolysis of rice mill by *Aspergillus niger*. J Microb World. 2015; 8(3): 231-240. [In Persian]

16. Ardestani F, Kasebkar R. Non-structured kinetic model of *Aspergillus niger* growth and substrate uptake in a batch submerged culture. Brit Biotechnol J. 2014; 4(9): 970-977.

17. Amini M, Younesi H, Bahramifar N. Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus niger*: response surface methodology and isotherm study. Chemosphere. 2009; 75: 1483-1491.

18. Marangoni AG. Enzyme kinetics: a modern approach. Published Online. John Wiley & Sons; 2003. doi: 10.1002/0471267295.

19. Kothari R, Kumar V, Pathak VV, Ahmad S, Aoyi O, Tyagi VV. A critical review on factors influencing fermentative hydrogen production. Front Biosci. 2017; 22: 1195-1220.

20. Chen HC. Non-aseptic, multi-stage, multi-feeding, continuous fermentation of cane molasses to ethanol. Process Biochem. 1990; 25(3): 87-92.

21. Ghorbani F, Younesi H., Esmaeili Sari A, Najafpour G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. Renew Energy. 2011; 36(2): 503-509.

22. Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for dtermination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31(3): 426-428.

23. Gonçalves FA, Ruiz HA, Silvino dos Santos E, Teixeira JA, de Macedo GR. Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mo*bilis from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. Renew Energy. 2016; 94: 353-365.

24. Bailey JE, Ollis DF. Biochemical engineering fundamentals. Chemical engineering education. 1976.

25. Grous W, Converse A, Grethlein H, Lynd L. Kinetics of cellobiose hydrolysis using cellobiase composites from *Ttrichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. Biotechnol Bioeng. 1985; 27(4): 463-470.

26. Sohail M, Siddiqi R, Ahmad A, Khan SA. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. N Biotechnol. 2009; 25(6): 437-541**.**

27. Pedersen H, Nielsen J. The influence of nitrogen sources on the α-amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 53(3): 278-281.

28. Karimi k, Beagi A. Effect of temperature, pH and glucose concentration on ethanol production by the fungus *Mucor indicu*. Iran Chem Eng J. 2010; 9(50): 38-43. [In Persian]

29. Saha BC, Nichols NN, Qureshi N, Cotta MA. Comparison of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation processes for ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 92(4): 865-874.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Original Article

Kinetic study of starch enzymatic hydrolysis by *Aspergillus niger* and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*

Masoud Hatami Manesh[1], **Mousa Nazari**[2]

[1]Ph.D. student, Department of Environment, Malayer University, Hamadan, Iran.
[2]Ph.D. student, Science and Research branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The use of biological processes and optimizing them in order to produce biofuels such as ethanol is very important due to economic and environmental issues. Therefore, this study was conducted to investigate the kinetic model of starch enzymatic hydrolysis by *Aspergillus niger* and ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*.
Materials & Methods: The study was performed on a laboratory scale. The effect of different parameters such as pH and temperature on starch enzyme hydrolysis by *A. niger* was investigated. Also, the Michaelis-Menten's model was used to assess the Kinetic model of the enzymatic hydrolysis process. In order to produce ethanol from the hydrolyzed starch, *S. cerevisiae* (yeast) was used at the temperature of 25 °C and pH of 4.5.
Results: The results showed that the pH of 5 and the temperature of 35 °C have the highest effect on glucose production by *A. niger*. In addition, assessment of the kinetics and the constants of the model measured Vmax and Km as 10.41 and 73.23, respectively. Comparison between the experimental data and those predicted from the rate model indicated good agreement (R^2= 0.93). The results of ethanol production by *S. cerevisiae* on hydrolyzed medium with glucose initial concentration of 32 g/l showed the maximum ethanol production and cell dry weight as 10.04 g/l and 3.08 g/l, respectively.
Conclusion: According to the results of this study Michaelis–Menten kinetics model is able to predict enzymatic hydrolysis of starch. Furthermore, hydrolyzed starch can be used as an appropriate substrate for ethanol production.
Keywords: Ethanol, Michaelis–Menten kinetics model, *Aspergillus niger*, Enzymatic hydrolysis, *Saccharomyces cerevisiae.*

Correspondence to: Masoud Hatami Manesh

Tel: +98 9362155349

E-mail: masoud_hatami68@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 164-176.