Applied Biology, Volume 11, Issue 41, 2021

Research Article

Bio-butanol production from bread waste with using the amylolytic Clostridium isolated from Parishan Lake[1]

Maryam Mirzadeh | M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. mirzadeh_mr@yahoo.com
AbbasAli Rezaeian | Assistant Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran **(Corresponding Author).** rezaeianfon45@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Bio-butanol has been regarded as an alternative to petroleum fuels due to its renewability. The aim of this study was to produce bio-butanol using bread waste and environmental bacteria.

Materials and Methods: In this study, samples were randomly taken from the depth of 50 to 100 cm of Parishan Lake sediments. After culturing under anaerobic conditions and phenotypic diagnosis of the *Clostridium* genus, 16S rRNA primer was used for genotypic identification. Isolates were screened based on amylase activity in starch-agar medium. To evaluate the effect of environmental factors (pH, temperature and raw material) on amylase activity of the selected isolates, a modified culture medium containing starch was used. Then, in an optimal culture medium, merely consisting of water and dry bread, bio-butanol was produced and separated by fractional distillation. The accuracy of its presence was confirmed by chromic acid test and gas chromatography.

Results: Out of a total of 530 isolated bacteria, three clostridium isolates had the highest amylase activity and bio-butanol production, which after 16S rRNA sequencing, were registered as *Clostridium Beijerinckii* (KM999944), *Clostridium diolis* (KM999945) and *Clostridium roseum* (KM999946) in NCBI. The highest yield with a concentration of 2.344g/l in the culture medium containing 25g/l bread waste, pH7 and 35°C has been related to *Clostridium roseum*.

Conclusion: The results showed that under optimal conditions, environmental clostridia have a good potential for the production of bio-butanol from cheap raw materials like bread waste.

Keywords: Bio-butanol, Clostridium, Bread waste, Amylase enzyme, Parishan Lake.

1. **The present study is taken from:** Maryam Mirzadeh 's dissertation, entitled **Isolation and molecular identification of anaerobic bacteria producing biofuels from bread waste**, presented at the Islamic Azad University, Jahrom Branch.

Received: 2020/10/20 ; **Accepted:** 2021/03/23

**Copyright © the authors

http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۱، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

تولید بوتانول زیستی از ضایعات نان با استفاده از کلستریدیوم‌های آمیلولیتکی جدا شده از دریاچه پریشان[۱]

مریم میرزاده | کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. mirzadeh_mr@yahoo.com
عباسعلی رضائیان | استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران (**نویسنده مسئول**). rezaeianfon45@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: بوتانول زیستی به دلیل تجدیدپذیر بودن، به عنوان یک جایگزین برای سوخت‌های نفتی مورد توجه قرار گرفته است. هدف این پژوهش استفاده از باکتری‌های محیطی و ضایعات نان جهت تولید بوتانول زیستی می‌باشد.

روش‌شناسی: در این پژوهش، به طور تصادفی از عمق ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی متری رسوبات دریاچه پریشان نمونه تهیه شد. پس از کشت در شرایط بی‌هوازی و تشخیص فنوتیپی جنس کلستریدیوم، از پرایمر 16S rRNA جهت شناسایی ژنوتیپی استفاده گردید. جدایه‌ها براساس فعالیت آمیلازی در محیط کشت نشاسته-آگار غربالگری شدند. برای بررسی تأثیر فاکتورهای محیطی (pH، دما و ماده اولیه) بر فعالیت آمیلازی جدایه‌های منتخب، از یک محیط کشت تغییر شکل یافته حاوی نشاسته استفاده گردید. سپس در یک محیط کشت بهینه، صرفاً شامل آب و نان خشک، بوتانول زیستی تولید و بوسیله تقطیر جزء به جزء جداسازی شد. صحّت وجود آن با تست اسیدکرومیک و دستگاه کروماتوگرافی گازی تأیید گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۵۳۰ باکتری جدا شده، ۳ جدایه کلستریدیوم بیشترین فعالیت آمیلازی و تولید بوتانول زیستی را داشتند که پس از تعیین توالی 16S rRNA، با نام‌های کلستریدیوم بیجرینکی (KM999944)، کلستریدیوم دیولیس (KM999945) و کلستریدیوم روزئوم (KM999946) در NCBI ثبت گردیدند. بالاترین محصول با غلظت ۲/۳۴۴g/l در محیط کشت حاوی ۲۵g/l ضایعات نان، pH۷ و دمای ۳۵ درجه سلسیوس مربوط به کلستریدیوم روزئوم بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که در شرایط بهینه، کلستریدیوم‌های محیطی، پتانسیل خوبی برای تولید بوتانول زیستی از مواد اولیه ارزان قیمتی همچون ضایعات نان دارند.

کلیدواژه‌ها: بوتانول زیستی، کلستریدیم، ضایعات نان، آنزیم آمیلاز، دریاچه پریشان.

---

۱. **پژوهش حاضر برگرفته از:** پایان‌نامه کارشناسی ارشد مریم میرزاده، با عنوان **جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های بی‌هوازی تولیدکننده سوخت زیستی از ضایعات نان**، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۹ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۱/۰۳

۱. مقدمه

علی‌رغم اینکه سوخت‌های فسیلی مهم‌ترین منبع تولید انرژی محسوب می‌شوند، محدودیت ذاتی این سوخت‌ها و در نتیجه به پایان رسیدن آن‌ها، انتشار گازهای گلخانه‌ای ناشی از احتراق این سوخت‌ها و به دنبال آن گرم شدن کره زمین، باران اسیدی، افزایش سطح دریا، عقب کشیدن یخچال‌ها، از دست رفتن تنوع زیستی و...، توجه محققان را به جایگزین کردن انرژی در جهت کاهش این نگرانی‌ها جلب کرده است (۱،۲،۳). از میان انرژی‌های جایگزین، سوخت‌های زیستی (تولید شده از گیاهان و ضایعات) به دلیل تجدیدپذیر بودن و سازگاری با محیط زیست، به عنوان انتخابی مطلوب در نظر گرفته شده‌اند (۴،۵،۶). تاکنون تمرکز بر روی اتانول زیستی قرار داده شده که دلیل آن در دسترس بودن مواد خام برای تولید و روش‌های به خوبی توسعه یافته برای جداسازی و خالص‌سازی آن بوده است (۷،۸). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که استفاده از بوتانول زیستی به دلیل محتوا و چگالی انرژی بالاتر، حلالیت ناچیز در آب و آلودگی کم‌تر با آن، فشار بخار، فراریت و خورندگی کم‌تر، نقطه اشتعال بالاتر و تولید دی اکسید کربن خنثی مناسب‌تر می‌باشد (۹،۱۱،۱۰،۱۲). بوتانول به دو روش شیمیایی و زیستی تولید می‌شود که از میان این دو، روش زیستی تخمیر مورد توجه قرار گرفته است. با گذری اجمالی بر حوادث مهم قرن گذشته درمی‌یابیم که این روش ریشه‌ای دور در زمان دارد (۱۴،۱۳). برای اولین بار در سال ۱۸۶۲، لوئی پاستور[1] کشف کرد که بوتانول زیستی محصول تخمیری حاصل از فعالیت باکتری‌های بی‌هوازی (کلستریدیوم‌ها) است. پس از آن، موفقیت و توسعه این فرایند تولیدی، بنا به دلایل مختلف ازجمله جنگ‌های جهانی و گسترش صنعت پتروشیمی، به شدت تحت تأثیر قرار گرفته است. علی‌رغم وجود تاریخچه‌ای طولانی در تولید این الکل، استفاده از آن به جای سوخت در سال ۲۰۰۵ گزارش شده است (۱۵،۱۶). از آنجا که ماده اولیه برای تبدیل به بوتانول زیستی یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تخمیر و تولید بوده و بیش از ۶۰ درصد هزینه کل را به خود اختصاص داده است، بی‌شک استفاده از محصولات غیر قابل استفاده برای تولید، بسیار سودآورتر است (۱۸،۱۷). ضایعات نان حاوی ۵۹/۸ گرم نشاسته، ۱/۵۶ گرم نیتروژن آلی و ۸/۹ گرم پروتئین در ۱۰۰ گرم می‌باشد (۱۹).

1. Louis Pasteur

هدف مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های کلستریدیوم تولیدکننده بوتانول زیستی، بهینه‌سازی شرایط رشد میکروارگانیسم و استفاده از ضایعات نان به عنوان منبعی ارزان قیمت در جهت تولید بوتانول زیستی بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری و غربال‌گری گونه‌های کلستریدیوم

جمع‌آوری نمونه در شرایط استریل به صورت تصادفی از عمق ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی متری رسوبات دریاچه پریشان از ۳۰ نقطه انجام شد. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها (تا 10^{-3}) و متعاقباً شوک حرارتی، با بکارگیری محیط‌های کشت کوکت میت[1]، تیوگلیکولات[2] و میت لیور گلوکز[3] آگارجداسازی باکتری‌ها در شرایط بی‌هوازی صورت گرفت. جهت خالص‌سازی، جدایه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار کشت و درون جار بی‌هوازی به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها با استفاده از تست‌های استاندارد مندرج در کتاب باکتری‌شناسی سیستماتیک برجی مانوئل صورت گرفت (۲۰).

ب) بررسی اولیه تولید آنزیم آمیلاز

برای غربال‌گری جدایه‌های مختلفی که تاییدیه فنوتیپی گرفتند، در شرایطی کاملاً یکسان، تست آمیلاز گذاشته شد. به همین منظور از محیط کشت نشاسته- آگار، براساس قطر هاله ناشی از هیدرولیز نشاسته استفاده گردید و جدایه‌هایی که بیشترین هاله را تشکیل داده بودند، انتخاب شدند. قدرت آمیلازی جدایه‌ها با معرف لوگل مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱).

ج) استخراج DNA و بررسی ژنوتیپی

در ابتدا با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران)، DNA کلستریدیوم‌های منتخب، استخراج گردیدند و تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای بررسی ژنوتیپی، از جفت پرایمر 16S rRNA با توالی‌های 5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG3' به عنوان پرایمر رفت و

1. Cooked Meat Medium
2. Thioglycolate broth
3. Meat-liver Glucose Agar

5'TGACGGGCGGTGTGTACAAG3' به عنوان پرایمر برگشت با تشکیل باند ۱۰۴۷ bp استفاده شد (۲۲). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl شامل: ۲/۵µl از بافر PCR (با غلظت ۱۰X)، ۰/۴۵µl از هر نوکلئوتید، ۰/۴۵µl از $MgCl_2$، ۱µl از هر پرایمر، ۲µl آنزیم Taqپلی مراز، ۱µl از DNA ژنومی و ۱۶/۶µl از آب دیونیزه انجام شد. برنامه دمایی مورد نیاز برای انجام این واکنش شامل واسرشت اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ سیکل به صورت ۱ دقیقه واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲% با ولتاژ ۹۵ الکتروفورز گردید (۲۲).

د) سویه استاندارد

برای مقایسه میزان بوتانول زیستی تولید شده توسط جدایه‌ها، از سویه استاندارد کلستریدیوم استوبوتیلیکوم PTCC1492 (خریداری شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران) به عنوان سویه شاهد در تمام مراحل کار استفاده گردید. محیط کشت رینفورسد کلستریدیوم براث[1] برای فعال‌سازی و نگهداری این سویه بکار گرفته شد.

هـ) استانداردسازی سوسپانسیون میکروبی

از محیط کشت رینفورسد کلستریدیوم براث و دمای ۳۵ درجه سلسیوس برای تهیه کشت تازه میکروبی استفاده گردید و بعد از ۷ ساعت گرم‌خانه‌گذاری و معادل‌سازی غلظت آن با استاندارد نیم مک فارلند، به میزان مساوی در تمام آزمایش‌ها از آن استفاده شد.

و) بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم آمیلاز

به منظور بررسی تأثیر عوامل محیطی(pH، دما و غلظت نشاسته) بر فعالیت آمیلولیتیکی جدایه‌ها و بهینه‌سازی تولید، محیط کشت پایه تغییر شکل یافته‌ای مطابق با جدول ۱ ساخته شد. pH اولیه محیط کشت با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ مولار و اسید کلریدریک ۱ مولار بر روی ۶، ۷ و ۸ با دمای گرم‌خانه‌گذاری ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس تنظیم گردید. جهت تعیین غلظت نشاسته و بررسی فعالیت آنزیم آمیلاز از روش شرح داده شده توسط اسمیت و رو استفاده گردید (۲۳).

1. Reinforced clostridial broth

جدول ۱- مقایسه محیط Mineral base media با محیط تغییر شکل یافته آن

Mineral base media (MBM)	میزان برحسب گرم	محیط کشت MBM تغییر شکل یافته	میزان برحسب گرم
کربوهیدرات	۱۰	نشاسته	۵ -۵۰*
آمونیم دی هیدروژن فسفات	۱	آمونیم دی هیدروژن فسفات	۱
سدیم کلراید	۵	سدیم کلراید	۵
منیزیم سولفات ۷ آب	۱	منیزیم سولفات ۷ آب	۱
پتاسم هیدروژن فسفات	۱	پتاسم هیدروژن فسفات	۱
-	-	گلوکز	۲
-	-	پپتون	۴
-	-	آگار	۰/۶
آب	۵۰۰ میلی لیتر	آب	۱۰۰۰ میلی لیتر

* برحسب غلظت مورد نیاز

ز) تولید بوتانول زیستی

پس از بهینه‌سازی عوامل محیطی، با توجه به غلظت نشاسته موجود در ضایعات نان، محیط‌های کشت حاوی ۳۵۰ میلی لیتر آب و ۲۵ گرم بر لیتر پودر ضایعات نان (حاوی ۱۵ گرم بر لیتر نشاسته) با pHv و بدون اضافه کردن هرگونه ماده مغذی تهیه گردید و پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی، تمامی فرمانتورها به مدت ۷۲ ساعت در دمای۳۵ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. در انتهای دوره زمانی تخمیر، بوتانول و اتانول زیستی تولید شده در محیط کشت به وسیله دستگاه تقطیر جزء به جزء جداسازی شدند. صحت وجود این دو محصول با تست اسید کرومیک مورد تایید اولیه قرار گرفت و تایید نهایی نیز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام شد (۲۴).

ح) سینتیك رشد

به صورت مشابه و هم‌زمان با تولید بوتانول زیستی، محیط‌های کشتی به طور جداگانه ساخته شد و سینتیک رشد سویه‌ها، هر یک ساعت یکبار از طریق خوانش جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی گردید.

ط) توالی یابی و رسم درخت فیلوژنی نمونه‌های منتخب

به منظور خالص‌سازی و تعیین توالی قطعه ژنی تکثیر یافته (16S rRNA)، از کیت خالص‌سازی DNA از ژل (شرکت Roche، آلمان) استفاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی

(توسط شرکت پیشگام، تهران) با دیگر توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه و جهت تأیید این نتایج، با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 درخت فیلوژنی رسم گردید.

۲-۱. تجزیه و تحلیل آماری

از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ برای رسم نمودارها، میانگین داده‌ها و تعیین میزان خطا در سه تکرار استفاده شد.

۳. یافته‌ها

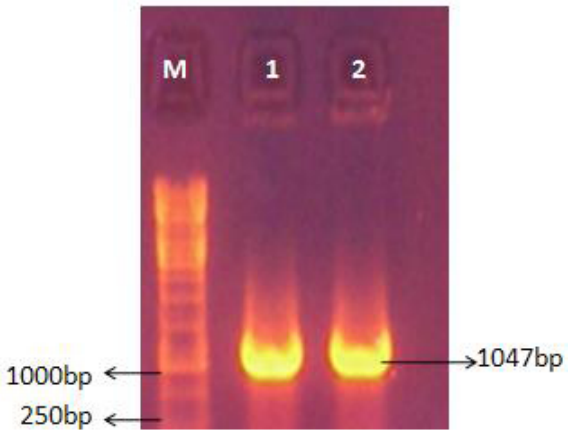
از مجموع ۵۳۰ باکتری جدا شده، ۱۲ جدایه مختلف کلستریدیوم با استفاده از تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بر مبنای 16S rRNA (شکل۱) جداسازی و خالص‌سازی شدند که از این بین، ۳ جدایه با بیشترین قدرت تجزیه نشاسته انتخاب و برای ادامه کار نام‌های KJ۹۰، AR۹۳ و MR۴۵ برای آنها در نظر گرفته شد.

طبق نتایج مندرج در جدول ۲، بررسی تأثیر pHهای ۶، ۷ و ۸ بر فعالیت آمیلولیتیکی سویه‌ها در دماهای ثابت ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس و غلظت ۵ گرم بر لیتر نشاسته نشان داد که pH۷ و دمای ۳۵ درجه سلسیوس می‌توانند شرایط بهینه‌ای برای تولید بوتانول زیستی را فراهم کنند. در نمودار ۱ و ۲ بررسی تأثیر pH و دما در سویه MR۴۵ به عنوان نمونه نشان داده شده است.

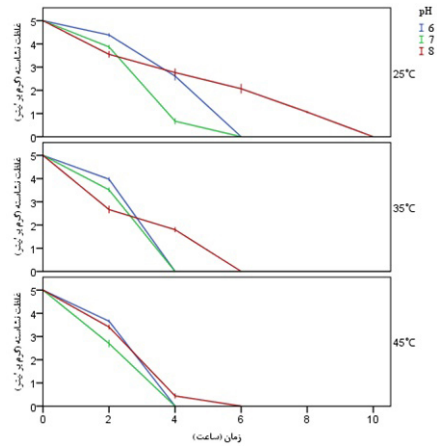
جدول ۲- بررسی تأثیر pH ها و دماهای مختلف بر فعالیت آمیلولیتیکی سویه‌های کلستریدیوم در غلظت ۵ گرم بر لیتر نشاسته

	۲۵°C	۳۵°C	٤٥°C
pH٦	**ساعت ششم** سویه شاهد/MR۴۵/KJ۹۰	**ساعت چهارم** سویه شاهد/MR۴۵/KJ۹۰	**ساعت چهارم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳/KJ۹۰
	ساعت هشتم AR۹۳	**ساعت ششم** AR۹۳	
pH۷	**ساعت ششم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳/KJ۹۰	**ساعت چهارم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳/KJ۹۰	**ساعت چهارم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳/KJ۹۰
pH۸	**ساعت دهم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳/KJ۹۰	**ساعت ششم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳/KJ۹۰	**ساعت ششم** سویه شاهد/MR۴۵/AR۹۳
			ساعت چهارم KJ۹۰

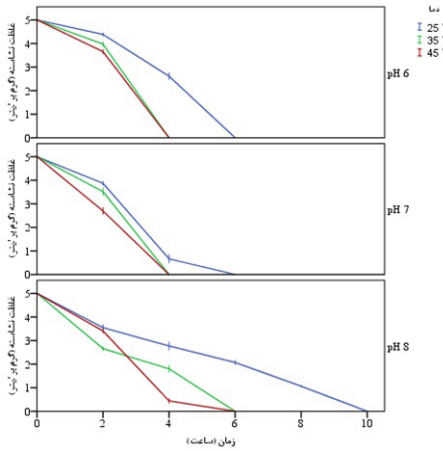
ساعت: ساعت به صفر رسیدن غلظت نشاسته



شکل ۱ – تصویر الکتروفورز ژل آگاروزِ 16S rRNA جنس کلستریدیوم
(M: مارکر، ۱: کنترل مثبت، ۲: نمونه MR٤٥)



نمودار ۱- تأثیر pH بر فعالیت آمیلولیتیکی سویه کلستریدیوم روزئوم MR٤٥



نمودار ۲- تأثیر دمابر فعالیت آمیلولیتیکی سویه کلستریدیوم روزئوم MR٤٥

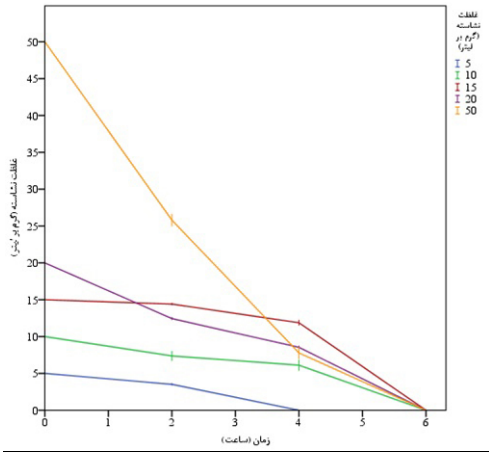
نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۵۰ گرم بر لیتر نشاسته بر فعالیت آمیلولیتیکی سویه‌ها در pHv و دمای ۳۵ درجه سلسیوس نشان داد که ترشح آنزیم‌های هیدرولیزکننده نشاسته به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر غلظت نشاسته محیط کشت قرار دارد، به گونه‌ای که با افزایش متناوب غلظت اولیه نشاسته ترشح و فعالیت این آنزیم‌ها به‌طور چشمگیری

افزایش یافته است.

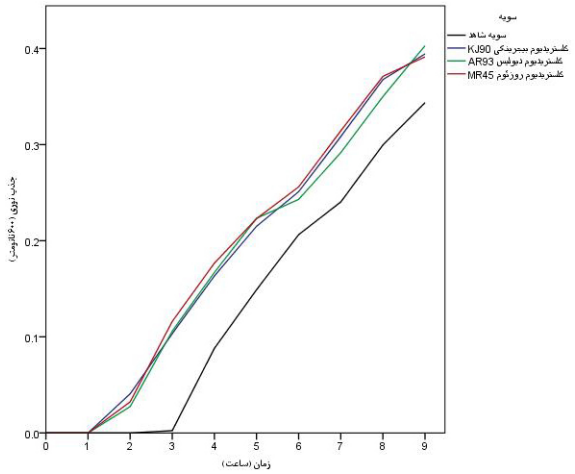
هیدرولیز نشاسته در همه محیط‌های کشت با غلظت‌های مورد بررسی، در تمام سویه‌ها به‌طور کامل صورت گرفته و هیچ نشاسته‌ای در محیط‌های تخمیری، در ساعت چهارم (با غلظت ۵ گرم بر لیتر در تمام سویه‌ها)، ساعت ششم (با غلظت ۵۰-۱۰ گرم بر لیتر در تمام سویه‌ها به جز سویه شاهد با غلظت ۵۰ گرم بر لیتر) و ساعت هشتم (با غلظت ۵۰ گرم بر لیتر در سویه شاهد) مشاهده نشد. در نمودار ۳ بررسی تأثیر غلظت نشاسته در سویه MR۴۵ به عنوان نمونه نشان داده شده است.

نمودار سینتیک رشد سویه‌ها در محیط‌های کشت بهینه حاوی ۲۵ گرم بر لیتر ضایعات نان با pH۷ و دمای ۳۵ درجه سلسیوس در نمودار ۴ نشان داده شده است.

سویه شاهد ۳ ساعت و هر سه سویه انتخابی، ۱ ساعت در فاز تأخیری رشد بوده‌اند و پس از این ساعات با مصرف و هیدرولیزنشاسته شروع به رشد کرده و وارد فاز نمایی رشد شدند. با گذشت زمان، مقدار آنزیم‌های ترشح شده به محیط‌های کشت، بیشتر و میزان رشد و تولید متابولیت‌های اسیدی افزایش یافته و چهار سویه در ساعت نهم به ماکزیمم فعالیت خود رسیده‌اند و در حالت مقایسه به ترتیب سویه AR۹۳>KJ۹۰>MR۴۵> شاهد، بیشترین غلظت سلولی را تولید کرده‌اند.



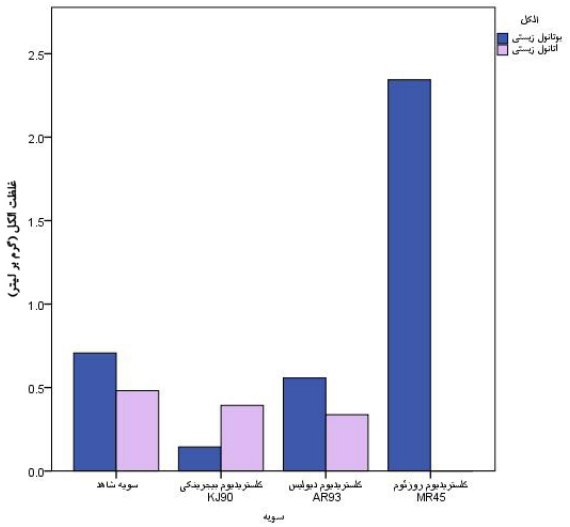
نمودار ۳- تأثیر غلظت نشاسته بر فعالیت آمیلولیتیکی سویه کلستریدیوم روزئوم MR٤٥



نمودار٤- سینتیک رشد سویه‌های مورد مطالعه در محیط‌های کشت بهینه حاوی۲۵ گرم بر لیتر ضایعات نان (۷ pH ودمای ۳۵ درجه سلسیوس)

۳-۱. تولید بوتانول زیستی

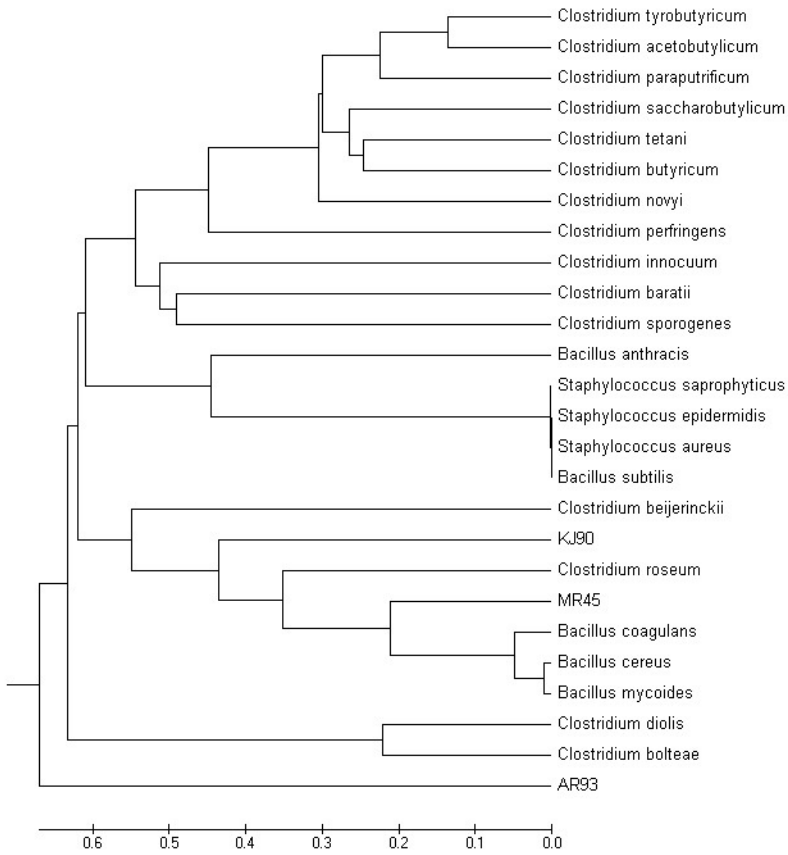
نتایج حاصل از جداسازی بوتانول و اتانول زیستی و بررسی میزان تولید نشان داد، که مقادیر ۰/۷۰۷ گرم بر لیتر بوتانول زیستی و ۰/۴۸۱ گرم بر لیتر اتانول زیستی، به وسیله سویه شاهد، ۰/۱۴۴ گرم بر لیتر بوتانول زیستی و ۰/۳۹۳ گرم بر لیتر اتانول زیستی به وسیله سویه KJ۹۰، ۰/۵۵۷ گرم بر لیتر بوتانول زیستی و ۰/۳۳۷ گرم بر لیتر اتانول زیستی به وسیله سویه AR۹۳ و ۲/۳۴۴ گرم بر لیتر بوتانول زیستی به وسیله سویه MR۴۵ تولید شده است. مورد آخر هیچ اتانول زیستی تولید نکرد (نمودار ۵).



نمودار ۵- مقایسه تولید بوتانول زیستی و اتانول زیستی توسط سویه‌های شاهد و KJ۹۰، AR۹۳، MR٤٥

۳-۲. نتایج توالی‌یابی

پس از تطبیق توالی و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 مشخص شد که شباهت ۹۹ درصدی بین ۳ جدایه منتخب و گونه‌های کلستریدیوم بیجرینکی، کلستریدیوم دیولیس و کلستریدیوم روزئوم وجود دارد. بنابراین، نام‌های کلستریدیوم بیجرینکی۹۰KJ، کلستریدیوم دیولیس۹۳AR و کلستریدیوم روزئوم MR۴۵ برای آنها انتخاب گردید و به ترتیب با شماره‌های دسترسی KM999944، KM999945 و KM999946 در بانک ژن ثبت شدند. در شکل ۲ درخت فیلوژنی سویه‌های ثبت شده نشان داده شده است.



شکل ۲- درخت فیلوژنی سویه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI)

٤. بحث

در این مطالعه با بکارگیری ضایعات نان به عنوان ماده اولیه، فعالیت آمیلولیتیکی گونه‌های کلستریدیوم جدا شده از رسوبات دریاچه پریشان و قدرت آنها در تولید بوتانول زیستی مورد بررسی قرار گرفت و با بهینه‌سازی شرایط محیطی (pH، دما و غلظت ماده اولیه)، سعی گردید تا محصول بیشتری تولید شود. نتایج این پژوهش نشان داد که کلستریدیوم روزئوم MR۴۵ در pH۷، دمای ۳۵ درجه سلسیوس و غلظت ۲۵ گرم بر لیتر پودر نان خشك (حاوی ۱۵ گرم بر لیتر نشاسته) و بدون افزودن هرگونه مکمّل‌های غذایی، در طی مدت زمان ۷۲ ساعت تخمیر، بالاترین مقدار بوتانول زیستی با غلظت ۲/۳۴۴ گرم بر لیتر را تولید کرده است.

کوئین[1] و همکاران (۲۰۱۸)، توانستند با استفاده از کلستریدیوم سویه HN۴ در یك فرایند تخمیری و با بکارگیری غلظت ۱۲۰-۳۰ گرم بر لیتر ضایعات غذایی در pH۶/۲ و دمای ۳۵ درجه سلسیوس، تولید بوتانول زیستی را بررسی کنند. نتایج نشان داد که بالاترین محصول (۱۴/۱۲ گرم بر لیتر) مربوط به ۱۲۰ گرم بر لیتر ضایعات غذایی بوده است (۲۵). در تحقیقی دیگر لو[2] و همکاران (۲۰۱۸)، با استفاده از پسماند نشاسته گندم و غنی‌سازی آن با کربوهیدارت و سایر مکمّل‌ها همچون نیتروژن و با تغییر درصد مواد محیط، موفق به تولید ۱۴/۷۲-۹/۴۱ گرم بر لیتر بوتانول زیستی شدند (۲۶). هوسین[3] و همکاران (۲۰۱۸)، نیز با بکارگیری کلستریدیوم استوبوتیلیکوم ATCC۸۲۴ و استفاده از۷۰ گرم بر لیتر همپاس ساگو[4] (ضایعات به دست آمده از فرآوری نشاسته ساگو) و اضافه کردن تشویق‌کننده‌های رشد، میزان ۴/۶۲ گرم بر لیتر بوتانول زیستی در pH۵/۵ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس تولید کردند (۲۷). جان راویندر[5] و همکاران (۲۰۱۹)، در پژوهشی موفق به جداسازی کلستریدیوم سویه AS3 از پساب کارخانه نشاسته‌سازی شدند. زباله‌های این کارخانه حاوی مقدار زیادی مواد لیگنوسلولزی نشاسته‌ای، به ویژه تفاله کاساوا می‌باشد. این تیم تحقیقی با بکارگیری منابع مختلف کربن (از جمله پسماند کاساوا) در

1. Queen
2. Luo
3. Hosín
4. Sago hampas
5. Johnravindar

pH۶/۳ و دمای۳۳ درجه سلسیوس، تولید بوتانول زیستی را مورد بررسی قرار دادند. بیشترین محصول با میزان ۶/۴۸ گرم بر لیتر در غلظت ۶۰ گرم بر لیتر پسماند کاساوا گزارش شده است که این میزان، با اضافه کردن ۲۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، به ۸/۰۱ گرم بر لیتر افزایش یافت (۲۸). مقایسه نتایج مطالعات فوق با نتیجه مطالعه حاضر همگی مؤید این نکته می‌باشد که افزایش در میزان ماده اولیه و اضافه کردن عوامل محرك رشد می‌تواند باعث افزایش بهره‌وری شود. لکن، با توجه به اینکه ضایعات نان علاوه بر نشاسته، حاوی ریزمغذی‌های دیگری هم می‌باشد و از طرف دیگر کاهش هزینه، یکی از شاخص‌های بهبود بهره‌وری است، لذا در این مطالعه، تصمیم گرفته شد که به غیر از تغییر شرایط محیطی، به ضایعات نان در محیط‌های تخمیری چیز دیگری اضافه نشود.

لین[1] و همکاران (۲۰۱۹)، از ۷۰ گرم بر لیتر آرد کاساوا تیمار شده با آنزیم آمیلاز، موفق به تولید ۱۱/۶ گرم بر لیتر بوتانول زیستی شدند (۲۹). در تحقیقی دیگر نیز، یانگ[2] و همکاران (۲۰۱۵)، با استفاده از نشاسته از پیش هیدرولیز شده جو، تولید بوتانول زیستی را بررسی کردند (۳۰). این در حالی است که در تحقیق حاضر با بکارگیری سینتیك رشد، سویه‌ای انتخاب گردید که بتواند در فاصله زمانی کوتاه مقدار ماده اولیه محیط کشت را به صفر برساند.

بدر[3] و همکاران (۲۰۰۱)، با بکارگیری سویه فوق آمیلولیتیکی کلستریدیوم استوبوتیلیکوم NRRL B-۵۹۴، محیط کشت TPSY حاوی غلظت ۵۰ گرم بر لیتر نشاسته محلول سیب زمینی با pH۷/۲ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، مقدار ۴/۲۰ گرم بر لیتر بوتانول زیستی تولید کردند (۳۱). در پژوهشی دیگر لی[4] و همکاران (۲۰۱۵)، با استفاده از سویه کلستریدیوم استوبوتیلیکوم GX۰۱ در محیط تخمیری حاوی۱۰۰ گرم بر لیتر نشاسته کاساوا و با اضافه کردن آرد سویا، موفق به تولید ۱۸/۳ گرم بر لیتر بوتانول زیستی در pH۶ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس شدند (۳۲). ال شورگانی[5] و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از غلظت ۶۰ گرم بر لیتر نشاسته بدون اضافه کردن مکمّل‌های

1. Leen
2. Yang
3. Badr
4. Li
5. Al-Shorgani

غذایی، pH۶ و گرم‌خانه‌گذاری سویه کلستریدیوم ساکاروپربوتیل استونیکوم (۱۳۵۶۴) N۱-۴ در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، میزان ۳/۹۶ گرم بر لیتر بوتانول زیستی تولید کردند. همچنین این محققان، در مقایسه تأثیر محیط‌های TYA و P۲ بر تولید، بالاترین مقدار تولید (۹/۸۳ گرم بر لیتر) را در محیط P۲ با غلظت ۷۰ گرم بر لیتر نشاسته ساگو گزارش کردند (۳۳). دینگ[1] و همکاران (۲۰۱۹)، با بکارگیری کلستریدیوم استوبوتیلیکوم ATCC۸۲۴ و استفاده از محیط کشت پایه حاوی ۶/۴ درصد نشاسته ذرت و با افزودن ۸۰ گرم بر لیتر مخمّر پیچیا پاستوریز، موفق شدند از هفت لیتر محیط، میزان ۱۰/۵-۹/۵ گرم بر لیتر بوتانول زیستی تولید کنند (۳۴). معمولاً به طور سنتی برای تولید بوتانول زیستی از نشاسته خالص استفاده می‌شود، اما از آنجا که نشاسته گران قیمت است، استفاده از ضایعات نان به عنوان ماده اولیه به جای نشاسته خالص، یك مزیت بزرگ محسوب می‌شود که قابل تعمیم به سایر پسماندهای حاوی نشاسته می‌باشد.

در اغلب مطالعات انجام شده، همزمان با تولید بوتانول زیستی، اتانول زیستی نیز تولید شده، ولی آنالیز محصولات سویه MR۴۵ نشان‌دهنده عدم تولید اتانول زیستی بوده است. این موضوع بسیار حائز اهمیت می‌باشد، چرا که تولید محصول زیستی در این سویه فقط به بوتانول ختم می‌شود که از هدر رفت ماده اولیه جلوگیری می‌کند. در کل، بکارگیری ضایعات و به دنبال آن کاهش هزینه‌های تولید و همچنین برتری بوتانول زیستی نسبت به بنزین سبب می‌گردد تا بتوان از این الکل به عنوان سوختی مناسب در آینده استفاده کرد.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در صورت بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌های کلستریدیوم، می‌توان جهت تولید بوتانول زیستی از ضایعات نان به دلیل داشتن منابع کربنی و سایر ریزمغذی‌ها، بدون افزودن هر نوع فاکتور رشد دیگری استفاده کرد. ایجاد شرایط بهینه همچون pH، دما و غلظت نشاسته، میزان بهره‌وری را افزایش می‌دهد. سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق موفق شدند در شرایط بهینه آزمایشگاهی، در طی مدت زمان ۶ ساعت، ۵۰ گرم نشاسته را به طور کامل مصرف نمایند که نسبت به سایر تحقیقات انجام شده، از سرعت بیشتری برخوردار بوده است.

1. Ding

جدایه بومی کلستریدیوم روزئوم MR۴۵ به عنوان کاندیدی مناسب به منظور افزایش بازده تولید بوتانول زیستی از ضایعات نان معرفی می‌گردد.

٦. تشکر و قدردانی

محققان این پژوهش از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، به دلیل همکاری صمیمانه در اجرا این پژوهش کمال تشکر را دارند.

References

1. Gaurav N, Sivasankari S, Kiran GS, Ninawe A, Selvin J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. *Renew Sust Energ Rev*. 2017; 73: 205-14.
2. Seo PW, Ahmed I, Jhung SH. Adsorptive removal of nitrogen-containing compounds from a model fuel using a metal-organic framework having a free carboxylic acid group. *Chem Eng J*. 2016; 299: 236-43.
3. Rakopoulos DC, Rakopoulos CD, Kyritsis DC. Butanol or DEE blends with either straight vegetable oil or biodiesel excluding fossil fuel: Comparative effects on diesel engine combustion attributes, cyclic variability and regulated emissions trade-off. *Energy*. 2016; 115: 314-25.
4. Liu C-M, Wu S-Y. From biomass waste to biofuels and biomaterial building blocks. *Renew Energy*. 2016; 96: 1056-62.
5. Rodionova MV, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG & et al. Biofuel production: challenges and opportunities. *Int J Hydrogen Energy*. 2017; 42(12): 8450-8461.
6. Whalen J, Xu CC, Shen F, Kumar A, Eklund M, Yan J. Sustainable biofuel production from forestry, agricultural and waste biomass feedstocks. *Appl Energy*. 2017; 198: 281-283.
7. Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sust Energ Rev*. 2017; 71: 475-501.
8. Cardona CA, Sánchez ÓJ. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol*.2007; 98(12): 2415-2457.
9. Bharathiraja B, Jayamuthunagai J, Sudharsanaa T, Bharghavi A, Praveenkumar R, Chakravarthy M & et al. Biobutanol-An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing tecniques. *Renew Sust Energ Rev*. 2017; 68: 788-807.
10. Rathour RK, Ahuja V, Bhatia RK, Bhatt AK. Biobutanol: New era of biofuels. *Int J Energy Res*. 2018; 42(15): 4532-45.
11. Feng H, Liu D, Yang X, An M, Zhang W, Zhang X. Availability analysis of using iso-octane/n-butanol blends in spark-ignition engines. *Renew Energy*. 2016; 96: 281-94.
12. Da Silva Trindade WR, dos Santos RG. Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines. *Renew Sust Energ Rev*. 2017; 69: 642-51.
13. Brito M, Martins F. Life cycle assessment of butanol production. *Fuel*. 2017; 208: 476-82.
14. Jiménez-Bonilla P, Wang Y. In situ biobutanol recovery from clostridial fermentations: a critical review. *Crit Rev Biotechnol*. 2018; 38(3): 469-82.
15. Millat T, Winzer K. Mathematical modelling of clostridial acetone-butanol-ethanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017; 101(6): 2251-71.

16. Zhang Y-HP, Sun J, Ma Y. Biomanufacturing: history and perspective. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2017; 44(4-5): 773-84.
17. Procentese A, Raganati F, Olivieri G, Russo ME, de la Feld M, Marzocchella A. Renewable feedstocks for biobutanol production by fermentation. *N Biotechnol*. 2017; 39: 135-40.
18. Maiti S, Sarma SJ, Brar SK, Le Bihan Y, Drogui P, Buelna G & et al. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Food Bioprod Process*. 2016; 98: 217-26.
19. Leung CCJ, Cheung ASY, Zhang AY-Z, Lam KF, Lin CSK. Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochem Eng J*. 2012; 65: 10-5.
20. Vos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer. 2009: 738-828
21. Fuwa H. A new method for microdetermination CF amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J Biochem*. 1954; 41(5): 583-603.
22. Abdollahi M, Karbalaei-Heidari H. Isolation, identification, biochemical properties and potential application of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain NEB-1. *Iran J Sci Technol Trans A Sci*. 2014; 38(3): 221-9.
23. Smith BW, Roe JH. A photometric method for the determination of α-amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color. *J Biol Chem*.1949; 179(1): 53-9.
24. Bohringer P, Jacob A. The determination of alcohol using chromic acid. *Zeitschr Flussiges Abst*. 1964; 31: 233-6.
25. Qin Z, Duns GJ, Pan T, Xin F. Consolidated processing of biobutanol production from food wastes by solventogenic *Clostridium sp.* strain HN4. *Bioresour Technol*. 2018; 264: 148-53.
26. Luo W, Zhao Z, Pan H, Zhao L, Xu C, Yu X. Feasibility of butanol production from wheat starch wastewater by Clostridium acetobutylicum. *Energy*. 2018; 154: 240-8.
27. Husin H, Ibrahim MF, Kamal Bahrin E, Abd-Aziz S. Simultaneous saccharification and fermentation of sago hampas into biobutanol by Clostridium acetobutylicum ATCC 824. *Energy Sci Eng*. 2018;7(1): 66-75.
28. Johnravindar D, Elangovan N, Gopal NO, Muthaiyan A, Fei Q. Biobutanol production from cassava waste residue using Clostridium sp. AS3 in batch culture fermentation. *Biofuels*. 2019:1-8. **DOI:** https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1608671.
29. Lin Z, Liu H, Wu J, Patakova P, Branska B, Zhang J. Effective continuous acetone-butanol-ethanol production with full utilization of cassava by immobilized symbiotic TSH06. *Biotechnol Biofuels*. 2019; 12(219): 1-11.
30. Yang M, Kuittinen S, Zhang J, Vepsäläinen J, Keinänen M, Pappinen A. Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone-butanol-ethanol production. *Bioresour Technol*. 2015; 179: 128-35.
31. Badr HR, Toledo R, Hamdy MK. Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of Clostridium acetobutylicum. *Biomass Bioenergy*. 2001; 20(2): 119-32.

32. Li S, Guo Y, Lu F, Huang J, Pang Z. High-level butanol production from cassava starch by a newly isolated Clostridium acetobutylicum. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 177(4): 831-41.
33. Al-Shorgani NKN, Kalil MS, Yusoff WMW. Fermentation of sago starch to biobutanol in a batch culture using Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 (ATCC 13564). *Ann Microbiol*. 2012; 62(3): 1059-70.
34. Ding J, Xu M, Xie F, Chen C, Shi Z. Efficient butanol production using corn-starch and waste *Pichia pastoris* semi-solid mixture as the substrate. *Biochem Eng J*. 2019; 143: 41-7.

استناد به این مقاله

میرزاده، مریم؛ رضائیان، عباسعلی (۱۴۰۰). تولید بوتانول زیستی از ضایعات نان با استفاده از کلستریدیوم‌های آمیلولیتکی جدا شده از دریاچه پریشان. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۱، شماره ۴۱، ص ۱۰۷-۱۲۴.