

مقایسه عملکرد دو سویه صنعتی "ایران ملاس و *Saccharomyces cerevisiae* EC1118" در تولید اقتصادی بیواتانول

آزاده توفیقی^{۱*}، محمد حسین آرش اسدی راد^۲، مهناز مظاهری اسدی^۳، مهرداد آذین^۳

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

۲- مربی گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

۳- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

مکان انجام پژوهش: سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی

* مسئول مکاتبات: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

پست الکترونیکی: azadeh_t392@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۰

چکیده

بیواتانول در دنیا به عنوان سوختی سبز، با قابلیت جایگزینی سوخت‌های فسیلی، شناخته شده است. با این وجود، بهای تمام شده بیواتانول حاصل از موادی مانند چغندر قند، ذرت و...، بیش از دو برابر بهای بنزین است و این امر، خود مانعی بر سر راه استفاده از بیواتانول در بخش حمل و نقل عمومی به شمار می‌آید. ترکیبات لیگنوسلولزی، فراوان و ارزان قیمت و برای تولید اقتصادی بیواتانول، به صرفه‌اند. قابل استفاده شدن توده لیگنوسلولزی و به دنبال آن، فرآیند تخمیر توسط میکروارگانیزم‌های مسئول، منوط به انجام تیمار اسیدی آن است. مشکل اساسی در این راستا ایجاد ترکیبات سمی و مهارکننده رشد، مانند فورفورال، طی روند هیدرولیز اسیدی است. حذف ترکیبات سمی مذکور در صنعت، با واسطه مرحله سم زدایی صورت می‌پذیرد. این مرحله، از یک سو هزینه‌بر و وقت‌گیر است و از سوی دیگر، باعث از دست رفتن مقداری از قند هیدرولیز شده می‌گردد. پژوهش حاضر با هدف غربال‌گری سویه میکروبی مقاوم به فورفورال و حذف مرحله سم زدایی انجام شده است. برای این منظور، از دو سویه صنعتی ساکارومایسس سرویزیه (ایران ملاس و EC1118) استفاده شد. اثر غلظت‌های فورفورال ($0 - 6 \text{ g.l}^{-1}$) بر راندمان تولید اتانول و میزان جذب گلوکز، ارزیابی گردید. نتایج به دست آمده حاکی از مقاومت بالای سویه EC1118 در حضور غلظت‌های بالای فورفورال بوده است.

واژه‌های کلیدی: بیواتانول، ساکارومایسس سرویزیه، فورفورال

مقدمه

اتانول به عنوان یک انرژی مطلوب و تجدیدپذیر برای جایگزینی سوخت‌های فسیلی و تمام‌شدنی، شناخته شده است. در حال حاضر در دنیا برای تولید اتانول سوختی، از موادی مانند چغندر قند، ذرت، گندم و نیشکر استفاده می‌شود، قیمت نهایی تولید اتانول از چنین مواد اولیه کشاورزی، بیش از دو برابر قیمت بنزین است و این امر، خود مانعی بر سر راه استفاده از اتانول، در بخش حمل و نقل عمومی به

شمار می‌آید (۴-۱). برای تولید اقتصادی اتانول، استفاده از مواد اولیه ارزان قیمت و تجدیدپذیر، مانند پسماندهای کشاورزی و جنگلی (ترکیبات لیگنوسلولزی) پیشنهاد شده است (۸-۵). لیگنوسلولز، ترکیبی است که در ساختار دیواره سلولی گیاهان وجود دارد. سلولز، همی‌سلولز و لیگنین، سازندگان اصلی ترکیبات لیگنوسلولزی هستند. ترکیب این ساختار از یک گونه گیاهی به

ساکارومایسس سرویزیه، میکروارگانیزی شناخته شده و کارا در تولید اتانول به شمار می‌آید. این مخمر به واسطه داشتن مقاومت نسبتاً بالا در برابر مهارکنندگان رشد، به عنوان یکی از بهترین گزینه‌ها در رابطه با تخمیر ترکیبات لیگنوسلولزی به اتانول، شناخته شده است (۲، ۵، ۸). در نتیجه اگر بتوانیم با استفاده از روش‌های مختلف، سویه‌ای مقاوم به فورفورال بیابیم، خواهیم توانست علاوه بر بالا بردن راندمان تولید بیواتانول، هزینه و زمان مورد مصرف جهت حذف ترکیبات سمی مانند فورفورال را در فرایند تولید کاهش دهیم و بدین ترتیب، از یک منبع انرژی تجدید شونده دوست‌دار طبیعت و مقرون به صرفه بهره‌مند شویم.

در پژوهش حاضر، مقاومت نسبی دو سویه EC1118 و ایران ملاس ساکارومایسس سرویزیه، در حضور غلظت‌های بالای فورفورال، با اندازه‌گیری راندمان رشد و تولید اتانول، مورد مقایسه قرار گرفتند. فرآیند تخمیر به روش batch و در محیط کشت سنتتیک، تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

سویه صنعتی *Sacchromyces cerevisiae* Lalvin EC1118 (Scott از Lallomands Laboratories, Canada) و سویه ایران ملاس مورد استفاده قرار گرفتند. مخمرها در محیط کشت PDA (سیب زمینی ۳۰ درصد، گلوکز ۳ درصد، و آگار ۱/۵ درصد) در ۴۰°C نگهداری شدند. محیط پیش‌کشت (preculture) با مقادیر ۳ (w/v) درصد دکستروز، عصاره مخمر ۱ درصد، فسفات آمونیوم ۰/۰۶ درصد و سولفات آمونیوم ۰/۱۲ درصد، تهیه و در pH = ۵/۳ با کمک اسید کلریدریک ۱ مولار تنظیم شده است. محیط کشت تولید (production)، در همان مقادیر محیط پیش‌کشت، تهیه شد و تنها میزان گلوکز به ۲۰ درصد افزایش یافت. قبل از تلقیح میکروارگانیزم مورد نظر، غلظت‌های قابل توجهی از فورفورال تازه تقطیر شده به محیط‌های کشت اضافه شد. با توجه به متفاوت بودن ترکیب ساختار لیگنوسلولزی از یک گونه گیاهی به

گونه‌ای دیگر متفاوت است. به علاوه، ترکیب لیگنوسلولزی گیاه با سن، مرحله رشد و سایر شرایط، تغییر خواهد کرد (۹-۱۱).

مزایای استفاده از بیواتانول حاصل از ترکیبات لیگنوسلولزی مانند باگاس را می‌توان بدین شرح خلاصه کرد:

۱) جایگزین مناسب سوخت‌های فسیلی؛ ۲) مکمل مطلوب سوخت‌های فسیلی؛ ۳) کاهش گازهای گلخانه‌ای به همراه منافع زیست محیطی فراوان؛ ۴) افزایش ضریب امنیت انرژی ملی و ۵) تأمین سوختی مطمئن و پاک برای آینده.

جهت دسترسی به بیواتانول حاصل از ترکیبات لیگنوسلولزی باید بتوان موانعی چند را از سر راه برداشت. هیدرولیز و شکستن ساختار توده لیگنوسلولزی، اولین گام برای تولید بیواتانول است و در این راستا، تیمار اسیدی یا استفاده از آنزیم، روش شناخته شده‌ای به حساب می‌آید (۱، ۳، ۷، ۱۱). هیدرولیز اسیدی، روشی آسان و مقرون به صرفه برای تبدیل ترکیبات لیگنوسلولزی به قندهای تشکیل‌دهنده آن است. اساسی‌ترین مشکل در راستای تخمیر ترکیبات لیگنوسلولزی، ایجاد ترکیبات سمی و مهارکننده‌ای است که طی تیمار اسیدی به وجود می‌آیند. از مؤثرترین این ترکیبات می‌توان فورفورال را نام برد. فورفورال ترکیبی آلدهیدی و سمی است و مانع عملکرد بهینه میکروارگانیزم‌های مسئول عمل تخمیر می‌شود (۳). اثرات منفی فورفورال بر روی آنزیم‌های الکل دهیدروژناز (ADH)، آلدهاید دهیدروژناز (ALDH) و پیرووات دهیدروژناز (PDH) مورد بررسی قرار گرفته است. اثر مهارکنندگی 1 g.l^{-1} فورفورال در فعالیت PDH و ALDH شدید بود، در صورتی که این اثر بر فعالیت ADH، ملایم گزارش شد. در نتیجه، هر دو مسیری که پیرووات را به استیل کوآنزیم A می‌رساند، متوقف می‌شوند؛ در حالی که مسیر پیرووات تا اتانول هنوز به میزان محسوسی در جریان است. بنابراین، به نظر می‌رسد که رشد مخمر نسبت به فورفورال، حساس‌تر از تولید اتانول باشد (۴، ۸، ۹، ۱۲).

۵۰۰ نانومتر خوانده شد و در انتها میزان قند هر نمونه، با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه گردید.

سنجش میزان اتانول پس از تقطیر نمونه، به کمک دستگاه گاز کرماتوگرافی مدل 14A Shimadzu و با استفاده از ستون Carbowax 20M (diameter 0.2 mm) انجام شد. دمای اولیه 50°C ، دمای نهایی 200°C و گاز حامل N_2 (50 ml/min) انتخاب گردید. در انتها میزان اتانول هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد اتانول محاسبه شد.

محاسبه پارامترهای تخمیر

برای به دست آوردن راندمان تولید اتانول ($Y_{p/s}$) از فرمول زیر استفاده شد. غلظت اتانول، پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان کشت و غلظت گلوکز در زمان صفر منظور شده است (۶، ۷، ۱۴).

$$Y_{p/s} = \frac{[\text{EtOH}](\text{g/l})}{[\text{Glucose}](\text{g/l})}$$

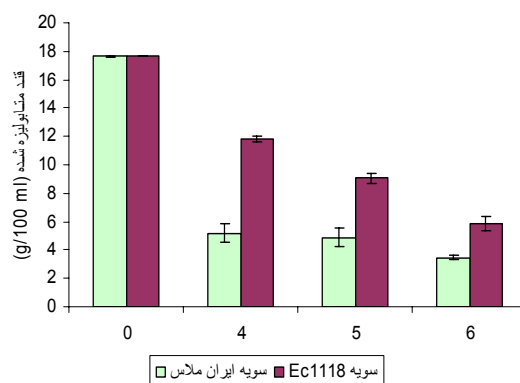
نتایج

اثر غلظت‌های مختلف فورفورال بر دو سویه صنعتی ساکارومایسس سرویزیه (ایران ملاس و EC1118) مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت‌های فورفورال بین $0 - 6 \text{ g.l}^{-1}$ انتخاب شد و مصرف قند و راندمان تولید اتانول ($Y_{p/s}$) مورد سنجش قرار گرفت. همان گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، در محیط فاقد فورفورال، قند متابولیزه شده توسط دو سویه، تقریباً به یک میزان است.

گونه‌ای دیگر، غلظت فورفورال استفاده شده، بین $0 - 6 \text{ g.l}^{-1}$ انتخاب شد. به میزان یک لوپ از میکروارگانیزم مورد نظر برای تلقیح پیش‌کشت استفاده شد. به مدت ۲۰ ساعت در 30°C و در انکوباتور شیکردار (Clim-O-Shake, Switzerland) با دور ۱۵۰ (rev/min) هوادهی صورت گرفت. در مرحله بعد، تلقیح محیط کشت تولید، به میزان ۱۰٪ انجام و به مدت ۸ ساعت در 30°C و در انکوباتور شیکردار (Clim-O-Shake, Switzerland) با دور ۱۵۰ (rev/min) هوادهی گردید. پس از این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۴۰ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی در 30°C انکوبه شدند (۱، ۲، ۱۳).

مقادیر توده زیستی (biomass) با کمک وزن خشک سلول‌ها به دست آمد. در این مرحله، از سانتریفوژ مدل Hermle.Z200CS- Germany به مدت ۱۰ دقیقه در 10000 g استفاده شد و طی ۲۴ ساعت در 95°C خشک شدند. وزن خشک به دست آمده، با شمارش سلول‌ها در لام نئوبار و نیز تعیین کدورت محیط کشت در ۶۲۰ نانومتر (Shimadzu-Uv-160A-Japan) نیز مورد مقایسه و تأیید قرار گرفت. تمام کشت‌ها و آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

کیت سنجش گلوکز (Chimenzyme, Iran) جهت ارزیابی مقادیر گلوکز در محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفت. در این راستا میزان جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu-UV-160A-Japan) در طول موج

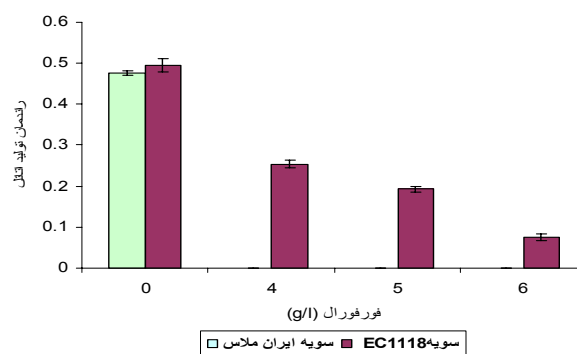


نمودار ۱- مقایسه میزان متابولیزه شدن گلوکز توسط سویه‌های صنعتی ایران ملاس و EC1118 (نسبت به قند اولیه، 19 g/100 ml) در غلظت‌های مختلف فورفورال.

در حالی که روند کاهش میزان قند متابولیزه شده در سویه ایران ملاس، بین غلظت‌های 5 g.l^{-1} و 4 g.l^{-1} فورفورال محسوس نبوده و در غلظت 6 g.l^{-1} فورفورال با شیب بسیار کم نسبت به غلظت‌های 5^1 و 4^1 کاهش نشان داد.

از سوی دیگر، راندمان تولید اتانول سویه صنعتی EC1118 در محیط کشت فاقد فورفورال، کمی بیش از سویه ایران ملاس بود (نمودار - ۲).

در غلظت‌های $4-6 \text{ g.l}^{-1}$ فورفورال، میزان قند متابولیزه شده توسط سویه EC1118 نسبت به سویه ایران ملاس کمتر بود. میزان مصرف قند در سویه‌های EC1118 و ایران ملاس در حضور 1 g.l^{-1} فورفورال در مقایسه با محیط کشت فاقد فورفورال، به ترتیب $1/3$ و $2/3$ ، کاهش نشان داد. کاهش مصرف قند سویه EC1118 در غلظت‌های بالاتر فورفورال (6 g.l^{-1} و 5) به صورت تدریجی بود؛



نمودار ۲- راندمان تولید اتانول (w/v)، در *Saccharomyces cerevisiae* سویه‌های ایران ملاس و EC1118

تخریبی بیشتر فورفورال بر آنزیم الکل دهیدروژناز سویه ایران ملاس نسبت به سویه EC1118 بوده است. از سوی دیگر، میزان مصرف قند سویه ایران ملاس، بیشتر از سویه EC1118 تحت تأثیر مهارکنندگی غلظت‌های بالای فورفورال قرار گرفت که نشان می‌دهد توان زیستی سویه ایران ملاس در حضور غلظت‌های بالای فورفورال، بسیار پایین است. با توجه به اثر تخریبی فورفورال بر آنزیم الکل دهیدروژناز (۱۸-۱۴) که مسئول تخمیر الکی به حساب می‌آید، نتایج به دست آمده حاکی از مقاومت نسبی EC1118 در مقابل غلظت‌های بالای فورفورال و حفظ نسبی توان زیستی و تولید اتانول است. تولید اتانول از مواد اولیه‌ای مانند ترکیبات لیگنوسلولزی، نیازمند استفاده از سویه‌های مقاوم به ترکیبات سمی حاصل از هیدرولیز اسیدی ضایعات لیگنوسلولزی است. این امر می‌تواند به حذف مرحله سم‌زدایی و بالا بردن راندمان بهره‌وری، در تولید

اثر منفی فورفورال بر راندمان تولید اتانول در غلظت‌های $4-6 \text{ g.l}^{-1}$ ، در سویه EC1118 به صورت تدریجی و در سویه ایران ملاس، به صفر رسیده بود. این امر نشان دهنده حساسیت نسبی سلول‌های مخمر، نسبت به افزایش سمیت فورفورال در محیط کشت است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها، اثر مهارکنندگی غلظت‌های بالای فورفورال (1 g.l^{-1} - 6 g.l^{-1}) بر تولید اتانول سویه‌های صنعتی EC1118 و *Saccharomyces cerevisiae* ایران ملاس را در کشت batch نشان می‌دهد. در غلظت‌های بالای فورفورال ($4-6 \text{ g.l}^{-1}$) راندمان تولید اتانول سویه ایران ملاس نسبت به سویه EC1118 بسیار ناچیز بود؛ در صورتی که تحت شرایط مشابه، مصرف گلوکز توسط سویه ایران ملاس مشاهده گردید. داده‌های به دست آمده حاکی از اثر

و صنعتی ایران به خاطر مساعدت‌ها و تأمین تجهیزات و فضای پژوهش، و همچنین از مسئولین بخش گاز کروماتوگرافی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به جهت همکاری و هماهنگی در انجام آنالیزهای شیمیایی، قدردانی و تشکر می‌نماییم.

صنعتی بیواتانول به عنوان جایگزینی مناسب برای سوخت‌های فسیلی کمک نماید.

تشکر و قدردانی

از زحمات بی‌دریغ مسئولین و کارکنان پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی

منابع مورد استفاده

- Kim, S., Dale, B. E., 2005. Global Potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 29: 361-375.
- Montane, D., Salvado, J., Torras, C., Farriol, X., 2002. High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass and Bioenergy* 22: 295-304.
- Ozeimen, D., Karaosmanoglu, F., 2005. Production and characterization of bio-oil and biochar from rapeseed cake. *Renewable Energy* 29: 779-787.
- Reijnders, L., 2006. Conditions for sustainability of biomass based fuel use. *Energy Policy* 34: 863-876.
- Richard, P., Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., Penttila, M., 2003. Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS yeast Res* 3: 185-189.
- Roberto, I. C., Mussatto, S. I., Rodrigues, R., 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind Crops Prod* 7: 171-6.
- Shetty, J. K., Lantero, O. J., Dunn-Coleman, N., 2005. Technological advance in ethanol production. *International Sugar Journal* 107: 605-608.
- Sreenath, H. K., Jeffries, T. W., 2000. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technol* 72: 253-260.
- Talebna, F., Taherzadeh, M. J., 2006. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 125: 377-384.
- Tanuja, S., 2008. Fermentation Technology. *Biotechnol Prog* 23: 45-51.
- Tyurin, M. V., Sullivan, C. R., Lynd, L. R., 2005. Role of spontaneous current oscillations during high-efficiency electrotransformation of thermophilic anaerobes. *Appl Environ Microbiol* 71: 8069-8076.
- Verduyn, C., 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose- limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology* 136: 395- 403.
- Verstrepen, K. J., 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 197-203.
- Blottnitz, H., Curran, M. A., 2006. A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective. *Journal of Cleaner Production* 32: 61-68.
- Wahlbom, C. F., Hahn-Hägerdal, B., 2002. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 78: 172-178.
- Walker, G. M., 1998. Yeast physiology and biotechnology. Wiley, New York.
- Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M., Amorim, H. V., 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol* 17: 482-487.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Prog* 19: 1109-1117.