مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۲۴۰-۲۳۱

Original Article

تولید گلوکز از پساب برنج با استفاده از فرآیند هیدرولیز آنزیمی *آسپرژیلوس نایجر* به منظور تولید اتانول

مسعود حاتمی منش[۱]، حبیب اله یونسی[*۲]، نادر بهرامی فر[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، [۲] دانشیار، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، گروه محیط زیست، [۳] استادیار، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، گروه محیط زیست

چکیده

سابقه و هدف: پساب برنج یکی از مهم ترین و فراوان ترین پساب های شهری است که روزانه به میزان فراوانی تولید می شود. و به دلیل بار بالای مواد آلی می تواند به عنوان گزینه مناسب در تولید اتانول(سوخت زیستی سازگار با محیط زیست) به کارگرفته شود. این مطالعه با هدف بررسی تولید اتانول از پساب برنج با استفاده از فرآیند هیدرولیز آنزیمی و تخمیر توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای بهینه سازی فرآیند هیدرولیز آنزیمی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به منظور تولید گلوکز، تاثیر غلظت های مختلف پساب با میزان نشاسته اولیه (۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰) گرم بر لیتر، و منبع نیتروژنی (NH_4NO_3، NH_4SO_4 و NH_4CL) مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تعیین غلظت قند تولید شده از روش DNS استفاده شد. برای اندازه گیری غلظت اتانول تولیدی از دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت ۶۰ گرم بر لیتر و منبع نیتروژنی NH_4SO_4 بیشترین تاثیر را بر روی گلوکز تولیدی به میزان ۳۱/۸۴ و ۳۲/۲۷ گرم بر لیتر دارا می باشد. نتایج بررسی تولید اتانول توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از پساب هیدرولیز شده با غلظت گلوکز اولیه ۳۲/۴ گرم برلیتر نشان داد که بیشترین میزان اتانول تولیدی و بازده آن به ترتیب برابر با ۱۱/۵۱ گرم بر لیتر و ۰/۳۷ گرم اتانل در هر گرم از کل قند می باشد. همچنین بیشترین میزان وزن خشک سلولی و بازده آن به میزان ۲/۹۸ گرم توده زیستی و ۰/۱۴ g CDW/g total sugar به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به فراوان بودن پساب برنج و همچنین میزان بازده اتانول تولیدی، پساب مورد نظر می تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب در تولید اتانول به عنوان یک سوخت زیستی بکار گرفته شود.

واژگان کلیدی: اتانول، پساب برنج، *ساکارومایسس سرویزیه*، هیدرولیز آنزیمی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۴

مقدمه

امروزه استفاده از فرآیندهای بیولوژیکی به منظور تولید مواد زیست تخریب پذیر مانند اتانول، بیودیزل و پلاستیک های زیستی در صنایع مختلف از جمله صنعت مواد غذایی، کشاورزی و حمل و نقل به دلیل مسایل اقتصادی و زیست محیطی توجه محقیق زیادی را به خود جلب کرده است (۱). در این میان استفاده از فرآیندهای آنزیمی به جای فرآیندهای شیمیایی به منظور تولید قندهای قابل احیا مانند گلوکز از مواد نشاسته ای، سلولزی و پساب واحدهای تولید کننده و مصرف کننده این مواد به منظور تولید فرآورده های با ارزشی مانند اتانول بسیار ضروری است. اتانول رایج ترین سوخت زیستی موجود در جهان است که می تواند از مواد مختلف قندی،

*) آدرس برای مکاتبه: نور، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، گروه محیط زیست. تلفن: ۰۹۳۶۲۱۵۵۳۴۹ پست الکترونیک: hunesi@yahoo.com

نشاسته ای، سلولزی، لیگنوسلولزی و پساب صنایع مختلف همچون صنایع غذایی تولید شود. این ماده می تواند به عنوان یک سوخت سازگار با محیط زیست که آلودگی کمتری نسبت به سوخت های فسیلی دارد به صورت خالص یا در ترکیب با بنزین به عنوان حامل اکسیژن به کار گرفته شود و سبب اکسیداسیون بهتر هیدروکربن ها، و در نتیجه کاهش میزان آلودگی های زیست محیطی شود (۲).

بنابراین باتوجه به اهمیت اتانول امروزه محققین زیادی به بررسی تولید آن از مواد مختلف مانند پساب صنایع غذایی و کشاورزی پرداخته اند. از این پژوهش ها می توان به پژوهش سیلوا (Silva) و همکاران در سال ۲۰۱۰ و قربانی (Ghorbani) و همکاران در سال ۲۰۰۹ اشاره نمود، که به ترتیب به تولید اتانول از کاه برنج و ملاس کارخانه قند را مورد بررسی قرار دادند (۳ و ٤).

درکنار مضرات پساب ها برای جوامع بشری و محیط زیست، با تصفیه و حذف آلاینده های موجود در پساب ها می توان از آنها برای تولید مواد با ارزشی مانند اتانول بهره گرفت. به دلیل تاثیرگذاری قیمت مواد اولیه به ویژه منبع کربن بر روی هزینه های تولید سوخت های زیستی، یکی از مهمترین شیوه های کاهش این هزینه ها استفاده از پسماند و محصولات فرعی صنایع به عنوان ماده خام در فرآیند تولید این مواد است. اگر چه استفاده از پساب و پسماند به دلیل ترکیبات پیچیده و وجود ترکیبات بازدارنده، کاربرد آنها را به شدت محدود ساخته است. اما با این حال مواد نشاسته ای و پساب تولید شده از واحدهای تولیدکننده یا مصرف کننده این مواد، سوبستراهای مناسب و ارزان قیمت محسوب می شوند (۵). به طور نمونه، استفاده از پساب یا ضایعات کارخانه آرد به عنوان یک سوبسترای مناسب جهت تولید گلوکز و یا اتانول به دلیل مسایل زیست محیطی و عدم رقابت با سایر صنایع به ویژه صنایع غذایی و کشاورزی که در واقع یکی از مشکلات اساسی تولید مواد سازگار با محیط زیست هستند، بسیار ضروری می باشد (٦ و ۷).

پساب برنج یکی از مهم ترین و فراوان ترین پساب های شهری است که روزانه به میزان فراوانی تولید و بدون هیچ گونه استفاده یا تصفیه ای وارد سیستم فاضلاب شهری و خانگی می گردد. ورود این پساب به اکوسیستم های آبی به دلیل بار بالای مواد غذایی و انواع کاتیون ها و آنیون ها، باعث مشکلات زیست محیطی مانند افزایش COD و BOD شده و صدمات غیر قابل جبرانی به بار می آورد. این پساب به دلیل فراوان بودن و بار بالای مواد آلی می تواند به عنوان یک ماده ارزان قیمت و مناسب برای تولید اتانول به کار گرفته شود. بدین ترتیب هم از ورود آن به محیط زیست جلوگیری می شود و هم به عنوان یک ماده اولیه جهت تولید اتانول مورد استفاده قرار می گیرد. اما تحقیقات نشان می دهند میکروارگانیسم اصلی تولیدکننده اتانول یعنی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* قادر به هیدرولیز مواد پلی ساکاریدی مانند نشاسته نمی باشد. بنابراین فرآیند تولید اتانول از مواد نشاسته ای فرآیند دو مرحله ای است. مرحله اول فرآیند هیدرولیز نام دارد. در این مرحله نشاسته به کمک آنزیم یا اسید به قند های ساده تر مانند گلوکز تبدیل می گردد. سپس در مرحله دوم قندهای حاصل از فرآیند هیدرولیز به وسیله ی میکروارگانیسم های مناسب به اتانول تبدیل می گردد (فرآیند تخمیر) (۸ و ۹). شواهد نشان می دهد استفاده از فرآیند هیدرولیز آنزیمی به منظور تولید قندهای قابل احیا به دلیل مسایلی مانند آلودگی کمتر نسبت به فرآیندهای دیگر، ارزان تر بودن و بازدهی بالاتر دارای اهمیت فراوانی می باشد (۱۰). هدف از این مطالعه بررسی فرآیند هیدرولیز آنزیمی پساب برنج با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به منظور تولید گلوکز برای تولید اتانول توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بود.

مواد و روش ها

الف) سویه های مورد بررسی: در این مطالعه ابتدا میکروارگانیسم های مورد استفاده شامل قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مخمر *ساکارمایسیس سرویزیه* PTCC از وزارت علوم و تحقیقات فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

(مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی) به صورت لیوفلیزه تهیه و سپس در محیط کشت استریل کشت گردید.

ب) هیدرولیزآنزیمی: پس از آماده شدن محیط کشت تکثیر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* حاوی ترکیبات گلوکز (۳۰ g/l)، عصاره مخمر (۱ g/l)، پتاسم هیدروژن فسفات (۱/۵ g/l)، پتاسم دی هیدروژن فسفات (۱ g/l)، منیزیم سولفات (۲/۵ g/l)، آمونیوم سولفات (۹ g/l)، سولفات آهن (۰/۰۰۵ g/l)، سولفات منگنز (۰/۰۱٦ g/l)، کلرید کبالت (۲/۹ g/l) و سولفات روی (۰/۰۰۱٤ g/l)، این محیط در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. پس از استریل شدن محیط کشت و سرد شدن آن در دمای محیط، عمل تلقیح قارچ به نسبت ۵ درصد محیط کشت انجام پذیرفت. سپس محیط کشت حاوی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در گرمخانه ۳۰ درجه سلیسیوس و pH ۵ در شرایط ساکن به مدت ۵ روز تا رسیدن به مرحله نمایی رشد و تزریق به محیط کشت نگهداری شد. در هر آزمون ۱۵۰ میلی لیتر از محیط کشت حاوی آب برنج در ارلن های با حجم ۵۰۰ میلی لیتر ریخته شد و از زمان صفر تا ۸٤ ساعت هر ۱۲ ساعت ۱ نمونه از محیط کشت برای اندازه گیری میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ از هیدرولیز پساب گرفته شد. ۲ سری آزمون به منظور مطالعه تاثیر غلظت های مختلف نشاسته اولیه پساب (۲۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰ و ۸۰) گرم بر لیتر، و تاثیر منبع نیتروژنی (NH_4NO_3، NH_4SO_4 و NH_4CL) بر روی توانایی قارچ *آسپیژیلوس نایجر* برای هیدولیز آنزیمی پساب، به منظور تولید گلوکز انجام شد. هر آزمایش ۳ بار تکرارگردید و به صورت میانگین گزارش شد (۱۱).

همچنین برای تعیین میزان نشاسته اولیه پساب برنج ابتدا منحنی کالیبراسیون آن رسم گردید. سپس بر اساس منحنی مورد نظر میزان نشاسته مطابق با روش موجود اندازه گیری شد. به منظور رسم منحنی کالیبراسون نشاسته ابتدا ٤ گرم از نشاسته به ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از اتمام این مدت محلول حاصل به حجم یک لیتر رسانده شد. پس از رسیدن دمای محلول یاد شده به دمای ۲۰ درجه سلیسیوس، برای تهیه غلظت های ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ گرم بر لیتر از آن، در ٦ سری بالن ژوژه های ۱۰۰ میلی لیتری حجم معینی از آن ها ریخته و با آب مقطر به حجم ٤۰ میلی لیتر رسانده شدند. سپس به هر یک از آن ها ۲ میلی لیتر از اسیدسولفوریک ۱ نرمال اضافه شد (برای هیدرولیز محلول های بالا با اسید سولفوریک ۰/۰۵ نرمال)، همین کار با یک میلی لیتر آب مقطر به عنوان نمونه شاهد نیز انجام گرفت.

محلول های بالا به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و پس از این مدت بلافاصله به هر یک از آنها ٤۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از سرد شدن تا رسیدن به دمای ۲۰ درجه سلیسیوس ۲ میلی لیتر از محلول ید اضافه گردید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان جذب آن ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway 6305, UK) و در طول موج ٦۰۰ نانومتر قرائت شد (۱۲).

ج) فرآیند تخمیر: محیط کشت تکثیر مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* حاوی گلوکز (۱۵ g/l)، عصاره مخمر (۱۵ g/l)، پتاسیم هیدروژن فسفات (۱۰ g/l)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۵ g/l)، منیزیم سولفات (۲/۵ g/l) و آمونیوم سولفات (۹ g/l) آماده شد. این محیط در دمای ۱۲۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. سپس عمل تلقیح مخمر به نسبت ۳ درصد محیط کشت انجام پذیرفت (۱۳). در ادامه محیط کشت حاوی مخمر در گرمخانه ۲۵ درجه سلیسیوس و pH ٤/۵ در شرایط ساکن تا رسیدن به مرحله نهایی نگهداری شد.

برای تولید اتانول پس از دستیابی به شرایط بهینه تولید گلوکز، پساب در شرایط بهینه هیدرولیز و پس تعیین میزان گلوکز آن ۱۵۰ میلی لیتر از آن در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری جهت تولید اتانول ریخته شد. پس اتوکلاو پساب هیدرولیز شده، عمل تلقیح مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. به منظور اندازه گیری قند کل، اتانول تولیدی و غلظت توده زیستی (بیومس) پساب در طول فرآیند تخمیر از زمان صفر تا ۳٦ ساعت، هر ٤ ساعت ۳ نمونه از محیط کشت

گرفته شد.

همچنین به منظور بررسی وضعیت و روند اتانول تولیدی و رشد سلولی مخمر در طی فرآیند تخمیر به ترتیب از مدل سنتیکی رشد بیومس سلولی، تولید اتانول و گلوکز مصرفی استفاده شد (معادلات ۱، ۲ و ۳) (۱٤).

$$X = \frac{x_0 e^{\mu_m t}}{1-(^{x_0}/_{x_m})(1-e^{\mu_m t})} \qquad (۱)$$

در معادله ۱ (مدل سنتیکی رشد سلولی): t زمان تخمیر بر حسب h، X میزان وزن خشک سلولی در حال رشد بر حسب گرم بر لیتر، x_0 غلظت اولیه وزن خشک سلولی بر حسب گرم بر لیتر، x_m بیشترین مقدار وزن خشک سلولی بر حسب گرم بر لیتر، μ_m بیشترین شدت ویژه تولید بیومس بر حسب h^{-1} می باشد.

$$p = \frac{P_0 e^{P_r t}}{1-(^{P_0}/_{P_m})(1-e^{P_r t})} \qquad (۲)$$

در معادله ۲: t زمان تخمیر بر حسب h، P غلظت اتانول تولیدی بر حسب گرم بر لیتر، P_m بیشترین مقدار اتانول تولیدی برحسب گرم بر لیتر، P_r شدت ویژه تولید اتانول بر حسب h^{-1} و P_0 غلظت اولیه اتانول تولیدی بر حسب گرم بر لیتر می باشد (۱٤).

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{P/S}}(P - P_0) - \frac{1}{Y_{x/S}}(x - X_0) \qquad (۳)$$

در معادله ۳ (معادله سنتیکی مصرف گلوکز): $Y_{P/S}$ و $Y_{X/S}$ به ترتیب بازده محصول تولیدی برای اتانول و زیست توده برحسب، gl^{-1}(ethanol)g(total sugar)، P و P_0 به ترتیب میزان اتانول تولیدی نهایی و اولیه بر حسب گرم بر لیتر، x و x_0 غلظت نهایی و اولیه زیست توده بر حسب گرم بر لیتر و S_0 غلظت اولیه قند کل بر حسب گرم بر لیتر می باشد.

د) اندازه گیری قند، اتانول تولیدی و غلظت بیومس: در این مطالعه به منظور تعیین غلظت قند تولید شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و همچنین قند مصرف شده توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* از روش DNS استفاده شد (۱۵).

برای تعیین بیومس سلولی، یکی از نمونه های گرفته شده ۳ بار رقیق سازی گردید و میزان جذب آن در طول موج ٦۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (JENWAY, 6305, UK) تعیین شد. سپس وزن خشک سلولی با استفاده از نمودار کالیبراسیون (میزان جذب به دست آمده در ٦۲۰ نانومتر در مقابل وزن خشک سلولی) به دست آمد. همچنین برای اندازه گیری غلظت اتانول تولیدی، به مدت ۳٦ ساعت هر ٤ ساعت یک نمونه از محیط کشت برداشت شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد.

در این مطالعه برای اندازه گیری غلظت اتانول از دستگاه کروماتوگرافی گازی philips PU 4400, England مجهز به آشکارساز FID و نرم افزار (Republic Clarity 402, Data Apex, Czech) استفاده گردید (۱٦).

یافته ها

الف) بررسی اثر غلظت اولیه نشاسته پساب و منبع نیتروژنی بر تولید گلوکز آسپرژیلوس نایجر: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت های مختلف نشاسته پساب بر روی فعالیت و توانایی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در هیدرولیز پساب برنج به منظور تولید گلوکز نشان داد، که به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار گلوکز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در طول دوره زمانی ٤۸ تا ٦۰ ساعت پس از تلقیح در محیط هایی با غلظت های اولیه نشاسته ٦۰ و ۲۰ گرم بر لیتر به میزان ۳۱/۸٤ و ۱۰/٤ گرم بر لیتر به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اولیه نشاسته پساب به بیش از ٦۰ گرم بر لیتر، از میزان تولید گلوکز توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* کاسته می شود (نمودار ۱).

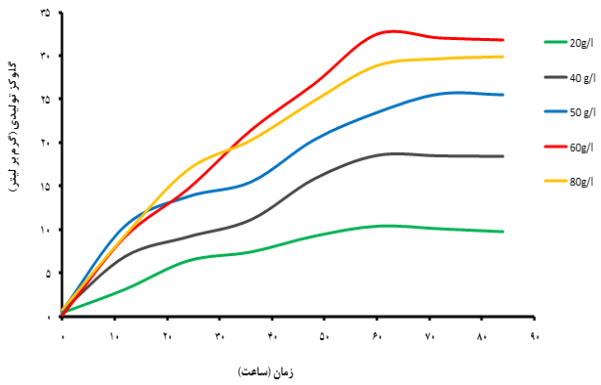
نتایج حاصل بررسی اثر منابع نیتروژنی مختلف (NH_4NO_3، NH_4SO_4 و NH_4CL) بر روی میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر*در طول مدت زمان ۸٤ ساعت نشان داد که به ترتیب منبع نیتروژنی آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات دارای بیشترین و کمترین بازده بر روی میزان گلوکز تولیدی به میزان ۳۲/۲۷ و ۲۲/۱۵ گرم بر لیتر می باشند (نمودار ۲).

ب) تولید بیومس، اتانول و گلوکز مصرفی ساکارومایسس

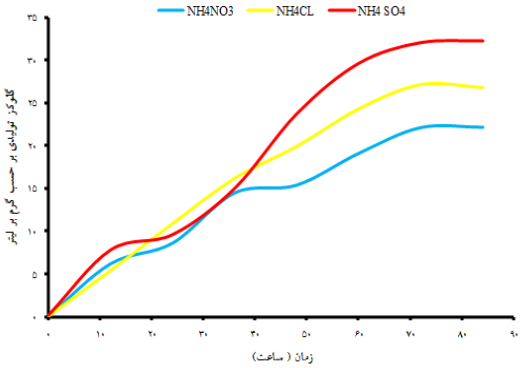
سرویزیه از پساب هیدرولیز شده توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر: نتایج بررسی هم زمان اتانول تولیدی و گلوکز مصرفی نشان داد که در ابتدا با افزایش زمان، میزان اتانول تولیدی تا مدت زمان ۱۸ ساعت به شدت افزایش می یابد. اما پس از آن میزان تولید اتانول با زمان، افزایش قابل ملاحظه ای نشان نداد. به طوری که از زمان ۱۸ تا ۳٦ ساعت تنها به میزان ۲/۷ گرم بر لیتر افزایش داشت.

همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان اتانول تولیدی و بازده تولیدی آن به ترتیب به میزان ۱۱/۵۱ (گرم بر لیتر) و ۰/۳۷ گرم از پساب برنج هیدرولیز شده با غلظت گلوکز اولیه ۳۲/۲٤ (گرم بر لیتر) در مدت زمان ۱۸ تا ۲٤ ساعت پس از شروع فرآیند تخمیر به دست آمد (نمودار ۳). همچنین نتایج حاصل از بررسی میزان وزن خشک سلولی و بازده تولیدی آن نشان داد که با افزایش زمان در ابتدا میزان این فاکتور با یک فاز تاخیری آغاز و پس از گذشت مدت زمان ٦ تا ۸ ساعت وارد فاز نمایی رشد شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت مخمر به فاز تاخیری رشد وارد شد. به طوری که پس از آن افزایش زمان تاثیر چندانی بر روی میزان بیومس تولیدی نداشت. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک سلولی تولیدی و بازده آن به ترتیب ۲/۹۸ گرم بیوماس و ۰/۱٤ g CDW/g total sugar در مدت ۲٤ ساعت می باشد (نمودار ٤).

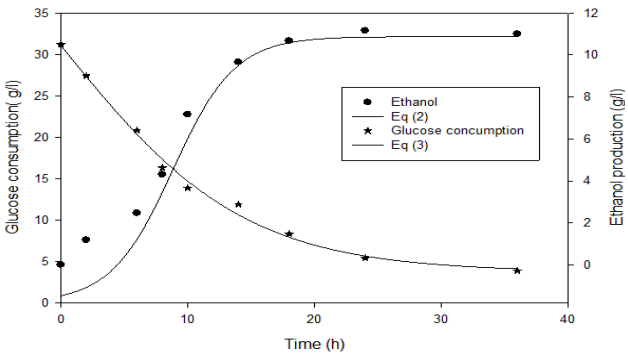
نتایج حاصل از بررسی مدل سنتیکی تولید اتانول، رشد بیومس سلولی و گلوکز مصرفی بر اساس معادلات ۱ تا ۳ نشان داد که مدل های مورد مطالعه به خوبی توانسته اند رفتار تولید اتانول و رشد سلولی را توجیه نمایند. همان طور که در جدول ۱ نشان



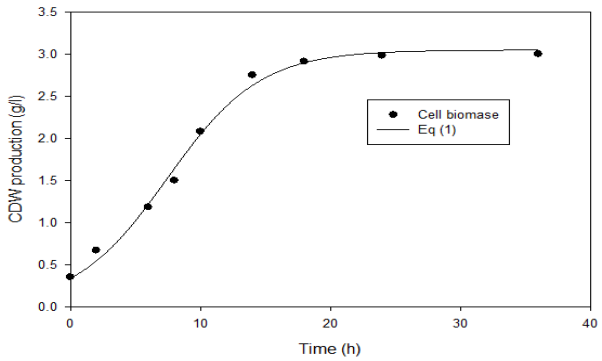
نمودار ۱: بررسی اثر غلظت های مختلف نشاسته پساب برنج بر روی میزان گلوکز تولیدی *آسپرژیلوس نایجر* (گرم بر لیتر).



نمودار ۲: بررسی اثر منابع نیتروژنی مختلف بر میزان گلوکز تولیدی



نمودار ۳: تغییرات میزان گلوکز مصرفی و اتانول تولیدی توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در فرآیند تخمیر (گرم بر لیتر).



نمودار ۴: تغییرات بیومس تولیدی توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در فرآیند تخمیر (گرم بر لیتر).

جدول ۱: رگرسیون و پارامترهای سینتیکی رشد مخمر، تولید اتانول و گلوکز مصرفی (گرم بر لیتر) در فرآیند تخمیر پساب هیدرولیز شده دارای غلظت اولیه قند ۳۰ گرم بر لیتر.

پارامترهای فرآیندی	پارامترهای سینتیکی				
رشد بیومس سلولی	غلظت اولیه وزن خشک سلولی (گرم برلیتر) ۰/۵۳	بیشترین مقدار وزن خشک سلولی (گرم بر لیتر) ۳/۵	بیشترین شدت ویژه تولید بیومس (یک بر ساعت) ۰/٦۱	R^2 ۰/۹۷	بازده سلولی (گرم بر گرم) ۰/۱٤
اتانول تولیدی (گرم بر لیتر)	غلظت اولیه اتانول تولیدی (گرم بر لیتر) ۱/۰٤	بیشترین مقدار اتانول تولیدی (گرم بر لیتر) ۰/۲۵	شدت ویژه تولید اتانول (یک بر ساعت) ۱۲/۱۳	R^2 ۰/۹۹٤	بازده اتانول (گرم اتانول بر گرم گلوکز) ۰/۳٦
گلوکز مصرفی (گرم بر لیتر)	غلظت اولیه قند کل (گرم بر لیتر) ۳۲	بازده محصول تولیدی زیست توده (گرم وزن خشک سلولی بر گلوکز) ۷/۱٤	بازده محصول تولیدی تانول (گرم اتانول بر گلوکز) ٦/۳	R^2 ۰/۹۹۳	گلوکز مصرفی(گرم بر لیتر) ۲۸/۱٦

داده شده است مقادیر ضریب تبیین (R^2) بالای ۰/۹۷ برای تمام پارامترها و همچنین مقدار *F-value* بالا نشان دهنده معنی دار بودن مدل های به کار گرفته شده می باشد.

بحث

امروزه استفاده از فرآیندهای آنزیمی برای تولید قندهای ساده مانند گلوکز توسط میکروارگانیسم های گوناگون از مواد پلی ساکاریدی همچون نشاسته، سلولز و مواد لیگنوسلولزی و پساب واحدهای تولید کننده و مصرف کننده این مواد بسیار مهم و ضروری است. این مواد بسته به نوع سوبسترای اولیه می توانند به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم از طریق فرآیندهای هیدرولیز و تخمیر به دو روش جداگانه یا همزمان از مواد مختلف با استفاده از میکروارگانیسم گوناگون تولید شوند. این فرآیندها (فرآیند آنزیمی) به دلیل توانایی ایجاد شرایط بهینه برای فعالیت میکروارگانیسم مورد استفاده در طول فرآیند هیدرولیز و یا تخمیر و همچنین هزینه کمتر نسبت به سایر روش ها مانند هیدرولیز اسیدی، کاربرد زیادی در صنایع تولیدی مختلف پیدا کرده است.

نتایج حاصل از بررسی غلظت های مختلف نشاسته پساب بر میزان گلوکز تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نشان داد که در بین غلظت های مختلف، غلظت ٦۰ گرم بر لیتر بیشترین تاثیر را بر میزان گلوکز تولیدی به میزان ۳۱/٤۲ گرم بر لیتر دارا می باشد. به طوری که در غلظت های بالاتر و یا پایین تر از این مقدار، از میزان گلوکز تولیدی طی فرآیند هیدرولیز کاسته می شود. این امر می تواند به دلیل کم بودن میزان قند محیط کشت در غلظت های پایین پساب و اشغال سایت های فعال آنزیم های هیدرولیز کننده قارچ و همچنین تاثیرات بازدارندگی غلظت بالای محیط کشت بر روی فعالیت قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در غلظت های بالای پساب باشد.

در مجموع نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که با افزایش غلظت سوبسترا سرعت واکنش و فعالیت آنزیم در ابتدا تا زمانی که سایت های فعال آنزیم ها اشغال شود افزایش می یابد و پس از آن سرعت واکنش و میزان فعالیت آنزیم ها بدون توجه به میزان افزایش مقدار سوبسترا افزایش نمی یابد. یا حتی ممکن است با کاهش نیز همراه باشد (۱۱). همچنین در مطالعه میلان (Milan) و جولانتا (Jolanta) در سال ۲۰۰۳، میزان قند محیط کشت، غلظت سوبسترا و ترکیبات آن را به عنوان عوامل بازدارنده فعالیت و تولید آنزیم گلیکو آمیلاز توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* معرفی نمودند (۱۷).

منبع نیتروژنی و نوع آن یکی از مهمترین عوامل موثر بر راندمان تولید گلوکز در فرآیند هیدرولیز آنزیمی است که موجب بهبود یا کاهش فعالیت آنزیم های تولیدی توسط میکروارگانیسم هیدرولیز کننده می گردد. نتایج حاصل از بررسی اثر منابع نیتروژنی مختلف بر روی توانایی قارچ در هیدرولیز پساب نشان داد که به ترتیب نمک آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات بیشترین و کمترین تاثیر را بر روی میزان گلوکز تولیدی دمای ۳۵ درجه سلسیوس و pH ۵ می گذارند. به طوری که بیشترین میزان گلوکز ۳۱/۲۷ گرم بر لیتر در مدت زمان ٦۰ ساعت در

محیط کشت با منبع نیتروژنی آمونیوم سولفات به دست آمد. شواهد حاکی از آن است که یافته های تحقیق حاضر با مطالعه پدرسن (Pedersen) و همکاران، فاسیتی (Faccitti) و همکاران که به ترتیب، نوع منبع نیتروژنی بر روی تولید آنزیم آلفا آمیلاز توسط قارچ *آسپرژیلوس اوریزیه* (*Aspergillus oryzae*) و *آسپرژیلوس آوامـوری* (*Aspergillus awamori*) مورد بررسی قرار دادند، مطابقت دارد (۱۸ و ۱۹).

یافته های آنها نشان داد که کمترین میزان فعالیت آنزیمی هنگامی است که آمونیوم نیترات به عنوان منبع نیتروژنی به کار گرفته شود. همچنین آنها بیان نمودند که تاثیر همزمان آمونیوم سولفات و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژنی بر روی فعالیت و رشد قارچ نسبت به سایر ترکیبات و همچنین نسبت به مواقعی که هرکدام به صورت جداگانه بکار روند نیز بیشتر می باشد.

نتایج حاصل از بررسی هم زمان اتانول تولیدی و گلوکز مصرفی نشان از مصرف گلوکز و تولید اتانول با گذشت زمان توسط مخمر در طول فرایند تخمیر دارد. همچنین هماهنگی بین کاهش میزان غلظت گلوکز کل با تولید اتانول بیانگر مصرف قند توسط مخمر و تولید اتانول می باشد.

بررسی میزان اتانول تولیدی و بازده تولیدی آن در طی فرآیند تخمیر توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نشان داد که به ترتیب بیشترین مقدار این فاکتورها به میزان ۱۱/۵۱ g/l و ۰/۳۷ g ethanol/g total sugar از پساب برنج هیدرولیز شده با غلظت گلوگز اولیه ۳۲/٤ گرم بر لیتر در مدت زمان ۱۸ تا ۲٤ ساعت پس از شروع فرآیند تخمیر به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که پس از سپری شدن زمان ۱۸ تا ۲٤ ساعت از شروع واکنش، فرآیند تخمیر تاثیر چندانی بر روی میزان اتانول تولیدی ندارد. دلیل این امر را می توان به کاهش یا مصرف میزان گلوکز موجود در محیط کشت با گذشت زمان و یا تولید ترکیبات بازدارنده رشد مخمر در طی فرآیند تخمیر مانند لاکتیک اسید نسبت داد.

همچنین از دلایل دیگر این موضوع می توان به وجود و یا سایر ترکیبات موجود در محیط کشت مانند نمک های معدنی موجود در پساب برنج اشاره نمود که می توانند تاثیر منفی بر روی رشد مخمر داشته باشند.

ساها (Saha) و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان اتانول تولیدی از کاه گندم را با استفاده از فرآیند هیدرولیز و تخمیر به دو صورت همزمان وجداگانه توسط سویه نوترکیب *اشریشیا کلی* FBR5 مقایسه نمودند. یافته های آنها نشان دهنده تولید ۲۱/۹ و ۲٤/۹ گرم بر لیتر اتانول در هر فرایند بود (۲۰). میزان کربوهیدرات محیط کشت یکی از عوامل اساسی بسیار تاثیرگذار محیط کشت بر رشد و متابولسم مخمر می باشد. به طوری که در غلظت های پایین قند، مخمر دچار گرسنگی شده و بهره دهی به شدت کاهش می یابد. در حالی که در غلظت های بالای سوبسترا، بازدارندگی قند مانع عمل آنزیم ها شده و سرعت تبدیل قند به اتانول با کاهش همراه می گردد (۱۳). با توجه به عدم توانایی کامل هیدرولیز پساب توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و در نتیجه میزان گلوکز پایین محیط کشت تخمیر می توان احتمال داد که غلظت پایین اتانول تولیدی ناشی از پایین بودن میزان قند محیط کشت نسبت به مطالعات مشابه می باشد.

نتایج حاصل از بررسی رشد مخمر *مخمرساکارومایسس سرویزیه* در فرآیند تخمیر نشان داد که مخمر در ساعت های اولیه پس از تلقیح در مرحله فاز تاخیری رشد قرار دارد و پس از آن وارد مرحله نمایی رشد می شود و تا زمان ۱۸ تا ۲٤ ساعت به حداکثر رشد خود می رسد. پس از آن نهایتاً رشد مخمر کم و یا کاهش می یابد.

در واقع مخمر وارد فاز مرگ می شود. همچنین بررسی روند تولید وزن خشک سلولی در طول فرآیند تخمیر نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک سلولی تولیدی و بازده آن به ترتیب به میزان ۲/۹۸ g biomass و ۰/۱٤ g CDW/g total sugar در مدت زمان ۲٤ ساعت به دست آمد. یکی از مشکلات تولید محصولات با ارزش از پساب های شهری و صنعتی وجود ترکیبات بازدارنده مانند نمک های معدنی است که موجب کاهش بازده تولیدی می گردد. به همین دلیل می توان گفت یکی از دلایل میزان پایین مقدار بیومس تولیدی طی

فرآیند تخمیر ناشی از وجود چنین ترکیباتی یا تولید ترکیبات بازدارنده دیگر همچون لاکتیک اسید و غیره در طی فرآیند هیدرولیز و یا تخمیر می باشد.

به طور کلی نتایج نشان داد که فرایند تخمیر پساب هیدرولیز شده توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* با کاهش قند کل همراه بوده و پس از پایان فاز رشد نمایی مخمر، میزان قند سوبسترای تخمیر به میزان زیادی کاهش یافته است. این نتایج بیانگر این است که مخمر *ساکارومایسیس سرویزیه* به عنوان میکروارگانیسم اصلی تولید کننده اتانول قادر است از قند های موجود در پساب برنج هیدرولیز شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به عنوان منبع کربنی مناسب جهت تولید اتانول استفاده نماید.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و نیز فراوان بودن پساب برنج و میزان بازده اتانول تولیدی، پساب مورد نظر می تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب در تولید اتانول به عنوان یک سوخت زیستی به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئول محترم دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین کارشناس آزمایشگاه محیط زیست دانشکده سرکار خانم حقدوست به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Reddy CSK, Ghai R, Rashmi KC. Poly hydroxyl alkanoates: an overview. Bioresour Technol. 2003; 87(2): 137-146.

2. Cardona A, Toro O. Energy consumption analysis of integrated flow sheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. Energy. 2006; 31: 2447-2459.

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

4. Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. Appl Biochem Biotech. 2010; 5(162): 1306-1315.

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

6. Oberoi HS, Vadlani K, Brijwani VK, Bharga RT. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. Process Biochem. 2010; 45: 1299-1306.

7. Jason H, Telman D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. PNAS. 2006; 2: 159-160.

8. Sakthi SS, Saranraj P, Rajasekar M. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using paddy straw as substrate. Biochem Eng J. 2010; 24: 57-64.

9. 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(3):1299-1306.

10. Tanaka YLS. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 69: 627-642.

11. Aderemi B, Abu E, Highina B. The kinetics of glucose production from rice straw by *Aspergillus niger*. Afr J Biotechnol. 2008; 7(2): 61-68.

12. Nedeltscheva M, Stoilkov G, Popova SA. Modified analysis method of starch determination by iodine spectrophotometry. Starch Stärke. 1975; 27(9): 298-301.

13. Chen HC. Non-aseptic, multi-stage, multi-feeding, continuous fermentation of cane mollasses to ethanol. Process Biochem. 1990; 23(12): 254-260.

14. Ghorbani F, Yunesi H. Kinetics of ethanol production from cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae* in a batch ractor. Energy Sources.2012. [In Press]

15. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31(3): 426-428.

16. 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.

17. Milan P, Bryjak J. Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. Biochem Eng J. 2004; 18: 57-63.

18. Facciotti MC, Chiquetto ML, Kilikian BV. Influence of carbon and nitrogen sources on glucoamylase production by *Aspergillus* in batch process. Biotechnol Lett. 1992; 14: 465-470.

19. Pedersen HN, Abu E. The influence of nitrogen sources on the a-amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 53(2): 278-281.

20. Saha C, Nichols N, Qureshi N. 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: 865-874.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

The production of glucose used in ethanol production through an enzymatic hydrolysis of rice mill by *Aspergillus niger*

Masoud Hatamimanesh[1], Habibollah Younesi[2], Nader Bahramifar[3]

[1] M.Sc., Department of Environment, Faculty of Natural Source and Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Source, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Source, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Rice mill is one of the mostabundant effluent waste waters worldwide. Due to the high starch and organic compound content, it can be used as alternatives source for ethanol production as an environmental sustainable biofuel. This study was aimed to examine the ethanol production through enzymatic hydrolysis of rice mill and fermentation process by using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast.

Materials & Methods: In order to optimize the enzymatic hydrolysis process by *A. niger,* an analysis was performed to determine the effects of different concentrations of effluent with initial starch concentrations (20, 40, 50, 60and80 gl^{-1}) and nitrogen source (NH_4NO_3, NH_4SO_4 and NH_4CL). The levels of sugar and the produced ethanol were determined by DNS and gas chromatography, respectively.

Results: The results showed that the effluents containing a starch concentration of 60gl^{-1} and (NH_4 SO_4) had the highest influence on glucose production, 32.27 and 31.84 gl^{-1} respectively. Also the results of ethanol production through hydrolysis of rice mill, with initial glucose concentration 32. 4gl^{-1}, by *saccharomyces cerevisiae* showed the maximum amount of ethanol production and yield,11.51gl^{-1} of 0.37 g ethanol/g total sugar. The highest cell dry weight and yield were 2.98 g biomass cell and 0.14 g CDW/g total sugar, respectively.

Conclusion: Regarding the abundance of rice mill and the yield of ethanol production of this effluent yield, the rice mill can be used as a suitable substrate for the ethanol production.

Keywords: Ethanol, Rice mill, *Saccharomyces cerevisiae*, Enzymatic hydrolysis.

Correspondence to: Habibollah Younesi

Tel: +98 9362155349

E-mail: hunesi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 231-240.