فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۱۱- ۲۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۱۵

بهینه‌سازی تولید بیواتانول از باگاس نیشکر پیش تیمار اسیدی شده با به کارگیری *پیکیا استیپیتیس*

محسن آهی: دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، mohsen.ahi@modares.ac.ir
مهرداد آذین: دانشیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، azin@irost.org *
سید عباس شجاع السادات: استاد بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، shoja_sa@modares.ac.ir *
ابراهیم واشقانی فراهانی: استاد مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، evf@modares.ac.ir
محسن نصرتی: استادیار بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، mnosrati20@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: به علت محدود بودن سوخت‌های فسیلی و مصرف روز افزون آن‌ها، تولید سوخت‌های زیستی مایع از اهمیت بالایی برخوردار است. استفاده از مواد اولیه‌ای که مصرف غذایی نداشته باشند، مانند مواد لیگنوسلولزی برای تولید سوخت‌های زیستی نسل دوم مطرح‌اند. با توجه به این‌که مقدار در خور توجهی از مواد لیگنوسلولزی را قندهای پنتوز تشکیل می‌دهد، استفاده از این قندها برای تولید سوخت‌های زیستی اهمیت ویژه‌ای دارد. بنابراین، در این پژوهش، از مخمر *پیکیا استیپیتیس* برای تولید بیواتانول از این قندهای پنج کربنه و بهینه‌سازی شرایط تخمیر استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: باگاس نیشکر با روش اسید رقیق پیش تیمار شد. از مخمر *پیکیا استیپیتیس* برای تخمیر قندهای حاصل از پیش تیمار باگاس استفاده شد. برای بهینه‌سازی فرآیند تخمیر و افزایش مقدار اتانول منابع نیتروژن، فسفر، روی، گوگرد، منیزیم و ویتامین مورد نیاز مخمر با استفاده از روش طراحی آزمایش‌ها بررسی شد. در طراحی تاگوچی، آرایه L27 با ۸ عامل و سه سطح در نظر گرفته شد.

نتایج: تحلیل نتایج حاصل از طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی نشان می‌دهد که شربت ذرت خیسانده، دی‌آمونیوم‌هیدروژن فسفات، منیزیم سولفات و پتاسیم دی هیدروژن فسفات به ترتیب اثر در خور توجهی بر روی تولید اتانول داشته‌اند. آزمایش تاییدی نشان داد که مقدار اتانول نسبت به میانگین داده‌ها ۹۷ درصد افزایش یافت. اتانول طی ۴۸ ساعت با بازده ۰/۲۶گرم اتانول بر گرم قند مصرفی و بهره دهی ۰/۱۲۵ گرم بر لیتر بر ساعت تولید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: تولید اتانول از باگاس نیشکر از آبکافته باگاس در شرایط بهینه نسبت به پژوهش‌های مشابه بازده بیشتری داشته است. نتایج حاصل از تولید اتانول با استفاده از منابع ارزان قیمت، پس از بهینه‌سازی، نشان از اهمیت محیط کشت بهینه برای تولید اقتصادی اتانول دارد.

واژه‌های کلیدی: هیدرولیز اسیدی، باگاس، بهینه‌سازی، بیواتانول، پیش تیمار، *پیکیا استیپیتیس*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

با توجه به محدودیت سوخت‌های فسیلی و به علت مصرف روزافزون آن‌ها، تولید سوخت‌های زیستی مایع از مواد لیگنوسلولوزی اهمیت ویژه‌ای یافته است. بیواتانول به عنوان یکی از سوخت‌های جایگزین مطرح است که می‌توان آن را به شکل ترکیبی با بنزین برای استفاده در وسایل نقلیه و بدون تغییر موتور استفاده کرد (۱). روش متداول تولید اتانول استفاده از روش‌های تخمیری است که با استفاده از سوبسترای قندی انجام می‌گیرد. سوبسترای قندی مانند ملاس یا به شکل قندهای قابل تخمیر است که مستقیما می‌توان از آن اتانول تولید کرد و یا این‌که مانند ذرت سوبسترای نشاسته ایست که باید آن را به قندهای قابل تخمیر تبدیل و سپس برای تولید اتانول استفاده کرد. به سوخت‌های حاصل از سوبستراهای مانند نشاسته که می‌توان آن‌ها را برای مصرف غذایی نیز در نظر گرفت، سوخت‌های نسل اول می‌گویند. امروزه انتقادهای زیادی برای استفاده از سوخت‌های نسل اول مطرح است از این رو که مواد اولیه آن‌ها سطح بالایی از زمین‌های کشاورزی را به خود اختصاص می‌دهند و نیز مصرف غذایی دارند. استفاده از منابع اولیه ای که مصرف غذایی نداشته باشند برای تولید سوخت‌های زیستی نسل دوم مطرح‌اند و مواد لیگنوسلولزی را در بر می‌گیرند. با توجه به این‌که مقدار زیادی از مواد لیگنوسلولزی را قندهای پنتوز تشکیل می‌دهند، استفاده از این قندها برای تولید سوخت‌های زیستی اهمیت ویژه ای دارد. میزان تولید باگاس نیشکر در ایران سالیانه حدود ۴ میلیون تن است (۲). این میزان بقایای کشاورزی باعث اشغال فضای زیاد و اعمال هزینه‌های در خور توجه برای از بین بردن، سوزاندن، دفن کردن و از طرف دیگر اثرات زیست محیطی نامطلوب شده است. باگاس نیشکر را می‌توان به طیف وسیعی از محصولات از جمله خوراک دام، کاغذ، نئوپان، و غیره تبدیل کرد. در این میان بیواتانول که جزو یکی از محصولات زیستی مهم است را می‌توان از باگاس تولید کرد. از آن‌جایی که قندهای پنتوز سهم بیشتری از مواد لیگنوسلولزی را تشکیل می‌دهند، بنابراین، ایجاد فرآیندی اقتصادی برای تخمیر قندهای پنتوز مورد توجه واقع شده است. مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*[1] که از متداول‌ترین میکروارگانیسم‌های صنعتی تولید اتانول است قابلیت مصرف پنتوزها را ندارد، بنابراین، باید از میکروارگانیسمی استفاده کرد که توانایی مصرف قندهای پنتوز و تبدیل آن‌ها به اتانول را داراست. یکی از میکروارگانیسم‌های شناخته شده ای که قابلیت تبدیل قندهای پنج کربن را به اتانول دارد مخمر *پیکیا استیپیتیس*[2] است که بهترین تخمیر کننده قندهای پنتوز به شمار می‌رود (۳). یکی از ویژگی‌های تخمیر قندهای پنتوز این است که برای تخمیر آن‌ها به هوادهی محدود نیاز است. طی پژوهشی برای بهینه‌سازی مخمر *پیکیا استیپیتیس* با استفاده از محیط کشت کاملا معین، اوره و اسیدهای آمینه و یون‌های منیزیم و روی و آهن و منگنز، دارای اثر در خور توجهی بر روی تولید اتانول بوده است (۴). شربت ذرت خیسانده به عنوان یک منبع غنی از ویتامین و اسیدهای آمینه می‌تواند جایگزین مناسبی برای عصاره مخمر و پپتون در تولید اتانول با مخمر *پیکیا استیپیتیس* باشد (۵). اگرچه تا کنون برای تولید اتانول از قند زایلوز به شکل خالص پژوهش‌های متعددی انجام شده است با این حال برای بهینه‌سازی محیط کشت تولید بیواتانول با استفاده از مخمر *پیکیا استیپیتیس* و محیط آبکافته باگاس پژوهشی انجام نشده است. در این پژوهش، با استفاده از محیط پیش تیمار شده باگاس نیشکر، که مقدار بیشتری قندهای پنتوز دارد، تولید بیواتانول با مخمر *پیکیا استیپیتیس* و استفاده از روش تاگوچی بهینه‌سازی شده است.

مواد و روش‌ها

پیش تیمار

باگاس نیشکر از شرکت کشت و صنعت کارون، اهواز تهیه، ابتدا آسیاب و با استفاده از غربال‌های با مش ۳۵ تا ۸۰ غربال شد. رطوبت باگاس نیشکر ۶ درصد اندازه‌گیری شد. برای پیش تیمار هر بار ۳۰ گرم از باگاس نیشکر در ۲۷۰ میلی‌لیتر محلول سولفوریک اسید ۰/۷ درصد (درصد حجمی) به مدت نیم ساعت خیسانده شد و سپس با استفاده از رآکتور ۱ لیتری که از جنس استیل ۳۱۶ ساخته شده بود پیش تیمار شد. برای تامین دمای مورد نظر در پیش تیمار از دستگاه اجاق[۳] استفاده شد. رآکتور پس از آماده‌سازی درون اجاق با دمای ثابت ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. پس از طی مدت زمان لازم رآکتور در یک ظرف بزرگ حاوی آب قرار گرفت تا خنک شود. پس از پیش تیمار باگاس، آبکافته[۴] با استفاده از کاغذ صافی از جامد جدا شد. تفاله جامد یکبار شستشو و سپس برای استفاده‌های بعدی نمونه‌ها در فریزر منجمد شد.

تخمیر

دو سوش *پیکیا استیپیتیس* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران با مشخصه PTCC 5309 و PTCC 5310 به شکل اسلنت روی محیط PDA تهیه شد. آبکافته باگاس نیشکر که مطابق روش فوق به دست آمد، دارای مقدار زیادی قند پنتوز است و به عنوان منبع کربن برای تولید اتانول استفاده شد. منابع نیتروژن و فسفر و یون‌های فلزی هر کدام به شکل محلول‌های جداگانه تهیه و استریل شدند. محلول ویتامین ب کمپلکس حاوی ب ۱، ب ۲، ب ۳، ب ۵، ب ۶ با درجه خلوص دارویی با غلظت به ترتیب ۱، ۰/۴، ۴، ۰/۶ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. محلول‌هایی حاوی ۲۰۰ گرم در لیتر پودر خیسانده شربت ذرت و ۱۶۰ گرم در لیتر از اوره، دی آمونیوم هیدروژن فسفات، آمونیوم سولفات، ۴۰ گرم در لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات، منیزیم سولفات، سولفات روی هر کدام به شکل جداگانه و به ترتیب در اتوکلاو و اوره با صافی ۰/۴۵ میکرون استریل شدند. برای هر آزمایش مقدار معینی از این محلول‌ها به هر ارلن اضافه شد و تخمیر در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۰۰ کشت داده شدند.

انتخاب بین دو زیر گونه *پیکیا استیپیتیس* PTCC 5309 و PTCC 5310

برای انتخاب یکی از دو مخمر *پیکیا استیپیتیس* که در کلکسیون میکروبی وجود داشت چند آزمایش مقدماتی انجام شد. بدین شکل که تولید اتانول بر روی محیط حاوی زایلوز ۳ و ۶ درصد و محیط آبکافته باگاس انجام شد. محیط کشت دارای شربت ذرت خیسانده ۱۰، آمونیوم سولفات ۱/۲ و آمونیوم فسفات ۰/۶ گرم بر لیتر بود.

روش‌های سنجش

اندازه‌گیری مقدار قندهای آزاد شده با روش DNS (۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید) انجام شد (۶). مقدار اتانول با روش دی کرومات پتاسیم اندازه‌گیری شد بدین ترتیب که محلول دی کرومات پتاسیم ۰/۱ مولار در سولفوریک اسید ۵ مولار تهیه شد. ۰/۳ میلی‌لیتر نمونه تقطیر شده حاوی اتانول را به ۳ میلی‌لیتر معرف اضافه، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه گرم خانه‌گذاری و جذب آن در طول موج ۵۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد (۷) .

روش طراحی آزمایش‌ها

برای بهینه‌سازی مقدار اتانول تولیدی، انتخاب عامل‌های اثر گذار با استفاده از مرور مقالات و آزمایش‌های مقدماتی بر روی آبکافته انجام شد. از روش تاگوچی و نرم افزار Minitab 16 استفاده شد. در این طراحی آزمایش‌ها هشت عامل در ۳ سطح با استفاده از آرایه L27 با دو تکرار بررسی شد. هر یک از عامل‌ها و سطوح و واحد آن‌ها در جدول ۱ آمده است. برای ارزیابی طراحی تاگوچی می‌توان از میانگین تکرار آزمایش‌ها یا از نسبت سیگنال به نویز[5] (S/N) استفاده نمود. در آزمایش‌هایی که تکرار شده اند استفاده از تحلیل سیگنال به نویز (S/N) نسبت به میانگین داده‌ها اولویت دارد (۸). در طراحی تاگوچی مقدار S/N طبق رابطه زیر برای به‌دست آوردن مقدار بیشینه اتانول استفاده شد:

$$S/N = -10 \times log\left(\frac{\Sigma(\frac{1}{Y^2})}{n}\right) \quad (۱)$$

در رابطه بالا S/N نسبت سیگنال به نویز ،Y پاسخ هر آزمایش و n تعداد آزمایش‌ها است. در طراحی تاگوچی نسبت S/N هر چه بیشتر باشد نشان دهنده شرایطی است که در آن عامل‌های کنترل کننده اثر عامل‌های اغتشاشی (نویز) را در پاسخ به کم‌ترین مقدار می‌رساند (۸). با توجه به این‌که در طراحی تاگوچی L27 با هشت عامل فقط می‌توان اثرات متقابل دو عامل را در نظر گرفت در این آزمایش‌ها اثرات متقابل CSL با اوره و ویتامین در نظر گرفته شد.

جدول ۱-فاکتورها و سطوح انتخاب شده برای فاکتورهای مطالعه شده

فاکتورها	اختصار	واحد	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دی آمونیوم هیدروژن فسفات	DAHP	گرم در لیتر	۰	۱	۲
آمونیوم سولفات	AS	گرم در لیتر	۰	۱	۲
اوره	Urea	گرم در لیتر	۰	۱	۲
پودر خیسانده شربت ذرت	CSL	گرم در لیتر	۰	۱۰	۲۰
سولفات روی	Zn	گرم در لیتر	۰	۰/۲۵	۰/۵
سولفات منیزیم	Mg	گرم در لیتر	۰	۰/۲۵	۰/۵
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	K	گرم در لیتر	۰	۰/۲۵	۰/۵
محلول ویتامین	Vitamin	میکرو لیتر در لیتر	۰	۲	۴

نتایج

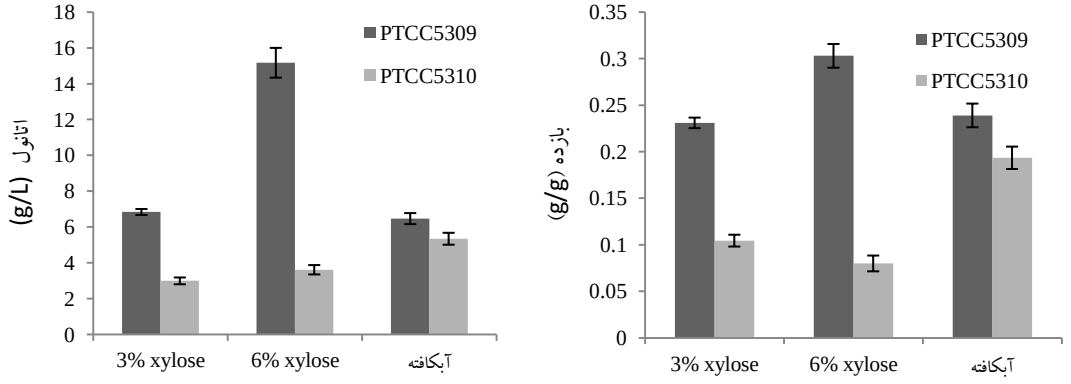
انتخاب سوش برتر

تولید اتانول با استفاده از دو مخمر پیکیا نشان داد که مخمر PTCC 5309 نسبت به مخمر PTCC 5310 در تولید اتانول برتری دارد(شکل ۱). علاوه براین بازدهی تولید اتانول در مخمر PTCC 5309 نسبت به مخمر PTCC 5310 بالاتر بوده است.

بهینه‌سازی محیط کشت برای مخمر پیکیا PTCC 5309

غلظت نهایی اتانول در هر آزمایش (با دو تکرار) به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد و در جدول ۲ آمده است.

نتایج بهینه‌سازی عامل‌های محیط کشت برای تولید اتانول نشان داد که دی آمونیوم هیدروژن فسفات اثر در خور توجهی بر روی تولید اتانول دارد. دی آمونیوم هیدروژن فسفات به عنوان منبع نیتروژن و نیز منبع فسفر محسوب می‌شود و اثر این عامل بر روی تولید اتانول را می‌توان به هر کدام از این دو منبع ارتباط داد. آمونیوم سولفات که به عنوان منبع گوگرد و منبع نیتروژن مطرح است اثر در خور توجهی بر روی تولید اتانول نداشته و در مقادیر صفر، ۱ و ۲ گرم بر لیتر تغییری در تولید اتانول حاصل ایجاد نمی‌کند.



شکل ۱- مقایسه دو سویه از مخمر *پیکیا استیپیتیس*. (چپ: غلظت تولید اتانول، راست: بازدهی تولید اتانول)

جدول ۲- طراحی آزمایش‌ها و پاسخ مربوطه (غلظت نهایی اتانول)

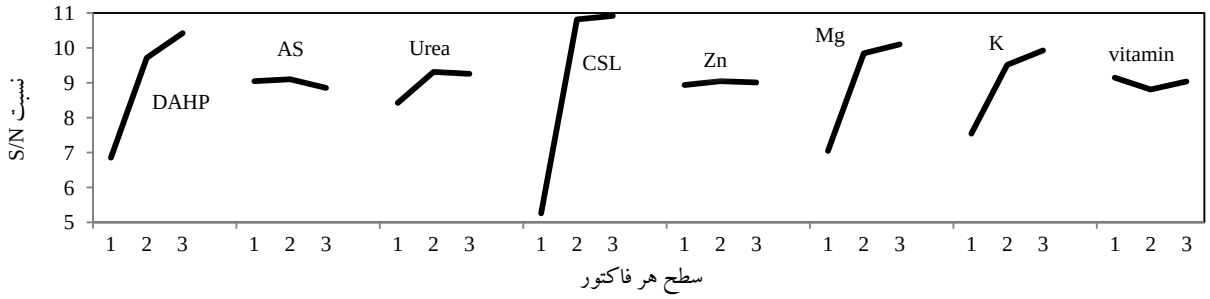
شماره	DAHP	AS	Urea	CSL	Zn	Mg	K	Vitamin	اتانول[1] (g/L)
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۷۷±۰/۳۸
۲	۱	۱	۰	۰	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۱	۸۰	۱/۸۳±۰/۱۲
۳	۲	۲	۰	۰	۰/۰۵	۰/۵	۲	۱۶۰	۲/۲۵±۰/۱۴
۴	۱	۱	۲	۱۰	۰	۰/۵	۰	۸۰	۳/۶۳±۰/۱۹
۵	۲	۲	۲	۱۰	۰/۰۲۵	۰	۱	۱۶۰	۳/۲۱±۰/۲۶
۶	۰	۰	۲	۱۰	۰/۰۵	۰/۲۵	۲	۰	۳/۶±۰/۰۰
۷	۲	۲	۴	۲۰	۰	۰/۲۵	۰	۱۶۰	۳/۵۳±۰/۱
۸	۰	۰	۴	۲۰	۰/۰۲۵	۰/۵	۱	۰	۳/۵۴±۰/۰۲
۹	۱	۱	۴	۲۰	۰/۰۵	۰	۲	۸۰	۳/۰۶±۰/۴۳
۱۰	۱	۲	۲	۲۰	۰	۰	۲	۰	۳/۸۳±۰/۱۴
۱۱	۲	۰	۲	۲۰	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۰	۸۰	۳/۶۵±۰/۲۶
۱۲	۰	۱	۲	۲۰	۰/۰۵	۰/۵	۱	۱۶۰	۳/۰۹±۰/۲۴
۱۳	۲	۰	۴	۰	۰	۰/۵	۲	۸۰	۳/۱۱±۰/۲۱
۱۴	۰	۱	۴	۰	۰/۰۲۵	۰	۰	۱۶۰	۱/۳۴±۰/۰۰
۱۵	۱	۲	۴	۰	۰/۰۵	۰/۲۵	۱	۰	۲/۴۵±۰/۲۴
۱۶	۰	۱	۰	۱۰	۰	۰/۲۵	۲	۱۶۰	۳/۲۹±۰/۱۹
۱۷	۱	۲	۰	۱۰	۰/۰۲۵	۰/۵	۰	۰	۳/۷۵±۰/۰۲
۱۸	۲	۰	۰	۱۰	۰/۰۵	۰	۱	۸۰	۳/۷۶±۰/۱
۱۹	۲	۱	۴	۱۰	۰	۰	۱	۰	۳/۴۹±۰/۰۰
۲۰	۰	۲	۴	۱۰	۰/۰۲۵	۰/۲۵	۲	۸۰	۳/۱۲±۰/۰۰
۲۱	۱	۰	۴	۱۰	۰/۰۵	۰/۵	۰	۱۶۰	۳/۵۱±۰/۰۷
۲۲	۰	۲	۰	۲۰	۰	۰/۵	۱	۸۰	۳/۳۳±۰/۰۵
۲۳	۱	۰	۰	۲۰	۰/۰۲۵	۰	۲	۱۶۰	۳/۴۱±۰/۱۷
۲۴	۲	۱	۰	۲۰	۰/۰۵	۰/۲۵	۰	۰	۴/۵±۰/۰۰
۲۵	۱	۰	۲	۰	۰	۰/۲۵	۱	۱۶۰	۲/۸۹±۰/۴۳
۲۶	۲	۱	۲	۰	۰/۰۲۵	۰/۵	۲	۰	۲/۹۲±۰/۰۰
۲۷	۰	۲	۲	۰	۰/۰۵	۰	۰	۸۰	۱/۰۶±۰/۱۲

۱) غلظت اتانول بر اساس میانگین دو تکرار ± انحراف معیار نشان داده شده است

آزمایش‌هایی که با عامل اوره در مقادیر صفر، ۲ و ۴ گرم بر لیتر انجام شد، نشان داد که وجود اوره در حد ۲ گرم بر لیتر نسبت به نبودن آن تولید اتانول را بهبود می‌بخشد ولی استفاده از ۴ گرم بر لیتر اوره تغییر چندانی بر تولید اتانول ندارد. نتایج نشان داد که در شرایط عدم حضور پودر شربت ذرت خیسانده، نسبت S/N 26/5 برای تولید اتانول حاصل شده است. در حالی که در مقدار ۱۰ گرم بر لیتر از این عامل، نسبت S/N افزایش چشم‌گیری نشان داده و به مقدار ۱۰/۸۲ رسیده و افزایش بیشتر CSL از ۱۰ به ۲۰ گرم بر لیتر تغییر در خور توجهی در نسبت S/N ایجاد نمی‌کند. نتایج نشان می‌دهد که از شرایط بدون حضور یون منیزیم تا ۰/۲۵ گرم بر لیتر، نسبت S/N از ۷/۰۵ تا ۹/۸۴ تغییر می‌کند و در مقدار ۰/۵ گرم در لیتر نسبت S/N به ۱۰/۱ می‌رسد. پتاسیم دی هیدروژن فسفات در اینجا به عنوان یک منبع فسفر دیگر بررسی شده است تا بتوان اثر منبع فسفر را به طور جداگانه بررسی کرد. طبق شکل ۲، نسبت S/N در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات به ترتیب به۷/۵۴، ۹/۵۲، ۹/۹۳ گرم بر لیتر می‌رسد. افزودن محلول ویتامین که دارای چند نوع ویتامین‌های گروه ب بوده، تاثیر در خور توجهی بر نسبت S/N نداشته است. شکل ۲ اثر هر یک از عامل‌ها را بر نسبت S/N نشان می‌دهد. جدول ۳ تحلیل واریانس را برای این طراحی آزمایش نشان می‌دهد. طبق این جدول دی آمونیوم هیدروژن فسفات، پودر شربت ذرت خیسانده، منیزیم فسفات و پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات جزو عامل‌های مهم تاثیرگذار ($p < ۰/۰۵$) هستند.

جدول ۳- تحلیل واریانس برای عامل‌های انتخابی

عامل	درجه آزادی	F	P
DAHP	۲	۴۸/۴۹	۰/۰۲۰
AS	۲	۰/۲۳	۰/۸۱۲
Urea	۲	۳/۳۱	۰/۲۳۲
CSL	۲	۱۴۲/۰۶	۰/۰۰۷
Zn	۲	۰/۰۴	۰/۹۶۲
Mg	۲	۳۸/۷۱	۰/۰۲۵
K	۲	۲۲/۰۳	۰/۰۴۳
Vitamin	۲	۰/۴۲	۰/۷۰۵
Urea×CSL	۴	۹/۲۹	۰/۱۰۰
CSL×Vitamin	۴	۳/۶۱	۰/۲۲۸
Residual Error	۲		
Total	۲۶		



شکل ۲- اثرات اصلی هر عامل با استفاده از بررسی سیگنال به نویز (S/N)

جدول ۴-تایید شرایط بهینه برای تولید اتانول با مخمر PTCC 5309

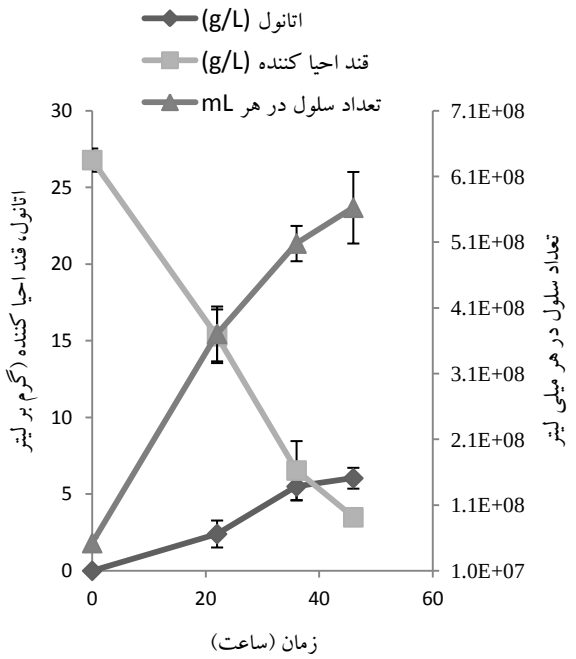
مقدار واقعی الکل (g/L)	مقدار پیش بینی شده الکل (g/L)	Vitamin	K	Mg	Zn	CSL	Urea	AS	DAHP
۶/۰۴	۵/۳	۰	۰/۵	۰/۵	۰	۱۰	۲	۰	۲

تایید شرایط بهینه

بررسی شرایط بهینه تولید اتانول نشان می‌دهد که تولید اتانول پس از ۴۸ ساعت به ۶ گرم بر لیتر رسید. مقدار اتانول تولیدی با مقدار پیش بینی شده در جدول ۴ آمده است.

تولید اتانول در شرایط بهینه

تولید اتانول طی ۴۸ ساعت بر حسب زمان در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که شکل نشان می‌دهد، تعداد سلول‌ها در فلاسک‌های صد میلی‌لیتری با حجم محیط ۴۰ میلی‌لیتر پس از طی ۴۸ ساعت از $۵/۸\times۱۰^{۷}$ در هر میلی‌لیتر، به $۵/۶\times۱۰^{۸}$ در هر میلی‌لیتر رسیده است. میزان قند اولیه نیز که ۲۶/۸ گرم بر لیتر بوده پس از ۴۸ ساعت به ۳/۵ گرم بر لیتر رسیده است و در این‌حال، میزان اتانل پس از ۴۸ ساعت به بیش از ۶/۰۴ گرم بر لیتر بالغ شده است.



شکل ۳- تولید اتانول در شرایط بهینه

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد بین دو سوش آزمایش شده *پیکیا استیپیتیس*، سوش PTCC 5309 تولید اتانول بیشتری داشته است. مطالعات گذشته نیز برای تولید اتانول در محیط زایلوز ۲ درصد با این دو مخمر نتیجه مشابهی داشته است و مخمر CBS 5773(PTCC 5309) نسبت به مخمر CBS 5776(PTCC 5310) تولید اتانول بیشتری داشته است (۹).

بهینه‌سازی محیط کشت

محیط کشت بر روی حالت فیزیولوژی و زیستی مولکولی مخمر تاثیر می‌گذارد و می‌تواند در نهایت باعث تاثیر بر روی عملکرد و بازدهی میکروارگانیسم‌ها شود. مخمرها به ترکیبات نیتروژن دار با وزن مولکولی پایین مثل یون غیر آلی آمونیم، اوره، آمینواسیدها و پپتیدها نیاز دارند (۱۰). معمولا نیتروژن به شکل یون آمونیم و با اضافه کردن اوره، نمک فسفات و سولفات برای مخمر فراهم می‌شود. اوره توسط مخمر شکسته شده تا دو مولکول آمونیاک و یک مولکول دی اکسید کربن تولید کند. در تحقیقات انجام شده در مقیاس آزمایشگاهی معمولا از عصاره مخمر و پپتون استفاده شده است. با این حال این مواد برای استفاده در تخمیرهای صنعتی صرفه اقتصادی ندارد. بنابراین نیاز است از ترکیبات ارزان استفاده کرد که نیازهای تغذیه‌ای مخمر را مرتفع کند. پژوهش‌های دیگر نشان داده است که با استفاده از CSL در مقایسه با محیط کشت‌هایی که دارای عصاره مخمر و پپتون بوده اند اتانول بیشتری تولید شده است (۵). نتایج بهینه‌سازی محیط کشت از روش تاگوچی نشان می‌دهد که CSL در تولید اتانول دارای اثر در خور توجهی بوده است. CSL که محصول جانبی کارخانه‌های تولید نشاسته از

ذرت است منبع ارزانی است که دارای پروتئین، اسیدهای آمینه مختلف و ترکیبات معدنی و ویتامین و عناصر فلزی کم مقدار است که می‌توان آن را جایگزین عصاره مخمر و پپتون نمود (۱۰). اثر یون‌های فلزی بر روی رشد و تخمیر مخمر اثبات شده است. طبق مطالعات انجام شده منیزیم، روی و کلسیم بر سرعت مصرف قند تاثیرگذار بوده و به علاوه این فلزات به عنوان کوفاکتورهای مورد نیاز در چرخه‌های متابولیکی مطرح هستند (۱۱). اثر یون منیزیم و کلسیم برای افزایش تحمل مخمر برای اتانول گزارش شده است. ساز و کار اثر یون منیزیم در حفاظت مخمر با کاهش تراوایی پذیری غشای سلول تحت تاثیر اتانول انجام می‌گیرد (۱۲). طبق شکل ۳ تولید اتانول با تغییر مقدار روی یا مقدار ویتامین تغییر چندانی نداشته است. دلیل این عدم تاثیر را می‌توان این گونه توجیه کرد که چون شربت ذرت خیسانده (CSL) خود دارای مقدار کافی یون روی و همچنین، مقدار کافی از انواع مختلف ویتامین‌ها است این عامل در تولید اتانول تاثیر ندارد.

در شرایطی که هر یک از عامل‌های مورد بررسی در مقدار مناسب خود قرار داشتند تولید اتانول طی ۴۸ ساعت بررسی شد و نتیجه نشان می‌دهد که تولید اتانول نسبت به بیش‌ترین مقدار مشاهده شده (۵/۴ گرم در لیتر) در طراحی آزمایش‌ها بالاتر بوده است. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تولید اتانول با استفاده از باگاس نیشکر و بدون سم زدایی پس از ۱۲۰ ساعت به۴/۹ گرم بر لیتر رسیده است بازده تخمیر در این حالت ۰/۲ بوده است. با سم زدایی با زغال فعال اتانول تولیدی ۶/۱ و با سم‌زدایی با رزین تبادل یونی ۷/۵ گرم بر لیتر بوده و بازده تولید ۰/۳ و مدت زمان تخمیر ۴۸ ساعت بوده است (۱۳). همچنین، تحقیق دیگری برای تولید اتانول از باگاس نیشکر نشان داده است که تخمیر آبکافته باگاس نیشکر که با استفاده از زغال فعال تیمار شده است با مقدار قند اولیه ۶۸ گرم در لیتر موجب تولید ۲۴ گرم در لیتر اتانول و بازده ۰/۳۵ شده است (۱۴). اگر چه در این تحقیقات سم زدایی آبکافته باعث بهبود تولید اتانول شده است اما باید توجه داشت سم زدایی مشکلات فرآیندی متعددی دارد و هزینه‌های بسیار زیادی بر فرآیند تولید اتانول تحمیل می‌کند و از همه مهم‌تر سم زدایی باعث افت مقدار قندها می‌شود (۱۵). بنابراین، استفاده از محیط بهینه شده ای که در آن تولید اتانول بیشتر و بدون سم زدایی به دست آید بسیار مطلوب‌تر است.

استفاده از محیط شربت ذرت خیسانده برای تولید اتانول نه تنها به عنوان یک منبع ارزان قیمت می‌تواند استفاده شود بلکه از آنجایی که محیطی بسیار غنی است می‌تواند با عصاره مخمر و پپتون در فرآیند تولید اتانول رقابت کند. نتایج حاصل نشان می‌دهد که با بهینه‌سازی محیط کشت مقدار اتانول بدون سم زدایی نسبت به مطالعات مشابه از مقدار بالاتری برخوردار بوده و حتی با نتایج مطالعات دیگر که از تخمیر محیط سم زدایی شده به‌دست آمده قابل رقابت است.

References

(1) Pandey A. *Handbook of plant-based biofuels*. Boca Raton: CRC Press; 2009.

(2) Najafi G, Ghobadian B, Tavakoli T, Yusaf T. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renew Sust Energ Rev*. 2009; 13(6-7):1418-27.

(3) Unrean P, Nguyen NA. Optimized Fed-Batch Fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for Efficient Production of Ethanol from Hexoses and Pentoses. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013; 169(6): 1895-909.

(4) Slininger PJ, Dien BS, Gorsich SW, Liu ZL. Nitrogen source and mineral optimization enhance D -xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;72(6):1285-96.

(5) Amartey S, Jeffries TW. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnol Lett*. 1994; 16(2): 211-4.

(6) Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959; 31(3): 426-8.

(7) Manivannan A, Jayarani PH, Narendhirakannan R. Enhanced acid hydrolysis for bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) using fermentating yeast *Candida intermedia* NRRL Y-981. *J Sci Ind Res*. 2012; 71: 51-6.

(8) Roy R. *A primer on the Taguchi method*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1990.

(9) Toivola A, Yarrow D, Van Den Bosch E, Van Dijken JP, Scheffers WA. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl Environ Microbiol*. 1984;47(6):1221-3.

(10) Jacques KA, Lyons TP, Kelsall DR. *The alcohol textbook : a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*. 3rd ed. Nottingham: Nottingham University Press; 1999.

(11) Pereira FB, Guimarães PM, Teixeira JA, Domingues L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour Technol*. 2010; 101(20): 7856-63.

(12) Hu C-K, Bai F-W, An L-J. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnol Lett*. 2003; 25(14): 1191-4.

(13) Canilha L, Carvalho W, de Almeida Felipe MG, de Almeida e Silva JB, Giulietti M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010; 161(1): 84-92.

(14) Roberto IC, Lacis LS, Barbosa MFS, de Mancilha IM. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochem*. 1991; 26(1): 15-21.

(15) Avci A, Saha BC, Kennedy GJ, Cotta MA. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Bioresour Technol*. 2013; 142: 312-9.

[1] *Saccharomyces cerevisiae*
[2] *Pichia stipitis*
[3] Oven
[4] Hydrolysate
[5] Signal-to-noise

Optimization of media for bioethanol production by *Pichia stipitis* from sugarcane bagasse pretreated by dilute acid

Mohsen Ahi
Ph.D student of Biotechnology, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran, mohsen.ahi@modares.ac.ir
Mehrdad Azin*
Associated Professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran, azin@irost.org
Seyed Abbas Shojaosadati *
Professor of Biotechnology, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran, shoja_sa@modares.ac.ir
Ebrahim Vasheghani Farahani
Professor of Chemical Engineering, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran, evf@modares.ac.ir
Mohsen Nosrati
Assistant Professor of Biotechnology, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran, mnosrati20@modares.ac.ir

Abstract

Introduction: Reduction of fossil fuels due to its increasing consumption caused the biofuels production as an important topic, today. Using resources that have not food application was regarded as the second generation biofuels and consisted of lignocelluloses. Since considerable amount of lignocellulosic material are pentoses, utilizing them is important for the production of biofuels.

Materials and methods: Sugarcane bagasse was pretreated with dilute acid method. *Pichia stipitis* was used for the fermentation of released sugars. A L27 Taguchi orthogonal array was considered to optimize the fermentation process and increase the amount of ethanol. The eight factors with three levels considering nitrogen, phosphorus, zinc, sulfur, magnesium, and vitamins sources were considered in this study.

Results: The analysis of the results shows that corn steep liquor, ammonium hydrogen phosphate, potassium di-hydrogen phosphate and magnesium sulfate have a significant effect on the production of ethanol, respectively. Confirmation of the optimal conditions shows that ethanol production was increased 97% relative to the mean of the observed results. The yield and productivity during 48 h of the fermentation were reached to 0.26 (g ethanol/g consumed sugar) and 0.125g (L.h), respectively.

Discussion and conclusion: At the optimum condition the production of ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate had higher efficiency relative to previous studies. Results of medium optimization considering cheap resources showed showed an excellent potential toward an economical bioethanol production process.

Key words: Dilute acid, Optimization, *Pichia stipitis*, Pretreatment, Sugarcane bagasse

* Corresponding author
Received: July 17, 2013 / **Accepted:** October 7, 2013