Archive of SID

بهینه سازی تولید اتانل با استفاده از سوبستر های ارزان قیمت توسط باکتری *Zymomonas mobilis* PTCC 1718

شیوا سلیمانی*[۱]، محمد فائزی قاسمی[۲]، ابوالفتح شجاعی آرانی[۳]

۱*، ۲و۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

Soleimani_shiva@yahoo.com

چکیده

هدف از این تحقیق بهینه سازی محیط و شرایط کشت جهت بالا بردن تولید اتانل توسط باکتری *Zymomonas mobilis* بود. ابتدا با استفاده از روش تغییر یک فاکتور در یک زمان (one-factor-at-a-time) اثر منابع کربنی و نیتروژنی مختلف همچنین اثر دما، pH و درصد تلقیح اولیه در تولید بررسی گردید. سپس بهینه سازی بهترین منابع غذایی به روش آنالیز آماری تاگوچی انجام پذیرفت. ابتدا اثر منابع کربنی مختلف مانند زایلوز، فروکتوز، رافینوز، لاکتوز، مانیتول، مالتوز، سوکروز و گلوکز در تولید اتانل توسط این باکتری بررسی شد. پس از آن اثر منابع نیتروژنی پیچیده و معدنی مختلف مانند آب پنیر، عصارهٔ مخمر، پپتون، نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم در تولید اتانل توسط این باکتری بررسی شد. اثر منابع نیتروژنی ارزان قیمت مانند عصارهٔ آرد جو، عصارهٔ سبوس گندم، عصارهٔ سبوس برنج و عصارهٔ سیب زمینی نیز در افزایش تولید اتانل بررسی شد. نتایج نشان داد که از میان منابع کربنی سوکروز به عنوان بهترین منبع کربن است. ولی چون هدف استفاده از منابع ارزان قیمت در تولید اتانل بود، شکر به جای سوکروز جایگزین شد که اثر خوبی در تولید اتانل داشت. از میان منابع نیتروژنی آب پنیر، عصارهٔ مخمر، پپتون به عنوان بهترین منابع نیتروژنی و از میان منابع ارزان قیمت عصارهٔ سبوس گندم به عنوان بهترین منبع شناخته شدند. بهترین دما، درصد تلقیح و pH به ترتیب 50^{o} C، (حجمی/حجمی) ۱۲٪ و ۵/۵ بودند. اثر حذف پپتون و عصارهٔ مخمر روی تولید اتانل بررسی شد که نتایج نشان داد وجود هر دو منبع برای تولید اتانل ضروری می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده میزان تولید اتانل در شرایط اولیهٔ ۲/۶۷ درصد بود که با بهینه سازی شرایط تولید پس از انجام روش تغییر یک فاکتور در یک زمان (one-factor-at-a-time) و تاگوچی به ترتیب به میزان ۳۸/۶۳ و ۸۶/۰۷ درصد رسید.

کلمات کلیدی: *Zymomonas mobilis* ، بهینه سازی، اتانل.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

با توجه به حقایقی همچون محدود بودن منابع سوخت های فسیلی، در خواست رو به رشد برای دریافت انرژی و همچنین افزایش بهای سوخت در جهان، جوامع صنعتی را در این اندیشه فرو برد که برای دریافت انرژی به جزء منابع نفتی باید در جستجو و جایگزین کردن سایر منابع تجدیدپذیر انرژی بود. در این میان بهره جستن از اتانل به عنوان سوخت کامل و یا مادهٔ افزودنی به سوخت در بسیاری از کشورهای صنعتی جهان مطرح شده و استفاده از الکل به عنوان سوخت برتر در دستور کار بسیاری از دولت ها قرار گرفته است. از جمله بسیاری میکروارگانیسم ها که تولید کنندهٔ اتانل بودند، ساکارومایسس سرویزیه هنوز در رتبه اول باقی مانده است. در مقام بعدی باکتری *Zymomonas mobilis* از مهمترین کاندیداها برای تولید صنعتی اتانل می باشد (۱).

در تولید اتانل بهتر است که از محیط های کشت ارزان قیمت و مواد غذایی در دسترس و مورد نیاز میکروارگانیسم استفاده شود. *Zymomonas mobilis* یک باکتری بی هوازی، گرم منفی است که اتانل را از گلوکز توسط روش انتردئودورف(ED) به کمک آنزیم های پیروات دکربوکسیلاز (PDC) و الکل دهیدروژناز (ADH) تولید می کند(۱، ۴و ۹). این باکتری جهت تولید اتانل بیش از سه دهه است که مطالعه می شود (۱) و دارای برخی مزایا در زمینه تولید اتانل نسبت به ساکارومیسس می باشد که این مزایا عبارتند از : ۱) جذب بالاتر قند و بازده بالاتر الکل، ۲) کمتر بودن بیومس و تحمل غلظت های بالاتر الکل، ۳) عدم نیاز به افزودن اکسیژن در حال تخمیر، ۴) توانایی انجام دستکاری های ژنتیکی، ۵) عدم وجود بازدارندگی سوبستر روی آن، ۶) توانایی رشد در دماهای بالا، ۷) توانایی تحمل pH پائین (۴).

تکنولوژی تولید اتانل از منبع غذایی شکر و نشاسته توسط Bai و همکاران در سال ۲۰۰۸ بررسی شد(۳). طبق گزارش آن ها *Zymomonas mobilis* در مقایسه با ساکارومایسس سرویزیه، محصول اتانل بیشتری دارد. ارزیابی زیموموناس مبنی بر تولید اتانل از یک پسماند نشاسته هیدرولیز شده نیز توسط Davis و همکاران در سال ۲۰۰۶ بررسی شد (۳). بهینه سازی شرایط تخمیر به روش واکنش سطح برای تولید اتانل از نشاستهٔ ساگو همراه با ثابت کردن همزمان آمیلوگلوکوسیداز و سلول های *Zymomonas mobilis* توسط Veera Venca و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد (۱۱). همچنین بهینه سازی و بر هم کنش ترکیبات محیط های کشت در تولید اتانل به روش واکنش سطح با استفاده از *Zymomonas mobilis* توسط Othumpangat در سال ۱۹۹۹ گزارش شد (۷). Veera Venca و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۱)، Vasimon.R و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۰) Sonali Patle و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۸) و Yuya و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۱۳) از منابع ارزان قیمتی چون تاپیوکا (نشاسته کاساوا)، مواد صنعتی Agro و Thippi و تفاله‌های کاغذ در تولید اتانل استفاده کردند. Davis و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش دادند که در حال حاضر، تولید اتانل تجاری به تخمیر سوکروز از نیشکر و ملاس یا مشتقات گلوکز از نشاسته مبتنی بر محصولاتی چون ذرت، گندم و نشاسته کاساوا است (۳).

در این تحقیق از منابع ارزان قیمتی چون آب پنیر، عصارهٔ سبوس گندم، عصارهٔ سبوس برنج، عصارهٔ آرد

www.SID.ir

Archive of SID

جو و عصارهٔ سیب زمینی استفاده شد که در زمینهٔ منابع ارزان قیمت اولین تحقیقی بود که انجام پذیرفته است. با توجه به مطالعات انجام شده اطلاعاتی کمی در زمینهٔ بهینه سازی تولید اتانل توسط این باکتری در محیط کشت با منابع ارزان قیمت ذکر شده وجود دارد و این اولین گزارش علمی در این زمینه می باشد. بهینه سازی به روش تاگوچی طی دو مرحله انجام شد که در مرحله اول یک آرایه ۱۲ تایی بررسی شد که با توجه به نتایج و انتخاب فاکتورهایی که بیشترین اثر را داشتند مرحله دوم انجام شد که در این مرحله آرایه ۹ تایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

ارگانیسم: باکتری *Zymomonas mobilis* PTCC 1718 (DSMZ 424) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و در طول این تحقیق استفاده شد.

محیط کشت: محیط کشت زیموموناس موبیلیس حاوی ترکیبات ذیل برحسب گرم در لیتر بود:

Bacto peptone 10.0g , Yeast extract 10.0g , Glucose 20.0g , Agar 15.0g , Distilled water 1000.0ml.

شرایط محیط کشت: باکتری در شرایط بی‌هوازی (anaerobic)در دمای ۳۰ ^{o}C از آمپول لیوفیلیزه کشت داده شد.

باکتری ها بعد از زمان ۳۲-۲۴ ساعت در پلیت ها و محیط براث رشد کردند و سپس پلیت ها در یخچال نگهداری شدند و بنا به نیاز هر مرحله به مایع تلقیح از کلنی های شکل گرفته در پلیت برای تلقیح در محیط براث استفاده شد و هر سه هفته یک پاساژ جدید در پلیت حاوی محیط تازه انجام شد. ترکیب محیط کشت پایه حاوی ترکیبات ذیل برحسب گرم در لیتر بود :

Bacto peptone 2.5g , Yeast extract 2.5g , Glucose 1.5g , KH_2PO_4 0.1g , $MgSO_4$ 0.1g , $(NH_4)_2SO_4$ 0.1g

تلقیح به این محیط کشت به میزان ۸٪ از سوسپانسیون کشت اولیه در دمای ۳۷^{o}C و pH=۴/۵ انجام پذیرفت.

سنجش اتانل: در این تحقیق سنجش اتانل به روش Dichromate Colorimetric methodانجام شد. که دستور کار آن توسط ویلیام و همکاران در سال ۱۹۵۰ گزارش شد (۱۳).

که مراحل سنجش آن به شرح ذیل بود:

ابتدا با پیپت ۱ml از نمونه رویی (سانتریفیوژ شده) برداشته و ۱ml محلول دی کرومات پتاسیم و ۱ml محلول اشباع دی فنیل کاربازید به آن اضافه شد. سپس ترکیب در ۹۰^{o}C برای ۱۵-۵ دقیقه تا ایجاد رنگ قرمز قهوه ای گرما داده شد سپس ۱ml محلول تارتارات سدیم پتاسیم ۴۰٪ (Rochelle salt) برای پایدار کردن رنگ اضافه شد. بعد از خنک کردن و رساندن به دمای اتاق در یک حمام آب سرد، میزان جذب با یک اسپکتوفتومتر در ۵۷۵nm خوانده شد. غلظت اتانل تولید شده با کمک منحنی استاندارد تعیین شد.

زمان ماکزیمم تولید (Time course) **اتانل با استفاده از محیط پایه:** ابتدا زمان ماکزیمم تولید در محیط کشت پایه بررسی شد.

بهینه سازی منابع کربنی و مقادیر آن: جهت بهینه سازی منبع کربن از هفت منبع مانیتول، لاکتوز، سوکروز، زایلوز، فروکتوز، رافینوز، گلوکز به میزان

www.SID.ir

Archive of SID

۱/۵ گرم در لیتر استفاده شد و پس از بررسی نتایج و به دست آوردن بهترین منبع کربن، مقادیر آن نیز بهینه شد.

بهینه سازی منابع نیتروژنی و مقادیر آن: جهت بهینه سازی منبع نیتروژن از پنج منبع کربن آب پنیر، عصارهٔ مخمر، پپتون، نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم استفاده شد و پس از بررسی نتایج و به دست آوردن بهترین منبع نیتروژن، مقادیر آن نیز بهینه شد.

بررسی زمان ماکزیمم (Time course) تولید اتانل در محیط بهینه: پس از بهینه سازی منبع کربن و منابع نیتروژنی و بدست آوردن بهترین مقادیر منابع در این مرحله زمان ماکزیمم تولید در این محیط بررسی شد.

بررسی تغییر شرایط محیط کشت: جهت تعیین بهترین شرایط محیط کشت میزان تلقیح ، دما و pH بهینه شد.

تأثیر استفاده از منابع ارزان نیتروژنی در میزان تولید اتانل: هدف اصلی از این تحقیق استفاده از منابع ارزان قیمت برای تولید اتانل بود که برای این منظور آب پنیر، آرد جو، سبوس گندم، سبوس برنج و سیب‌زمینی تهیه شد و تولید اتانل در محیط های حاوی این ترکیبات به میزان ۲/۵ گرم در لیتر سنجیده شد.

بررسی تولید اتانل در شرایط بهینه از نظر شرایط محیطی و منابع: پس از به دست آوردن بهترین شرایط محیطی و بهترین منابع کربنی و نیتروژنی و منابع ارزان قیمت ماکزیمم میزان تولید اتانل در شرایط بهینه سنجیده شد.

بهینه سازی محیط به روش تاگوچی مرحله اول: تا این مرحله بهینه سازی تولید اتانل به روش کلاسیک one-factor-at-a-time انجام گرفت و تغییری در فرمولاسیون محیط کشت بهینه از لحاظ کربن و نیتروژن انجام نشد. با استفاده از روش آنالیز آماری Taguchi بهینه سازی فاکتورهای غذایی محیط کشت در دو مرحله انجام شد. در مرحلهٔ اول با توجه به هشت فاکتور غذایی محیط کشت همه فاکتورها در دو سطح در نظر گرفته شدند. با این شرایط از یک آرایه ی ۱۲ تایی (L_{12}) استفاده شد (جدول۱). آنالیز آماری داده‌های بدست آمده با کمک نرم افزارهای Minitab15 و Splus انجام شد.

جدول ۱: سطح و مقادیر فاکتورهای محیط کشت در بهینه‌سازی به روش تاگوچی مرحله اول

سطح / فاکتورها	سطح ۱	سطح ۲
شکر	۰/۷۵	۱/۵
آب پنیر	۰/۲۵	۰/۵
عصارهٔ مخمر	۰/۲۵	۰/۵
عصارهٔ مخمر	۰/۲۵	۰/۵
پپتون	۰/۲۵	۰/۵
KH_2PO_4	۰/۱	۰/۲
$(NH_4)_2SO_4$	۰/۱	۰/۲
$MgSO_4$	۰/۰۵	۰/۱

بهینه سازی محیط به روش تاگوچی مرحلهٔ دوم : با توجه به آنالیز نتایج به دست آمده از مرحلهٔ اول چهار فاکتور اولیه که بیشترین تاثیر را در محیط داشتند انتخاب شده و در سه سطح بررسی گردید. بقیه فاکتورها در همان میزان بهینه اضافه شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: سطوح مورد استفاده برای فاکتورهای محیط کشت آزمایش در آزمایش های (Trials) مختلف تاگوچی مرحله دوم

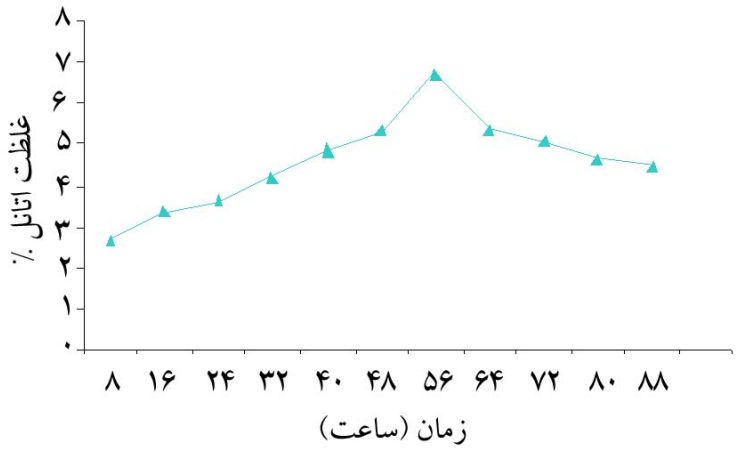
سطح / فاکتورها	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
شکر	۱/۵	۲/۰	۲/۵
آب پنیر	۰/۵	۱/۰	۱/۵
KH_2PO_4	۰/۲	۰/۷	۰/۱۲
$MgSO_4$	۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵

بقیهٔ فاکتورها به همان میزان اولیه اضافه شدند.

بررسی میزان تولید اتانل با حذف پپتون و عصارهٔ مخمر در بهترین شرایط به دست آمده در تاگوچی مرحله اول: جهت بررسی میزان اثر عصاره مخمر و پپتون در تولید اتانل دو محیط که یکی حاوی بهترین مقادیر به دست آمده از مرحله تاگوچی بود و یکی حاوی مقادیر محیط بهینه با این تفاوت که در هر دو آن ها عصارهٔ مخمر و پپتون حذف شد و سپس تولید اتانل در هر دو سنجیده شد.

نتایج

بررسی زمان ماکزیمم تولید (Time course) اتانل با استفاده از محیط پایه: طبق نمودار (۱) زمان ماکزیمم تولید اتانل در محیط پایه ۵۶ ساعت به دست آمد.

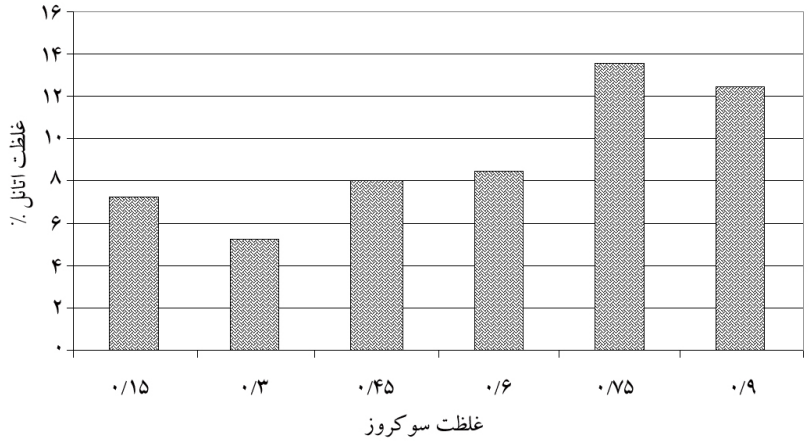


نمودار ۱: زمان ماکزیمم تولید اتانل توسط باکتری *Zymomonas mobilis* در محیط پایه

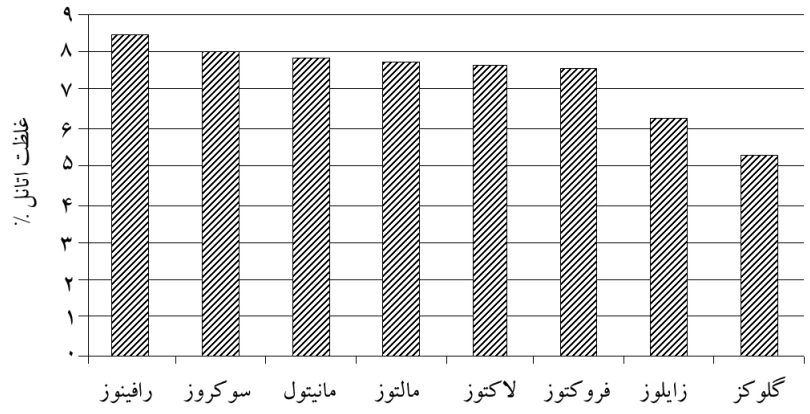
بهینه سازی منابع کربنی و مقادیر آن: طبق نمودارهای (۲و۳) از بین ۸ منبع کربن مورد استفاده سوکروز بهترین اثر را در تولید اتانل داشته و در بررسی بهترین غلظت های آن سوکروز ۰/۷۵ گرم درصد بیشترین اثر را در تولید اتانل داشت.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲: تاثیر سطوح مختلف سوکروز در تولید اتانل

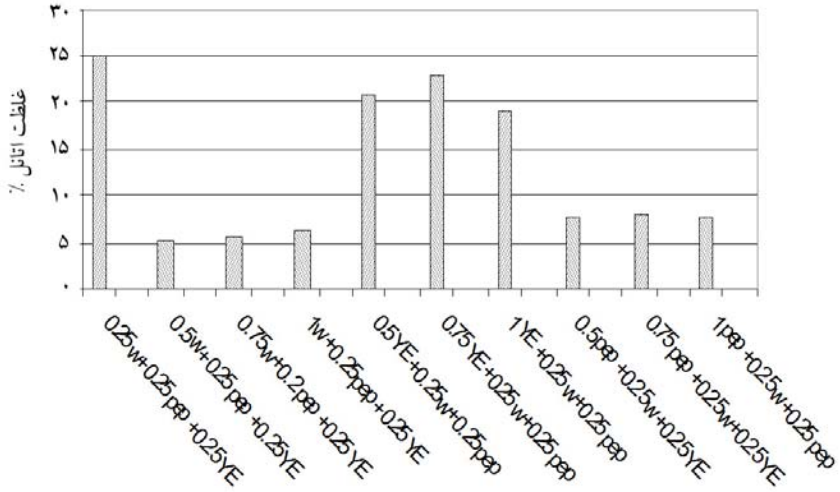


نمودار ۳: تعیین منبع کربن مناسب

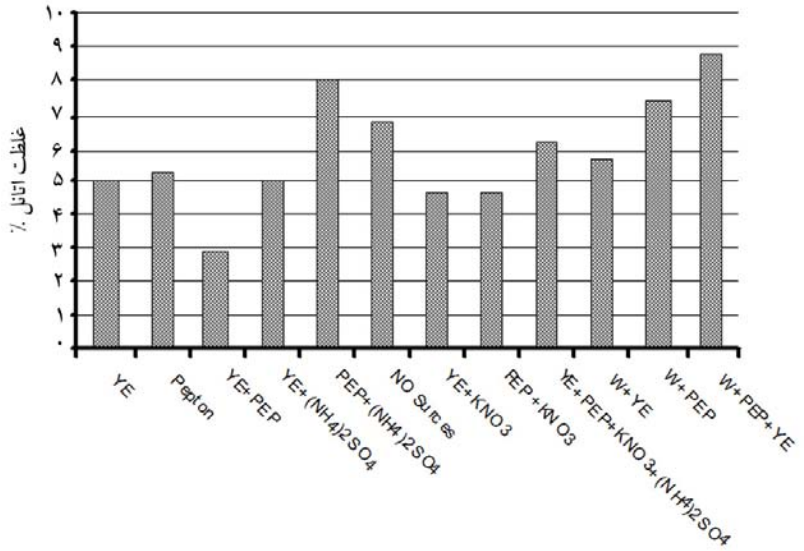
بهینه سازی منابع نیتروژنی و مقادیر آن: طبق نمودارهای (۴ و ۵) منابع نیتروژنی عصاره ی مخمر، آب پنیر و پپتون به میزان مساوی ۰/۲۵ گرم درصد بیشترین اثر را در تولید اتانل داشتند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۴: تاثیر سطوح مختلف منابع نیتروژنی

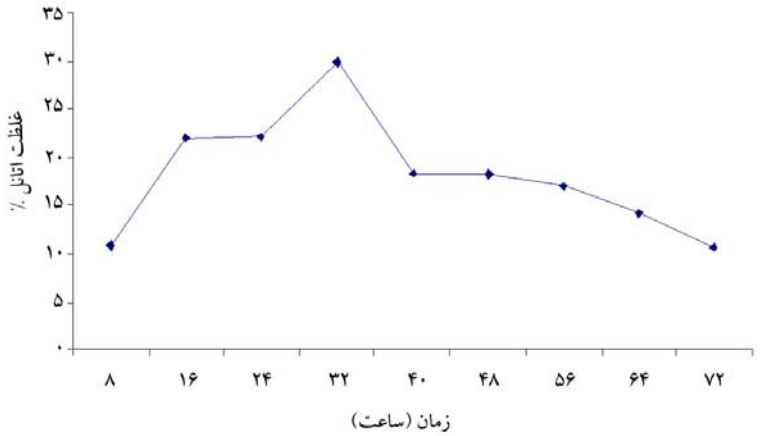


نمودار ۵: تعیین منابع نیتروژنی مناسب

بررسی زمان ماکزیمم (Time course) تولید اتانل در محیط بهینه: طبق نمودارهای (۶ و ۷) زمان ماکزیمم تولید اتانل در محیط بهینه ۳۲ ساعت شد. چون هدف استفاده از منابع ارزان قیمت بود در این مرحله شکر جایگزین سوکروز شد. نمودار (۶) زمان بهینه در محیط حاوی شکر و نمودار (۷) زمان بهینه در محیط حاوی سوکروز را نشان می دهد.

www.SID.ir

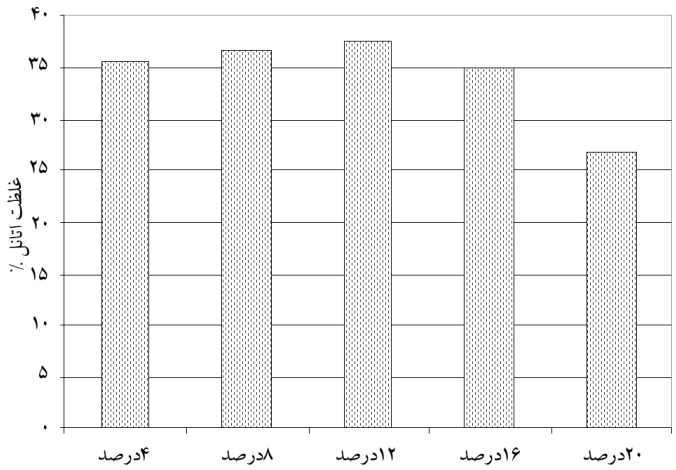
Archive of SID



نمودار ۶: زمان ماکزیمم تولید اتانل در محیط بهینه (منبع کربن شکر)

نمودار ۷: زمان ماکزیمم تولید اتانل در محیط بهینه (منبع کربن سوکروز)

تغییر غلظت تلقیح در محیط بهینه: طبق نمودار (۸) در بین تلقیح های۴، ۸، ۱۲، ۱۶و ۲۰ درصد تلقیح (حجمی/حجمی) تلقیح ۱۲٪ (حجمی/حجمی) بیشترین تولید اتانل را داشت.

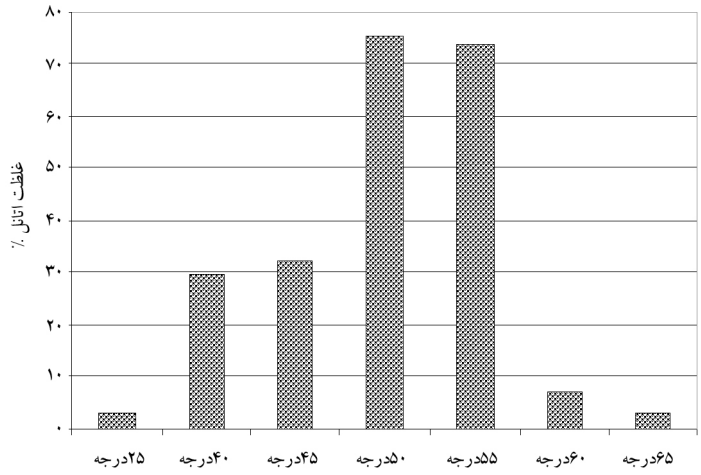


نمودار ۸: تغییر غلظت تلقیح در محیط بهینه

www.SID.ir

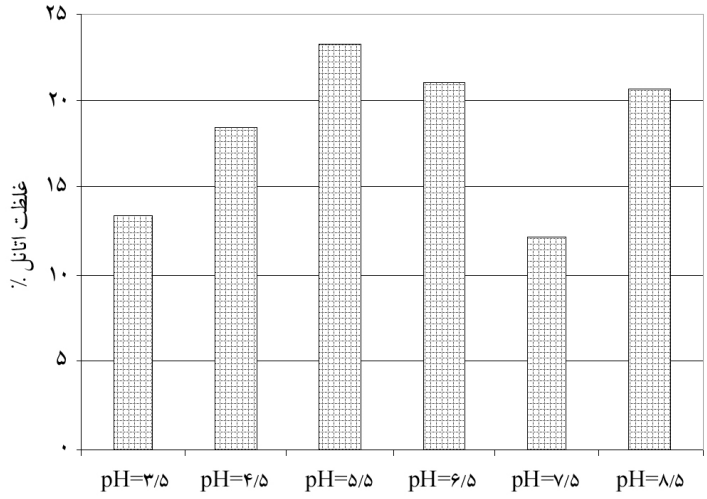
Archive of SID

تغییر دما در محیط بهینه: طبق نمودار (۹) دمای ۵۰ درجه سانتی گراد بهترین اثر را در تولید اتانل داشت.



نمودار ۹: تغییردما در محیط بهینه شده

تغییر pH در محیط بهینه: طبق نمودار (۱۰) pH=۵/۵ بهترین اثر را در تولید اتانل داشت.

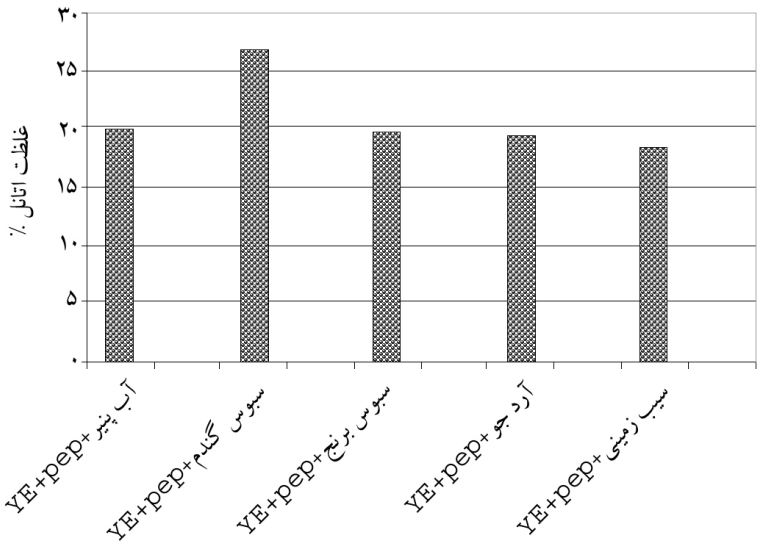


نمودار ۱۰: تغییر pH در محیط بهینه

تأثیر استفاده از منابع ارزان نیتروژنی در میزان تولید اتانل: طبق نمودار (۱۱) عصاره ی سبوس گندم بهترین اثر را در تولید اتانل داشت.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱۱: تاثیر منابع ارزان نیتروژنی در تولید اتانل

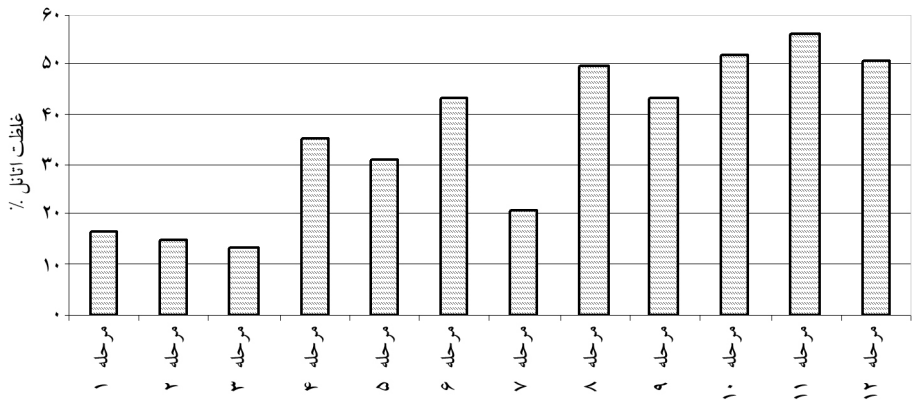
بررسی تولید اتانل در شرایط بهینه از نظر شرایط محیطی و منابع کربنی، نیتروژنی و ارزان قیمت: طبق نمودار (۱۲) میزان تولید اتانل در شرایط بهینهٔ منابع کربنی، نیتروژنی حاوی سوکروز و شکر به ترتیب معادل ۲۴/۰۶۵ و ۳۸/۶۲۹ درصد شد.

نمودار ۱۲: تولید اتانل در شرایط بهینه و بهترین منبع ارزان نیتروژنی (سبوس گندم)

بهینه سازی محیط به روش تاگوچی مرحله اول: میزان تولید ۱۲ ارلن در جدول (۳) نشان داده شده است. نمودار (۱۳) نشان می دهد ارلن شماره ی ۱۱ نسبت به بقیه بیشترین تولید اتانل را دارد که معادل ۵۶/۱۴۸ درصد می باشد. طبق جدول (۴) تحلیل نتایج به وسیلهٔ تحلیل واریانس انجام پذیرفت. طبق نتایج نتیجه گرفتیم چهار فاکتور $MgSO_4$ ، KH_2PO_4 ، Sugar، Whey بیشترین اثر را در تولید اتانل دارند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱۳: بهینه سازی تولید اتانل توسط روش تاگوچی (مرحله اول)

جدول ۳: میزان تولید اتانل در شرایط بهینهٔ تاگوچی مرحله اول

فاکتورها / آزمایش	سوکروز	آب پنیر	عصارهٔ گندم	عصارهٔ مخمر	پپتون	KH_2PO_4	$(NH_4)_2SO_4$	$MgSO_4$	تولید برحسب درصد
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۶/۴۸۵
۲	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱۴/۸
۳	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۱	۱	۱۳/۲۵۴
۴	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۳۵/۵۰۵
۵	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۳۰/۷۸۸
۶	۱	۲	۲	۱	۲	۲	۲	۱	۴۳/۲۵۴
۷	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۲	۲۰/۶۲۷
۸	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۴۹/۴۷۱
۹	۲	۱	۲	۲	۲	۱	۱	۲	۴۳/۵۹۱
۱۰	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۵۱/۹۵۲
۱۱	۱	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۲	۵۶/۱۴۸
۱۲	۱	۲	۱	۲	۱	۱	۲	۲	۵۰/۷۲۷

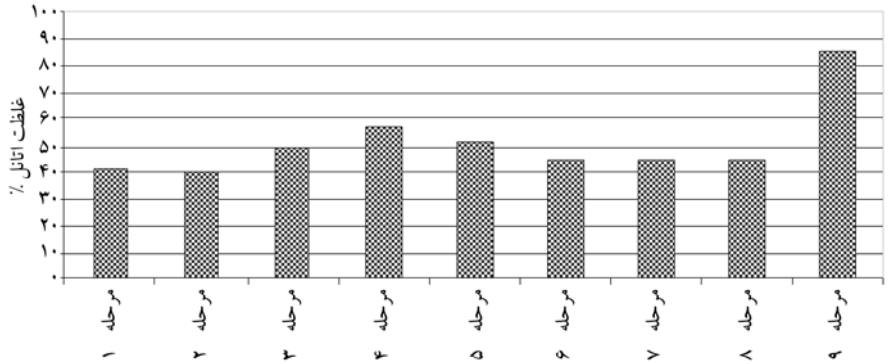
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴: آنالیز واریانس اثر فاکتورهای مختلف در تولید اتانل (تاگوچی مرحله اول)

فاکتورها	DF	SUM OF Sq	Mean Sq	F value	تولید برحسب درصد
سوکروز	۱	۲۴۵۲/۶۵۸	۲۴۵۲/۶۵۸	۴۱۸/۷۹۹۰	۰/۰۰
آب پنیر	۱	۲۰۴۷/۹۵۰	۲۰۴۷/۹۵۰	۳۴۹/۶۹۳۹	۰/۰۰
عصارهٔ گندم	۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۵	۰/۹۸
عصارهٔ مخمر	۱	۱۵/۰۴۹	۱۵/۰۴۹	۲/۵۶۹۷	۰/۱۳
پپتون	۱	۷۱/۶۰۵	۷۱/۶۰۵	۱۲/۲۲۶۸	۰/۰۰
KH_2PO_4	۱	۳۶۳/۲۴۰	۳۶۳/۲۴۰	۶۲/۰۲۴۴	۰/۰۰
$(NH_4)_2SO_4$	۱	۰/۹۳۳	۰/۹۳۳	۰/۱۵۹۳	۰/۶۹
$MgSO_4$	۱	۱۵۶/۲۶۵	۱۵۶/۲۶۵	۲۶/۶۸۲۸	۰/۰۰
شکر * آب پنیر	۱	۱۰۷/۸۷۸	۱۰۷/۸۷۸	۱۸/۴۲۰۵	۰/۰۰
شکر * KH_2PO_4	۱	۱۹۵/۴۱۴	۱۹۵/۴۱۴	۳۳/۳۶۷۶	۰/۰۰
شکر * $MgSO_4$	۱	۲۲۶/۵۸۱	۲۲۶/۵۸۱	۳۹/۶۸۹۵	۰/۰۰
Residual	۱۲	۷۰/۲۷۷	۵/۸۵۶	–	–

بهینه سازی محیط به روش تاگوچی مرحلهٔ دوم: نمودار (۱۴) نشان می دهد که ارلن شمارهٔ ۹ بیشترین تولید اتانل را داشت که معادل ۸۶/۰۷ درصد می باشد. طبق جدول (۶) تحلیل نتایج به وسیلهٔ تحلیل واریانس انجام پذیرفت. طبق نتایج نتیجه گرفتیم سه فاکتور $MgSO_4$ ، Sugar ، Whey بیشترین اثر را در تولید اتانل دارند.



نمودار ۱۴: بهینه سازی تولید اتانل توسط روش تاگوچی (مرحله دوم)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۵ :میزان تولید اتانل در شرایط بهینهٔ تاگوچی مرحله دوم

فاکتورها / آزمایش	شکر	آب پنیر	KH_2PO_4	$MgSO_4$	تولید برحسب درصد
۱	۱	۱	۱	۱	۴۱/۳۸۵
۲	۱	۲	۲	۲	۳۹/۷۶۲
۳	۱	۳	۳	۳	۴۹/۰۱۲
۴	۲	۱	۲	۳	۵۶/۹۱۴
۵	۲	۲	۳	۱	۵۱/۷۹۹
۶	۲	۳	۱	۲	۴۴/۸۷۷
۷	۳	۱	۳	۲	۴۵/۲۷۵
۸	۳	۲	۱	۳	۴۵/۰۳
۹	۳	۳	۲	۱	۸۶/۰۷

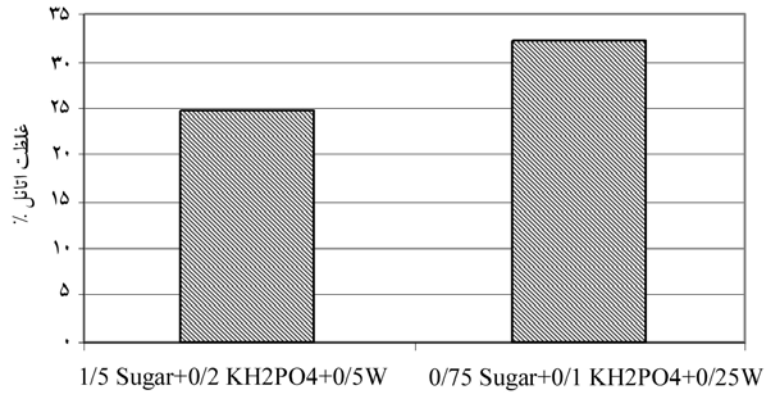
جدول ۶ : آنالیز واریانس اثر چهار فاکتور موثرتر در تولید اتانل (تاگوچی مرحله دوم)

فاکتورها	DF	SUM OF Sq	Mean Sq	F value	تولید برحسب درصد
شکر	۱	۵۰۶/۷۲۲	۵۰۶/۷۲۲	۲۴/۹۹۴۲۱	۰/۰۰
آب پنیر	۱	۳۴۴/۴۱۱	۳۴۴/۴۱۱	۲۳/۷۸۵۰۳	۰/۰۰
KH_2PO_4	۱	۴۸/۶۶۴	۴۸/۶۶۴	۳/۳۶۰۷۵	۰/۰۹
$MgSO_4$	۱	۴۱۲/۴۵۴	۴۱۲/۴۵۴	۲۸/۴۸۴۰۶	۰/۰۰
شکر * آب پنیر	۱	۱۲۹۵/۵۸۳	۱۲۹۵/۵۸۳	۸۹/۴۷۲۹۶	۰/۰۰
شکر * KH_2PO_4	۱	۴۵۳/۹۶۴	۴۵۳/۹۶۴	۳۱/۳۵۰۷۷	۰/۰۰
شکر * $MgSO_4$	۱	۱۳۶/۱۷۷	۱۳۶/۱۷۷	۹/۴۰۴۳۷	۰/۰۱
Residual	۱۲	۱۳۰/۳۲۱	۱۴/۴۸۰	–	–

بررسی تولید اتانل با حذف پپتون و عصارهٔ مخمر در بهترین شرایط به دست آمده در تاگوچی مرحلهٔ اول: یک ارلن محتویاتش به همان میزان شرایط بهینه بود و یک ارلن محتویاتش به میزان ارلن بهینهٔ تاگوچی مرحله اول بود که میزان تولید اتانل در ارلن اول ۲۴/۷۵۸ درصد و در ارلن دوم ۳۲/۳۲ درصد بود و با توجه به نتایج به دست آمده متوجه شدیم که حذف پپتون و عصارهٔ مخمر موجب کاهش قابل توجه تولید اتانل می شود و هر دو عامل وجودشان در محیط لازم است. نتایج به دست آمده در نمودار (۱۵) نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱۵: میزان تولید اتانل در محیط بدون پپتون و عصارهٔ مخمر

بحث

از سال ۱۹۷۰، *Z. mobilis* به عنوان منبع تولید کنندهٔ اتانل مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. ویژگی رشد و تخمیر سریع، مقاومت بالا به اتانل جزء خصوصیات واقعاً منحصر به فرد در این باکتری می باشد و محصول بیشتری از *Saccharomyces cerevisiae* دارد.

میزان تولید اتانل سه تا پنج برابر بیشتر از *Saccharomyces cerevisiae* بوده و محصول اتانل ۹۷٪ از ماکزیمم تئوری را دارد، در حالیکه برای *Saccharomyces cerevisiae* ۹۲-۹۰٪ می باشد (۲).

استفاده از روش One-factor-at-a-time به راستی ممکن است ترکیبات مواد غذایی و شرایط محیط کشت را برای به دست آوردن اتانل بیشتر توسط باکتری *Zymomonas mobilis* به وجود آورد. مواد غذایی همچون شکر، آب پنیر، عصارهٔ مخمر، عصارهٔ گندم کاندیداهای مناسبی به عنوان مواد ارزان قیمت در راستای کاربرد صنعتی هستند.

ابتدا با استفاده از روش تغییر یک فاکتور در یک زمان (one-factor-at-a-time) اثر منابع کربنی و نیتروژنی مختلف همچنین اثر دما، pH و درصد تلقیح اولیه در تولید بررسی گردید. سپس بهینه سازی بهترین منابع غذایی به روش آنالیز آماری تاگوچی انجام پذیرفت. نتایج نیز از طریق تحلیل واریانس تحلیل و بررسی شد. ابتدا اثر منابع کربنی مختلف مانند زایلوز، فروکتوز، رافینوز، لاکتوز، مانیتول، مالتوز، سوکروز و گلوکز در تولید اتانل توسط این باکتری بررسی گردید و پس از به دست آوردن بهترین منبع میزان آن بهینه شد که نتایج نشان داد رافینوز و سوکروز ۰/۷۵ گرم درصد بهترین اثر را در تولید دارند و چون هدف استفاده از منابع ارزان قیمت در تولید اتانل بود و چون رافینوز قند گرانی است و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبود در بقیهٔ مراحل از سوکروز استفاده شد و با جایگزین کردن شکر به جای سوکروز نیز افزایش تولید بدست آمد. پس از آن اثر منابع نیتروژنی پیچیده و معدنی مختلف مانند آب پنیر، عصارهٔ مخمر، پپتون، نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم در تولید اتانل توسط این باکتری بررسی شد و پس از به دست آوردن بهترین منابع میزان آن ها نیز بهینه شد که نتایج نشان داد که سه منبع عصارهٔ مخمر، پپتون و آب پنیر هر سه به میزان مساوی ۰/۲۵گرم درصد بیشترین تأثیر را در تولید اتانل

www.SID.ir

Archive of SID

دارند. اثر منابع نیتروژنی ارزان قیمت مانند عصارهٔ آرد جو، عصارهٔ سبوس گندم، عصارهٔ سبوس برنج و عصارهٔ سیب زمینی نیز در افزایش تولید اتانل بررسی شد که با توجه به نتایج به دست آمده عصارهٔ سبوس گندم بیشترین اثر را در تولید اتانل داشت. بهترین دما، درصد تلقیح و pH به ترتیب عبارت بودند از ۵۰°C ، ۱۲٪ (حجمی/حجمی)، ۵/۵. اثر حذف پپتون و عصارهٔ مخمر روی تولید اتانل بررسی شد که نتایج نشان داد وجود هر دو منبع برای تولید اتانل ضروری می باشد. بهینه سازی به روش تاگوچی در دو مرحله انجام شد. که در مرحلهٔ اول ترتیب اثر فاکتورها به شکل ذیل بود

Sugar>Whey>KH_2PO_4>$MgSO_4$> peptone>Wheat extract> $(NH_4)_2SO_4$> Yeast extract

نتایج بهینه سازی در تاگوچی مرحلهٔ اول نشان داد که ارلن ۱۱ بیشترین تولید اتانل را دارد که محتویات آن شامل مواد زیر بود:

Sugar (1/5%), Whey (0/5%), Wheat extract (0/25%), Yeast extract (0/5%), peptone (0/25%), KH_2PO_4 (0/2%), $(NH_4)_2SO_4$ (0.1%), MgSO4 (0.05%)

که پس از تحلیل واریانس نتایج مرحلهٔ اول تاگوچی چهار فاکتور موثرتر در مرحلهٔ اول انتخاب و در سه سطح بررسی شد که نتایج نشان داد ارلن شمارهٔ ۹ بیشترین تولید اتانل را دارد که محتویات آن شامل مواد زیر بود:

Sugar (2/5%), Whey (1/5%), Wheat extract (0/25%), Yeast extract (0/5%), peptone (0/25%), KH_2PO_4 (0/7%), $(NH_4)_2SO_4$ (0.1%), MgSO4 (0.05%)

با توجه به نتایج به دست آمده میزان تولید اتانل در شرایط اولیهٔ ۲/۶۷ درصد بود که با بهینه سازی شرایط تولید پس از انجام روش تغییر یک فاکتور در یک زمان (one-factor-at-a-time) و تاگوچی تولید به ترتیب به میزان ۳۸/۶۳ و ۸۶/۰۷ رسید.

جوآ و همکاران در سال ۲۰۰۳ از عصارهٔ نیشکر جهت تولید اتانل توسط *Z. mobilis* استفاده کردند (۵)، لیندا و همکاران در سال ۲۰۰۶ از نشاستهٔ مانیلدرا (Manildra) جهت تولید اتانل توسط *Z. mobilis* استفاده کردند (۳). در این تحقیق بهینه سازی به روش تاگوچی طی دو مرحله انجام شد در تحقیقات انجام شده توسط وراونکاتا و اتومپانگات بهینه سازی شرایط تخمیر برای تولید اتانل از نشاستهٔ ساگو به وسیلهٔ روش ثابت کردن همزمان آمیلوگلوکوسیداز و سلول های *Z. mobilis* به کمک روش آنالیز آماری واکنش سطح و بهینه سازی و بر هم کنش ترکیبات محیط های کشت انجام شد و آن ها توانستند میزان تولید اتانل را به مقدار ۵۵/۳ گرم در لیتر برسانند (۷و۱۱). در این تحقیق از منابع ارزانی چون آب پنیر، عصاره آرد جو، عصاره سبوس گندم، عصاره سیب زمینی و عصاره سبوس برنج استفاده شد در تحقیقات سونالی پاتل و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۸) و یویا یامیشیتا و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۱۳) از منابع ارزان قیمتی چون تاپیوکا (نشاسته کاساوا)، مواد صنعتی agro و thippi و تفاله های کاغذ در تولید اتانل استفاده شد.

در بررسی های انجام گرفته با حذف پپتون و عصارهٔ مخمر این نتیجه بدست آمد که هر دو فاکتور در تولید اتانل تأثیر مهمی دارند و حضورشان در محیط ضروری است. در تحقیق صورت گرفته توسط اتومپانگات و همکاران نیز با فقدان عصارهٔ مخمر اتانل

www.SID.ir

Archive of SID

تولید نشد. طبق نتیجهٔ آن ها محصول اتانل به طور رایج توسط افزایش غلظت عصارهٔ مخمر افزایش می یابد، اما بعد از رسیدن به سطح ماکزیمم محصول کاهش می‌یابد. اتومپانگات و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت سولفات آمونیوم افزایش محصول اتانل را سبب می شود و بالاتر از سطح اپتیمم محصول اتانل کاهش می یابد (۷). در این تحقیق سولفات آمونیوم اثر زیادی در تولید اتانل نداشت. در این تحقیق در بررسی منابع کربنی گلوکز کمترین اثر را در تولید اتانل داشت. در بررسی های انجام شده توسط علی محققی و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۶) و لیندا داویس و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲) نیز گلوکز کمترین اثر را داشت.

سپاسگزاری

بدینوسیله از جناب آقای دکتر آسمار مدیر گروه محترم کارشناسی ارشد میکروبیولوژی و خانم کتایون داستان مسئول آزمایشگاه کارشناسی ارشد که با تمام وجود ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند و جناب استاد شکری که در تجزیه و تحلیل آماری به ما کمک نمودند نهایت قدردانی را داریم.

منابع

1. Bai, F.W.; Aderson, W.A. and MOO-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances 26, pp.89-105.
2. Davis, L.; Jeon, Y.J.; Svenson, Ch.; Rogers, P.; Pearce, J. and Peiris, P., 2005. Evaluation of wheat for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy 29, pp. 49-59.
3. Davis, L.; Rogers, P.; Pearce, J. and Peiris, P., 2006. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. Biomass and Bioenergy 30, pp. 809-814.
4. Gunaskaran, P. and Chandra Raj, K., 2009. Ethanol fermentation technology-*Zymomonas mobilis*. Department of Microbial Technology, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India, pp.1-15.
5. Joao Batista Buzato, Maria Antonia P.C Celligioi, 2003. Fermentation of glucose by *Zymomonas mobilis* CP4 utilising continuous transient technique. Semina: Ciencias Exatas e Tecnologicas, Londrina, v. 24, pp. 97-100 des.
6. Mohagheghi, A.; Mark Ruth, Daniel J. Schell, 2006. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. Process Biochemistry 41, pp. 1806-1811.
7. Othumpangat S.; Nagin C. and Sidppa C., 1999. Optimization and Interaction of Media Components in ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* by Response Surface Methodology. Journal of Bioscience and Bioengineering Vol.88, No.3, pp.334-338.
8. Patle, S. and Lal, B., 2008. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis* .Biomass and Bioenergy 32, pp.569-602.
9. Tao, F.; Miao, J.Y.; Shi, G.Y. and Zhang K.C., 2005. Ethanol fermentation an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. Process Biochemistry 40, pp. 183-187.
10. Vasimon R.; Damrongdech, M. and Sudarut Tripetchkul., 2006. Evaluation of Tao agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry 41 pp.1423-1437.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Veera Venca, R.B.; Subba, R.S.; Damodara, R.M.; Narasimha, R.M. and Ayyanna, C., 2006. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells *of Zymomonas mobilis* using response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology 38, pp.209-214.
12. Williams, M.B. and Reese, D., 1950. Colorimetric determination of ethyl alcohol, Anal. Chem., 22, 15-56.
13. Yuya, Y.; Akihiro, K.; Chizuru, S. and Yoshitoshi, N., 2008. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis.* Biochemical Engineering Journal 42, pp.314-319.

www.SID.ir