در
پژوهش و سازندگی
زراعت و باغبانی شماره ۷۴، بهار ۱۳۸۶

مطالعه عوامل موثر در بهبود راندمان تخمیر الکلی نشاسته گندم

• **محمدعلی گرجی،**
دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
• **ایرج نحوی،**
دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
• **گیتی امتیازی،**
دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
• **حمید بیدرام،**
دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه آمار

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۸۵

email: magorji2004@yahoo.com

چکیده

با توجه به افزایش قیمت ملاس و خودکفایی در تولید گندم، ترکیبات نشاسته‌ای می‌توانند به عنوان جایگزین ملاس، در صنایع تخمیری کشور مورد استفاده قرار گیرند. نتایج این تحقیق که در آن از نشاسته گندم برای تولید الکل استفاده شده، حاکی از آن است که تجزیه آنزیمی‌محلول نشاسته ۱۵٪ تیمار شده در دمای ۱۳۰ درجه سانتیگراد و pH ۱/۳۵، نسبت به سایر روش‌های مورد بررسی، راندمان تخمیر بالاتری را باعث می‌شود. همچنین در ادامه مشخص شد غنیسازی مایع تخمیر با املاح حاوی عناصر فسفر، روی، منیزیم و پتاسیم به همراه کنترل pH ابتدای تخمیر بر روی ۵/۵، می‌تواند نقش بسزائی در افزایش غلظت الکل به همراه داشته باشد. از دیگر نتایج این تحقیق می‌توان به بی تاثیر بودن اسید استیک و اسید لاکتیک (غلظت ۹gr/l) بر تخمیر نشاسته هیدرولیز شده اشاره نمود. بیشینه غلظت الکل حاصل در این بررسی ۷۱/۹gr/l بود که با راندمانی معادل ۷۸٪ میزان تئوری حاصل گردید.

کلمات کلیدی: نشاسته، اتانول، اکسیژن، املاح صنعتی، اسید استیک و اسید لاکتیک

www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi No: 74 pp: 79- 89

The study of effective factors in improving the fermentation yield of wheat starch

By: Gorji, M.A., Nahvi, Emtiazi, G. and Bidram H. Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan.

Due to the increase of molasses prices and becoming self-dependent in production of wheat, it can be recommended to replace starch compounds with molasses in fermentation industries in our country. In this research using wheat starch to produce alcohol, we show that enzymatic decomposition of treated starch (15% wt solution) at 130 °C and pH 1.35, gives better fermentation yield in comparison with other methods of hydrolization. Also, enriching fermentation liquid with mineral such as P, Zn, Mg and K and with pH controlling at 5.5 in starting of fermentation can be very effective in increasing of alcohol concentration. Another result of this research is that acetic acid and lactic acid (up to 9 gr/l) have no effect in fermentation of hydrolyzed starch.

Keywords: Starch, Ethanol, Oxygen, Mineral elements, Acetic acid and Lactic acid.

مقدمه

هزینه تولید الکل تا حد زیادی تحت تأثیر قیمت مواد اولیه قرار دارد و انتخاب یک سوبسترای ارزان و در دسترس، می‌تواند نقش مهمی‌در کاهش هزینه‌های تولید ایفا نماید. طی سالهای گذشته ملاس عمده‌ترین منبع تولید الکل در کشور بوده ولی هم اکنون با توجه به افزایش قیمت این ماده، لازم است نوع سوبسترای مورد استفاده برای تولید اتانول به ماده ای در دسترس تر تغییر یابد و از میان سوبستراهای مختلف، نشاسته به عنوان یک منبع ارزان و تجدیدپذیر، دارای ارجحیت می‌باشد. همچنین مواردی مثل خودکفایی در تولید گندم، از بین رفتن مقادیر زیادی از منابع گیاهی حاوی نشاسته به خاطر عواملی همچون شکستن، کپک زدن و حمله حشرات و تولید حجم بالای ضایعات کشاورزی- صنعتی دارای نشاسته، سرمایه گذاری برای انجام تحقیقات مرتبط با تولید الکل از مواد نشاسته‌ای را موجه می‌سازد (۴، ۲۲).

Saccharomyces cervisiae، میکروارگانیسم اصلی مورد استفاده در تولید الکل، فاقد آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته بوده و در نتیجه قادر به تخمیر آن نیست. لذا جهت تولید الکل از نشاسته اولین مرحله، هیدرولیز آن است که می‌تواند به روش آنزیمی، اسیدی و یا ترکیبی از هر دو روش انجام گیرد (۱۶). علاوه بر اهمیت انتخاب یک روش مناسب برای تجزیه نشاسته، بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت و همچنین پارامترهای محیطی موثر بر تخمیر الکلی از جمله مواردی است که می‌بایست در تولید صنعتی الکل از ترکیبات نشاسته‌ای لحاظ شود که در ادامه به برخی از مهمترین این عوامل اشاره می‌شود.

علاوه بر منابع کربن، اکسیژن و هیدروژن، محیط کشت تخمیر می‌بایست با عناصر دیگری هم که جهت رشد و تخمیر مخمر ضروری هستند، غنیسازی شود که از مهمترین این مواد غذایی می‌توان به نیتروژن، فسفر و گوگرد اشاره نمود (۱۰). همچنین منیزیم از یون‌های اساسی برای رشد و تخمیر مخمر بوده و کوفاکتور آنزیم‌هایی مثل هگزوکیناز، فسفوفروکتوکیناز و پیروات کیناز می‌باشد. روی هم از عناصر ریزمقدار بوده و کوفاکتور الکل و آلدهید دهیدروژناز است (۵). میزان کربوهیدرات موجود در محیط کشت هم بر متابولیسم مخمر بسیار تأثیرگذار است. در غلظت‌های پایین قند، مخمر دچار گرسنگی شده و بهره دهی به شدت کم می‌شود در حالی که در غلظت‌های بالای سوبسترا، بازدارندگی قند مانع عمل آنزیم‌ها شده و سرعت تبدیل کاهش می‌یابد (۹).

هرچند اغلب مخمرها در دامنه pH ۴ تا ۶ فعال هستند ولی برای افزایش راندمان تخمیر، لازم است pH بهینه‌سازی شود. به طور کلی pH ترکیب پروتئین‌های دیواره را تغییر داده و با کاهش آن، اسیدهای چرب غشاء به فرم‌های اشباع تر تبدیل می‌شوند، که این امر محکم تر شدن و غیرقابل نفوذ شدن آن را به همراه دارد (۲۰).

از دیگر نکاتی که در فرآیند تولید تخمیری الکل باید مد نظر قرار گیرد، کم هوازی یا بیهوازی بودن فرآیند است. هرچند غالب شدن متابولیسم هوازی طی تخمیر، باعث مصرف سوبسترای قندی بدون تولیدالکل می‌شود، ولی نتایج تحقیقات مختلف حاکی از آن است که مقادیر جزئی اکسیژن می‌تواند باعث تحریک قابل توجه تخمیر شود. زیرا با حضور اکسیژن به عنوان یک واحد ساختمانی در بیوسنتز چربی‌ها و لیپیدهای غیراشباع در میتوکندری و غشاء پلاسمایی، رشد و قابلیت زیست پذیری سلول‌ها افزایش می‌یابد(۳۲). جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مزاحم هم از دیگر مواردی است که می‌تواند بر راندمان تولیدالکل موثر باشد. مهمترین میکروارگانیسم‌های آلوده کننده تخمیر، باکتری‌های مولد اسید لاکتیک مربوط به جنس لاکتوباسیلوس و پدیوکوکوس می‌باشند این باکتری‌ها علاوه بر مصرف سوبسترا و در بعضی مواقع الکل، باعث تولید ترکیباتی همچون اسیداستیک و اسید لاکتیک می‌شوند که ترکیبات اخیر از بازدارنده‌های مهم رشد و تخمیر *Saccharomyces cervisiae* به شمار می‌روند(۳، ۴، ۸).

در این تحقیق سعی شده پس از تعیین شرایط بهینه هیدرولیز نشاسته گندم و انتخاب مناسب ترین غلظت آن برای دستیابی به راندمان بالای تخمیر، اثر عواملی مثل افزودن نیتروژن، فسفر، گوگرد، منیزیم، روی، اسید استیک و اسید لاکتیک، بر روی تخمیر بررسی گردد. از دیگر اهداف این تحقیق تعیین اثر پارامترهایی همچون pH و کم هوازی یا بیهوازی بودن فرایند، بر راندمان تولید الکل از نشاسته می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

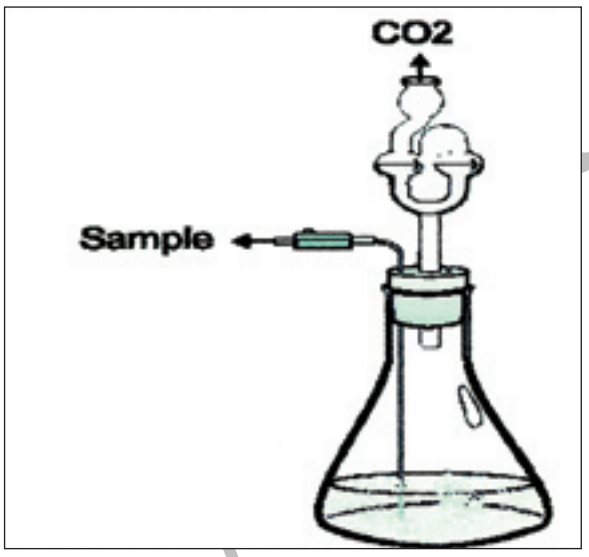
مواد و روش‌ها

در این بررسی از آنزیم آلفاآمیلاز با نام تجاری Termamyl (۱۲۰L) و با فعالیت آنزیمی KNU/g ۱۲۰ (هر KNU برابر با مقدار آنزیمی‌است که می‌تواند ۵/۲۶ گرم نشاسته محلول را در شرایط pH ۵/۶ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد طی زمان یک ساعت تجزیه نماید)، آنزیم آمیلوگلیکوزیداز با نام تجاری AMG (۳۰۰L) و با فعالیت آنزیمی AGU/g ۳۰۰ (هر AGU برابر با مقدار آنزیمی‌است که می‌تواند یک میکرومول مالتوز را در شرایط pH ۳/۴ و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد طی زمان یک دقیقه تجزیه نماید) و آنزیم تجاری دکستراناز (مخلوطی از چند آنزیم شاخه شکن) که همه از تولیدات شرکت نوونوردیسک هستند، برای تجزیه آنزیمی‌نشاسته استفاده شد (۳۰).

برای تکثیر مخمر (*S. cervisiae*) تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی‌و صنعتی ایران) در کلیه آزمایش‌ها از محیط کشت حاوی گلوکز ((gr/l) گلوکز ۲۰، عصاره مخمر ۵، دی هیدروژن پتاسیم فسفات ۲، سولفات منیزیم۱، سولفات آمونیوم۵ و عصاره مالت pH،۲ ۴/۵) استفاده شد. همچنین تکثیر و تخمیر در همه آزمایش‌ها، درون ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، با استفاده از تلقیح به نسبت ۵٪ (10^6 سلول مخمر در هر میلی لیتر) و در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۷۵ rpm (۱۳۰ rpm برای تکثیر) به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت (۲۷). در این بررسی، برای تعیین غلظت قندهای احیاکننده، قند کل، مقدار الکل و غلظت نشاسته به ترتیب از روش DNS، روش فنل سولفوریک اسید، روش دی کرومات پتاسیم و رنگ سنجی با محلول ید، استفاده شد (۱۳). غلظت بیومس و درصد سلول‌های زیست پذیر هم به ترتیب با روش وزن خشک و رنگ آمیزی با متیلن بلو تعیین گردید (۱۸). همچنین برای تعیین مقدار اسیدهای آلی (اسید استیک و اسید لاکتیک) از دستگاه HPLC (جسکو) مجهز به ستون Aminex HPX-۸۷H استفاده شد (۲۳).

آزمایش‌های اولیه نشان داد هیدرولیز شیمیایی – آنزیمی‌دارای برتری نسبی برای تجزیه و تخمیر نشاسته است. همچنین طی آزمایش‌های مذکور، حداقل میزان آنزیم لازم برای تجزیه نشاسته تعیین شده و مشخص شد که موثرترین پارامترها در هیدرولیز شیمیایی نشاسته، دما و pH می‌باشند (۱). ولی با توجه به اینکه در این تحقیق، نشاسته صنعتی تولید شده از آرد گندم سوبسترای اصلی تخمیر بود، در مرحله اول، شرایط مناسب برای تجزیه نشاسته صنعتی مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور، ابتدا دما (۱۱۰ و ۱۲۰ درجه سانتیگراد) و pH (۲/۵ و ۴) بهینه برای پیش تیمار اسیدی نشاسته تعیین شده و سپس ترکیب حاصل تحت هیدرولیز آنزیمی ۳/۵ میکرولیتر آلفا آمیلاز (به ازای هر گرم ماده جامد) و ۱۰۰ دقیقه تیمار در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد و pH ۶ و ۳ میکرولیتر آمیلوگلیکوزیداز و ۳ میکرولیتر دکستراناز (به ازای هر گرم ماده جامد) و ۱۰۰ دقیقه تیمار در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و pH=۵ تیمار گردید. بعد با استفاده از تجزیه غلظت‌های مختلف نشاسته به روش شیمیایی-آنزیمی‌و تخمیر آنها، غلظت مناسب از این ترکیب برای دستیابی به بالاترین راندمان تولید الکل، تعیین شد (۱۸، ۱۹، ۲۱، ۲۶).

در مرحله دوم، به بررسی اثر عناصری مثل نیتروژن، فسفر، گوگرد، منیزیم و روی بر تخمیر الکلی سوبسترای هیدرولیز شده، پرداخته شد و از آنجا که از یک سوبسترای صنعتی به عنوان منبع کربن برای تولید اتانول استفاده گردید سعی شد به همین منوال از منابع صنعتی عناصر فوق (آمونیوم سولفات ذوب آهن اصفهان، دی آمونیوم فسفات پتروشیمی‌رازی، سولفات منیزیم هفت آبه تولیدات مواد اولیه داروئی ایران و سولفات روی صنعتی) نیز برای بهینه‌سازی محیط کشت استفاده شود. سپس اثر pH ابتدای تخمیر بر میزان تولید الکل تعیین گردید. بعد با استفاده از تله تخمیر (شکل ۱) برای ایجاد حالت بیهوازی، تاثیر کم هوازی یا بیهوازی بودن فرایند تخمیر، بر راندمان تولید الکل از نشاسته مورد مطالعه قرار گرفت. در آخرین بخش از این تحقیق هم اثر اسیدهای آلی بر تخمیر الکلی، مورد بررسی واقع شد (۲۲، ۲۸). به این منظور ابتدا درون شیکرفلاسک، اثر مقادیر مختلف از اسیدهای استیک و لاکتیک روی میزان تولید الکل توسط مخمر بررسی شد. سپس آزمایش‌ها با استفاده از فرمنتر آزمایشگاهی مدل اینفورس تکمیل گردید. برای کسب نتیجه بهتر در این آزمایش از دو فرمنتر به صورت همزمان استفاده شد به این صورت که به محتویات یکی از وسل‌ها اسیدهای آلی (۹ gr/l از هریک از اسیدها) اضافه شد در حالی که به مخزن دیگر هیچ کدام از ترکیبات فوق، اضافه نگردید. در این آزمایش، تخمیر به صورت منقطع صورت گرفت و در فواصل زمانی خاص، جهت انجام آنالیزهای لازم، از محتویات وسل‌ها، نمونه گیری انجام شد (۱۴). لازم به ذکر است تمام آزمایش‌ها حداقل با سه مرتبه تکرار انجام شده و از میانگین داده‌ها برای مقایسه نتایج استفاده گردید (۲).



شکل ۱- شمای ارلن دارای تله تخمیر برای ایجاد شرایط بیهوازی

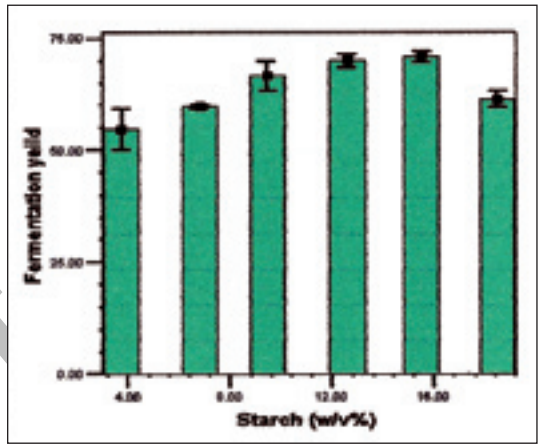
نتایج

آزمایش‌ها نشان داد که محلول نشاسته صنعتی دارای gr/l ۴۴۸/۴ ماده جامد خشک، معادل gr/l ۳۵۰ گلوکز و فاقد قندهای احیاکننده می‌باشد. پس از رقیقسازی این ترکیب تا رسیدن به غلظت ۱۵٪ مواد خشک، اثر دما و غلظت‌های مختلف اسید بر روی تجزیه شیمیایی آن آزمایش شد که بررسی آماری نتایج حاصله نشان داد (جدول ۱)، راندمان هیدرولیز در نمونه ی دارای ۰/۴٪ حجمی‌اسید (pH ۱/۳۵ برای محلول

www.SID.ir

۱۵٪ وزنی نشاسته) که در دمای ۱۳۰درجه سانتیگراد تیمار شده است، نسبت به سایر نمونه‌ها بالاتر می‌باشد.

پس از تعیین مناسبترین روش برای هیدرولیز نشاسته صنعتی، محلول‌های با غلظت متفاوت از آن تهیه شده و پس از تجزیه آنها به روش شیمیایی- آنزیمی، محصول هیدرولیز با استفاده از مخمر تخمیر گردید. نتایج این آزمایش هم حاکی از آن بود که بالاترین راندمان تولید الکل از نشاسته (۷۱٪ میزان تئوری) در محلول حاوی ۱۵/۵٪ مواد جامد حاصل می‌شود (شکل ۲). البته راندمان هیدرولیز برای کلیه غلظت‌های مورد بررسی مشابه و بین ۹۰ تا ۹۳٪ مقدار تئوری آن در نوسان بود.



شکل ۲- مقایسه راندمان تولید الکل از محلول‌های با غلظت متفاوت از نشاسته صنعتی

بهینهسازی غلظت منابع نیتروژن، فسفر و گوگرد با استفاده از دو نمک دی آمونیوم فسفات و دی آمونیوم سولفات و طی دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول این آزمایش‌ها از غلظت‌های ۲، ۴ و۶ gr/l هر یک از نمکها استفاده شد و نتایج نشان داد که هر دو نمک، هم به طور انفرادی و هم طی اثر متقابل، تاثیر بسزایی بر میزان تولید الکل دارند و در مجموع ۹۹٪ تغییرات الکل تحت اثر عوامل مورد آزمایش، ایجاد شده بود. با این حال بیشترین غلظت الکل در غیاب هر دو نمک حاصل گردید (شکل ۳- A). از آنجا که در آزمایش اول از غلظت‌های نسبتا بالای نمک‌ها استفاده شده بود گمان آن می‌رفت که شاید غلظت‌های مورد استفاده بالاتر از مقدار مورد نیاز برای تخمیر بوده است. لذا در آزمایش دوم از غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ gr/l نمکها استفاده شد. ولی باز هم نمونه فاقد نمک دارای غلظت بالاتری از الکل بود (شکل ۳- B).

حال این پرسش مطرح شد که آیا نشاسته صنعتی هیدرولیز شده نیازی به افزودن ترکیبات نیتروژنی، گوگردی و فسفری دارد یا نه؟ همانطور که قبلاً نیز ذکر گردید در این بررسی از نمک‌های صنعتی استفاده شد و وجود ترکیبات سمی‌در این مواد خیلی دور از انتظار نیست. از این رو در آزمایش بعد از نمکهای مشابه املاح صنعتی ولی با گرید آزمایشگاهی استفاده شد (پتاسیم دی هیدروژن فسفات به جای دی آمونیوم فسفات و دی آمونیوم سولفات مرک به جای نوع صنعتی آن). داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که ۹۸٪ تغییرات الکل تحت اثر عوامل مورد بررسی ایجاد شده ولی همانند قبل مقدار تولید الکل در نمونه‌های فاقد دی آمونیوم سولفات بالاتر از سایر نمونه‌ها می‌باشد که این مشاهده عدم نیاز به این نمک برای تهیه محیط کشت تخمیر را تایید می‌کرد. ولی وجود نمک دیگر یعنی پتاسیم دی هیدروژن فسفات بر تخمیر اثر مثبت داشت و غلظت ۱/۵ gr/l آن مقدار تولید الکل را تا حد محسوسی افزایش می‌داد (شکل ۴- A).

بهینه‌سازی غلظت سولفات‌های منیزیم و روی هم تقریبا همانند آنچه که در مورد منابع گوگرد، نیتروژن و فسفر ذکر شد، صورت گرفت و مشخص شد نمک‌های سولفات منیزیم و سولفات روی، هم به تنهایی و هم با واکنش متقابل بر روی تولید الکل موثر هستند و مناسبترین غلظت از این دو نمک برای دستیابی به بالاترین غلظت الکل، ۵/۰ gr/l از هریک از آنها می‌باشد (شکل ۴- B).

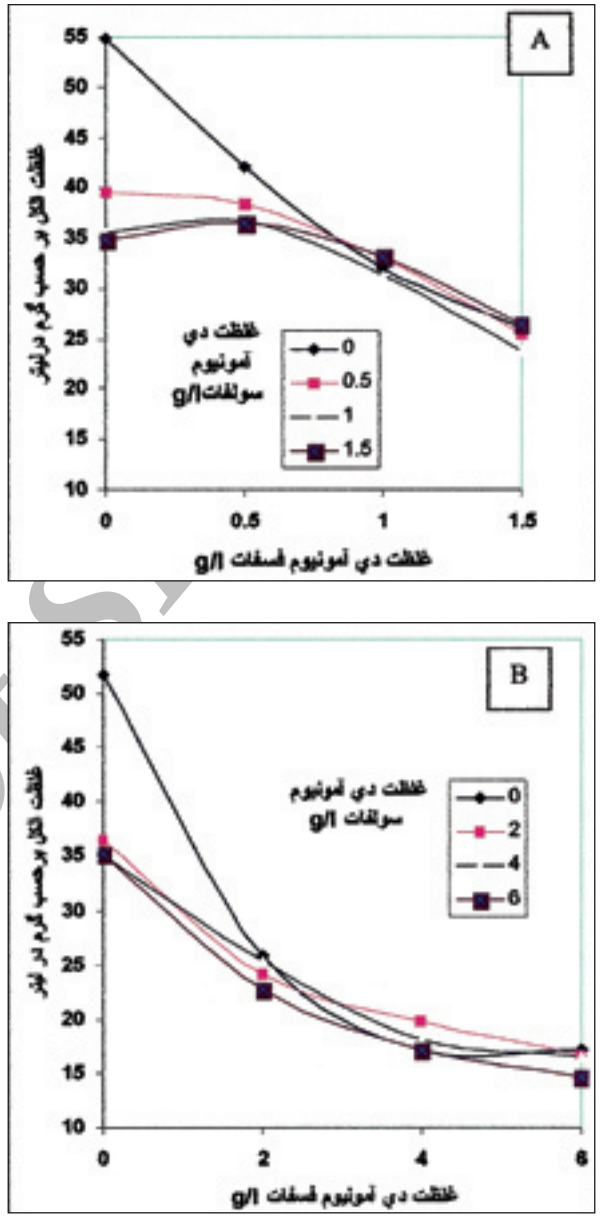
بعد از تعیین فرمولاسیون محیط کشت تخمیر، در اولین گام جهت بهینه‌سازی شرایط کشت، pH ابتدای تخمیر مورد آزمایش قرار گرفت و

جدول ۱: نتایج تیمار شیمیایی- آنزیمی‌نشاسته صنعتی با پیش تیمارهای مختلف

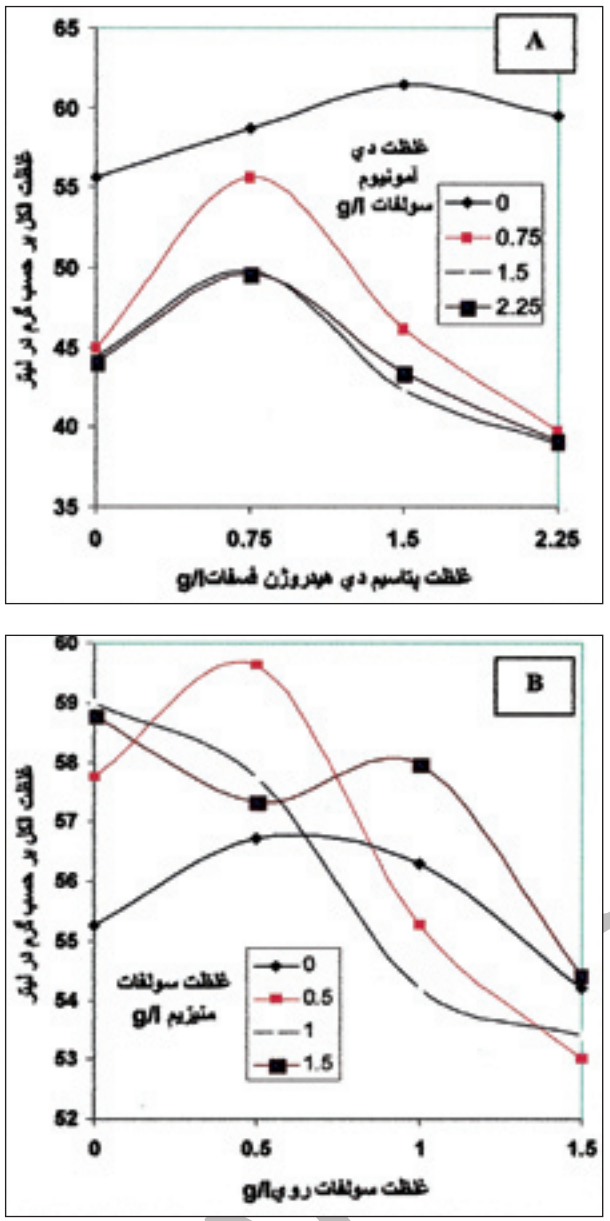
شماره نمونه	غلظت اسید (٪ حجمی)	pH	غلظت قندآزادشده (gr/l)		مواد جامد باقی مانده (٪ وزنی حجمی)	
			۱۳۰ درجه سانتیگراد	۱۲۰ درجه سانتیگراد	۱۳۰ درجه سانتیگراد	۱۲۰ درجه سانتیگراد
۱	۱/۴	۰/۷۵	۱۲۸	۱۲۰	۲۴	۳۲
۲	۱	۰/۹۵	۱۳۹	۱۱۵	۱۲	۳۸
۳	۰/۴	۱/۳۵	۱۴۸	۹۲	۶	۵۵
۴	۰/۱	۲/۲۵	۱۱۸	۲۳	۳۶	۱۱۹
۵	۰/۰۴	۳/۲۵	۹۵	-	۵۲	-
۶	۰/۰۱	۴/۵۵	-	-	-	-

* نمونه شماره ۶ برای دمای تیمار ۱۳۰ درجه سانتیگراد و نمونه‌های شماره ۵ و ۶ برای دمای تیمار ۱۲۰ درجه سانتیگراد پس از سرد شدن منجمد شده و قابل استفاده نبود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف
دی آمونیوم سولفات و دی آمونیوم فسفات بر میزان تولید الکل از نشاسته
هیدرولیز شده (A- آزمایش اول B- آزمایش دوم)



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف دی آمونیوم سولفات مرک و پتاسیم
دی هیدروژن فسفات (A) و غلظتهای مختلف سولفات روی و سولفات منیزیم (B)،
بر میزان تولید الکل از نشاسته هیدرولیز شده

مشخص شد در میان pHهای مورد بررسی، بالاترین غلظت الکل در pH ۵/۵ حاصل می‌شود. ولی چنین به نظر می‌رسید که مقدار تولید الکل در محدوده pH بین ۵ تا ۶ تقریبا مشابه می‌باشد که البته تجزیه آماری داده‌ها، این مطلب را تایید کرد (جدول ۲).

از دیگر شرایط موثر بر راندمان تولید الکل، وجود یا عدم وجود هوا می‌باشد که باعث کم هوازی یا بیهوازی شدن کشت می‌شود. در آزمایش اول این قسمت، پس از تلقیح مخمر، دهانه همه ارلن‌ها با پنبه مسدود شده و سپس در فواصل زمانی معین، پنبه با تله تخمیر تعویض گردید. نتایج این شیوه تخمیر (کم هوازی-بیهوازی) که در شکل ۵A نمایش داده شده است، حاکی از آن بود که مقدار الکل نمونه‌ها، با افزایش زمان بیهوازی شدن کاهش محسوسی را نشان می‌دهد در حالی که بیشترین غلظت الکل در ارلنی حاصل شد که از همان آغاز دهانه آن با تله تخمیر مسدود شده بود. لذا در آزمایش بعدی شرایط کشت به حالت عکس یعنی بیهوازی-کم هوازی تغییر یافت. یعنی در ابتدا دهانه همه ارلن‌ها با تله تخمیر مسدود شده و سپس در فواصل زمانی خاص، تله تخمیر با پنبه تعویض گردید. نتایج این بررسی که در شکل ۵B نمایش داده شده، نشان از آن داشت که

www.SID.ir

جدول ۲: بررسی آماری تاثیر pH بر غلظت اتانول

	N	Subset for alpha = /۰۵					
PH		۱	۲	۳	۴	۵	۶
۳/۵۰	۳	۳۹/۱۰۰۰					
۷/۵۰	۳		۴۷/۰۰۰				
۴/۰۰	۳			۵۰/۴۰۰۰			
۷/۰۰	۳				۵۶/۱۰۰۰		
۴/۵۰	۳				۵۸/۳۸۶۷	۵۸/۳۸۶۷	
۶/۵۰	۳					۵۸/۹۰۰۰	
۵/۰۰	۳					۶۰/۹۰۰۰	۶۰/۹۰۰۰
۶/۰۰	۳					۶۱/۰۰۰۰	۶۱/۰۰۰۰
۵/۵۰	۳						۶۲/۰۳۰۰
Sig.		۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۶۵	۰/۰۵۲	۰/۳۷۱

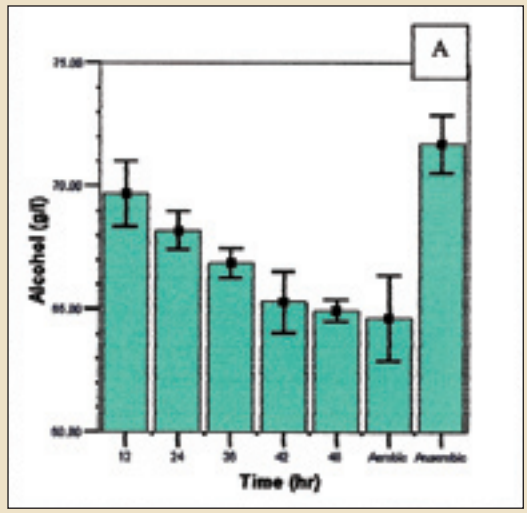
بر داشتن تله تخمیر و در حقیقیت کم هوازی نمودن کشت، باعث افزایش تولید الکل می‌شود و مناسبترین زمان برای این تعویض ۱۲ ساعت پس از تلقیح مخمر می‌باشد.

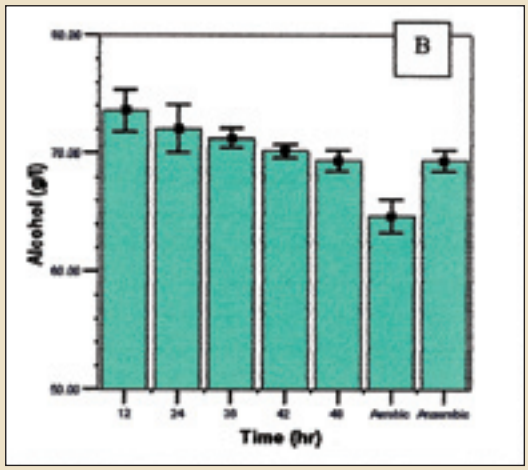
بررسی اثر تغییرات غلظت اسید استیک و اسید لاکتیک بر روی رشد و تخمیر *Saccharomyces cervisiae* در دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول این آزمایش‌ها که در آن از غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ gr/l اسید استیک و از ۰، ۰/۵ و ۱ gr/l اسید لاکتیک استفاده شد، هیچ تغییری در غلظت نهایی الکل، تعداد سلول‌ها، درصد سلول‌های زیست پذیر و درصد سلول‌های دارای جوانه مشاهده نگردید. لذا در آزمایش دوم غلظت‌های هر دو اسید نسبت به آزمایش اول افزایش داده شده و به ۲، ۵ و ۹ gr/l رسانیده شد. نتایج این بخش نیز در غلظت نهایی الکل، غلظت قند باقی مانده، درصد سلول‌های دارای جوانه و تعداد سلول‌ها در تمام نمونه‌ها یکسان بود و تنها در pH پایان تخمیر (شکل ۶ (A)) و درصد سلول‌های زیست پذیر (شکل ۶ (B)) بین نمونه‌ها تفاوتهایی مشاهده گردید. از این رو در آخرین آزمایش این بخش که درون فرمنتر آزمایشگاهی انجام شد، تغییرات غلظت قند، الکل، اسید استیک، اسید لاکتیک و تعداد سلولها، در مش دارای ۹ gr/l از هر یک از اسیدها و مش بدون اسید، اندازه گیری شد که نتایج آن در شکل ۷ نمایش داده شده است. همانگونه که نتایج نشان می‌دهد در این آزمایش نیز بین نمونه‌های دارای اسید و کنترل تفاوت محسوسی مشاهده نشد. علاوه بر این مشخص گردید مقدار اسیدهای مورد بررسی طی تخمیر تقریبا بدون تغییر باقی می‌ماند.

بحث و بررسی

آزمایش‌هایی که با استفاده از نشاسته خالص انجام گرفت نشان داد که تیمار شیمیایی – آنزیمی‌مناسب ترین روش برای تولید الکل از نشاسته است. همچنین در ادامه این آزمایش‌ها، حداقل غلظت لازم از آنزیم برای هیدرولیز مقادیر مختلف نشاسته محلول تعیین گردید (۱). ولی با توجه به منشاء متفاوت نشاسته گندم و نشاسته محلول، برای استفاده از این نتایج، برای تجزیه نشاسته صنعتی لازم بود تغییراتی در روش هیدرولیز، ایجاد شود زیرا Montesinos پس از انجام تحقیقات بر روی آرد گندم، چنین اظهار داشت که وجود ویسکوزیته مهمترین عامل اختلاف نشاسته محلول با آرد گندم بوده و عامل وقوع چنین رخدادی پنتوزان‌ها و سلولز می‌باشد. به عبارت دیگر انجام پیش تیمار شیمیایی قبل از هیدرولیز آنزیمی، به آزاد شدن نشاسته از سلولز و آماده شدن آن برای تیمار آنزیمی‌و کاهش ویسکوزیته محلول، کمک می‌کند (۲۲ ، ۲۸). در این تحقیق پس از بهینه‌سازی هیدرولیز شیمیایی، راندمان ۸۹ درصدی هیدرولیز و بازده ۷۱ درصدی تخمیر با محلول دارای ۱۵۵ gr/l ماده جامد (محلول نشاسته گندم و آب) و طی مدت زمان ۴۸ ساعت، حاصل گردید. البته راندمان تخمیر در غلظت‌های مختلف نشاسته تفاوت زیادی با هم نداشت و منشاء بروز آنها را می‌توان به عواملی همچون افزایش مواد جامد غیرقابل تخمیر در غلظت‌های بالا و همچنین کم بودن غلظت قند حاصل از تخمیر در غلظت‌های پایین نشاسته، مربوط دانست. Ryu در تخمیر با شوانیومایسس کاستلی متوجه شد که با افزایش غلظت نشاسته از ۵ تا ۱۵٪، میزان تولید الکل افزایش می‌یابد ولی در غلظت‌های بالاتر نشاسته، راندمان تولید اتانول کم می‌شود. ماکزیمم الکل تولید شده توسط این محقق ۵۸/۱ gr/l گزارش گردید که طی ۶۰ ساعت تخمیر حاصل شده بود (۲۴). Suresh هم در SSF *Saccharomyces cervisiae* و *Aspergilus niger* روی غلات خراب شده به بررسی اثر غلظت نشاسته (۲ تا ۱۲٪ پودر غله دارای ۶۰٪ نشاسته) روی تولید الکل پرداخت. وی بیشترین غلظت الکل (۲۲/۴ gr/l) را با نشاسته ۱۰٪ و طی ۷۰ ساعت تخمیر و با بازده ۹۱/۵٪ میزان تئوری

Archive of SID
www.SID.ir

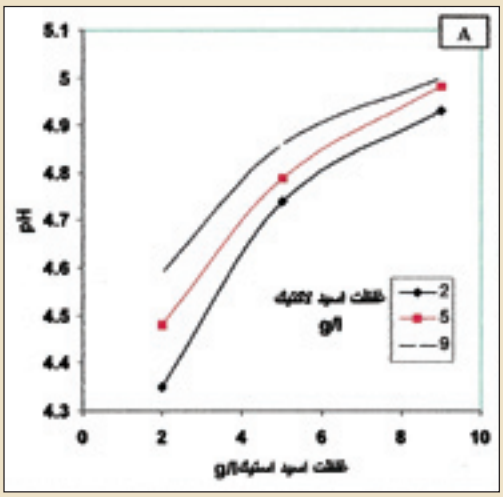


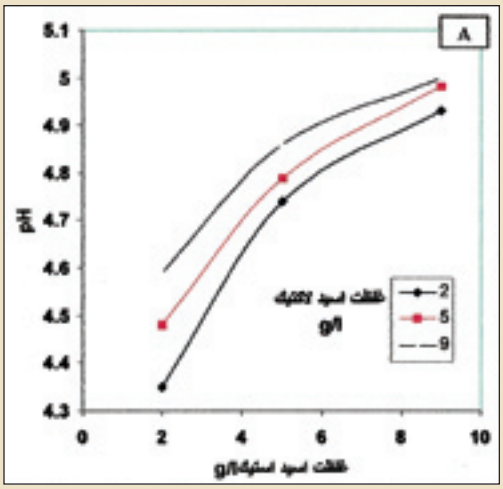


شکل ۵- تاثیر کم هوازی یا بیهوازی بودن کشت بر میزان تولید الکل.
A-کشت کم هوازی-بیهوازی، در این آزمایش ابتدا دهانه همه ارلن‌ها با پنبه بسته شده و سپس در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۲ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح مخمر، پنبه با تله تخمیر (جهت ایجاد شرایط بیهوازی) تعویض گردید. B- کشت بیهوازی- کم هوازی، در این آزمایش ابتدا دهانه همه ارلن‌ها با تله تخمیر بسته شده و سپس در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۲ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح مخمر، تله تخمیر با پنبه (جهت ایجاد شرایط کم هوازی) تعویض گردید. لازم به ذکر است در هر دو آزمایش از دو نمونه به عنوان کنترل استفاده شد که دهانه یکی از آنها از ابتدا تا انتهای تخمیر با تله تخمیر و دهانه دیگری با پنبه بسته شده بود.

بدست آورد (۲۷). همانگونه که مشاهده می‌شود نتایج بررسی حاضر، هم از لحاظ راندمان تولید و هم به لحاظ زمان تخمیر در مقایسه با تحقیقات مشابه دارای برتری می‌باشد که عامل آن را می‌توان انتخاب روش مناسب برای هیدرولیز نشاسته دانست.

غلظت الکل مش حاصل از تخمیر نقش بسزایی در کاهش هزینه‌های تقطیر و تصفیه پساب، به همراه دارد. از جمله پارامترهای موثر در افزایش غلظت الکل می‌توان به ترکیب محیط کشت و شرایط تخمیر اشاره نمود

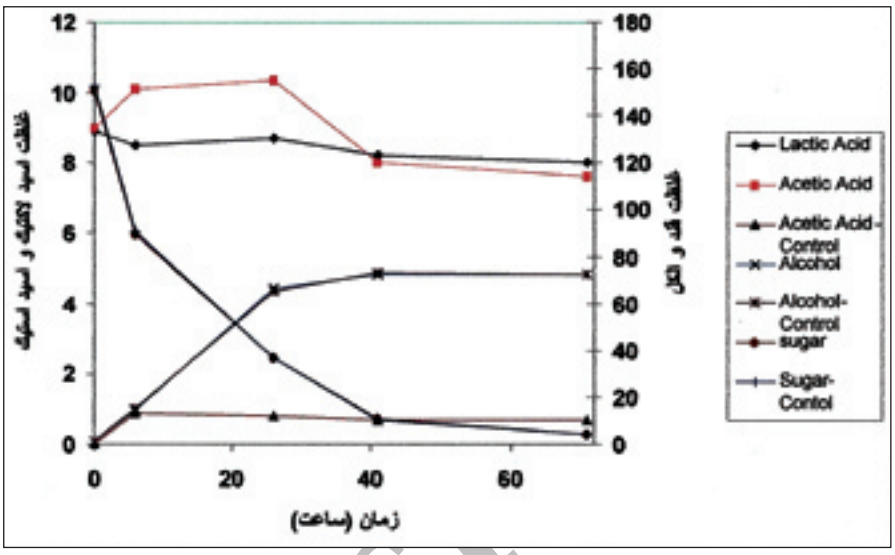




شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف اسید استیک و اسید لاکتیک بر pH محیط کشت (A) و درصد سلول‌های زیست پذیر (B)، در پایان تخمیر نشاسته هیدرولیز شده

که می‌توانند باعث تعدیل تحمل الکل و در نتیجه افزایش غلظت آن در مش حاصل از تخمیر شوند (۱۴). تاکنون مقالات متعددی راجع به اثر املاح بر روی رشد و تخمیر *Saccharomyces cervisiae* منتشر شده و در هر یک اثر افزودن ترکیبات ساده (مثل نمک‌های آمونیوم) ویا پیچیده (مثل عصاره مخمر) و یا حتی حذف برخی از مواد (مثلا کاهش مقدار کلسیم با استفاده از EDTA) بر روی رشد و تخمیر این میکروارگانیسم بررسی شده است (۱۱). ولی در هیچ یک از آنها، بهینه‌سازی فرمولاسیون محیط کشت با دید تولید صنعتی مورد توجه قرار نگرفته است. زیرا علاوه بر افزایش هزینه، به کار بردن یک نمک خالص در مقایسه با یک نمک صنعتی که می‌تواند دارای ناخالصی‌های گوناگون باشد، نتایج متفاوتی را به همراه دارد. نتایج این بررسی نشان داد که نمک سولفات آمونیوم در هر دو فرم خالص و صنعتی و نمک دی آمونیوم فسفات در فرم صنعتی باعث تاثیر منفی در میزان تولید الکل می‌شود در حالی که Montesinos در تحقیق خود بر روی

www.SID.ir



شکل۷- مقایسه تغییرات غلظت الکل، قند و اسیدهای استیک و لاکتیک در نمونه دارای ۹gr/l از هر دو اسید با نمونه کنترل

آرد گندم نشـان داد اضافه نمودن دی آمونیوم فسفات به نشاسته هیدرولیز شـده به مقدار gr/l ۵، سـرعت تولید را از ۳ به gr/h.l ۹/۵ افزایش می‌دهد در حالی که روی بـازده تولید اثری ندارد (۲۸). اولین احتمال برای توجیه تاثیر منفـی افزودن املاح صنعتی بـر تخمیر الکلی، وجـود ناخالصی‌های سمی(ارسـنیک و جیوه) در این ترکیبات بود ولی صحت این حدس زمانی مورد تردید قرار گرفت که آزمایش با نمک خالص نیز تاثیر مشـابهی را به همراه داشت. در این صورت می‌توان حدس زد که ترکیبات مختلف موجود در گندم، تامین کننده نیتروژن، گوگرد، فسـفر و اسـید آمینه مـورد نیاز مخمر بوده اسـت. کاهش شـدید pH پایان تخمیر تا حدود ۳، باعث تداعی حدس دیگری در این زمینه می‌شد و آن اینکه مصرف نمک‌های فوق، افت pH و در نتیجـه کاهش زیسـت پذیری سـلول‌های مخمر را در پـی دارد. Helena نیـز در تحقیقـات خود به این موضوع اشـاره کرده و نشـان داده است که در حضور دی آمونیوم سولفات pH از ۵ به ۳ کاهش می‌یابد (۱۵). زیرا در چنین شـرایطی، سلول‌ها باید با مصرف کربن و نیتروژن موجود در محیط کشت، به ساخت اسیدهای آمینه بپردازند و یون هیدروژن به عنوان محصول جانبی انجام واکنش‌های مربوط به این سـوخت و سـاز در محیط آزاد می‌شـود که خود باعـث کاهش pH محلول می‌شـود (۱۴). همچنین هرچند افزودن پتاسـیم دی هیدروژن فسـفات به محیـط تخمیر، افزایش تولیـد الکل را به همراه داشـت ولی نمی‌توان این افزایـش تولید را به طور یقین به یون فسـفات مربوط دانسـت زیرا ممکن اسـت وجود یون پتاسیم منجر به ایجاد چنین تغییری شده باشد (۱۷).

نتایـج آزمایش‌های بعدی این تحقیق نشـان داد که افـزودن نمکهای صنعتی سـولفات منیزیم و سـولفات روی، افزایش تولید الکل را به همراه دارنـد. Chandrasena در کشـت *Saccharomyces cervisiae* در محیـط گلوکز با ترکیب کاملاً مشـخص دریافت که بـا افزایش غلظت یون منیزیم در تمام سـطوح یون‌های پتاسیم و کلسیم، درصد الکل بالا می‌رود که این نتیجـه، اثر قـوی یون منیزیم را روی تخمیر نشـان می‌دهد. از طرف دیگر وی ثابـت کرد کـه عناصر فـوق، دو به دو (Ca/Mg -K/Ca -K/Mg) و هر سـه با هم اینتراکشـن دارند. به عبـارت دیگر ترکیب یون‌های پتاسیم و کلسـیم برای دستیابی بـه ماکزیمم الکل بسـتگی به سـطح یون منیزیـم دارد (۷). لازم به ذکر اسـت یون منیزیم کاتیونی ضروری در سنتز اسیدهای نوکلئیک بـوده و کوفاکتور بیـش از ۳۰۰ نـوع آنزیم اسـت. همچنین این یـون در پایدارسـازی غشاء و تشـدید فعالیت پمپ غشـائی H^+ -ATPase+ کـه خود نقشـی حیاتی در نگهداری عملکرد غشـاء به عهده دارد، تاثیر زیـادی بر جای می‌گـذارد که مجموع آثار فوق باعث می‌شـود در حضور یون منیزیم، تا حد زیادی از سمیت اتانول در محیط کشـت کاسـته شـود. روی هم عنصری لازم در متابولیسـم مخمری است. ایـن عنصر به عنوان کوفاکتـور آنزیم‌هایی مثـل الکل و آلدهید دهیدروژناز که به طور مسـتقیم در تولید الکل درگیر هستند، عمل می‌کند. روی همچنین سنتز ریبوفلاوین را فعال کرده و باعث افزایش میزان پروتئین در مخمر و تحریک ورود و مصرف مالتوز و مالتوتریوز می‌شـود. البته نباید فراموش شـود که غلظت بالای هر کدام از عناصر یاد شـده بر فرایند تخمیر اثر بازدارنده دارد (۷، ۱۱). در مجموع می‌توان اظهار داشـت که افزودن املاح حاوی فسـفر، منیزیم و روی (و احتمالا پتاسیم) برای تخمیر نشاسته هیدرولیز شده ضروری است.

غلظـت یون هیـدروژن یکـی از فاکتورهای مهمی‌اسـت کـه حیات بیولوژیک سـلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این فاکتور بر سطح یونی و در نتیجه در دسترس بودن یا نبودن بسیاری از متابولیت‌ها و یون‌های غیرآلی اثر می‌گذارد. pH بهینه فعالیت برای اکثر مخمرها در محدوده بین ۶-۴ قرار دارد ولی رفتار سـویه‌های مختلف و حساسـیت آنها نسبت به تغییرات pH بسـیار متفاوت و تا حد زیادی به شـرایط محیطی بسـتگی دارد. به عنوان نمونه Suresh در SSF *S. servisies* و *A. niger* روی غلات خراب شده، در pH ۵ به ماکزیمم غلظت الکل در آزمایش‌های خود رسـید (۲۷). در حالی کـه در تحقیق دیگری بر روی *S. serrisae* معلوم شـد کـه توانایی تخمیر سـلول‌های تثبیت شـده در محدوده pH ۳/۱ تا ۶/۲۵ ثابت مانـده یعنی تثبیت، سـلول‌ها را در برابر اثر عوامل محیطی حفظ کرده است. در تحقیق اخیر بیشترین تولید الکل در pH=۵/۵ حاصل گردید (۶، ۲۵، ۲۷).

حضور اکسیژن برای رشد مخمر *S. serviisae* و حفظ قابلیت زنده ماندن آن به عنوان یک واحد ساختمانی در بیوسنتز چربی‌ها و لیپیدهای غیر اشباع در میتوکندری و غشـاء ضروری اسـت (۹). در تحقیق صورت گرفته توسط Laro با اسـتفاده از کشت مخمر *S. servisiae* بر روی آب انگور با میزان قند اولیه gr/l ۲۴۶ و در یک سیسـتم ناپیوسته، مشـخص شد که در شرایط بی هوازی کامل، پس از دو روز میزان اسـترول، کمی‌افزایش می‌یابد ولی پس از آن به شـدت دچار کاهش می‌شود. در حالی که در شرایط کم هوازی میزان اسـترول سـلولی بعد از دو روز بیش از ۸۰٪ نسبت به سلول‌های تلقیح شده

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش نشـان داده و در پایان کشت، علاوه بر افزایش سرعت تخمیر، میزان قند مصرف شـده هم بیشتر بوده است. در تکمیل تحقیق بر روی کشت‌های بیهوازی، یک کشـت در روز سـوم و کشـت دیگر در روز دهم پس از ایجاد شرایط بیهوازی، به مدت ۵ دقیقه هوادهی نمود. در آزمایش اول افزایش میزان استرول سلول‌ها مشاهده شد در حالی که در آزمایش دوم یعنی هوادهی یک کشـت بی‌هوازی در روز دهم، این افزایش مشـاهده نگردید. در مجمـوع از تحقیقـات می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد کـه حضور حداقل مقادیر جزئی اکسیژن در کشت در یک زمان کوتاه در خلال مراحل اولیه تخمیر، می‌تواند تاثیر زیادی بر محتوای استرول سلولی و در نتیجه قابلیت تخمیری سلول‌ها، بر جای گذارد (۱۲). از طرف دیگر وقتی مخمر در یک محیط با غلظت بالای سوبسترا کشت داده می‌شود، در ساعات ابتدایی تخمیر غلظت بیومس پایین بوده و تحت چنین شـرایطی منبع اصلی تامین انرژی، مسیرهای متابولیکی درگیر در تولید الکل نیست. ولی با افزایش غلظت بیومس به تدریج متابولیسم بیهوازی حاکم می‌گردد که البته این مساله به راحتی با محاسبه شدت انتقال اکسیژن در کشت مخمر، شدت مصرف اکسیژن توسط مخمر و غلظت مخمر، قابل اثبات اسـت. از این رو لازم اسـت برای اعمال شرایط بیهوازی همراه با هوادهـی، میزان هوادهی را با توجه به میزان اکسـیژن و بیومس موجود در کشـت تعیین نمود. البته باید به این موضوع هم توجه داشـت که نوع کشت و میکروارگانیسـم‌های موجود در آن و همچنین نوع فرایند مورد استفاده، از جمله عوامل تعیین کننده اثر هوادهی طی تخمیر بر راندمان تولید هستند. در تحقیقی بر روی پساب کارخانه فرآوری سیب زمینی با استفاده از آسپرژیلوس و *S. cervisiae*، به این نتیجه رسـیدند که شـرایط بیهوازی برای تولید الکل مناسب تر بوده زیرا در شرایط هوازی، افزایش تولید بیومس، منجر به کاهش راندمان شده است (۱۲، ۲۴، ۳۲). حال با توجه به موارد مذکور نتایج تحقیق حاضر را می‌توان به این صورت تفسیر نمود که در آزمایش اول یعنی تعویض پنبه با تله تخمیر (شـکل ۵ A)، چون در آغاز کشـت هم محتوای استرولی سلول‌ها کافی بوده و هم تا حدودی اکسیژن در محیط کشت وجود داشته، و همچنین با توجه به پایین بودن غلظت بیومس، شرایط به طور کامل بیهوازی نشده و لذا قرار دادن تله تخمیر از همان آغاز فرایند، منجر به تسریع در ایجاد حالت بیهوازی و در نتیجه غالب شدن هرچه سریعتر متابولیسم درگیر با تولید الکل گردیده است. در حالی که آزمایش دوم (شکل ۵ B) ارلنی بالاترین تولید را داشـته که پس از ۱۲ سـاعت از آغاز کشت، تله تخمیر آن با پنبه تعویض شده است و به این ترتیب با افزایش زمان بیهوازی بودن کشت نسبت به این ارلن، مقدار تولید الکل کاهش محسوسـی را نشـان می‌دهد. این مشاهده را می‌توان به این صورت تفسـیر کرد که قـرار گرفتن تله تخمیر بر روی دهانه ارلن، باعث تسـریع در مصرف اکسیژن موجود در محیط کشت شده و چون تله تخمیر مانع ورود اکسیژن به ارلن می‌شود شرایط کشت با سرعت به سمت بیهوازی شـدن میل پیدا کرده اسـت. حال با توجه به اینکه طی چند ساعت ابتدای تخمیر بیومس افزایش می‌یابد، چنین به نظر می‌رسـد که سلول‌ها با کاهش اسیدهای چرب ضروری روبرو می‌شوند و در نتیجه تعویض تله تخمیر با پنبه، به انتشـار اکسیژن به درون محتویات ارلن و ساخت ترکیبات مذکور توسط مخمر کمک نموده است.

از عمـده دلایل ذکر شـده در مورد علت کاهـش تولید محصول در مش آلوده به باکتری‌های مزاحم، اثر بازدارندگی اسـید اسـتیک و اسید لاکتیک تولیدی توسـط این میکروارگانیسـم‌ها، بر روی رشـد و تخمیر مخمـر *C. servisiae* می‌باشـد. مثلاً Pampulha بـا آزمایش روی یک سـویه *C. servisiae* در محیط گلوکز نشـان داد کـه ۱۷۰ میلی مولار اسـید اسـتیک فاز تاخیر را تـا ۵ روز افزایش می‌دهـد. Helle هم طی تحقیقـی اثـر افـزودن اسـید اسـتیک را در pH=۵ روی *C. servisies* بررسـی کرد. وی نشان داد که افزایش اسید به صورت خطی از رشد *C. servisiae* کـم کرده و مقدار نهایی بیومـس را در محیط گلوکز کاهش می‌دهد. همچنین وی ثابت کرد، وجود اسـید استیک در غلظت gr/l ۶/۴، رشـد را به میزان ۵۰٪ کاهش می‌دهـد حال آنکه در غلظت gr/l ۸، رشـد مخمر به طور کامل متوقف می‌شـود. از دیگر نتایج این بررسـی چنین بود که بازده تولید الکل تا غلظت gr/l ۴ اسـید تغییری نداشـته اسـت در صورتی که با افزایش غلظت از این مقدار، بازده به شـدت کم شـده و در gr/l ۹ اسـید به حدود ۱۰٪ رسیده اسـت. نکته دیگر اینکه در شـرایط بیهوازی تحمل مخمر نسـبت به اسید اسـتیک بیشتر بوده اسـت (۲۸). همچنین در بسـیاری از مراجع علمی‌به افزایش غلظت این دو ترکیب در مش آلوده به باکتری اشـاره شـده اسـت. به عنوان نمونه طی تخمیر ذرت خرد شـده، بـروز آلودگی با باکتـری *Lactobacillus fermentum* می‌تواند غلظت اسـید لاکتیک را تـا ۱۴ گرم در کیلوگرم مـش‌افزایـش‌دهـد

تا کنون تحقیقات زیادی روی مکانیسـم اثر بازدارندگی اسـید استیک و اسـید لاکتیک بر رشـد و تخمیر ساکارومایسس سـروزیه صورت گرفته و اغلب آنها دلایل مشـابهی را برای وقوع بازدارندگـی ذکر نموده اند. مثلا Halm (۱۴) چنین عنوان می‌کند که حین رشـد *C. servisies*، فرم آنیونی اسید لاکتیک و اسید استیک به صورت سمپورت با یک یون هیدروژن و از طریـق جذب فعال و فرم غیر یونی آنها از طریق انتقال غیر فعال از غشـاء، وارد سیتوپلاسم مخمر می‌شـود. درون سیتوپلاسم، چون pH سیتوزول از pKa این اسـیدها بالاتر اسـت، ترکیبـات فوق به فرم یونیزه تبدیل شـده و اسـیدی شـدن سـیتوزول را باعث می‌شـوند. حال مخمر برای مقابله با تغییر ایجاد شـده در pH سیتوپلاسم، سـعی می‌کند از طریق پمپ ATP آز، پروتن اضافی را به بیرون سـلول پمپ نماید که البته این راهکار تنها در غلظت‌های پایین اسید می‌تواند مناسب باشد و در غلظت‌های بالاتر، افزایش مصرفATP درون سلولی را به همراه دارد که این امر مرگ سلول را باعث می‌شـود. علاوه بر این، کاهش pH سـیتوزول منجر به اختلال در عملکرد آنزیم‌ها شـده و متابولسیم سـلول را با مشکل مواجه می‌سازد (لازم به ذکر اسـت وجود اسیدهای آلی در محیط کشت روی جذب گلوکز توسط مخمر بی تاثیر است).

عوامل متعددی در میزان بازدارندگی اسـیدهای آلی بر رشـد و تخمیر *Saccharomyces cervisiae* دخالت دارد. به عنوان نمونه، غلظت کمتری از اسـید استیک نسبت به اسـید لاکتیک لازم است تا بتواند pH درون سلول را تغییر دهد. علت بازدارنده تر بودن اسـید استیک pKa بالاتر آن (۴/۷۴) نسـبت به اسید لاکتیک (۳/۸۶) است. همچنین علاوه بر نوع اسید، غلظت آن هـم در ایجـاد اثر بازدارندگی موثر اسـت که البته در مراجـع مختلف، به غلظت‌های متفاوتی از اسـید برای ایجاد حالت بازدارندگی اشـاره شـده اسـت (۱۴، ۲۸، ۳۱). نوع محیط کشـت و pH آن هم از دیگر عوامل موثر در بازدارندگی اسـیدهای آلی بر رشـد و تخمیر مخمر اسـت. محیط‌های کمپلکس نسبت به محیط‌های حداقل آزمایشگاهی دارای دامنه وسیع تری

Archive of SID
www.SID.ir

از نوترینت‌ها و ویتامین‌ها بوده و از این رو اثر بازدارندگی اسیدهای آلی در محیط‌های حداقل بیشتر از محیط‌های طبیعی است. همچنین همانگونه که ذکر شد از آنجا که فرم غیر یونی اسیدهای آلی می‌توانند به صورت غیرفعال وارد سلول شود، بسیار از فرم یونیزه آنها سمی‌تر است. لذا کنترل pH محیط کشت در سطحی که از تشکیل فرم غیر یونیزه اسید بکاهد می‌تواند در کاهش بازدارندگی آن موثر باشد. به عنوان نمونه Taherzadeh در بررسی خود نشان داد که حداکثر مقدار اسید استیک برای حفظ تولید الکل در محیط گلوکز در pH ۳/۵، gr/l ۳/۵ و در pH ۵، gr/l ۹ می‌باشد (۲۹). افزایش pH محیط کشت دارای اسیدهای آلی، آثاری همچون نزدیک تر شدن pH داخل و خارج سلول و در نتیجه کاهش استرس وارده به سلول، کاهش فرم غیر یونیزه اسید در مقابل فرم یونیزه آن و ایجاد جفت بافری تشکیل شده از اسیدهای آلی که از افت ناگهانی pH جلوگیری می‌کند، را به همراه دارد. نکته دیگر این که ترکیباتی مثل اسید استیک و یا اسید لاکتیک هر چند در غلظت‌های بالا باعث کاهش راندمان تخمیر می‌شوند ولی در مقادیر کم، تولید الکل را افزایش می‌دهند زیرا در چنین شرایطی، سلول پروتن اضافی را به بیرون پمپ می‌کند که این کار افزایش مصرفATP، فعال تر شدن چرخه گلیکولیز و در نتیجه افزایش تولید الکل را به همراه دارد. همچنین در حالت طبیعی بخشی از ATP تولید شده در سلول برای تولید بیومس مصرف می‌شود. ولی در حالت بروز استرس به علت مصرف بالای ATP، بیومس تولید نشده و بازده تخمیر افزایش می‌یابد. البته طولانی شدن چنین روندی مختل شدن فعالیت سلول را باعث می‌شود. همچنین اثر بازدارندگی اسیدهای آلی تا حد زیادی به شرایط محیطی، نوع سویه مورد استفاده و تحمل آن نسبت به اسید بستگی دارد (۱۴، ۲۹، ۳۱).

نتایج این پروژه حاکی از عدم تاثیر اسید استیک و اسید لاکتیک بر روی رشد و تخمیر در شرایط مورد آزمایش بود. دلایل چنین مشاهده ای را می‌توان به این موارد نسبت داد: ۱- مقاومت سویه مورد استفاده به اثر بازدارندگی اسیدهای آلی که این امر با توجه به اینکه مخمر مورد استفاده در این آزمایش‌ها، یک سویه صنعتی مولد الکل بود، دور از انتظار نیست، ۲- غنی بودن محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق، که احتمالا از اثر بازدارندگی اسیدهای آلی بر روی مخمر، کاسته است و ۳- pH مناسب محیط کشت در آغاز تخمیر، که هم نقش موثری در ایجاد حالت بافری در محیط کشت دارد و هم کاهش فرم غیر یونیزه اسید را باعث می‌شود. ذکر سه نکته در مورد نتایج آزمایش‌های این بخش ضروری است و این نکات عبارتند از: ۱- همانگونه که شکل ۶A نشان می‌دهد با افزایش غلظت اسید در محیط کشت، pH پایان تخمیر بالاتر بوده که علت چنین مشاهده ای را می‌توان به تشکیل زوج بافر اسیدها با سایر ترکیبات موجود در محیط کشت و در نتیجه جلوگیری از ایجاد تغییر در pH اولیه محیط کشت (۱/۵) نسبت داد. ۲- کاهش زیست پذیری سلول‌ها با افزایش غلظت اسید (شکل ۶B) را هم می‌توان به وجود استرس بالا در پایان تخمیر ربط داد. زیرا در مش پایان تخمیر علاوه بر وجود غلظت بالای الکل، وجود اسیدهای آلی بر استرس وارده به مخمر افزوده است. ۳- همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود مقدار اسید استیک در نمونه کنترل در مقایسه با نمونه دارای اسید، کمی‌افزایش یافته است. که علت این مشاهده می‌تواند آزاد شدن اسید از سلول‌های در حال تکثیر باشد (استات از واسطه‌های چرخه TCA است).

راندمان تخمیر در تولید الکل از نشاسته و همچنین سوبسترای باقی مانده در انتهای تخمیر، قویا توسط ماهیت ماده خام مصرفی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. از این رو نمی‌توان به راحتی نتایج بررسی‌های مختلف را با هم مقایسه نمود. چون نوع نشاسته مورد استفاده (شامل نوع پلیمر غالب موجود در آن و یا میزان فیبر، واکس، پنتوزان و ویسکوزیته آن) و همچنین نوع آنزیم‌ها و یا راکتور به کار رفته، همه در ایجاد یک تولید موثر، دارای اهمیت هستند (۲۲، ۳۰). ولی به هر حال در ادامه به نتایج چند مورد از تحقیقات مشابه اشاره می‌گردد. Verma در تحقیق خود بالاترین غلظت الکل (gr/l ۶/۳۷) را با نشاسته ۱۰٪ تیمار شده با هر دو آنزیم آلفاآمیلاز و آمیلوگلیکوزیداز، و با راندمان معادل ۶۶٪ میزان تئوری، بدست آورد (۲۳). Suresh هم درSSF روی نشاسته ۱۵٪، توانست *Saccharomyces servisiae* و *S. costdyli* gr/ ۶۴/۳۱ الکل تولید نماید (با راندمانی معادل ۷۴٪ میزان تئوری). در تحقیق انجام شده توسط Montesinos هم که بر روی آرد گندم صورت گرفت، از سوبسترای دارای ۲۰٪ ماده جامد طی ۳۵ ساعت، gr/l ۶۹ الکل حاصل گردید (با راندمان ۵۸٪ میزان تئوری) (۲۷، ۳۳). در تحقیق حاضر هم ماکزیمم مقدار تولید الکل gr/l ۷۱/۹ بود که با استفاده از سوبسترای دارای gr/l ۱۵۵ ماده جامد و با راندمانی معادل ۷۸٪ میزان تئوری حاصل گردید.

منابع مورد استفاده

۱ - گرجی، م. ع. ۱۳۸۴؛ بهینه‌سازی تولید الکل از نشاسته. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه اصفهان. دانشکده علوم. گروه زیست شناسی.

2- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F. and Malik, M. A. 2003; Production of amylase by newly isolated moderate halophile, Halobacillus sp. strain MA-2. Journal of Microbiological Methods. 52, 353– 359.

3- Baruque Filho, E. A., Baruque, M. G. and et al. 2000; Babassu coconut starch liquefaction: An industrial scale approach to improve conversion yield. Bioresource Technology. 75, 49-55.

4- Bayrock, D. P. and Thomas, K. C. 2003; Control of lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 498-502.

5- Birch, R. M. 1997; The role of selected metal ions in the growth and physiology of wine yeast. Phd thesis. University of Abertay Dundee.

6- Buzas, Z., Ballman, K. and et al. 1989; Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cell. Biotechnology and bioengineering. 34, 882-886.

7- Chandrasena, C. and Walker, G. M. 1997; Use of response surfaces to investigate metal ion interactions in yeast fermentation. American society of brewing chemists. 24-29.

8- Chang, S., Kim, B. H. and et al. 1997; Use of sulfate and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. Applied and environmental microbiology. 63(1), 1-6.

9- Chen, H. C. 1990; Non-aseptic, multi-stage, multi-feeding, continuous fermentation of cane mollasses to ethanol. Process biochemistry international. 254-260.

10- Dale, M. C. and Moelhman, M. 2002; High speed consecutive

Archive of SID

www.SID.ir

batch or continuous low effluent process for the production of ethanol from molasses, starch or sugar. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10, 56-63.

11- Ergun, M., Fedra-Mutlu, S. and Gurel, O. 1997; Improved ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* with EDTA, Ferrocyanide and zeolite X addition to sugar beet molasses. J Chem Tech Biotechnol. 68, 147-150.

12- Franzen, C. J. 1997; Analysis and control of continuous microaerobic ethanol produvtion by yeast. Phd thesis. Department of chemical reaction engineering. Chalmers university of technology. Goteborg.

13- Gerard, C., Barron, C., Colonna, P. and Planchot, V. 2001; Amylose determination in genetically modified starches. Carbohydrate Polymers. 44, 19–27.

14- Halm, M., Hornbek, T., Arneborg, N. and et al. 2004; Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. International Journal of Food Microbiology. 94, 97– 103.

15- Helena, S., Maffud, E. and et al. 2002; Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and ferm ntation. Journal of the institute of brewing. 108, 54-61.

16- Hisayori, S., Ken, U., Yasuya, F., Takeshi, M., Mitsuyoshi, U. and Atsuo, T. 2002; Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting alfaamylase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17, 179–187.

17- Jiff, B., Leeuwen, H. J., Patel, H. B. and Yu, Q. 1998; Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal alfa amylase by *Aspergilus oryzae*. Bioresource Technology. 66, 201-206.

18- Kilic Apar, D. and Ozbek, B. 2005; Alfaamylase inactivation during rice starch hydrolysis. Process Biochemistry. 40, 1367–1379.

19- Kondo, A., Shigechi, H., Abe, M. and et al. 2002; High-Level Ethanol Production from Starch by a Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain Displaying Cell-Surface Glucoamylase. Applied Microbiology and Biotechnology. 58(3), 291-296.

20- Kosaric, N., Russell, I. And Stewart, G. S. 1980; Ethanol production by fermentation: An alternative liquid fuel. Advances in applied microbiology. 26, 147-210.

21- Li, J. H., Vasanthan, T., Hoover, R. and Rossnagel, B. G. 2004; Starch from hull-less barley: V. *In-vitro* susceptibility of wa xy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. Food Chemistry. 84, 621.632.

22- Montesinos, T. and Navarro, J. 2000; Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 27, 362–370.

23- Pajunen, E. 2001; Analytica-Microbiologica-EBC (European brewery convention). Fachverlaghans carl. Pages 195-215.

24- Ryu, Y. W., Ko, S. H., Byun, S. Y. and Kim, C. 1994; Direct alcohol fermentation of starch by a derepressed mutant of *Schwanniomyces castellii*. Biotechnology Letters. 16(1), 107-112.

25- Singh, B., Oberoi, G. K. and Sharma, S. C. 1989; Effect of pH stress on lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Indian journal of experimental biotechnology. 28, 430-433.

26- Stenberg, K., Galbe, M. and Zacchi, G. 1999; The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. Enzyme and Microbial Technology. 26, 71–79.

27- Suresh, K., Kiran, N. and Venkateswer, L. 1999; Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Biorwource Technology. 68, 301-304.

28- Taherzadeh, M. J. 1999; Ethanol from Lignocellulose: Physiological Effects of Inhibitors and Fermentation Strategies. Phd thesis. Department of Chemical Reaction Engineering. Chalmers university of technology. Goteborg, Sweden.

29- Taherzadeh, M. J., Niklasson, C. and Liden, G. 1996; Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? Chemical engineering science. Vol 52. 15, 2653-2659.

30- Tanriseven, A., Uludag, Y. B. and Dogan, S. 2002; A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. Enzyme and Microbial Technology. 30, 406–409.

31- Thomas, K. C., Hynes, S. H. and Ingledew, W. M. 2002; Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. Applied and Environmental Microbiology. 1616-1623.

32- Valero, E. and Millan, C. 2001; Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipid in Saccharomyces cerevisiae in enological fermentation. Journal of bioscience and bioengineering. 92, 33-38.

33- Verma, G., Nigam, P., Singh, D. and Chaudhary, K. 2000; Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. Bioresource Technology. 72, 261-266.

Archive of SID

www.SID.ir