Archive of SID

# بررسی تأثیرمقدار مایه تلقیح ، غلظت قند وافزودن ویتامینها در فرآیند صنعتی تخمیر الکلی در مقیاس آزمایشگاهی

**ندا سینائی[۱]، محمد رعایایی اردکانی[۱] و جمشید فولادی[۲]**

[۱] **اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

[۲] **تهران، دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۱۰

## چکیده

امروزه اتانول زیستی همچنان جزء مهمترین محصولات زیست فناوری می باشد. مخمر*Saccharomyces cerevisiae*، در این صنایع بیشترین کاربرد را دارد و ملاس نیز به واسطه فراوانی و ارزان قیمت بودن و دارا بودن مقادیر بالای مواد قندی در ایران، منبع کربن مناسبی برای تولید اتانول محسوب می شود. هدف از این بررسی، در مرحله اول، بهینه سازی مقدار مایه تلقیح و سپس بهینه سازی غلظت قند محیط کشت است. با توجه به اهمیت ویتامینها، اثر دو ویتامین بیوتین و اسید پانتوتنیک نیز بررسی شد. ابتدا آنالیز کاملی از ملاس نیشکر انجام، و بر اساس اجزاء آن و فرمول عمومی مخمر، ترکیب محیط کشتی مطابق با صنایع تولیدی ترتیب داده شد. در ادامه، درصدهای مختلف مایه تلقیح، افزوده و بازده و بهره وری مربوطه محاسبه و تحلیل آماری شد. نتایج حاکی از آن است که میزان مایه تلقیح۴ v/v درصد بالاترین بهره وری تولید اتانول را دارا می باشد. سپس بریکسهای مختلف ملاس مطالعه شد. نتایج نشان داد که بریکس ۱۷/۵(غلظت قند:g/l ۱۱۰)، بالاترین بهره وری را دارد. همچنین افزودن بیوتین به محیط کشت، تأثیر قابل ملاحظه ای بر بهره وری تخمیر ندارد. در حالی که وجود اسید پانتوتنیک، باعث کاهش زمان تخمیر و افزایش بهره وری تولید می شود.

**واژه های کلیدی**: بهینه سازی، مایه تلقیح، غلظت قند، تخمیر الکلی، بیوتین، اسیدپانتوتنیک

* **نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۶۳۰۲۹۱۳۵ ، پست الکترونیکی:** neda_s7883@yahoo.com

## مقدمه

اتانول، کاربردهای فراوانی در صنایع رنگ سازی، داروسازی، مواد شوینده و غیره دارا می باشد (۱۷). علاوه بر این، امروزه بهره گرفتن از اتانول به عنوان سوخت برتر و سبز، بسیار مورد توجه می باشد (۲۰). تولید الکل به روش تخمیر، سالهای زیادی است که در مقیاس صنعتی انجام می شود، با این حال هنوز هم مسائل ناشناخته و مبهمی در این فرآیند وجود دارد. تخمیر که قلب این فرآیند زیستی را تشکیل می دهد، به دلیل پیچیدگیهای خود به عنوان جعبه سیاه صنعت تولید الکل شناخته می شود. *Saccharomyces cerevisiae* ، متداول ترین و بهترین میکروارگانیسمی است که در تولید صنعتی اتانول از گلوکز مورد استفاده قرار می گیرد (۱۴). در ایران به دلیل وجودکارخانه های قند و شکر، از ملاس که مازاد این کارخانه هاست، استفاده می کنند.

در برزیل سانچز و همکارانش در سال ۱۹۹۶ و ویلز و همکارانش در سال ۱۹۹۹ از نخستین افرادی بودند که در زمینه تولید اتانول از ملاس نیشکر فعالیت وسیع داشته اند (۱۶). تحقیقات بعدی نشان داد ترکیب محیط کشت تأثیر بسزایی بر میزان بازدهی فرآیند تخمیر الکلی دارد. در سال ۱۹۳۵، رگیاند گزارش کرد که غلظت بالاتر مخمر، سرعت



www.SID.ir

Archive of SID

تخمیر را بالا می برد (۸). این در حالی است که بررسیهای فالکون در سال ۱۹۶۱ و بورزانی در سال ۲۰۰۶ حاکی از آن است که افزایش غلظت مایه تلقیح منجربه کاهش کارایی تخمیر الکلی می شود (۵).

تحقیقات دیگر نشان داد که غلظت قندهای قابل تخمیر محیط کشت، تأثیر بسزایی بر میزان بازدهی فرآیند تخمیر الکلی دارد. الورزا درسال ۱۹۷۷ و ویتولو درسال۱۹۹۵ اظهار داشتند که غلظتهای بالای گلوکز اثر مهارکنندگی وسیعی برروی فعالیتهای آنزیمی بویژه اینورتاز دارد (۲۶ و ۳۱). از طرف دیگرتحقیقات بورزانی درسال ۲۰۰۶ نشان دادکه با افزایش غلظت قند محیط کشت، مقدار اتانول تولید شده افزایش می یابد اما درمیزان بازده محصول، افزایش قابل ملاحظه ای مشاهده نمی شود (۵). بررسیهای بورخولدر در سال ۱۹۴۴، کناب و زالمن در سال ۱۹۶۴، موئات و آلفنور در سال ۲۰۰۴ و وازکوئیز در ۲۰۰۵ نشان داد که با افزودن ویتامین از جمله بیوتین و اسیدپانتوتنیک می توان تولید اتانول را تا حدود ۱۹ v/v درصد افزایش داد ( ۳، ۱۶، ۲۰ و ۳۰).

بررسی منابع این فرضیه را می رساند که ممکن است علت تفاوت در نتایج اشاره شده، تفاوت در سویه های مورد مطالعه و یا غلظتهای متفاوت مواد مغذی محیط کشت بوده باشد. لذا رنج وسیعی از غلظتهای مختلف برای یک سویه صنعتی و در یک محیط کشت کاملاً صنعتی بررسی شد تا فرضیه های فوق مورد ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روشها

به منظور تهیه محیط کشت، بررسی کیفیت منبع کربنی مورد استفاده یعنی ملاس نیشکر خوزستان، ضروری به نظر می رسد. به این منظور، درصد رطوبت، بریکس، pH، خاکستر خام، میزان قندهای احیاکننده به روش فهلینگ، درصد سوکروز به روش دابل پلاریزاسیون، درصد قند کل بر اساس قندهای احیا کننده، میزان نیتروژن کل به روش کجلدال، فسفات بر حسب $P_2O_5$ ،کلسیم و منیزیم، سولفات، میزان$SO_2$ و $NO_2$ بررسی شد (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳).

**روشهای آنالیز: تعیین میزان نیتروژن(روش کجلدال):** هضم: جهت آنالیز ملاس،۲ گرم و دی آمونیوم فسفات، اوره و سولفات آمونیوم ۰/۲ گرم را درون یک ظرف کجلدال وزن و سپس ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۳ دانه سنگ جوش شیشه‌ای و یک قرص کجلدال یا ۰/۵گرم مخلوط کجلدال به آن افزوده و درون دستگاه هضم کجلدال قرار داده شد. زمان لازم برای جوشاندن حدود ۲ ساعت می باشد. بالنها در دمای محیط سرد و برای تقطیر استفاده شدند.

**تقطیر:** ۵ میلی لیتر محلول اسید بوریک درون یک ارلن مایر ریخته و تقریبا چهار قطره مخلوط شناساگر به آن اضافه شد و بالن در دستگاه تقطیر قرار گرفت و به نمونه هضم شده آنقدر سود ۳۵w/v درصد اضافه شد تا رسوب به دست آید. ۱۵۰ میلی لیتر از محلولها درون یک ارلن مایر، تقطیر شد و مایع حاصل با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تیتر گردید. تغییر رنگ از سبز به قرمز کمرنگ می‌باشد. یک نمونه شاهد با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر با همان روشی که برای نمونه گفته شد تهیه، تقطیر و تیتر گردید(۱۱).

$$\%\ N\ w/w = \frac{(A - B) \times ۰/۱ \times ۱۴/۰۰۶۷ \times ۱۰۰}{\text{وزن نمونه} \times ۱۰۰۰}$$

A = میلی لیتر مصرفی اسید کلریدریک ۰/۱N برای نمونه

B = میلی لیتر مصرفی اسید کلریدریک ۰/۱N برای شاهد

**تعیین میزان فسفات($P_2O_5$):** آماده سازی نمونه مشابه با مرحله هضم تعیین میزان نیتروژن است. محتوی بالن هضم، به یک بالن۲۵۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسید. ۲۵ میلی لیتر از محلول، در حضور فنل فتالئین با هیدروکسید سدیم(۱۰۰g/l) خنثی و سپس۱۰ میلی لیتر معرف فسفات اضافه و پس از به حجم رسیدن جذب


www.SID.ir

Archive of SID

نوری در طول موج ۶۵۰ نانومتر در مقابل نمونه شاهد اندازه‌گیری و مقدار $P_2O_5$ از روی منحنی کالیبراسیون تعیین شد (۱۱).

**اندازه گیری میزان اتانول تولید شده:** این آنالیز به وسیله ۱ میلی لیتر از نمونه و با کمک روش دی کرومات پتاسیم انجام گرفت (۱). منحنی استاندارد به وسیله تقطیر مقادیر ۱۰µl تا ۱۰۰µl الکل مطلق و اندازه گیری جذب در طول موج ۵۸۲nm (مطابق با روش مذکور) ترسیم شد.

**اندازه گیری میزان قند مصرف شده:** روشی که به منظور تعیین میزان قند استفاده گردید، موسوم به روش سموگی– نلسون می باشد (۷). برای رسم منحنی استاندارد نیز از محلول گلوکز ۱۰g/l استفاده شد. با کمک منحنی استاندارد و تأثیر ضریب رقت، مقدار قند باقیمانده در نمونه ها در طول موج ۵۲۰nm ارزیابی گردید.

**بازدهی:** میزان اتانول تولید شده به ازاء میزان قند مصرف شده را بازده تولید اتانول می نامند (۴و۵).

Y = بازده ، E p= غلظت اتانول تولید شده (g/l) ، S = مقدار قند مصرف شده(g/l) Yp/s = E p/S

**بهره وری:** در کارخانجات و صنایع تولیدی، بهره وری فاکتور تعیین کننده بوده و محور ارزیابی تولید قرار می گیرد و عبارتست از میزان اتانول تولید شده در واحد زمان (۲۱).P = بهره وری، t = زمان تخمیر P = E p/t

**محیط پیش کشت (مایه تلقیح):** مخمر مورد بررسی، سویه *Saccharomyces cerevisiae* صنعتی مولد اتانول می باشد که از یکی از مراکز تولیدی الکل تهیه شده است. ابتدا کشت ۲۴ ساعته ای از سویه مورد نظر بر روی اسلنت Yeast extract Glucose Chloramphenicol Agar در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تهیه شد. سپس مخمرها در محیط کشت مایع Yeast extract Malt extract در انکوباتور شیکر(دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵۰rpm) رشد داده شدند (۳۲). هر دو ساعت یک بار در شرایط کاملاً استریل، از آنها نمونه برداری و وزن خشک مخمر محاسبه، منحنی رشد مخمر ترسیم و بهترین زمان تلقیح یعنی زمانی که مخمر در اواخر فاز لگاریتمی رشد است، ارزیابی شد.

**محیط کشت تولید:** به منظور تهیه محیط کشت صنعتی، فرمول عمومی مخمر ($C_6H_{10/9}O_{3/06}N_{1/03}$) و درصد ترکیب مواد تشکیل دهنده آن به طور دقیق با نتایج حاصل از آنالیز ملاس مقایسه شد. نتایج حاکی از آن است که افزودن مواد معدنی همچون Ca و Mg ضرورتی ندارد(جدول۱)، لیکن منابع تغذیه ای مناسبی جهت تأمین سطوح مورد نیاز N و P لازم است. از آنجایی که منابع نیتروژن و فسفات محیط کشت نیز کاملاً صنعتی انتخاب شدند، اندازه گیری میزان خلوص آنها برای محاسبات محیط کشت لازم می باشد. منبع نیتروژن مورد استفاده، مطابق صنایع تولیدی، ۷۰ درصد اوره و ۳۰ درصد سولفات آمونیوم، و منبع فسفات نیز دی آمونیوم فسفات صنعتی(DAP) انتخاب شد. از آنجایی که دی آمونیوم فسفات و اوره در دمای اتوکلاو تجزیه می شوند، ابتدا فیلتر و سپس به محیط کشت افزوده شدند. برای محاسبه مقادیر اوره، دی آمونیوم فسفات و سولفات آمونیوم مورد نیاز ابتدا لازم است حداکثر مقدار ممکن مخمر موجود در محیط کشت محاسبه شود تا از نظر منابع نیتروژن و فسفات کمبودی ایجاد نگردد (۱۹).

جهت محاسبات، بالاترین مقدار تلقیح و غلظت قند مورد استفاده در مراحل بعدی (مقدار تلقیح۱۰ درصد (۲۵ ml)) و غلظت قند ملاس با بریکس۲۵ (۱۱۰g/l) به کار برده شد.

محاسبات مربوط به محیط کشت:

بریکس اولیه: ۸۴/۸۵ جدول(۱)

بریکس ثانویه: ۲۵ ۸۴/۸۵ ÷ ۲۵ = ۳/۳۹۴

۲/۳۹۴ ml = ۲/۳۹۴ گرم آب , ۰/۷۰۶ ml =۱ گرم ملاس


www.SID.ir

Archive of SID

۲/۳۹۴ ÷ ۰/۷۰۶ = ۳/۳۹ => x + ۳/۳۹ x = ۲۲۵ ml x = ۵۱/۲۵ ml =>

ملاس مصرفی m = d × v = ۱/۴۱۶ × ۵۱/۲۵ = ۷۲/۵۷ g

درصد وزنی کل قند بر حسب = مقدار کل قند قابل تخمیر ×۱۰۰/ ۵۳/۵ = وزن ملاس مصرفی× قندهای احیا کننده ۷۲/۵۷ = ۳۸/۸۳ g

بررسی منابع نشان می دهد که در بهترین شرایط تخمیر الکلی، به ازای هر گرم قند مصرفی، حدود ۰/۱۵گرم بیومس تولید می شود (۱۵).

حداکثر بیومس تولیدی ۰/۱۵ × ۳۸/۸۳ = ۵/۸۲ g

باتوجه به منحنی رشد مخمر در بخش نتایج مایه تلقیح مورد استفاده نیز دارای بیومسی حدود ۳/۵ g/l می باشد. بنابراین: =>بیومس تلقیحی ۳/۵ g/l ×۰/۰۲۵ l= ۰/۰۸۷۵g

مقدار کل مخمر ۵/۸۲ + ۰/۰۸۷۵ = ۵/۹۱ g

از آنجایی که حدود ۵ درصد خاکستر مخمر، ارتوفسفات و ۹/۸ درصد نیتروژن است، محاسبات صنایع به صورت ذیل می باشد:

– میزان فسفات موردنیازمخمر) = میزانDAP مورد نیاز = (عکس درصد خلوصDAP ) × (میزان فسفات ملاس [(۰/۰۵ × ۵/۹۱) – (۰/۲۸۸)]× (۱۰۰ ÷ ۴۰/۳۵) = ۰/۷۱ g

[میزان نیتروژن مورد نیاز مخمر] = میزان نیتروژن مورد نیاز نیتروژنی که از منبع + میزان نیتروژن موجود در ملاس)]– [(میزان دی آمونیوم فسفات تأمین می شود

= [۹/۸ ÷ ۱۰۰ × ۵/۹۱] – [(۰/۰۰۳ × ۷۲/۵۷) +(۰/۱۸ × ۰/۶)] = ۰/۲۵۴g

از آنجایی که در صنایع تولیدی، نیتروژن مورد نیاز را ۷۰ درصد اوره و ۳۰ درصد سولفات آمونیوم تأمین می کند، بنابراین:

(میزان نیتروژن مورد نیاز × ۷۰ درصد)= اوره مورد نیاز (۴۵/۲ ÷ ۱۰۰)×(۰/۲۵۴ × ۰/۷)=(عکس درصد خلوص)× =۰/۳۹۳g

میزان نیتروژن × ۳۰ درصد ) =سولفات آمونیوم مورد نیاز ( عکس درصد خلوص آن )×(مورد نیاز

= (۰/۳ × ۰/۲۵۴) × (۱۰۰ ÷ ۲۰/۳) = ۰/۳۷۵g

با کمک محاسبات ذکر شده وبا توجه به اینکه این مقادیر برای ۲۵۰ ml محاسبه شده است، به منظور اطمینان از عدم کمبود این منابع، غلظتهای نهایی دی آمونیوم فسفات۳g/l، اوره۲g/lو سولفات آمونیوم ۲g/l به کار برده شد.

**محیط کشت تولید(صنعتی) جهت بهینه سازی مقدار مایه تلقیح:** به این منظور، از محیط کشت تولید پایه که در بخش قبل توضیح داده شد، استفاده گردید. به این ترتیب که ۶ ارلن آماده شده، به ترتیب با غلظتهای ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد از مایه تلقیح مذکور تلقیح شدند و در انکوباتور شیکردار(۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۷۰ rpm) قرار داده شدند.

**محیط کشت تولید(صنعتی) جهت بهینه سازی غلظت قند محیط کشت:** در این مرحله غلظتهای مختلف قند محیط کشت بررسی شد. به این منظور، ارلنهای ۵۰۰ میلی لیتری محتوی ۲۲۵ میلی لیتر ملاس نیشکر با بریکسهای مختلف ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۱۷،۲۰/۵، ۲۲/۵ و ۲۵ با pH= ۴/۵ (۳۱) و اتوکلاو شده(۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه) آماده و محلول افزودنی مطابق محیط کشت تولید افزوده شد (۲۷). سپس بهترین غلظت یعنی v/v ۴ درصد مایه تلقیح افزوده و ارلنها در انکوباتور شیکردار(۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۷۰ rpm) قرار داده شدند.

**محیط کشت تولید(صنعتی) جهت بررسی تأثیر غلظتهای مختلف بیوتین:** به منظورتهیه محیط کشت در این مرحله، از نتایج مراحل قبلی استفاده گردید، به این ترتیب که ۵ ارلن ۵۰۰ میلی لیتری محتوی ۲۲۵ میلی لیتر ملاس نیشکر


www.SID.ir

Archive of SID

با بـریکس ۱۷/۵ بـا pH =۴/۵ (۳۱) و اسـتریل شـده (۱۱۰ درجه سانتی گـراد بـه مـدت ۱۰ دقیقـه) آمـاده و محلـول افزودنـی مشـابه مراحـل قبـل افـزوده شـد. سـپس (v/v ۴ درصد) از مایه تلقیح اضافه شد. محلول بیوتین فیلتـر شـده نیـز بـا غلظتهـای µ۳۰۰g/l، µ۶۰۰g/l، µ۹۰۰g/l، و mg/l ۱/۲ اضافه گردید. یک ارلن نیز به عنوان نمونه شاهد مورد مطالعه قرار گرفت. سپس ارلنها در انکوباتور شـیکردار(۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت rpm ۷۰) قرار داده شدند.

**محیط کشت تولید(صنعتی) جهت بررسی تأثیر غلظتهای مختلف اسید پانتوتنیک:** ۵ ارلن مشابه مرحله قبل تهیه شد با این تفاوت که در این بررسی، به جای بیوتین، پانتوتنـات کلسیم فیلتر شده به ارلنها افزوده شد و غلظتهای زیر مـورد ارزیابی قرار گرفـت. mg/l ۳، mg/l ۶، mg/l ۹ و mg/l ۱۲. یک ارلن نیز به عنوان نمونه شاهد و بـدون اسـیدپانتوتنیک مورد مطالعه قرار گرفت.

## نتایج

بر اساس روشهایی که در بخش روشهای آنالیز ارائه شـده، ملاس، دی آمونیوم فسفات، اوره و سولفات آمونیوم مـورد استفاده، آنالیز و نتایج آنها در جداول ۱و ۲ ارائه شده است.

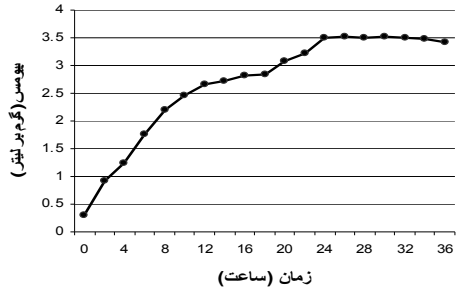
جدول ۱- نتایج آنالیز ملاس نیشکر مورد استفاده

| پارامتر | مقدار | واحد |
|---|---|---|
| رطوبت | ۱۴/۵۳ | % w/w |
| مواد جامد محلول(بریکس) | ۸۴/۸۵ | |
| خاکستر خام | ۱۳/۸۵ | % w/w |
| pH | ۵/۴۴ | |
| کلسیم | ۰/۷۲ | % w/w |
| منیزیم | ۰/۳۲ | % w/w |
| قندهای احیا کننده | ۱۸/۶۳ | % w/w |
| سوکروز | ۳۳/۲۳ | % w/w |
| کل قند بر اساس مواد احیاکننده | ۵۳/۵ | % w/w |
| نیتروژن کل | ۰/۳۳ | % w/w |
| فسفات بر حسب $P_2O_5$ | ۰/۰۱ | % w/w |
| سولفات | ۳/۱۲۴ | % w/w |
| SO۲ | ۸۴ | ppm |
| NO۲ | ۰/۸ | ppm |

جدول ۲- نتایج آنالیز منابع نیتروژن و فسفات محیط کشت صنعتی و میزان خلوص آنها بر اساس درصد وزنی/وزنی

| ماده مورد آنالیز | پارامتر | مقدار(درصد w/w) |
|---|---|---|
| دی آمونیوم فسفات صنعتی | فسفات($P_2O_5$) | ۴۰/۳۵ |
| | نیتروژن | ۱۸/۱ |
| اوره صنعتی | نیتروژن | ۴۵/۲ |
| سولفات آمونیوم صنعتی | نیتروژن | ۲۰/۳ |

**منحنی رشد مخمر:** نتایج شکل ۱ نشان می دهد، زمانی که وزن خشـک(بیومس) مخمرمـورد بررسـی حـدود g/l ۳/۵ باشد(تقریباً ۲۴ ساعت پس از تلقیح به محیط پیش کشت)، مخمر در انتهای فاز لگاریتمی بوده و مناسب برای تلقیح به محیط کشت تولید می باشد(شکل ۱).



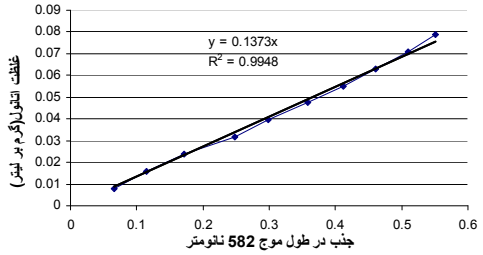

شکل ۱- رشد توده سلولی مخمر(گرم بر لیتر) بر حسب زمان(ساعت) در محیط پیش کشتYeast extract Malt extract در انکوباتور شیکر(دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت rpm ۱۵۰)

**منحنیهای استاندارد:** همان گونه که در بخش روشهای آنالیز توضیح داده شد، منحنیهای استاندارد آنالیز الکل و قند ترسیم و نتایج به دست آمده در شکلهای ۲ و ۳ نمایش

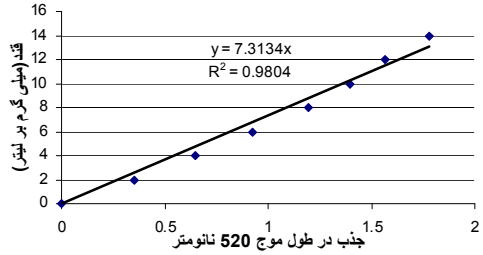

www.SID.ir

Archive of SID

داده شده است.

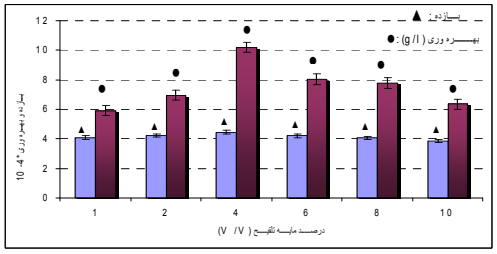



شکل۲- منحنی استاندارد آنالیزغلظت الکل(گرم بر لیتر) بر اساس میزان جذب در طول موج ۵۸۲ نانومتر




شکل۳- منحنی استاندارد غلظت قند محیط کشت(میلی گرم بر لیتر) بر اساس میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومترطبق روش سموگی- نلسون (۷). استاندارد مورد استفاده: محلول گلوکز ۱۰ گرم بر لیتر می باشد.

**بررسی تأثیر مقدار مایه تلقیح و بهینه سازی آن:** در این بررسی، اثر غلظتهای مختلف مایه تلقیح بر روی بازده و بهره وری تولید الکل، مطالعه و نتایج در شکل ۴ نمایش داده شده است. جهت این بررسی تمام شرایط و فاکتورها مشابه، و فقط غلظت مایه تلقیح (X)، تغییر داده شد.

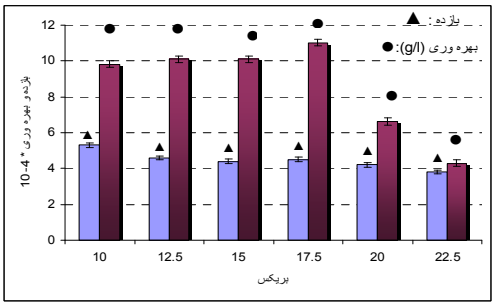



شکل ۴- دیاگرام درصد بازده الکلی و میزان بهره وری تولید اتانول با درصد های مختلف مایه تلقیح(v/v درصد). هر ستون نشان دهنده میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار(standard error) است.

($p<۰,۰۱$)

نتایج شکل ۴ نشان می دهد که با تغییر غلظت مایه تلقیح، تفاوت معنی داری در میزان اتانول تولید شده ایجاد می شود ($P<۰/۰۱$). در مورد سویه مورد بررسی بیشترین بازده، بالاترین کارآیی و بهترین بهره وری در غلظت ۴ درصد مایه تلقیح از محیط پیش کشت YM Broth به محیط کشت تولید حاصل شده است. نمودارهای مربوطه نشان می دهند که غلظتهای بالاتر مایه تلقیح نه تنها راندمان و بهره وری را افزایش نداده اند بلکه کاهش قابل توجهی را نیز باعث شده اند. زیرا از یک طرف میزان اتانول تولید شده به شدت کاهش پیدا کرده است و از طرف دیگر زمان تخمیر افزایش یافته است (شکل ۴).

**بررسی تأثیر مقدار غلظت قند محیط کشت و بهینه سازی آن:** با توجه به اینکه غلظت قند محیط کشت تأثیر بسزایی بر فعالیت تخمیر الکلی را داراست در این آزمایش اثر غلظتهای مختلف قند بر روی بازده وبهره وری تولید الکل بررسی و نتایج حاصله در شکل ۵ نمایش داده شده است.




شکل۵- نمودار درصد بازده الکلی و میزان بهره وری تولید اتانول بر حسب غلظتهای مختلف قند(بریکس). هر ستون نشان دهنده میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار(standard error)است. بهره وری در بریکس های بالاتر از ۱۵($p<۰,۰۰۱$)

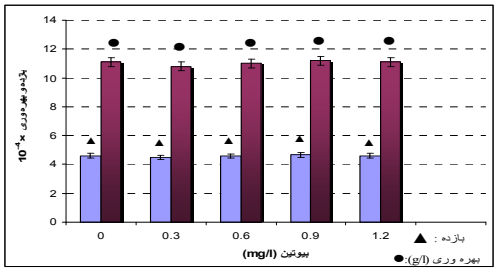
با توجه به شکل ۵ می توان گفت بازده الکلی بین بریکسهای ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ در سطح $P<۰/۰۵$ اختلاف معنی داری ندارد و با افزایش غلظت قند میزان بازده تخمیرتقریباً کاهش یافته است. از طرف دیگر، در بریکس بالاتر از ۱۵، میزان بهره وری به طور معنی داری افزایش یافته است


www.SID.ir

Archive of SID

(P<۰/۰۰۱). با وجود اینکه بازده در بریکس ۱۰ بالاتر از بریکس ۱۷/۵ بوده است ولی چون فاکتور مهم برای بهینه سازی در صنایع، بهره وری وتولید بیشتر محصول می باشد، بهترین غلظت قند محیط کشت برای سویه صنعتی مورد بررسی ۱۱۰g/l (بریکس ۱۷/۵) ارزیابی می شود (شکل ۵).

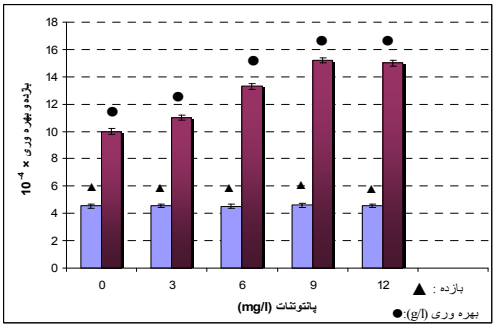
**بررسی تأثیر غلظتهای مختلف بیوتین بر فرآیند تخمیر الکلی:** نمودارهای شکل ۶ نشان می دهد که بیوتین تأثیر قابل ملاحظه ای بر روی هیچ کدام از فاکتورها نداشته و نتایج در سطح P<۰/۰۵ تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد. جالب آنکه بیوتین هیچگونه تأثیری بر زمان تخمیر نیز نداشت.




شکل ۶- درصد بازده الکلی و میزان بهره وری تولید اتانول بر حسب غلظتهای مختلف بیوتین(میلی گرم بر لیتر). هر ستون نشان دهنده میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار(standard error)است.

بنابراین سویه صنعتی مورد بررسی زمانی که منبع کربن محیط کشت آن، ملاس نیشکر انتخاب شود، نیازی به افزودن بیوتین نداشته و اضافه نمودن این ماده گران قیمت تأثیری بر بالا بردن بهره وری تولید نخواهد داشت(شکل ۶).

**بررسی تأثیر غلظتهای مختلف پانتوتنات بر تخمیر الکلی:** شکل ۷ بیانگر آن است که افزودن پانتوتنات حتی درغلظت بالا تأثیر قابل توجهی بر بازده تخمیر نداشت و نتایج در سطح P<۰/۰۵ تفاوت معنی داری نشان نمی دهد. نکته جالب اینکه بهره وری در محیطهای کشت حاوی پانتوتنات افزایش چشمگیری داشته است(P<۰/۰۱).




شکل ۷- درصد بازده الکلی و میزان بهره وری تولید اتانول بر حسب غلظتهای مختلف پانتوتنات(میلی گرم بر لیتر). هر ستون نشان دهنده میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار(standard error) است.
ستون های بهره وری($p<۰,۰۱$)

بنابراین افزودن پانتوتنات کلسیم تأثیری بر میزان اتانول تولیدی و قند مصرفی نداشته ولی زمان تخمیر را تا حد زیادی کاهش داده است که این امر در نهایت منجر به بالا رفتن بهره وری تولید گردیده است(شکل ۷).

## بحث

**آنالیز ملاس نیشکر:** اجزاء محیط کشت باید نیازهای رشد سلولی، تولید متابولیت و از طرف دیگرانرژی مورد نیاز برای بیوسنتز و نگهداری سلول را بر آورده سازند. برای اینکه در فرمول بندی محیط کشت، ضایعات اجزای محیط کشت به حداقل برسد، این رابطه باید به طور کمی بیان شود. دانستن ترکیب اجزای اصلی عنصر میکروارگانیسم که شامل C، H، O، N، S، P و Mg است، برای حل معادله موازنه عنصری لازم است (۱۴).

از طرف دیگر در صنایع تولیدی معمولاً بیشترین بهره وری با پایین ترین قیمت مد نظر است (۱۹). از آنجایی که ملاس، منبع کربنی مناسبی جهت فرآیندهای تخمیری به شمار می آید، آنالیز آن ضروری به نظر می رسد (۲۵).

از طرفی نتایج زچ در سال ۱۹۹۵ و رودز در سال ۱۹۹۶ موید این مطلب است که ملاس دارای ترکیباتی است که می توانند از رشد مخمر جلوگیری و راندمان تخمیر را کاهش دهند (۱۴). دی اکسید گوگرد و دی اکسید نیتروژن


www.SID.ir

Archive of SID

و فلزات سنگین از این دسته‌اند. اندازه‌گیری میزان $SO_2$ و $NO_2$ موجود در ملاس به همین منظور انجام شد. مقایسه مقادیر $SO_2$ و $NO_2$ جدول(۱) با استانداردهای اروپا که حد مجاز را برای $SO_2$، ۲۰۰ppm و برای $NO_2$، ۱۰۰ppm مشخص کرده اند، نشان می دهد که ملاس مورد بررسی از نظر محتویات این مواد قابل قبول می‌باشد (۹).

**بررسی تأثیر مقدار مایه تلقیح در فرآیند تخمیر الکلی به روش صنعتی و تعیین درصد بهینه آن برای سویه صنعتی مورد بررسی:** اطلاعات حاصله از این مطالعه نشان می دهد که میزان بازده، اثر بخشی و بهره وری تخمیر، نتایج متفاوتی را نسبت به سطوح مختلف غلظت مایه تلقیح اولیه بروز می دهد و یک سطح بهینه برای مایه تلقیح اولیه وجود دارد که با توجه به نوع سویه تعیین می گردد. در این مطالعه بهترین غلظت بیومس اولیه، تلقیح ۴ v/v درصد از محیط سنتتیک YM.Broth بوده است.

این در حالی است که در صنایع الکل سازی، افزایش مایه تلقیح به عنوان یک روش جایگزین و اثربخش برای افزایش سرعت تخمیر کاربرد فراوان دارد. مطالعات رابنر و همکاران در سال ۱۹۱۲، رگینالد و همکاران در سال ۱۹۳۵، ناجف و همکاران در سال ۲۰۰۲ و شافیک و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز این مطلب را تأیید می کند (۲۶). این در حالی است که بررسیهای فالکون در سال ۱۹۶۱ حاکی از آن است که افزایش غلظت مایه تلقیح منجربه کاهش بازده و کارآیی تخمیر الکلی می شود. نتایج والتر بورزانی در سال ۲۰۰۶ نیز این مطلب را تأیید می کند (۶). همین فرد در تحقیقات بعدی نشان داد که حتی با وجود کاهش کارآیی، میزان بهره وری(productivity) رابطه مستقیمی با افزایش مایه تلقیحی دارد، زیرا مدت زمان لازم برای رسیدن به حداکثر تولید کاهش می یابد (۴). نتایج وی تأییدی برای نتایج مشابهی است که توسط گوس و تیاگی در سال ۱۹۷۹ عنوان شده بود (۸). نتایج این پژوهش، نیز این موارد را تأیید می کند. در غلظتهای پایین تر مخمر(تلقیحهای v/v ۲ و ۱ درصد)، مقدار قند بیشتری مصرف گردیده است در حالی که غلظت اتانول تولید شده پایین تر بوده است. زمان حداکثر تولید نیز افزایش یافته است، که مؤید نیاز سلولها به زمان برای تکثیر و سازگار شدن با شرایط محیط کشت می باشد. بنابراین درغلظتهای پایین ترمایه تلقیح، بازده ،کارآیی و بهره وری با مقدار بیومس اولیه رابطه مستقیم دارد. از سوی دیگر، نتایج این مطالعه نشان می دهد که برای تلقیح، یک حد آستانه غلظت وجود دارد و سطوح بالاتر تلقیح (۶، ۸ درصد و ۱۰v/v درصد) نه تنها اثر سودمندی نداشته است بلکه باعث کاهش بازده، کارآیی و بهره وری نیز گردیده است. این نتایج با نتایج ساروس و ساتو در سال ۲۰۰۰، شافیک وهاک در سال ۲۰۰۲ و بورزانی در سال ۲۰۰۴ همخوانی دارد (۳، ۶ و ۲۱). بنابراین می توان چنین نتیجه گیری کرد که غلظت بهینه مایه تلقیح برای هر سویه بخصوص باید با مطالعات اختصاصی تعیین شود و اطلاق یک غلظت کلی صحیح نمی باشد و قبل از هر بهره برداری وسیع در صنایع تولیدی، مطالعات عملی برای تعیین غلظت مناسب مایه تلقیح اولیه، سودمند بوده و با انتخاب غلظت بهینه، یک افزایشی در بهره وری تولید اتانول نمایان خواهد شد.

**بررسی تأثیر غلظت قند محیط کشت در فرآیند تخمیر الکلی به روش صنعتی و بهینه سازی آن برای سویه صنعتی مورد بررسی:** نتایج این مطالعه نشان می دهد که غلظت اولیه قند، به عنوان واکنش دهنده اصلی در فرآیند تخمیر الکلی، هم بر غلظت نهایی اتانول و هم بر فعالیت متابولیکی مخمرها اثر مستقیم دارد. در صنایع تولیدی، افزایش غلظت قند یک مزیت می باشد زیرا منجر به تولید اتانول با غلظت نهایی بالاتر می شود که هزینه های تقطیر را کاهش می دهد. این در حالی است که نتایج این مطالعه نشان می دهد که برای غلظت قند، یک حد آستانه غلظت وجود دارد و غلظتهای بالاتر قند(بریکس بالاتر از ۱۷/۵) نه تنها بهره وری بیشتری نداشته است، بلکه تأخیر زمانی قابل


www.SID.ir

Archive of SID

توجهی را باعث شده است که حتی با وجود اتانول تولیدی بالاتر، بهره وری پایین تری را موجب شده است. نتایج بورزانی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز گویای این مطلب می باشد (۴). الورزا در سال ۱۹۷۷ و ویتولو در سال ۱۹۹۵ نیز اظهار داشتند که غلظتهای بالای گلوکز اثر مهار کنندگی وسیعی بر روی فعالیتهای آنزیمی به ویژه اینورتاز دارد (۲۸، ۳۱). نتایج دین در سال ۱۹۹۵ و استامبوک در سال ۱۹۹۹ نیز این نتایج را تأیید می کند (۱۸، ۲۳ و ۲۴).

تران-دین در سال ۲۰۰۰ و دومبک و آتاناسیادیس در سال ۲۰۰۱ نیز نتایج مشابهی به دست آوردند (۲ و ۲۴). مورمنئو(۲۰۰۲) و شافیک (۲۰۰۳) نیز این مسأله را تأیید نمودند (۱۸ و ۲۲).

با توجه به اینکه غلظتهای بالای قند باعث افزایش فشار اسمزی سیستم شده و منجر به اختلال در فعالیت آنزیمها و کاهش سرعت اولیه واکنش قبل از رسیدن محصول به مقدار ماکزیمم می گردد، کاهش بهره وری در غلظتهای بالاتر قابل توجیه است (۲۹). از طرف دیگر زمان مورد نیاز برای سازگار شدن سلولها با شرایط محیط کشت در بریکسهای بالاتر افزایش می یابد که می تواند توجیه قابل قبولی برای افزایش زمان تخمیر و کاهش بیشتر بهره وری باشد (۲).

**بررسی اثر ویتامین بیوتین بر فعالیت تخمیر الکلی:** بررسی نتایج نشان می دهد که بیوتین تأثیر قابل ملاحظه ای بر روی هیچ کدام از فاکتورها نداشته است. مقدار بیوتین لازم برای رشد مخمر، کمتر از ۱ppm بر اساس وزن خشک می باشد. رودز در سال ۱۹۹۶ نشان داد که ملاس نیشکر حاوی ppm ۸/۲-۰/۱ بیوتین می باشد (۲۴). بنابراین می توان توجیه نمود که منبع کربن مورد استفاده از نظر محتوی بیوتین کمبودی نداشته است و مقدار بیوتین لازم برای رشد و متابولیسم مخمر در اختیار آن قرار گرفته است، لذا افزودن این ویتامین تأثیری بر افزایش تولید اتانول و یا کاهش زمان تخمیر نداشته است و میزان بازده، کارآیی و بهره وری تخمیر تغییر معنی داری پیدا نکرده است.

**بررسی اثر ویتامین اسید پانتوتنیک بر فعالیت تخمیر الکلی:** تحقیقات مالونی(۱۹۹۸) نشان داد که مقدار پانتوتنات مورد نیاز مخمر جهت تخمیر بی هوازی، حدود ۱۲۰ppm می باشد. این درحالی است که مطالعات رودز در سال ۱۹۹۶ نشان داد که ملاس نیشکر حاوی حدود ppm ۲۰-۱۲۰ پانتوتنات است (۲۴). آلفنور در سال ۲۰۰۴ نشان داد که با افزودن اسید پانتوتنیک می توان افزایشی را تا حدودv/v ۱۹ درصد برای اتانول نتیجه گرفت (۳). آلفنور اهمیت این ویتامینها را برای بالا بردن سرعت تخمیر الکلی، نقش آنها در بهبود رشد مخمر و افزایش غلظت سلولهای زنده نسبت داد(۳). نتایج نشان می دهد که اسید پانتوتنیک تأثیر بسزایی بر سرعت تخمیر داشته و میزان فعالیت سلولهای مخمری را افزایش داده است ولی بر میزان مصرف قند و تولید اتانول تأثیری نداشته است. در حقیقت نتایج به دست آمده، با نتایج گوتیرز در سال ۱۹۹۳ و آلفنور در سال ۲۰۰۴ در رابطه با بالا رفتن بهره وری تولید همخوانی دارد (۳ و ۹).

## منابع


پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اصفهان- ۱۳۸۴- صفحات ۴۹-۴۵.

۱- حمیدی مطلق، ر. (۱۳۸۴). مصرف قندهای زایلوز و آرابینوز به وسیله مخمرها و کاربردهای صنعتی آنها.

2- Athanasiadis I., Boscoll D., Kanellaki M., Kantinas A.A. (2001). Effect of carbohydrate substrate on fermentation by kefir yeast supported on delignified cellulosic materials. 49 (2): 658-663.

3- Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillouet S., Uribelarrea J.L., Goma G., Benbadis L. (2004). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding



www.SID.ir

Archive of SID

strategy during fed-batch process. Appl. Microbiol. Biotechnol., 60 (2): 67-72.

4- Borzani W. (2004). Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. Biotechnol lett., 26 (4): 1953-1956.

5- Borzani W. and etal. (2006). Influence of the reactor shape on the kinetics of ethanol production in laboratory-scale batch fermentation tests carried out in unstirred vessels. Braz. Arch. Biol. Technol. 49: no.3 Curitiba.

6- Borzani W. (2006). Batch ethanol fermentation: the correlation between the fermentation efficiency and the biomass initial concentration depends on what is considered as produced ethanol. Braz.J.Micro. 37: 87-89.

7- Ceccato-Antonini S.R., Tosta C.D., Claudia da S.A. (2004). Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. Braz. Arch. Biol. Technol. 47 (1): 13-19.

8- Green F., clausen C.A., Highley T.L. (1989). Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing sugar assay to a microassay using microtiter plates. Anal. Bioch. 182: 197-199.

9- Gutierrez L.E. (1993). Effect of some vitamins and micronutrient deficiencies on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*. Sci. Agric. Piracicaba., 50 (3): 484-489.

10- Hopkins R.H. and Roberts R.H. (1985). The kinetics of alcoholic fermentation of sugars by brewer's yeast. I. Effect of concentrations of yeast and sugar. Department of industrial fermentation, University of Birmingham.

11- Hygiene book. (2005). European Patent Application & Standard methods. Vogelbusch GmbH, Vienna, Austria.

12- International Commission For Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). (1994). The determination of pH by a direct method. GS1/2/3/4/7/8-23.

13- International Commission For Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). (2003). The determination of reducing sugar in cane molasses and certain refined syrups by the Lane & Eynon constant volume procedure. GS4/3-3.

14- International Commission For Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). (1994). The determination of apparent sucrose in molasses by a double polarization method. GS4/7-1.

15- International Commission For Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). (1994). The determination of dry substance and moisture in molasses by vacuum oven drying on sand. GS4/7-11.

16- Kelsall D.R., Lyons T.P. (1999). Management of fermentations in production of alcohol: moving toward 23% ethanol. The alcohol textbook, A refrence for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. 3rd edition. Nottingham University Press., pp: 25-38

17- Knappe J., Lynen F. (1994). Carbon dioxide transfer by biotin in enzymes. Colloq. Ges. Physiol. Chem., 14: 265-274.

18- Kompala D.S. (1996). Yeast fermentation. University of Colorado-Boulder. Chemical Engineering Department.

19- Licht F. O. (2005). Brazil's Ethanol Industry Enters the Fast Lane. World Ethanol and Biofuels Report, 3 (22).

20- lim J.K. (2002). Fermentation of Ethanol, Regional Symposium on Chemical Engineering.

21- Moat A.G. and Lichstein H.C. (2004). The role of biotin in carbohydrate metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch.Biochim.Biophys., 48: 300-309.

22- Mormeneo S., Sentandreu R. (2001). Regulation of invertase synthesis by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 168 :14-18.

23- Murtagh. J.E. Molasses as a feedstock for alcohol production. The Alcohol Textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries by Jacques, Lyons and Kelsall. Nottingham University Press Third edition 1999. Chapter 6. pp: 89-96.

24- Rein M., Peter.A., (2004) "Feasibility Study on the Production of Fuel Alcohol from Louisiana Molasses," The Sugar Bulletin, Vol. 82, No. 12. pp. 13-17.

25- Rhodes A., Fletcher.D.L. (1996). Principles of industrial microbiology. Pergamon Press, Oxford.

26- Shafiq K., Ali S., Ehsan A., Haq I. (2003). Optimization of assay conditions and inuculum size with knetic analysis for biosynthesis of invertase by *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5. J. Biolog. Sci., 3 (2): 191-196.

27- Shafiq K., Ali S., Haq I. (2003). Time course study for yeast invertase production by submerged fermentetion. J. Biolog. Sci., 3 (11): 984-988.


www.SID.ir

Archive of SID

28- Stambuk B.U. (1999). A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α-glucosidase. Biochem. Edu. 27 (3): 177-180.

29- Tran-Dinh S.; Courtois A.; Wietzerbin J.; Bouet F. and Herve M. (2000). Reciprocal effects of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose and glucose on their metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* studied by multi-nuclear NMR spectroscopy. Fra.J.Biochimie 77: 233-239.

30- USDA., OEPNU., OCE., LSU. (2006). The Economic Feasibility of Ethanol Production from Sugar in the United States. This report was done through a cooperative agreement between U.S. Department of Agriculture., Office of Energy Policy and New Uses., Office of the Chief Economist., and Louisiana State University (LSU).

31- Vitolo M., Duranti M.A., Pellegrim M.B. (1995). Effect of pH, aeration and sucrode feeding on the invertase activity of intact *S.cerevisiae* cells grown in sugar cane blackstrap molasses. J.Ind. Microbiol. 15 (2): 75-79.

32- Zetic V.G., Stehlik-Tomas V., Grba S., Lutilsky L., Kozlek D. (2001). Chromium uptake by Saccharomyces cerevisiae and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. Ind. J. Biosci. 26: 217-223.

# Evaluation of inoculum's size, sugar concentration & adding of vitamins on industrial process of alcoholic fermentation in Lab scale

**Sinaei N.[1], Roayaee Ardekani M.[1] and Fouladi J.[2]**

**[1] Biology Dept., Faculty of Science, Chamran University, Ahwaz, I.R. of IRAN**

**[2] Biology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of IRAN**

## Abstract

At present bio-ethanol is considered as being one of the most important biotechnology products. In the world today, among which *Saccharomyces cerevisiae* yeast has the greatest usage in this industry. Moreover molasses is considered as an adequate carbon source for producing Ethanol in Iran due to its low cost and abundance, in addition to its large amount of sugar. The purpose of the study is first the optimization of inoculum's size and subsequently the optimization of sugar concentration in the crop yield. With due regards to the importance of vitamins, the effect of two vitamins, Biotin & Pentatonic acid, was also studied. Initially sugarcane molasses was analyzed and based on the chemical compounds of the analyzed molasses and the general formulation of yeast, the compound of the culture media as per productive industries was calculated. Following that various percentages of inoculum were added. Ultimately the quantity of the yield and productivity were computed and analyzed using statistical methods. The results showed that inoculum's size of 4% v/v had the highest productivity of Ethanol. In addition various brix of molasses were studied. The results showed that 17/5 brix (with a sugar concentration of 110 g/l) had the highest productivity of Ethanol. Furthermore it was seen that the addition of Biotin to the intended culture media had a significant effect on the productivity of fermentation, whereas Pentatonic acid leads to decreasing in fermentation time and consequently an increase in productivity.

**Keywords:** Optimization, inoculum, sugar concentration, alcoholic fermentation, Biotin, Pentatonic acid.



www.SID.ir