مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره دوم (پیاپی ۳۱) تابستان ۱۳۹۶
صفحات ۱۲۲-۱۱۴

Original Article

تولید بیواتانول توسط *ساکارومایسس سرویزیه* بومی تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان در شرایط تنش فورفورال

مهرو آهوی سیمین[۱]، آزاده توفیقی*[۲]، محمد حسین-آرش اسدی راد[۲]

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان،
[۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان.

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مشکلات مهم در تولید بیواتانول، تشکیل ترکیبات سمی مانند فورفورال و هیدروکسی متیل فورفورال از آبکافت اسیدی مواد لیگنوسلولزی است. تثبیت سلولی، یکی از روش های مناسب استفاده مجدد و حفاظت میکروارگانیسم ها در شرایط تنش های فیزیکی-شیمیایی محیطی می باشد. در این مطالعه اثر حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان با هدف تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* برای افزایش بازده تولید اتانول در حضور فورفورال مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این پژوهش سلول های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان تثبیت شد. سپس فورفورال به میزان ۳ گرم بر لیتر به عنوان عامل تنش زا به محیط کشت تخمیر اضافه گردید. میزان قند مصرفی به وسیله کیت سنجش گلوکز و میزان اتانول تولید شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که بازده تولید اتانول توسط مخمر بومی تثبیت نشده در محیط کشت حاوی ۳ گرم بر لیتر فورفورال نسبت به محیط فاقد فورفورال (شاهد)، به میزان ۲۱ درصد کاهش داشته است. از سویی دیگر استفاده از مخمر تثبیت شده در آلژینات-کیتوزان در حضور فورفورال موجب افزایش راندمان تولید به میزان ٦/٩ درصد و ١٤/٤ درصد به ترتیب در مقایسه با مخمر تثبیت شده در آلژینات و مخمر آزاد می گردد.

نتیجه گیری: حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان می تواند به عنوان یک حامل مناسب به منظور تثبیت و حفاظت سلول مخمر در برابر تنش های موجود در محیط و در نتیجه افزایش بازده تولید اتانول از ضایعات لیگنوسلولزی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آلژینات، بیواتانول، تثبیت، فورفورال، کیتوزان.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹٦ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹٦

مقدمه

سوختن منابع فسیلی می تواند منجر به آلودگی های زیست محیطی و پدیده گرم شدن کره زمین و عواقب ناشی از آن شود (۱ و ۲). از سویی دیگر مصرف روز افزون انرژی، کاهش منابع سوخت های فسیلی، رشد جمعیت جهان و احتمال افزایش قیمت سوخت در آینده، جهان را به سمت جایگزینی منابع پاک و تجدیدپذیر نموده است (۳). در این راستا، بیواتانول حاصل از پسماندهایی مانند ترکیبات لیگنوسلولزی کاندید مناسبی برای جایگزینی سوخت های فسیلی محسوب می شوند (٤ و ٥). تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی به منظور قابل استفاده شدن آن ها توسط میکروارگانیسم های تولید کننده بیواتانول امری ضروری به نظر می رسد. آبکافت اسیدی یکی از ساده ترین و به صرفه ترین روش های تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی به حساب می آید. در این روش علاوه بر فوایدی مانند تولید مونومرهای ٥ و ٦ کربنه قندی از پلی مر لیگنوسلولزی،

*) آدرس برای مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۲٤۳۳٤۲۱۰۳۰ پست الکترونیک: azadeh.tofighi@iauz.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مشکلاتی مانند احیای فراتر و تولید ترکیبات سمی نیز دیده می شود (٦ و ٧). فورفورال، ترکیبی آلدئیدی و سمی با اثر مهارکنندگی بر آنزیم هایی مانند الکل دهیدروژناز و عملکرد بهینه میکروارگانیسم های مسئول در فرآیند تخمیر می باشد (٨).

مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) یکی از مهم ترین و سازگارترین میکروارگانیسم ها در فرآیند تخمیر و تولید صنعتی بیواتانول به حساب می آید (٩ و ١٠). استفاده از سلول های کپسوله شده در فرآیندهای تخمیری و صنعتی در چند دهه ی اخیر به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. از این پژوهش ها می توان به تحقیق رازموفسکی (Razmovski) و وکورویک (Vucurovic) در سال ٢٠١٢ و مشهدی کریم (Mashhadi Karim) و همکاران در سال ٢٠١١ اشاره نمود که به ترتیب اثر حامل آلی پودر ساقه ذرت و آلژینات سدیم در تولید بیواتانول و پروتئاز قلیایی را مورد بررسی قرار داده اند (٨ و ١١).

نتایج نشان داده است که استفاده از سلول های کپسوله شده مزایای بسیاری نسبت به سلول های آزاد (تثبیت نشده) داشته است. از این میان می توان به سهولت نسبی جداسازی محصول، بهره وری حجمی بالا و کاهش حساسیت سلول ها به آلودگی ثانویه اشاره نمود. از میان روش های تثبیت سلول، روش به دام انداختن یکی از رایج ترین روش ها به حساب می آید. در این روش سلول ها در فضای داخل شبکه پلی مری دارای غشای نیمه تراوا محصور می شوند. در چنین شبکه ای اجازه ورود و خروج به مواد غذایی و زائد داده می شود. در حالی که از خروج سلول های به دام افتاده جلوگیری می گردد. در فرآیند تثبیت سلولی هیچ اتصال فیزیکی بین سلول و حامل دیده نمی شود (١٢). آلژینات حاملی آلی، متشکل از واحدهای مانورونیک اسید و گلوکورونیک اسید است. آلژینات به دلیل فراوانی، سازگاری زیستی بسیار خوب و ویژگی های زیست تخریب پذیری، یکی از مناسب ترین مواد زیستی در فرآیند تثبیت سلول به حساب می آید (١٢).

کیتوزان نیز شامل کوپلی مرهای گلوکز آمین و N–استیل گلوکز آمین است و همانند آلژینات ترکیبی آلی و زیست تخریب پذیر می باشد. کیتوزان در صنایع مختلف نظیر صنایع غذایی، نساجی، کشاورزی و غیره به کار گرفته شده است (١٣).

با توجه به اهمیت کاهش هزینه ها و افزایش راندمان تولید بیواتانول در صنعت، هدف از تحقیق حاضر ارزیابی کارایی حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان در افزایش بازده تولید بیواتانول از جدایه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* تثبیت شده در شرایط تنش فورفورال بود.

مواد و روش ها

الف) میکروارگانیسم مورد استفاده: در تحقیق حاضر جدایه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 (١٤) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (Persian Type Culture Collection; PTCC) تهیه شد و به عنوان سویه تولید کننده بیواتانول مورد استفاده قرار گرفت.

ب) محیط های کشت مورد استفاده: محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) (بر حسب گرم بر لیتر: سیب زمینی ٣٠٠، گلوکز ٣٠ و آگار ١٥)، به منظور کشت خطی و نگه داری کوتاه مدت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* استفاده شد. محیط پیش کشت حاوی گلوکز ٣٠ ، عصاره مخمر ١٠، فسفات آمونیوم ٠/٦ و سولفات آمونیوم ٠/١٢ (گرم بر لیتر) بود. محیط کشت تخمیر نیز با استفاده از گلوکز ١٨٠، عصاره مخمر ١٠، فسفات آمونیوم ٠/٦ و سولفات آمونیوم ٠/١٢ (گرم بر لیتر)، تهیه شد. محیط های پیش کشت و تخمیر با استفاده از اسید کلریدریک ٠/١ مولار در pH ٥ تنظیم شدند (٧). تمامی محیط های کشت و مواد مورد استفاده، از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

ج) تلقیح مخمر: یک لوپ پر از کشت ٢٤ ساعته مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط PDA جهت تلقیح محیط پیش کشت استفاده شد. سپس در دمای ٣٥ درجه سلیسیوس و ١٥٠ دور در دقیقه به مدت ٢٠ ساعت در انکوباتور شیکردار (Clim-O-Shake, Switzerland) گرما گذاری گردید (٧).

د) تهیه حامل های تثبیت سلولی مخمر: در این مطالعه از

Archive of SID
www.SID.ir

حامل های آلژینات و کیتوزان به منظور مقاوم سازی و تثبیت مخمر استفاده شد. حامل آلژینات از حل شدن ۳ گرم پودر آلژینات سدیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر (۱۵) و حامل کیتوزان نیز از ۳ گرم پودر کیتوزان در اسید استیک ۲ درصد (وزن/حجم) به دست آمد (۱۶). عوامل مورد نظر هر یک به صورت جداگانه تهیه و با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلیسیوس طی ۱۵ دقیقه سترون شدند.

ه) تثبیت سلول های مخمر در گویچه های آلژینات-کیتوزان: محیط پیش کشت ۲۰ ساعته، در ۲۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول های مخمر به تعداد $۶/۱۶\times۱۰^{۷}$ در واحد میلی لیتر، با ۲ میلی لیتر از محلول آلژینات سدیم ۳ درصد (وزن/حجم) استریل مخلوط گردید. مخلوط همگن به دست آمده در شرایط استریل به سرنگ استریل ۵ میلی لیتری انتقال داده شد. سپس سوسپانسیون به دست آمده از ارتفاع ۱۵ سانتی متری به بشر حاوی کلرید کلسیم ۰/۳ مولار استریل در حال هم خوردن بر روی هم زن مغناطیسی چکانده شد. قطره های حاوی آلژینات سدیم، پس از قرار گرفتن درون بشر حاوی کلرید کلسیم، به گویچه های آلژینات کلسیم تبدیل شدند. گویچه های آلژینات کلسیم به مدت ۱ ساعت درون یخچال در دمای ٤ درجه سلیسیوس برای تکمیل فرآیند، نگه داری شدند. سپس گویچه های آلژینات با آب مقطر استریل شسته، و به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول در حال دوران (هم خوردن) کیتوزان منتقل شدند (۱۶).

و) فرآیند تخمیر: فورفورال تازه تقطیر شده در شرایط استریل به میزان ۳ گرم بر لیتر به ۱۸ میلی لیتر محیط کشت تخمیر افزوده و همگن شد. ۵۰ عدد گویچه حاوی $۶/۱۶\times۱۰^{۷}$ سلول مخمر در واحد میلی لیتر، به هر یک از ویال های حاوی محیط کشت تخمیر و فورفورال، منتقل شد. درپوش پلاستیکی برای بستن سر ویال ها استفاده شد. بر روی هر یک از درپوش ها یک سرنگ استریل گذاشته شد تا گاز تولید شده در فرآیند تخمیر را به بیرون هدایت نماید. سپس نمونه ها در گرمخانه ۳۵ درجه سلیسیوس، به مدت ٤٨ ساعت درشرایط بی هوازی قرار گرفتند (١٤ و ١٧). هر یک از آزمون ها، در سه تکرار انجام شد.

ز) آنالیز دستگاهی: میزان گلوکز مصرفی و اتانول تولید شده در محیط کشت تخمیر پس از گذشت زمان انکوباسیون، مورد سنجش قرار گرفتند. کیت آنزیمی سنجش گلوکز (Chimenzyme, Iran)، به منظور تعیین میزان قند استفاده شد. در این راستا ۱۰ میکرولیتر از فاز مایع نمونه به لوله آزمایش انتقال داده شد و ۱ میلی لیتر از معرف آنزیمی کیت سنجش گلوکز به آن اضافه گردید. بر اساس میزان گلوکز موجود در محیط کشت، تغییرات رنگ از بی رنگ به قرمز مشاهده گردید. پس از آن جذب نوری نمونه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu-UV-160A, Japan)، در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت و با استفاده از نمودار استاندارد، میزان گلوکز موجود در واحد گرم بر لیتر گزارش گردید (١٤). دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Agilent (آمریکا)، با استفاده از ستون (C18 RP-ODC)، فسفریک اسید ۰/۱ مولار در pH ۲/۵ به عنوان فاز متحرک، طول موج ٢٥٤ نانومتر و سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر بر دقیقه جهت سنجش کمی اتانول، پس از گذشت زمان تخمیر (٤٨ ساعت) استفاده شد (۱۸). میزان قند مصرفی (گرم بر لیتر) و اتانول تولید شده (حجم به حجم) طبق معادله ۱، جهت محاسبه بازده تولید اتانول، استفاده شد (۱۹).

معادله ۱: درصد بازده تولید اتانول= $\frac{[\text{اتانول}](\frac{V}{V})}{[\text{قندمصرف}](\frac{g}{L})}\times ۱۰۰$

ح) تجزیه و تحلیل آماری: از نرم افزار مایکروسافت اکسل ۲۰۰۷ برای رسم نمودارها، میانگین داده ها و تعیین میزان خطا در سه تکرار استفاده گردید.

یافته ها

در این مطالعه، میزان قند مصرفی (گرم بر لیتر)، اتانول تولید شده (گرم بر لیتر) و بازده تولید اتانول (درصد) در محیط های کشت فاقد فورفورال (به عنوان نمونه های شاهد) و همچنین حاوی ۳ گرم بر لیتر فورفورال، پس از گذشت ٤٨ ساعت از زمان تخمیر، مورد سنجش قرار گرفت. نمونه های مورد بررسی شامل: نمونه مخمر آزاد (تثبیت نشده)، مخمر تثبیت شده در

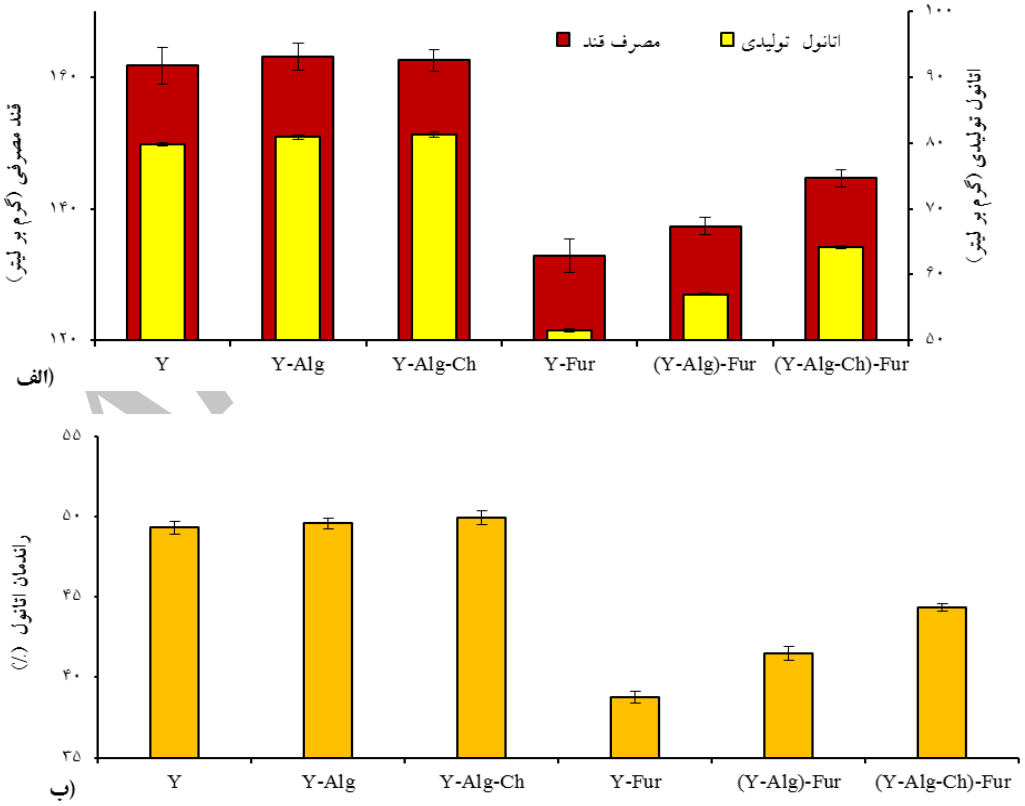
Archive of SID

www.SID.ir

حامل های آلژینات (Alg) و کیتوزان (Ch)، هر یک به صورت مجزا و ترکیبی بودند. میانگین میزان قند مصرف شده (گرم بر لیتر)، اتانول تولید شده (گرم بر لیتر) و درصد بازده اتانول تولیدی، توسط نمونه های مورد آزمایش تحت تنش ناشی از ۳ گرم بر لیتر فورفورال و فاقد آن (نمونه های شاهد)، پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان کشت تخمیر در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس، در نمودار ۱ نشان داده شده است.

همان گونه که در نمودار ۱ (الف و ب) مشاهده می شود، میزان مصرف قند (گرم بر لیتر)، تولید اتانول (گرم بر لیتر) و درصد راندمان تولید اتانول در محیط های کشت در تنش ماده سمی فورفورال، نسبت به نمونه های کشت شده در محیط کشت فاقد فورفورال (شاهد)، کاهش چشم گیری داشته است. تولید اتانول (نمودار ۱-الف) در نمونه های حاوی مخمرهای تثبیت نشده، تثبیت شده در آلژینات و تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان در محیط کشت فاقد فورفورال (نمونه های شاهد) به ترتیب با اختلافی ناچیز، معادل ۷۹/۷۷، ۸۰/۸۶ و ۸۱/۲ گرم بر لیتر به دست آمد. کاهش تولید اتانول با افزودن فورفورال به محیط کشت تخمیر، مشاهده شد به گونه ای که کم ترین میزان تولید اتانول (۵۱/۴۹ گرم بر لیتر)، از فعالیت مخمر آزاد در تنش فورفورال به دست آمد. استفاده از حامل آلی آلژینات در فرآیند تثبیت، موجب افزایش تولید اتانول شد و میزان تولید اتانول تا میزان ۵۶/۹۸ گرم بر لیتر افزایش یافت.

بیش ترین میزان تولید اتانول در محیط در تنش ۳ گرم بر لیتر فورفورال پس از گذشت ۴۸ ساعت، به میزان ٦٤/١٤ گرم بر لیتر، برای مخمرهای تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، گزارش شد. از سویی دیگر، پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تخمیر، بیش ترین میزان قند مصرف شده (نمودار ۱-الف) در محیط کشت فاقد فورفورال با میزان تقریبی



نمودار ۱: الف) میانگین میزان قند مصرف شده (گرم بر لیتر) و اتانول تولید شده و ب) درصد بازده اتانول تولیدی، توسط مخمر تثبیت شده در حامل های آلی مختلف در تنش ۳ گرم بر لیتر فورفورال طی ۴۸ ساعت تخمیر بی هوازی. نمونه های شاهد در محیط کشت فاقد فورفورال (Y: مخمر تثبیت نشده (آزاد)؛ Y-Alg: مخمر تثبیت شده در آلژینات؛ Alg-Ch-Y: مخمر تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان) و نمونه های مورد آزمایش در تنش فورفورال (Y-Fur: مخمر تثبیت نشده؛ (Y-Alg)-Fur: مخمر تثبیت شده در آلژینات؛ (Y-Alg-Ch)-Fur: مخمر تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان.

www.SID.ir

۱۶۲ گرم بر لیتر، مربوط به نمونه های شاهد حاوی مخمر آزاد، مخمر تثبیت شده در حامل آلژینات و حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان بود. با افزایش فورفورال به محیط کشت تخمیر، میزان مصرف قند توسط مخمرهای مورد آزمایش نیز کاهش یافت. کم ترین میزان مصرف قند در مخمرهای آزاد (۱۳۲/۸ گرم بر لیتر) مشاهده شد. با تثبیت سلول های مخمر در حامل منفرد آلژینات و حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، میزان مصرف قند به ترتیب به ۱۳۷/۳۶ و ۱۴۴/۶۳ گرم بر لیتر افزایش یافت. همچنین، نتایج حاصل از میزان درصد بازده بیواتانول تولید شده (نمودار ۱-ب) حاکی از کاهش بازده تولید در حضور فورفورال بود به گونه ای که کم ترین میزان بازده (۳۸/۷۶ درصد)، از نمونه حاوی کشت مخمر آزاد در حضور فورفورال به دست آمد. با پوشش دار نمودن و تثبیت سلول های مخمر با حامل آلژینات و حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، میزان درصد بازده تولید اتانول به ترتیب به میزان ۴۱/۴۸ درصد و ۴۴/۳۵ درصد، افزایش یافت. اما در محیط کشت فاقد فورفورال (شاهد) حاوی مخمر آزاد، مخمر تثبیت شده در آلژینات و تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، با میزان تقریبی ۴۹ درصد، بالاترین میزان راندمان تولید اتانول گزارش شد.

بحث

در مطالعه حاضر از حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان جهت مقاوم سازی جدایه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 در حضور ماده سمی فورفورال استفاده شد. ارزیابی نتایج حاصل از تولید اتانول، مصرف قند و بازده تولید اتانول پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تخمیر نشان داد که فعالیت جدایه بومی در محیط فاقد ماده سمی فورفورال (نمونه های شاهد) در شرایط ایده آل قرار داشت. کاهش شدید فعالیت سلول های جدایه مخمری با افزودن میزان ۳ گرم بر لیتر فورفورال تازه تقطیر شده به محیط کشت مشاهده شد.

با توجه به اهمیت تولید بیواتانول از ضایعات لیگنوسلولزی به عنوان سوختی تجدیدپذیر، پاک و مقرون به صرفه، افزایش بازده تولید، امری ضروری به نظر می رسد. مطالعات مختلفی بر روی استفاده از منابع اولیه ارزان قیمت، مقاوم سازی میکروارگانیسم های مسئول فرآیند تخمیر و کاهش هزینه تولید بیواتانول صورت گرفته است (۷، ۸ و ۱۴). اما تاکنون نتیجه مطلوب حاصل نشده و نیازمند مطالعات تکمیلی است.

جدایه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 جدایه ای مقاوم به حرارت (ترموتولرانت) و دارای ویژگی های منحصر به فرد مانند توانایی تولید فلوکول در شرایط سخت تخمیر می باشد (۱۴). اما تا کنون مقاوم سازی آن با استفاده از حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان و ارزیابی امکان افزایش بازده تولید اتانول انجام نشده است. در مطالعه حاضر بررسی فعالیت جدایه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان در حضور ماده سمی فورفورال نشان دهنده تأثیر مثبت حامل مورد استفاده بر مقاوم سازی جدایه مورد نظر بوده است. امروزه استفاده از ضایعات و پسماندهای لیگنوسلولزی، به ویژه در تولید سوخت بیواتانول با هدف کاهش هزینه تولید و همگانی نمودن استفاده از آن، مورد توجه جهانی قرار گرفته است. در ساختار شیمیایی اتانول ۳۵ درصد اکسیژن وجود دارد، به این ترتیب می توان از بیواتانول به عنوان مکمل و بالا برنده عدد اکتان در سوخت های فسیلی نیز استفاده نمود. استفاده از مواد لیگنوسلولزی ارزان قیمت مانند پسماندها و ضایعات کشاورزی می تواند در کاهش هزینه تولید صنعتی بیواتانول نقش موثری بازی نماید (۴ و ۵).

توفیقی (Tofighi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر مهاری غلظت های بالای فورفورال را بر سویه های صنعتی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*، مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که در غلظت های ۴، ۵ و ۶ گرم بر لیتر فورفورال، در شرایط یکسان، به ترتیب ۶۰، ۵۱ و ۳۳ درصد از گلوکز موجود در محیط توسط مخمر مورد مصرف قرار گرفته است. در حالی که در محیط کشت بدون فورفورال (شاهد) میزان مصرف گلوکز ۹۰ درصد گزارش شده است. همچنین با افزایش غلظت فورفورال از ۴ به ۶ گرم بر لیتر، به ترتیب کاهشی معادل ۵۲/۶۳ درصد و ۸۴/۲ درصد نسبت به نمونه شاهد گزارش شده است

Archive of SID
www.SID.ir

(۷). حاتمی منش (Hatami Manesh) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ تاثیر فورفورال بر مصرف گلوکز توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و بازده تولید اتانول را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق یاد شده، با افزایش میزان فورفورال از صفر (شاهد) به ۲ گرم بر لیتر، مصرف گلوکز به میزان ۲۵/۱۲ درصد و بازده تولید اتانول نیز به میزان ۱۶/٤ درصد نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت (۲۰).

در تحقیق حاضر، از ۳ گرم بر لیتر فورفورال در محیط کشت تخمیر استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان مصرف قند و تولید اتانول توسط سویه مخمر بومی مورد استفاده پس از گذشت ٤۸ ساعت از زمان تخمیر، به ترتیب به میزان ۱۷ درصد و ۲۵/٤ درصد نسبت به نمونه شاهد (محیط فاقد فورفورال) کاهش داشته است. نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از تحقیق توفیقی و همکاران (۷) و حاتمی منش و همکاران (۲۰) هم خوانی دارد و نشان دهنده تأثیر منفی و بازدارندگی غلظت های فورفورال بر رشد مخمر و تولید اتانول است. با این وجود مخمر بومی مورد مطالعه مقاومت نسبی بالاتری را در حضور ماده سمی فورفورال از خود نشان داد که حاکی از توان ذاتی بالاتر جدایه بومی مورد مطالعه بود. فرآیند تثبیت سلول در شبکه های پلی مری مختلف، امروزه در صنعت به عنوان روشی مناسب برای استفاده مجدد میکروارگانیسم ها و حفاظت آن ها از اثرات فیزیکی و شیمیایی نامطلوب محیط کاربرد دارد. در مراحل آماده سازی، سلول به محلول پلی مری اضافه شده و یک عامل شیمیایی و یا دما باعث شروع پلیمریزاسیون می شود و به این ترتیب شبکه پلی مری به صورت ژل سلول ها را می پوشاند (۱۱ و ۱۲).

امروزه به دام اندازی یا ریزپوشانی در پلی مری مانند آلژینات کلسیم یکی از فراوان ترین روش هایی است که برای تثبیت سلول ها مورد استفاده قرار گرفته است. در صنایع مختلف به ویژه صنایع داروسازی و لوازم پزشکی، غذایی، تولید کاغذ و منسوجات و حتی حذف آلودگی فنل از آب، فرآیند تثبیت آلژیناتی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲).

دووارت (Duarte) و همکاران در سال ۲۰۱۳ تأثیر تثبیت سلولی گویچه های آلژینات کلسیم-کیتوزان را در تخمیر الکلی مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* ابتدا در حامل آلی آلژینات کلسیم تثبیت گردید و سپس با کیتوزان پوشش داده شد. نمونه های تثبیت شده در شرایط تخمیر گلوکز قرار گرفتند. میزان تولید اتانول آن ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان راندمان تولید اتانول سلول های تثبیت شده در آلژینات و آلژینات-کیتوزان نسبت به نمونه های تثبیت نشده به ترتیب به میزان ۱٦/٦ درصد و ۱۹/۲ کاهش داشته است. با این وجود زنده مانی و مقاومت سلول ها طی ۸ کشت پیوسته (هر کشت ۱۰ ساعت) نسبت به نمونه های شاهد افزایش یافته است (۲۱).

وستمن (Westman) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، تجزیه و تحلیل پروتئومیکس *ساکارومایسس سرویزیه* تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان را مورد بررسی قرار دادند. آن ها به این نتیجه رسیدند که مقاومت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه CBS8066 تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان نسبت به سلول تثبیت نشده (سلول آزاد) در برابر درجه حرارت بالا و مهارکننده فورفورال از مقاومت بالاتری برخوردار بوده است. نتایج نشان داد که تنظیم پاسخ های مرتبط با پروتئین های سرکوب گر در پاسخ به تنش ها طی تثبیت سلولی افزایش یافته است. از سویی دیگر، به دلیل محدودیت انتقال مواد در توده گویچه آلژیناتی، فرآیند تثبیت سلولی می تواند منجر به کاهش غذارسانی به سلول های عمقی تر (نزدیک به مرکز گویچه) شود. بنابراین تثبیت سلولی در موارد خاصی همچون افزایش تحمل سلول در برابر تنش ها و یا مهارکنندگان محیطی می تواند سودمند باشد (۲۲).

در تحقیق حاضر نیز از ۳ گرم بر لیتر فورفورال به عنوان عامل تنش زا و حامل های آلی آلژینات و کیتوزان در حالت های ترکیبی و منفرد، به عنوان عامل محافظت کننده مخمر در برابر عوامل نامساعد محیطی استفاده شد. نتایج نشان داد که در محیط تنش فورفورال، میزان قند مصرفی توسط مخمر تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، نسبت به مخمرهای تثبیت شده در آلژینات و مخمر آزاد به ترتیب به میزان ۵ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

و ۸/۹ درصد افزایش داشته است. از سویی دیگر، تأثیر منفی فورفورال بر تولید اتانول حاصل از جدایه بومی*ساکارومایسس سرویزیه* پس از گذشت ٤٨ ساعت از زمان تخمیر در حضور فورفورال، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که میزان اتانول تولید شده توسط جدایه بومی تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، نسبت به نمونه های تثبیت شده در حامل منفرد آلژینات و نمونه مخمر آزاد به ترتیب افزایشی معادل ١٢/٦ درصد و ٢٤/٦ درصد را تجربه کرده است. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با گزارش تحقیق دووارت و همکاران مغایرت داشت که دلیل آن را می توان در مقاومت ذاتی مخمر بومی مورد استفاده در تحقیق حاضر و همچنین نوع تنش شیمیایی استفاده شده بیان نمود (٢١).

از سویی دیگر نتایج حاصل از تحقیق حاضر با گزارش وستمن و همکاران (٢٢) هم خوانی داشت که می تواند دلیل آن سنتز پروتئین های شوک حرارتی و افزایش ترهالوز در دیواره سلولی در اثر حضور تنش های محیطی و قرار گرفتن در محیط حاوی فورفورال باشد (٢١ و ٢٢). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، بازده تولید اتانول در محیط کشت حاوی فورفورال توسط جدایه *ساکارومایسس سرویزیه* بومی تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان نسبت به سلول های تثبیت شده در حامل آلی آلژینات و سلول های آزاد، به ترتیب به میزان ٦/٩ درصد و ١٤/٤ درصد بالاتر بود که نشان از تأثیر منفی فورفورال بر فعالیت سلول ها و همچنین تأثیر مثبت استفاده از حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان در افزایش مقاومت سلول ها در برابر عوامل شیمیایی محیط کشت دارد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از کیتوزان، همراه با حامل آلژینات نقش مؤثری در افزایش بازده تولید اتانول از جدایه منحصر به فرد *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 در تنش ٣ گرم بر لیتر فورفورال داشته است. به این ترتیب، استفاده از جدایه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* AT-1350 تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان، به عنوان کاندیدی مناسب به منظور افزایش بازده تولید اتانول حاصل از ضایعات و پسماندهای لیگنوسلولزی معرفی می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری و کمک های بی شائبه همکاران مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Wang R, Domínquez Espinosa RM, Leonard K, Koutinas A, Webb C. The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations. Biotechnol Prog. 2002; 18(5): 1033-1038.
2. Balat M, Balat H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Appl Energy. 2009; 24: 2273-2282.
3. Demirbas A. Use of algae as biofuel sources. Energ Convers Manage. 2010; 51: 2738-2749.
4. Gnansounou E, Dauriat A. Ethanol fuel from biomass: A review. J Sci Ind Res. 2005; 64(11): 809-821.
5. Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energ Convers Manage. 2008; 49(8): 2106-2116.
6. Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. The generation of fermentation inhibitors during dilutes acid hydrolysis of softwood. Enzyme Microb Technol. 1999; 24(3): 151-159.

Archive of SID

www.SID.ir

7. Tofighi A, Azin M, Mazaheri Assadi M, Assadi-rad MHA, Nejadsattari T, Fallahian MR. Inhibitory effect of high concentrations of furfural on industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Environ Res. 2010; 4(1): 137-142.

8. Razmovski R, Vucurovic V. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. Fuel. 2012; 92: 1-8.

9. Pandey A. Handbook of plant-based biofuels. Washington: Taylor & Francis Group; 2008.

10. Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 69(6): 627- 642.

11. Mashhadi Karim M, Azin M, Mousavi Gargari SL, Sarshar M. Comparison of function of immobilized and free *Bacillus licheniformis* cells in production of alkaline protease. J Microbial World. 2011; 4(1-2): 15-22. [In Persian]

12. Lee SE, Lee CG, Kang DH, Lee HY, Wan Jung KH. Preparation of corncob grits as a carrier for immobilizing yeast cells for ethanol production. J Microbiol Biotechnol. 2012; 22(12): 1673-1680.

13. Islam S, Rahman Bhuiyan MA, Islam MN. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering. J Polym Environ. 2017; 3(1):1-13.

14. Tofighi A, Mazaheri Assadi M, Asadirad MHA, Zare Karizi Sh. Bio-ethanol production by a novel autochthonous thermo-tolerant yeast isolated wastewater. J Environ Health Sci Eng. 2014; 12: 107-112.

15. Arun Kumar M, Sheik Abdullah S, Ramasamy KR, Revathi S. Comparative optimization of ethanol production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. Biosci Biotechnol Res Asia. 2009; 6(1): 155-160.

16. Westman JO, Bonander N, Taherzadeh MJ, Franzen CJ. Improved sugar co-utilization by encapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in alginate-chitosan capsules. Biotechnol Biofuels. 2014; 7: 102-116.

17. Mehdikhani P, Rezazadeh Bari M, Hovsepyan H. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for high tolerance of ethanol concentration and temperature. Afr J Microbiol Res. 2011; 5(18): 2654-2660.

18. Wong YC, Fikri AM. Synthesis of bio-ethanol from corn stalk by fermentation process. Orient J Chem. 2014; 30(2): 637-642.

19. Swain MR, Kar S, Sahoo AK, Ray RC. Ethanol fermentation of mahula (Madhucala tifolia) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Res. 2007; 162(2): 93-98.

20. Hatami Manesh M, Younesi H, Bahramifar N. Survey of the inhibitory effect on growth and ethanol yield in the fermentation process of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biological J Microorganism. 2015; 4(13): 11-24. [In Persian]

21. Duarte JC, Rodrigues JAR, Moran PJS, Valenca GP, Nunhez JR. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. AMB Express. 2013; 3: 31-39.

22. Westman JO, Taherzadeh MJ, Franzen CJ. Proteomic analysis of the increased stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* encapsulated in liquid core alginate-chitosan capsules. PLOS One. 2012; 7(11): e49335.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 2, June 2017

Original Article

Bio-ethanol production by an autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in alginate-chitosan complex carrier under furfural tension

Mahroo Ahooy Simin[1], Azadeh Tofighi[2], Mohammad Hosein-Arash Asadirad[2]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Biology Research Center, Zanjan branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Biology Research Center, Zanjan branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: One of the major problems in bio-ethanol production is formation of toxic compounds such as furfural and hydroxymethyl furfural from acidic hydrolysis of lignocellulosic materials. Cells immobilization is a useful method for protecting microorganisms against direct physicochemical tensions and reusing them. This study was conducted to assess the effect of alginate-chitosan complex carrier on immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* in order to enhance the yield of ethanol production in the presence of furfural.

Methods & Materials: In this study, *S. cerevisiae* AT-1350 were immobilized in alginate-chitosan complex carrier. Then, 3 g/L of furfural was added to the fermentation medium as the stressor. Glucose consumption was determined using glucose sensing kit. High performance liquid chromatography was used to measure the amount of ethanol production.

Results: The results showed that the ethanol yield was decreased 21% by non-immobilized autochthonous yeast, in the medium containing 3 g/L furfural as compared to the control (furfural-free medium). On the other hand, in the presence of furfural, using yeast immobilized in alginate-chitosan complex increased the ethanol yield 6.9% and 14.4% in comparison with yeasts immobilized in alginate and non-immobilized yeasts, respectively.

Conclusion: The alginate-chitosan complex can be used as a suitable carrier to immobilize and protect yeast cells against tensions and thusto enhance the ethanol yield obtained from lignocellulosic wastes.

Keywords: Alginate, Bio-ethanol, Immobilization, Furfural, Chitosan.

Correspondence to: Azadeh Tofighi

Tel: +98 2433421030

E-mail: azadeh.tofighi@iauz.ac.ir

Journal of Microbial World 2017, 10(2): 104-122.

Archive of SID
www.SID.ir