

## تولید سوخت اتانول با مخمر *Saccharomyces cerevisiae* از ملاس پسماند کارخانه‌های قند در سیستم تخمیر ناپیوسته

فرشید قربانی<sup>۱</sup>

حبیب اله یونسی<sup>۲\*</sup>

[hunesi@modares.ac.ir](mailto:hunesi@modares.ac.ir)

عباس اسماعیلی ساری<sup>۳</sup>

سید محمود قاسمپوری<sup>۴</sup>

ملیحه امینی<sup>۱</sup>

علی دانشی<sup>۱</sup>

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۱۰

### چکیده

میزان تولید ضایعات و پسماند محصولات کشاورزی در ایران بسیار بالا است که با توجه به ترکیب آن‌ها به منابع مناسبی برای تولید اتانول تبدیل شده‌اند. ملاس یکی از فراوان‌ترین و ارزان‌ترین منابع کربن در دسترس و قابل استفاده برای تولید اتانول می‌باشد که با این کاربرد علاوه بر جلوگیری از ورود آن به طبیعت، محصولی به دست می‌آید که یک سوخت پاک و سازگار با طبیعت است. هدف اصلی این تحقیق تولید اتانول از بیومس به عنوان یک سوخت زیست محیطی و پاک می‌باشد. برای این کار، سنتز زیستی اتانول توسط مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5010 و با استفاده از ملاس نیشکر به عنوان سوبسترا، با روش ناپیوسته انجام گرفت. در این روش تخمیر در دمای محیط (۲۵ °C) و با pH ۴/۵ انجام یافت. در سیستم ناپیوسته تولید اتانول، از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ g l<sup>-1</sup> ملاس به عنوان منبع کربن جهت تخمیر استفاده گردید. محصول تولیدی با افزایش غلظت ملاس افزایش یافته و بیشترین مقدار آن در فرآیند تخمیر پس ۳۶ ساعت و با مصرف ۹۳/۲۷٪ از قند کل موجود در ملاس ۵۰ g l<sup>-1</sup> به میزان ۹/۳ g ethanol/l molasses و همچنین بیشترین میزان بازده تولید اتانول ۰/۲۴ g ethanol/g total sugar بود. در این سیستم بیشترین میزان تولید بیومس ۵/۱۵ g CDW/l molasses و همچنین بیشترین میزان بازده وزن خشک سلولی ۰/۱۸ g CDW/g total sugar به دست آمد. نتایج نشان می‌دهد که سوبسترای بکار رفته می‌تواند از تولید یک سوخت زیستی پایدار حمایت کند و قابل رقابت با کلیه سوخت‌های تولید شده

۱- کارشناسی ارشد محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس.

۲- استادیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس\* (مسئول مکاتبات).

۳- استاد، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس.

۴- مربی، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس.

از بیومس‌های پر هزینه‌تر باشد. همچنین به دلیل پایین بودن میزان آلودگی ناشی از احتراق آن می‌تواند جایگزین مناسبی برای سوخت‌های فسیلی باشد.

واژه های کلیدی: اتانول، *Saccharomyces cerevisiae*، ملاس نیشکر، سیستم ناپیوسته تخمیر، کارخانه قند.

## مقدمه

می‌آورد. بنابر این به نظر می‌رسد که ملاس می‌تواند به عنوان یک ماده اولیه ارزان قیمت برای تولید اتانول که یک سوخت مناسب و سازگار با طبیعت است به کار گرفته شود و همچنین بدین وسیله از ورود آن به اکوسیستم های طبیعی جلوگیری گردد. کاربرد اتانول زیستی در مقیاس وسیع به عنوان یک سوخت در حمل و نقل می‌تواند میزان انتشار  $CO_2$  و همچنین دیگر آلاینده ها مثل  $SO_x$  و  $NO_x$  ناشی از حمل و نقل را کاهش دهد. در چند دهه گذشته، تولید اتانول با استفاده از فرآیند میکروبی مورد توجه قرار گرفته است. میکروارگانیسم‌های مختلف شامل *Clostridium sp*، مخمرهای شناخته شده از قبیل *Saccharomyces cerevisiae* و *Zymomonas mobilis* کاندیدای مناسبی برای تولید اتانول هستند (۷). روش های پیوسته<sup>۳</sup> تولید اتانول می‌تواند تولید بیشتر و اقتصادی‌تری را به دنبال داشته باشد اما تولید اتانول در سیستم‌های ناپیوسته<sup>۴</sup> اساس این مطالعات را تشکیل می‌دهد. هدف این مطالعه بررسی امکان کاربرد ملاس نیشکر به عنوان یک پسماند آلاینده محیط زیست برای تولید اتانول بعنوان یک سوخت زیست محیطی و بررسی چگونگی رشد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* با غلظت های مختلف ملاس و تولید اتانول بوده است.

## مواد و روش ها

### مخمر و محیط کشت

در این تحقیق از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5010 برای تولید اتانول استفاده شد که از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، سازمان پژوهشی، علمی و

با توجه به کاهش منابع سوخت فسیلی، نیاز به منابع انرژی که تجدیدپذیر، موثر، دارای قیمت مناسب و فاقد آلودگی باشند احساس می‌شود (۱). یک راه حل برای جانمایی سوخت‌های فسیلی و کاهش آلودگی اتمسفری ناشی از احتراق آن‌ها به کارگیری انرژی خورشیدی به نمودار بیومس<sup>۱</sup> می‌باشد. تبدیل بیومس به سوخت‌های زیستی<sup>۲</sup> یکی از گزینه‌های انرژی و کاهش آلودگی گازها، خصوصاً دی‌اکسید کربن می‌باشد (۲). اتانول مهمترین سوخت زیستی است که در برخی از کشورها آن را به عنوان سوخت سبز می‌شناسند. این الکل به دلیل عدد اکتان بالا می‌تواند به تنهایی به عنوان سوخت و یا بجای MTBE در بنزین و همچنین به عنوان حامل اکسیژن در گازوئیل به کار رود و محتوای اکسیژن آن را افزایش دهد، که سبب اکسیداسیون بهتر هیدروکربن ها و کاهش مقدار آلودگی گازهای رها شده به اتمسفر می‌شود (۳). اتانول می‌تواند از ملاس نیشکر و چغندر قند و هیدرولیز اسیدی نشاسته برخی از حبوبات از قبیل ذرت به دست آید (۴). ملاس یکی از فراوان‌ترین پسماندها در صنایع تولید قند می‌باشد و در حال حاضر یکی از ارزان‌ترین منابع قند است و در تولید اتانول بر خلاف دانه حبوبات، نیاز به هیدرولیز نشاسته ندارد (۵). مقدار ملاس تولیدی کارخانه‌های قند ایران در سال‌های مختلف، نسبت به میزان تولید چغندر قند و نیشکر متغیر است. ولی به طور متوسط در سال‌های ۱۳۷۰ تا ۱۳۷۷ به میزان ۳۵۶,۴۳۰ تن بوده است، از کل ملاس تولیدی کشور به طور متوسط حدود ۲۰۰,۰۰۰ تن به مصرف رسیده و حدود ۱۵۰,۰۰۰ تن به هدر می‌رود (۶). ورود این ملاس به اکوسیستم‌های آبی باعث افزایش COD و BOD آن‌ها شده و صدمات غیر قابل جبرانی را به بار

3- Continuous  
4- Batch

1 - Biomasse  
2 - Biofuels

دستگاه جذب اتمی (PHILIPS, PU 9400, USA) تعیین گردید. میزان  $N-NH_4^+$  و  $N-NO_3^-$  و  $PO_4^-$  توسط روش فتومتر (Palintest 8000, England) اندازه گیری شد. میزان نیتروژن و پروتئین خام آن توسط دستگاه کج‌لادل 2300 Kjetic Analyzer Unit, Foss Tacator, (Sweden) تعیین گردید. نتایج این آنالیزها در جدول ۱ داده شده است.

#### اندازه گیری قند کل، الکل تولیدی و غلظت بیوس

در هر آزمایش ۱۵۰ ml محیط کشت در ارلن با حجم ۲۵۰ ml تهیه گردید. از زمان صفر و به مدت ۳۶ ساعت هر ۲ ساعت ۳ نمونه از سیستم ناپیوسته برای اندازه گیری قند کل، اتانول، الکل تولیدی و غلظت بیوس گرفته شد. پنج رشته آزمایش و با غلظت های مختلف ملاس (۱۰، ۰۲، ۰۳، ۰۴ و  $5 \cdot g/l$ ) برای مطالعه تاثیر ملاس تصفیه نشده بر روی رشد میکروارگانیزم، مصرف قند آن و تولید الکل انجام شد و آزمایش سه بار تکرار گردید و مقدار میانگین گزارش شد.

#### روش های آنالیز

یکی از سه نمونه گرفته شده در هر ۲ ساعت ۱۰ مرتبه رقیق گردید و میزان جذب آن در طول زمان نمونه برداری از سیستم های ناپیوسته برای تعیین میزان تراکم سلولی در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (JENWAY, 6305, UK) اندازه گیری شد و وزن خشک سلولی با استفاده از نمودار کالیبراسیون (میزان جذب به دست آمده در ۶۲۰ نانومتر در مقابل وزن خشک سلولی) به دست آمد. میزان قند کل هر نمونه با استفاده از روش فنول-سولفوریک اسید تعیین گردید (۹). در این روش ۲۰ g فنول در ۸۰ ml آب مقطر حل شد تا محلول فنول ۰/۸۰٪ حاصل شود. سپس ۱ ml از محلول فنول به دست آمده را به ۱ ml از نمونه اضافه کرده و در نهایت ۷ ml اسید سولفوریک غلیظ را به آن اضافه می کنیم، محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه نگه داشته می شود تا کاملاً سرد شود. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر با طول

صنعتی ایران (مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی و عفونی) به صورت یخ خشک<sup>۱</sup> تهیه گردید و سپس در محیط کشت استریل کشت شد. ترکیب محیط کشت رشد<sup>۲</sup> به صورت زیر می باشد (بر حسب g/l): گلوکز ۱۵،  $(NH_4)_2SO_4$  ۹، Yeast extract ۲/۵،  $MgSO_4$  ۱. ترکیب محیط کشت تولید به صورت زیر می باشد (بر حسب g/l): قند کل رقیق شده ملاس ۸/۱۱-۴۱/۳۱،  $(NH_4)_2SO_4$  ۹،  $MgSO_4$  ۲/۵، Yeast extract ۱،  $KH_2PO_4$  ۱۰،  $K_2HPO_4$  ۵.

برای تهیه محیط کشت منشاء<sup>۳</sup> مخمر *S. cerevisiae* در محیط کشت آگار متنمودار از (بر حسب g/l): گلوکز ۱۵،  $(NH_4)_2SO_4$  ۹،  $MgSO_4$  ۲/۵، Yeast extract ۱،  $KH_2PO_4$  ۱۰،  $K_2HPO_4$  ۵، آگار ۲۰. کشت گردید و پس از سه روز نگهداری در دمای محیط به دمای  $4^\circ C$  منتقل شده تا در مواقع لازم مورد استفاده قرار گیرد. این محیط کشت هر دو ماه یک بار جهت زنده مانی مخمر تعویض گردید. میزان pH محیط کشت تولید اتانول توسط HCl و NaOH یک نرمال در ۴/۵ تنظیم گردید. دمای محیط کشت در این مطالعه دمای محیط در نظر گرفته شد که حدود ۲۵ تا  $30^\circ C$  بود. محیط کشت تهیه شده قبل از استفاده در دمای  $30^\circ C$  و ۱۲۱ و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید.

#### ملاس

ملاس نیشکر از کارخانه قند بیستون (کرمانشاه) تهیه گردید. pH اولیه آن در دمای  $21^\circ C$ ، ۶/۲ بود. درجه بریکس آن توسط دستگاه hand held refractometer (ATAGO, N-E3, Japan) اندازه گیری شد. وزن خشک، رطوبت، خاکستر و وزن مخصوص آن تعیین شد (۸). میزان جیوه ملاس توسط دستگاه (LECO AMA 254, USA) Advanced Mercury Analyzer و با روش ASTM، استاندارد D-6722 اندازه گیری شد. مقدار عناصر Fe, Ca, K, Mg, Na, Cu, Mn, Zn, Co, Ni و Pb ملاس توسط

- 1- Freeze dry
- 2- growth medium
- 3- seed culture

### آنالیز آماری

تولید اتانول در سیستم ناپیوسته با غلظت های مختلف ملاس انجام گرفت. آنالیزهای آماری داده‌های به دست آمده در نرم افزار Excel (Microsoft Excel, 2005) انجام گرفت. انحراف استاندارد آزمایش‌های انجام یافته برای وزن خشک سلولی، مصرف قند و تولید اتانول به ترتیب ۴/۷، ۳/۶ و ۵/۲٪ شد. نمودار مربوط به هر غلظت ملاس و با سه متغیر ذکر شده نیز در محیط Excel رسم گردید که در بخش نتایج عنوان شده است.

### نتایج

#### کاربرد ملاس به عنوان منبع کربن برای تولید الکل

خصوصیات ملاس در جدول (۱) ذکر شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود مقدار یک رشته از عناصر همچون Fe, Ca, K, Mg, Na, Mn, Zn بیشتر از حد طبیعی است که بتوان آن را به عنوان یک پسماند (ملاس) به اکوسیستمهای طبیعی دفع کرد و ورود آنها به طبیعت باعث آلوده شدن محیط خواهد شد. مقدار بالای جیوه (۱۴۸ ppb) در هر گرم ملاس) در این پسماند صنعتی با توجه به قابلیت تجمع زیستی جیوه در زنجیره های غذایی می‌تواند برای محیط زیست بسیار خطر آفرین باشد. همچنین مقدار بالای یک رشته از آنیون‌ها و کاتیون‌ها از قبیل کلراید و فسفر کل و نیز مقدار بالای قند و پروتئین ملاس، می‌تواند در صورت تخلیه شدن ملاس به اکوسیستم‌ها آبی موجب برهم زدن توازن مواد غذایی موجود در اکوسیستم و باعث پدیده یوتروفیکاسیون شود. بنابر این با توجه به کاهش مقدار قندهای موجود در ملاس تا حدود صفر در فرآیند تخمیر و همچنین با توجه به این‌که عناصر موجود در آن می‌تواند به دلیل خاصیت دیواره مخمر *S. cerevisiae* جذب آن شود (۱۰) از این طریق از ورود آن-ها به طبیعت جلوگیری می‌شود. از سوی دیگر، محصولی که از طریق فرآیند تخمیر حاصل می‌شود می‌تواند به عنوان یک سوخت پاک و زیست محیطی که در اثر سوختن فقط بخار آب و CO<sub>2</sub> تولید می‌کند، در وسایل نقلیه به کار گرفته شود.

موج ۴۲۰ نانومتر مقدار جذب آن را اندازه گیری می‌کنیم و با استفاده از منحنی کالیبراسیون میزان قند آن تعیین می‌گردد (منحنی کالیبراسیون توسط غلظت های مختلف ساکارز تهیه شده از محلول ۲ g/l ساکارز رسم گردید). اندازه‌گیری میزان قندهای کاهش پذیر<sup>۱</sup> ملاس نیز با روش DNS انجام شد. به این صورت که ابتدا ۱ ml از نمونه رقیق شده ملاس را داخل یک لوله آزمایش ریخته و ۱ ml محلول DNS را به آن اضافه می‌کنیم، همین کار را برای ۱ ml آب مقطر انجام می‌دهیم و از آن به عنوان نمونه شاهد استفاده می‌کنیم. محلول حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش گذاشته و پس از این مدت آن را سریعاً به حمام آب یخ انتقال می‌دهیم و پس از سرد شدن ۸ ml آب مقطر به آن اضافه می‌کنیم و سپس میزان جذب نمونه را با دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری می‌کنیم و در نهایت با استفاده از نمودار کالیبراسیون رسم شده (میزان غلظت های مختلف ساکارز در مقابل طول موج‌های به دست آمده) غلظت قندهای قابل تبدیل به دست آمد. برای اندازه گیری الکل از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) (Philips, PU4400, Us) با دکتور (Flame Ionization Detector) FID و نرم افزار Clarity 4.2, Data Apex, Czech Republic استفاده گردید. ستون استفاده شده PEG20M (ستون شیشه‌ای) با ۱/۵ متر طول ۱/۸ میلی متر قطر ( Philips, USA) بود. برنامه دمایی برای آنالیز مایع نمونه در GC طراحی شد. طی آنالیز، دمای اولیه ستون ۱۲۰°C بود، بعد از ۲ دقیقه دمای آون با ۱۰°C/min افزایش یافت تا به ۱۵۰°C برسد. دمای Injector و Detector به ترتیب ۱۵۰°C و ۲۰۰°C می‌باشد. مقدار جریان گاز حامل (نیترژن) ۳۰ ml/min می‌باشد و از ۲- متیل ۱- بوتانول (۱ v/v) به عنوان استاندارد داخلی با غلظت ۵۰ μl/ml استفاده گردید. حجم نمونه تزریق شده به دستگاه GC دقیقاً ۲ μl بود. هر آزمایش سه مرتبه تکرار گردید و میانگین آن‌ها گزارش شده است.

تغییرات رشد سلولی مخمر *S. cerevisiae* با درصدهای مختلف ملاس

همان گونه که در نمودار ۱ دیده می‌شود مخمر *S. cerevisiae* از زمان صفر تا حدود ۴ ساعت پس از کشت شدن در فاز تاخیری رشد<sup>۱</sup> می‌باشد و پس از آن فاز رشد نمایی<sup>۲</sup> شروع می‌شود و تا ۱۶ ساعت مخمر به حداکثر رشد خود می‌رسد و از آن به بعد وارد فاز مرگ<sup>۳</sup> می‌شود. همان گونه که مشاهده می‌شود بیشترین میزان تولید بیومس molasses g ۵/۱۵CDW/l و همچنین بیشترین میزان بازده وزن خشک سلولی Total sugar /g CDW /g ۰/۱۸۸ در ملاس ۵۰ g l<sup>-1</sup> می‌باشد. درصد افزایش رشد مخمر با استفاده از معادله (۱-۱) محاسبه گردید:

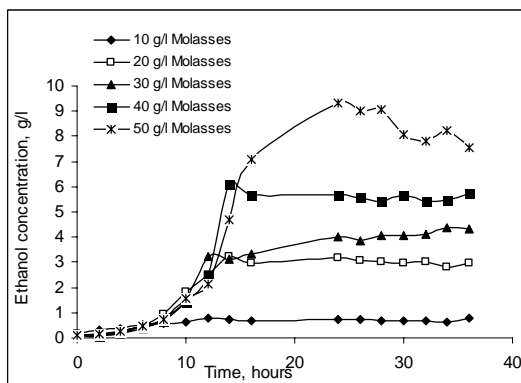
$$(1-1) \quad \text{درصد افزایش رشد} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

که در آن  $W_1$  وزن خشک بیومس در ملاس با غلظت کمتر و  $W_2$  وزن خشک بیومس در ملاس با غلظت بیشتر بر حسب  $g l^{-1}$  می‌باشد. درصد افزایش رشد مخمر از غلظت ۱۰ به ۵۰  $g l^{-1}$  با کاهش مواجه شده است به طوری که از غلظت ملاس ۱۰ به ۲۰  $g l^{-1}$  به میزان ۰/۷۱/۲۷٪، از غلظت ملاس ۲۰ به ۳۰  $g l^{-1}$  به میزان ۰/۲۴/۷۶٪، از غلظت ملاس ۳۰ به ۴۰  $g l^{-1}$  به میزان ۰/۲۳/۷۱٪ و از غلظت ملاس ۴۰ به ۵۰  $g l^{-1}$  به میزان ۰/۷/۲۹٪ افزایش رشد وجود داشته است.

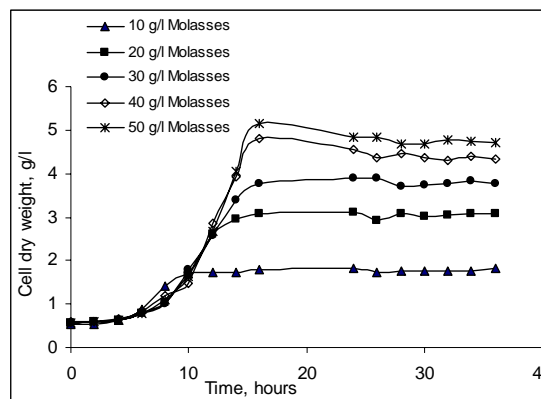
جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ملاس استفاده شده در فرآیند تخمیر

پارامتر	مقدار
درجه بریکس (درجه)	۷۹
چگالی ( $kg l^{-1}$ )	۱۳۶۰
قندهای کاهش پذیر بر اساس گلوکز ( $g g^{-1}$ molasses)	۰/۰۲۵۵
گلوکز (%)	۹/۵۹ ± ۲/۱۳
فروکتوز (%)	۴/۰۵ ± ۰/۰۸
ساکارز (%)	۵۱/۵۰ ± ۰/۲۳
دیگر قندها (%)	۳۴/۸۶ ± ۰/۸۱
قند کل ( $g g^{-1}$ molasses)	۰/۸۳۶
کلسیم ( $mg l^{-1}$ )	۷۷۰
پتاسیم ( $mg l^{-1}$ )	۲۴۴۸
آهن ( $mg l^{-1}$ )	۲۰/۱
منیزیم ( $mg l^{-1}$ )	۱۰۰
سدیم ( $mg l^{-1}$ )	۶۱۴
منگنز ( $mg l^{-1}$ )	۰/۷
روی ( $mg l^{-1}$ )	۱/۱
کبالت ( $mg l^{-1}$ )	-
نیکل ( $mg l^{-1}$ )	-
سرب ( $mg l^{-1}$ )	-
مس ( $mg l^{-1}$ )	-
جیوه ( $ppb.g^{-1}$ molasses)	۱۴۸
کلراید ( $mg l^{-1}$ )	۱۲
فسفر کل ( $mg l^{-1}$ )	۱۵۰
آمونیم ( $mg l^{-1}$ )	-
نترات ( $mg l^{-1}$ )	-
نیتريت ( $mg l^{-1}$ )	-
سولفات ( $mg l^{-1}$ )	-
پروتئین (%)	۰/۱۴۵
نیتروژن کل (%)	۰/۰۲۳۲
رطوبت (%)	۲۳/۳
وزن خشک (%)	۷۶/۷
مواد فرار (%)	۸۶/۳
خاکستر (%)	۱۳/۷

- 1 - Lag phase
- 2 - Exponential phase
- 3 - Death phase



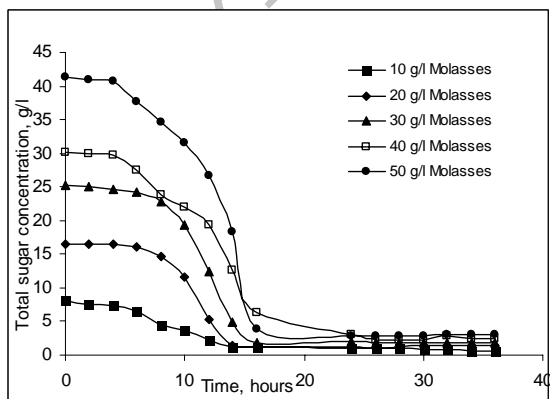
نمودار ۲- منحنی تغییرات تولید اتانول با درصدهای مختلف ملاس نیشکر



نمودار ۱- منحنی رشد سلول *S. cerevisiae* با درصدهای مختلف ملاس نیشکر

چگونگی تغییرات میزان قند ملاس در طول فرآیند تخمیر

مقدار قند کل ملاس که با روش فنول-سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد به طور متوسط  $g \text{ total sugar} / g \text{ molasses}$  ۰/۸۳۶ بوده و همچنین میزان قند قابل تبدیل که با روش DNS اندازه‌گیری شد  $g/g \text{ molasses}$  ۰/۲۵۵ می‌باشد. همان گونه در نمودار ۳ دیده می‌شود بالاترین میزان قند کل در ملاس های ۱۰ تا  $50 \text{ g l}^{-1}$  به ترتیب ۸/۱۱، ۱۶/۵۵، ۲۵/۲۳، ۳۰/۲۱ و  $30 \text{ g l}^{-1}$  می‌باشد که با روند فرآیند تخمیر توسط سلول‌های مخمر به مصرف رسیده و کاهش می‌یابد و پس از ۱۶ ساعت (پایان فاز رشد نمایی سلول مخمر) به حدود صفر می‌رسد. هماهنگی کاهش غلظت قند کل با تولید اتانول بیانگر مصرف قند توسط مخمر و تولید اتانول می‌باشد.



نمودار ۳- منحنی کاهش میزان قند کل ملاس با درصد های مختلف

تغییرات میزان تولید اتانول با درصدهای مختلف ملاس

بر اساس فرمول استکیومتریکی تبدیل گلوکز به اتانول در فرآیند تخمیر، یک مول گلوکز به ۲ مول دی‌اکسید کربن که از سیستم خارج می‌شود و ۲ مول اتانول تبدیل می‌شود:



که این پدیده کاهش وزن را به دنبال دارد و می‌تواند میزان تولید اتانول را افزایش دهد. هر گرم از گلوکز به صورت نتوریک می‌تواند  $0.51 \text{ g}$  اتانول تولید کند. بنابراین ۵۰٪ از گلوکز به اتانول و ۵۰٪ از آن به دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود. همان گونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، میزان تولید اتانول همچون منحنی وزن خشک سلولی (CDW) ابتدا با یک فاز تاخیری شروع می‌شود و پس از ۴ ساعت وارد فاز رشد نمای می‌شود. پس از گذشتن از فاز رشد نمایی به یک میزان ثابت می‌رسد که در غلظت های بالا این مراحل با وضوح بیشتری مشخص می‌باشد. با افزایش غلظت ملاس از  $10 \text{ g l}^{-1}$  به  $50 \text{ g l}^{-1}$  میزان تولید اتانول نیز افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین میزان تولید اتانول  $9.31 \text{ g ethanol/l molasses}$  و همچنین بیشترین میزان بازده تولید اتانول  $0.24 \text{ g ethanol/g total sugar}$  در ملاس  $50 \text{ g l}^{-1}$  می‌باشد.

بحث

## مزیت استفاده از ملاس

۱۸ و  $gl^{-1}$  ۱۵ گزارش شده است.اثر بازدارندگی سوپسترا بر رشد سلولی *S. cerevisiae*

نمودار ۱ مخمر را در سیستم ناپیوسته تولید اتانول با درصد‌های مختلف ملاس نیشکر نشان می‌دهد. مخمر قادر است به‌خوبی مراحل مختلف رشد را پشت سر گذارد و از قند موجود در آن به عنوان منبع کربن برای رشد و تولید محصول استفاده نماید. با افزایش غلظت ملاس وزن خشک سلولی نیز افزایش پیدا کرد. به طوری که بیشترین وزن خشک سلولی به مقدار  $50 \text{ g CDW/l molasses}$  در غلظت  $50 \text{ g l}^{-1}$  به دست آمد. مطالعات زیادی در مورد با تولید اتانول با این مخمر صورت گرفته است. غلظت قند یک عامل بسیار مهم در فرایند تخمیر می‌باشد. به طوری که غلظت بالای سوپسترا از رشد مخمر و تولید محصول جلوگیری کند و متابولیسم میکروارگانیزم را مختل نماید. در مطالعات مختلف گزارش شده است که غلظت قند بین  $(w/v) 25-5\%$  اثر باز دارندگی معنی داری دارد و در  $(w/v) 40\%$  باعث توقف کامل فعالیت میکروارگانیزم می‌شود (۱۴ و ۱۳). همان گونه که در نمودار ۱ دیده می‌شود با افزایش غلظت ملاس از  $10$  به  $50 \text{ g l}^{-1}$  میزان رشد سلول نیز بیشتر می‌شود، اما می‌توان مشاهده نمود که با هر مرحله افزایش غلظت ملاس اثر بازدارندگی آن نیز بیشتر می‌شود. وزن خشک سلولی مخمر، با افزایش غلظت ملاس از غلظت  $10$  به  $50 \text{ g l}^{-1}$  با کاهش مواجه شده است. به طوری که غلظت ملاس از  $10$  به  $20 \text{ g l}^{-1}$  به میزان  $71/27\%$ ، غلظت ملاس از  $20$  به  $30 \text{ g l}^{-1}$  به میزان  $24/76\%$ ، غلظت ملاس از  $30$  به  $40 \text{ g l}^{-1}$  به میزان  $23/71\%$  و غلظت ملاس از  $40$  به  $50 \text{ g l}^{-1}$  به میزان  $7/29\%$  افزایش رشد وجود داشته است. در مطالعه‌ای (۱۵) تاثیر پارامترهای مختلف را بر فعالیت تخمیری *S. cerevisiae* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها ملاس چغندر قند  $80\%$  را به عنوان منبع کربن بکار بردند و میزان بیومس تولیدی آن را  $10/5 \text{ g CDW/l molasses}$  گزارش کردند. در مطالعه دیگری (۱۶) اثر دما بر پارامترهای سینیتیک تخمیر اتانول توسط مخمر *S. cerevisiae* را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها

جدول ۱ نتایج آنالیز ترکیبات ملاس را نشان می‌دهد و در واقع بیانگر این است که در صورت تخلیه شدن به محیط بار آلودگی زیادی را به همراه خواهد داشت. در مطالعات مختلف از ملاس به عنوان منبع کربن برای تولید اتانول استفاده شده است. رشد مخمر *S. cerevisiae* در سیستم ناپیوسته و نیمه‌پیوسته با استفاده از ملاس نیشکر و شربت گلوکز توسط برخی از محققان (۱۱) مورد بررسی قرار گرفت. دما و  $\text{pH}$  بهینه برای رشد مخمر به ترتیب  $30^\circ \text{C}$  و  $5/5$  به دست آمد. آنها در سیستم ناپیوسته، با استفاده از شربت گلوکز میزان تولید اتانول و سلول را به ترتیب  $0/31 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  و  $0/22 \text{ g cell g}^{-1} \text{ sugar}$  و همچنین با ملاس نیشکر  $0/22 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  و  $0/18 \text{ cell g}^{-1} \text{ sugar}$  گزارش کردند. همچنین در سیستم نیمه پیوسته با استفاده از شربت گلوکز به ترتیب  $3/12 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  و  $0/52 \text{ g cell g}^{-1} \text{ sugar}$  و با استفاده از ملاس نیشکر به ترتیب  $2/33 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  و  $0/46 \text{ g cell g}^{-1} \text{ sugar}$  به دست آوردند. در مطالعه دیگری (۱۲) از مایع باقی‌مانده پس از تخمیر ملاس نیشکر که ویناس<sup>۱</sup> نامیده می‌شود، جهت تولید الکل با مخمر *S. cerevisiae* استفاده کردند. آنها این مایع پسماند را پس از تغلیظ به روش زیستی مجدداً مورد استفاده قرار دادند. در این مطالعه از این پساب به‌جای آب برای تهیه محیط کشت تخمیر استفاده کردند و این بازیافت چندین مرتبه انجام گرفته است. در پایان  $24\%$  مواد جامد (براساس وزن خشک) به عنوان پسماند باقی ماند. کاهش  $66\%$  مواد غذایی،  $44\%$  آب و  $50\%$  اسید سولفوریک همراه با بهبود فرآیند تخمیر به دست آمد. همچنین پساب باقی‌مانده یا همان ویناس دارای مقدار قابل توجهی محصول جانبی غیر فرار مثل گلیسرول بود که دارای ارزش تجاری می‌باشد. بیشترین میزان غلظت گلیسرول به دست آمده در این مطالعه  $12/6 \text{ g l}^{-1}$  بود. این محققان کاهش اتانول تولیدی با هر بار استفاده مجدد از ویناس را گزارش کردند، به طوری که در آزمایش اول و دوم این مقدار به ترتیب

<sup>۱</sup>- Vinasse

به اتانول را توسط *S. cerevisia* با حضور و یا عدم حضور مبدل‌های قارچی مورد بررسی قرار دادند که بیشترین میزان  $\text{CO}_2$  تولیدی (به عنوان شاخص تولید اتانول) و محصول تثوریک اتانول را در حضور مبدل قارچی و در دمای  $30^\circ\text{C}$  و pH ۵ به دست آوردند که به ترتیب ۲۱ g و ۹۳٪ بود. در مطالعه دیگری (۲۰) از روش دانه‌های بید تشکیل شده از پنیسیلیم<sup>۱</sup> برای تثبیت سلول‌های *S. cerevisia* در سیستم ناپیوسته استفاده کردند. آن‌ها از ملاس ۲۰٪ به عنوان سوبسترا استفاده کردند و ۷ مرتبه بازیابی از این بیدها صورت گرفت. آن‌ها بیشترین میزان تولید اتانول را پس از ۱۱ روز ( $77^{-1}$ ) ۱۱/۵٪ گزارش کردند.

#### نتیجه گیری

مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به منظور تولید اتانول به روش تخمیر با استفاده از ملاس نیشکر به عنوان منبع کربن و به روش ناپیوسته<sup>۲</sup> استفاده شد. در این سیستم از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و  $50\text{ g l}^{-1}$  ملاس استفاده شد. با افزایش غلظت ملاس از ۱۰ به  $50\text{ g l}^{-1}$  میزان تولید اتانول نیز افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان تولید اتانول  $9/3\text{ g l}^{-1}$  و همچنین بیشترین میزان بازده تولید اتانول و تولید حجمی آن به ترتیب  $0/24\text{ gg}^{-1}$  و  $0/58\text{ g l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  در ملاس  $50\text{ g l}^{-1}$  به دست آمد، که در آن ۹۳/۲۷٪ از قند کل موجود به مصرف رسید. همچنین بیشترین میزان تولید بیومس  $5/15\text{ g l}^{-1}$  و بیشترین میزان بازده وزن خشک سلولی  $0/18\text{ gg}^{-1}$  در همان غلظت از ملاس به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، در سیستم ناپیوسته تولید اتانول اثر بازدارندگی ناشی از افزایش غلظت ملاس و اتانول تولیدی در محیط کشت مخمر مانع از تولید بیشتر اتانول می‌گردد. اما به هر حال میزان اتانول تولیدی در مقایسه با مطالعات مشابه انجام یافته کمتر است. این مسئله به چند دلیل ممکن است رخ داده باشد. اول اینکه میزان گلوکز و فروکتوز ملاس مورد استفاده در مقایسه با ساکارز آن پایین

از ملاس نیشکر با میزان ۲۲٪ قند کاهش پذیر به عنوان سوبسترا استفاده کردند و بیشترین میزان بیومس تولیدی در دمای  $30^\circ\text{C}$  را  $8/2\text{ g l}^{-1}$  ( $77^{-1}$ ) گزارش کردند.

#### تغییرات میزان تولید اتانول با درصدهای مختلف ملاس

همان گونه که در نمودار ۲ دیده می‌شود با افزایش غلظت ملاس از ۱۰ به  $50\text{ g l}^{-1}$  میزان تولید اتانول نیز افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین میزان تولید اتانول  $9/3\text{ molasses}$  و همچنین بیشترین میزان بازده تولید اتانول  $0/24\text{ g ethanol/g total sugar}$  در ملاس  $50\text{ g l}^{-1}$  می‌باشد. تولید اتانول در سیستم ناپیوسته در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای رابطه بین تولید اتانول و غلظت اولیه بیومس *S. cerevisia* در سیستم ناپیوسته مورد بررسی قرار گرفت (۱۷). در این بررسی از سه غلظت ۱۰۰، ۱۵۰ و  $200\text{ g l}^{-1}$  گلوکز بعنوان منبع کربن استفاده شد. در هر یک از این غلظت‌ها از سه مقدار متفاوت بیومس یعنی ۷/۵، ۲۱/۵ و  $45/5\text{ g l}^{-1}$  استفاده شد. بیشترین میزان تولید اتانول و گلیسرول در غلظت  $200\text{ g l}^{-1}$  گلوکز و غلظت اولیه بیومس  $7/5\text{ g l}^{-1}$  به دست آمد که به ترتیب  $82/1$  و  $5/6\text{ g l}^{-1}$  بود. در مطالعه دیگری (۱۸) کشت مخمر *S. cerevisia* را به صورت نیمه پیوسته و ناپیوسته مورد بررسی قرار دادند. آنها با این روش به صورت غیر مستقیم میزان سوبسترا و غلظت مواد تولیدی را در طول فرآیند تخمیر اندازه گیری کردند که با غلظت گلوکز  $5\text{ g l}^{-1}$  بیشترین میزان تولید اتانول در سیستم ناپیوسته  $2\text{ g l}^{-1}$  بود که بالاتر از اتانول تولیدی در سیستم پیوسته ( $0/2\text{ g l}^{-1}$ ) بود.

#### مصرف سوبسترا در طول فرآیند تخمیر

در طول فرآیند تخمیر میزان قند کل در ملاس‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و  $50\text{ g l}^{-1}$  مورد پایش قرار گرفت. فرآیند تخمیر توسط سلول‌های مخمر با کاهش قند کل همراه بود و پس از ۱۶ ساعت (پایان فاز رشد نمایی سلول مخمر) تقریباً به پایین ترین سطح رسیده بود. در مطالعه‌ای (۱۹) تخمیر ملاس نیشکر

1- Penicillium  
2- Batch



صنایع غذایی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱: ۱۸۷-۱۷۵.

7. Wang, R., R. M. Dominguez-Espinosa, K. Leonard, A. Koutinas and C. Webb. (2002). The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations. *Biotechnol Prog.* 18(5): 1033-1038.
8. American Public Health Association (APHA). (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association Publications, Washington.
9. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28: 350-356.
10. Han, R., Li, H., Li, Y., Zhang, J., Xiao, H and Shi, J. (2006). Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast. *Journal of Hazardous Materials B.* 137, 1569-1576.
11. Win, S.S., Impoolsup, A and Noomhorm, A. (1996). Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugar cane molasses and glucose syrup from cassava starch. *Jornal of Industrial Microbiology.* 16:117-123.
12. Navarro, A. R., Sepulveda, M. del C. and Rubio, M. C. (2000). Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management.* 20 : 581-585.
13. Jones, R.P., Pamment, N., Geenfield, P.F., 1981. Alcohol fermentation by yeast: the effect of environment. *Proc. Biochem.* 16, 42-48.
14. Thatipamala, R., Rohani, S., Hill, G.A., 1992. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and

بود که با توجه به این مسئله که مخمر ابتدا گلوکز و فروکتوز را به مصرف می‌رساند و تا تمام شدن آن ها ساکارز را مصرف نمی‌کند می‌تواند مانع مصرف شدن کل قند موجود در ملاس شود. دیگر این که با توجه به استفاده از حشره کش ها یا علف کش ها در کشتزارها و یا باکتری‌کش ها یا دیگر مواد بازدارنده در کارخانه قند امکان بر جای گذاشتن اثر منفی بر مخمر وجود دارد (۲۲).

#### منابع

1. Najafpour, G., Younesi, H. and Ku Syahidah Ku Ismail, K. U. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology.* 92: 251-260.
2. Montesinos, T. and J. Navarro. (2000). Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 27(6): 362-370.
3. Cardona, C. A. and Sanchez, T. O. J. (2006). Energy consumption analysis of integated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy.* 31: 2111-2123.
4. Baptista, C. M. S. G., Oliveira, A. C. M., Oliviera, N. M. C., Rocha, J. M. S., Dempsey, M. J., Lannigan, K. C., and Benson, P. S. (2006). Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology.* 40: 127-131.
5. Goksungur, Y. and Zorlu, N. (2001). Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turk J Biol.* 25: 265-275.
۶. کرامت، ج و ملک، س (۱۳۸۰)، جدا کردن رنگ کاراملی از ملاس چقدر قند و بررسی ویژگی‌ها و کاربرد آن در

- molasses into ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(4): 988-989.
20. Peinado, R. A., Moreno, J. J., Villalba, J. M., Gonzalez-Reyes, J. A., Ortega, J. M. and Mauricio, J. C. (2006). Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 140: 457-459.
۲۱. میاهی پور، ع.، بنکدارپور، ب و بهرامی، ع. (۱۳۸۴). مقایسه رشد و تولید اتانول توسط مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در محیط‌های کشت حاوی ملاس‌های مختلف. دهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، دانشگاه سیستان و بلوچستان. صفحه ۴۴۴۸.
22. Phowchinda, O. and Strehaiano, P. (1999). Utilization of mixed sugars for alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Thammasat Int. J. Sci. Tech.* 4(2): 23-31.
15. Rollini, M., Manzoni, M. (2006). Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 41: 1501–1505.
16. Phisalaphong, M., Srirattana, N and Tanthapanichakoon, W. (2006). Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 28: 36–43.
17. 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. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 87-89.
18. Larsson, I.C., Lide, G., Blomberg, A., Niklasson, C. and Gustafsson, L. (1993). Monitoring and control of batch and fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* by calorimetry. *Pure and Appl. Chem.* (65)9: 1933-1937.
19. Park, Y.K. and Sato, H.H. (1982). Fungal invertase as an aid for fermentation of cane product yields during ethanol batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 289–297.