Archive of SID

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1392

مطالعه و بررسی تولید بوتانل به‌وسیله باکتری کلستریدیوم استوبوتیلیکام

مریم خیراندیش[1*]، محمد علی اسداللهی[2]، اعظم جیحانی پور[2]، کیخسرو کریمی[3]، حمید ریسمانی یزدی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان
2- عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان
3- عضو هیات علمی دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان
4- دانشیار، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه MIT، کمبریج، ایالات متحده آمریکا

* اصفهان، کد پستی 81746-73441
maryamkheyrandish@yahoo.com
(دریافت مقاله: 91/5/20 پذیرش مقاله: 93/1/30)

چکیده- با افزایش آگاهی در باره اثرات شدید و مضر آلودگی محیط زیست، گرمایش جهانی و محدودیت‌های سوخت‌های فسیلی، تلاش‌های زیادی برای تولید انرژی های تجدیدپذیر مانند اتانل و بوتانل صورت گرفته است. علاوه بر مصارف سوختی، در صنعت از بوتانل برای تولید نرم کننده‌ها، لیکور (لاک الکلی)، پوشش‌ها، پاک‌کننده‌ها و سیالات هیدرولیکی برای استفاده در ترمز اتومبیل‌ها استفاده می‌شود. بیوبوتانل صنعتی به وسیله فرایند تخمیر با استفاده از باکتری کلستریدیوم استوبیوتیلیکام در شرایط بی‌هوازی تولید می‌شود. بسته به طبیعت کربوهیدرات و مواد مغذی که در اختیار این باکتری قرار می‌گیرد، نسبت تولید حلال‌ها (استن، اتانل و بوتانل) متنوع است. در این پژوهش تأثیر نوع مواد مغذی و غلظت‌های مختلف گلوکز برای تولید بوتانل به‌وسیله این باکتری بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد که باکتری کلستریدیوم استوبوتیلیکام برای تولید حلال به ویتامین‌های بیوتین، تیامین و پارا آمینوبنزوئیک‌اسید و همچنین به حضور یون‌های منیزیم، آهن، منگنز، فسفات و آمونیوم استات به مقدار بسیار جزئی در کنار عصاره مخمر نیاز دارد و در عدم حضور این مواد، با وجود رشد مناسب باکتری، میزان حلال تولیدی به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد. همچنین غلظت گلوکز بهینه برای حداکثر تولید حلال 40 g/l است که در این غلظت حداکثر بوتانل تولیدی 6/7 g/l و حداکثر حلال تولیدی 10/5 g/l با بازده 25/26% می‌باشد.

کلیدواژگان: بوتانل، کلستریدیوم استوبوتیلیکام، تخمیر، مواد مغذی، غلظت گلوکز، شرایط بی‌هوازی.

1- مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش قیمت بنزین، افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای، کشمکش‌های مستمر در مناطق تأمین کننده نفت دنیا و کاهش منابع مربوط به سوخت‌های فسیلی، تحقیقات و تجاری‌سازی بر روی سوخت‌های بدست آمده از منابع تجدیدپذیر، مانند اتانل و بوتانل افزایش یافته است [1]. در این بین استفاده از بوتانل به عنوان سوخت، نیاز به تغییرات کمتری در موتور اتومبیل

www.SID.ir

Archive of SID

دارد و بر خلاف اتانل به هر نسبتی می‌تواند با بنزین ترکیب شود. استن نیز از حلال‌های مورد نیاز در کشور است که در حال حاضر بخش عمده آن به کشور وارد می‌شود. بیواتانل هم اکنون به عنوان یکی از مهم‌ترین سوخت‌های زیستی در بسیاری از کشورهای دنیا به صورت افزودنی و یا خالص برای سوخت وسایل نقلیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیوبوتانل که یک الکل 4کربنه مشتق شده از تخمیر زیست‌توده است، به عنوان یک سوخت زیستی مورد توجه قرار گرفته و مزایای زیادی نسبت به اتانل دارد. از جمله این مزایا می‌توان به مقدار انرژی بالاتر، فراریت پایین‌تر و خوردگی کمتر اشاره کرد [2]. همچنین در صنعت از بوتانل برای تولید نرم‌کننده‌ها، لیکور (لاک‌الکلی)، پوشش‌ها، پاک‌کننده‌ها و سیالات هیدرولیکی برای استفاده در ترمز ماشین استفاده می‌شود. در حال حاضر تقریباً 10-12 بیلیون پوند بیوبوتانل در سال تولید می‌شود [2]، که سهم ایران از این مقدار صفر است. صنعتی کردن تولید این ماده در کشور می‌تواند نقش زیادی در کاهش مشکلات ناشی از تأمین سوخت و همچنین اثرات مخرب زیست محیطی ناشی از استفاده از سوخت‌های فسیلی داشته باشد.

نیاز شدید به نرمال بوتانل به تحقیقات اساسی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های قادر به تولید این ماده به وسیله تخمیر منجر شده است. در سال 1911 فرندباخ[1] باکتری تولید کننده استن-بوتانل را جدا کرد، ولی محدوده مصرف سوبسترای این میکروارگانیسم کم و در نتیجه بازده تولید محصولات آن نیز کم بود [3]. در سال‌های 1912 تا 1914 چیم ویزمن[2] که به طور جداگانه بر روی این مسأله تحقیق می کرد میکروارگانیسمی را جدا کرد که سوبسترای نشاسته‌ای را تخمیر و قادر به تولید بوتانل و استن بیشتری بود [4]. این باکتری ابتدا نام دیگری داشت ولی بعدها به‌وسیله مک کوی[3] و همکارانش نام کلستریدیوم استوبوتیلیکام[4] گرفت [5]. باکتری‌ها و یوکاریوت‌های مختلفی توانایی تولید بیوبوتانل را دارند [6-8]. باکتری‌های کلستریدیا[5] به عنوان تولید کننده طبیعی بیوبوتانل شناخته می‌شوند ولی تنها گونه‌های معدودی از باکتری‌های کلستریدیا توانایی تولید مقادیر قابل توجهی از بوتانل طی تخمیر در شرایط مناسب را دارند. در میان گونه‌های کلستریدیا، کلستریدیوم استوبوتیلیکام رایج‌ترین گونه برای تولید بوتانل است [9]. کلستریدیوم استوبوتیلیکام برای رشد به مواد مغذی خاصی نیاز دارد [10،11] همچنین تولید حلال به حضور مواد مغذی و یا عدم حضور آنها وابسته است [10-13]. بسته به طبیعت کربوهیدرات و شرایط محیط کشت نسبت تبدیل حلال‌ها می‌تواند متفاوت باشد [10-12]. در این تخمیر محصول نهایی تخمیر یعنی بوتانل اثر ممانعت کنندگی دارد و بسته به طبیعت سوبسترا و مقدار آن، غلظت متفاوتی از بوتانل باعث توقف تولید می‌شود [14]. با تمام سختی این فرایند و شرایط ویژه‌ای که نیاز دارد به دلیل اینکه طرح جایگزینی بنزین با بوتانل در کشورهای توسعه یافته وجود دارد برای اقتصادی کردن این فرایند و یا یافتن سویه بهتری برای تولید این ماده همچنان تلاش‌های زیادی در حال انجام است.

در تحقیق حاضر تأثیر مواد مغذی موجود در محیط کشت و نیز غلظت گلوکز، زمانی که مواد مغذی در محیط وجود دارند، بر تولید بوتانل به‌وسیله باکتری استوبوتیلیکام بررسی شده است.

2- مواد و روش‌ها

تمامی مواد استفاده شده در این تحقیق به جز مواد استفاده شده در ساخت محلول ویتامین که از شرکت Sigma تهیه

1. Fernbach
2. Chaim Weizmann
3. McCoy
4. Clostridium Acetobutylicum
5. Clostridia

www.SID.ir

Archive of SID

شده است، محصول شرکت مرک آلمان هستند. همچنین دستگاه جذب نوری Biocrom (ساخت انگلستان) برای بررسی رشد استفاده شده است.

2-1- میکروارگانیسم، شرایط کشت، نگهداری و تخمیر

باکتری کلستریدیوم استوبوتیلیکام با شماره PTCC 1492 (معادل با باکتری NRRL B-591) به صورت پودر خشک[1] و منجمد شده از مرکز کلکسیون میکروبی ایران[2] تهیه و در اختیار این پروژه قرار گرفت. این باکتری در محیط کشت گوشت پخته[3] همراه با 15% گلیسرول در میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری در فریزر 80°C- نگه‌داری شد. 20 میلی‌لیتر محیط کشت حاوی (g/l): پپتون 3، عصاره مخمر 1 و غلظت‌های مختلف گلوکز (PGY) همراه با 0/005 (v/v) محلول 0/03 ، L- سیستئین در ویال‌های 60 میلی‌لیتری که قبل از تلقیح به‌وسیله گاز نیتروژنی که از ستون داغ مس (دمای 300 درجه سانتی‌گراد) عبور کرده بود (برای حذف کامل اکسیژن از گاز)، کاملاً بی‌هوازی شده بودند ریخته شد [15]، بعد از بی‌هوازی کردن ویال حاوی سیستئین، در 121 °C به مدت 20 دقیقه و ویال حاوی محیط در 115 °C به مدت 10 دقیقه اتوکلاو شدند. برای بررسی مواد مغذی 0/01 (v/v) از هر یک از محلول‌های بافر، ویتامین و معدنی (محلول‌های P2) که به‌وسیله فیلتر 0/2 میکرو استریل شده بودند، به ویال‌ها اضافه شد. تخمیر در شرایط کاملاً بی‌هوازی و به مدت 57 ساعت در دمای 37 °C و دور 160rpm با pH اولیه 6/8 انجام شد. در طول تخمیر برای اطمینان از بی‌هوازی بودن شرایط کشت از شناساگر رزازورین استفاده شد. این شناساگر در شرایط هوازی دارای رنگ صورتی است و با تغییر شرایط به شکل بی هوازی، رزازورین بی‌رنگ می شود [16]. همچنین با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم در ساعات مختلف تخمیر از مقداری از محیط کشت، به طور مستقیم لام تهیه گردید و از عدم آلودگی در محیط اطمینان حاصل شد.

2-2- محلول‌های P2

محلول بافر: این محلول شامل (گرم در لیتر): پتاسیم دی هیدروژن فسفات:50، دی پتاسیم هیدروژن فسفات:50، آمونیوم استات:220. محلول ویتامین این محلول شامل (گرم در لیتر): بیوتین: 0/001، تیامین: 0/1 و پارا آمینوبنزوئیک اسید: 0/1 محلول معدنی: این محلول شامل (گرم درلیتر): سولفات منیزیم هفت آبه:20، سولفات منگنز یک آبه:1، سولفات آهن دو ظرفیتی هفت آبه:1 و کلریدسدیم:1 می‌باشد.

2-3- روش آنالیز

حلال‌ها (استن، اتانل و بوتانل) و اسیدهای موجود در سوپرناتانت با کروماتوگرافی گازی[4] مجهز به آشکارساز FID و ستون Innowax اندازه‌گیری شدند. دمای آون از 80°C تا 170°C با سرعت 3°C/min افزایش یافت. دمای ورودی و آشکارساز در 250°C تنظیم شد. از هلیم به عنوان گاز حامل با شدت جریان 3 ml/min استفاده شد. استن، اتانل، بوتانل، استیک اسید و بوتیریک اسید به ترتیب در دقایق 3/5، 4، 6/9 ، 16/3 و 21/4 بعد از تزریق دیده می‌شوند.

3- نتایج

3-1- اثر غلظت گلوکز

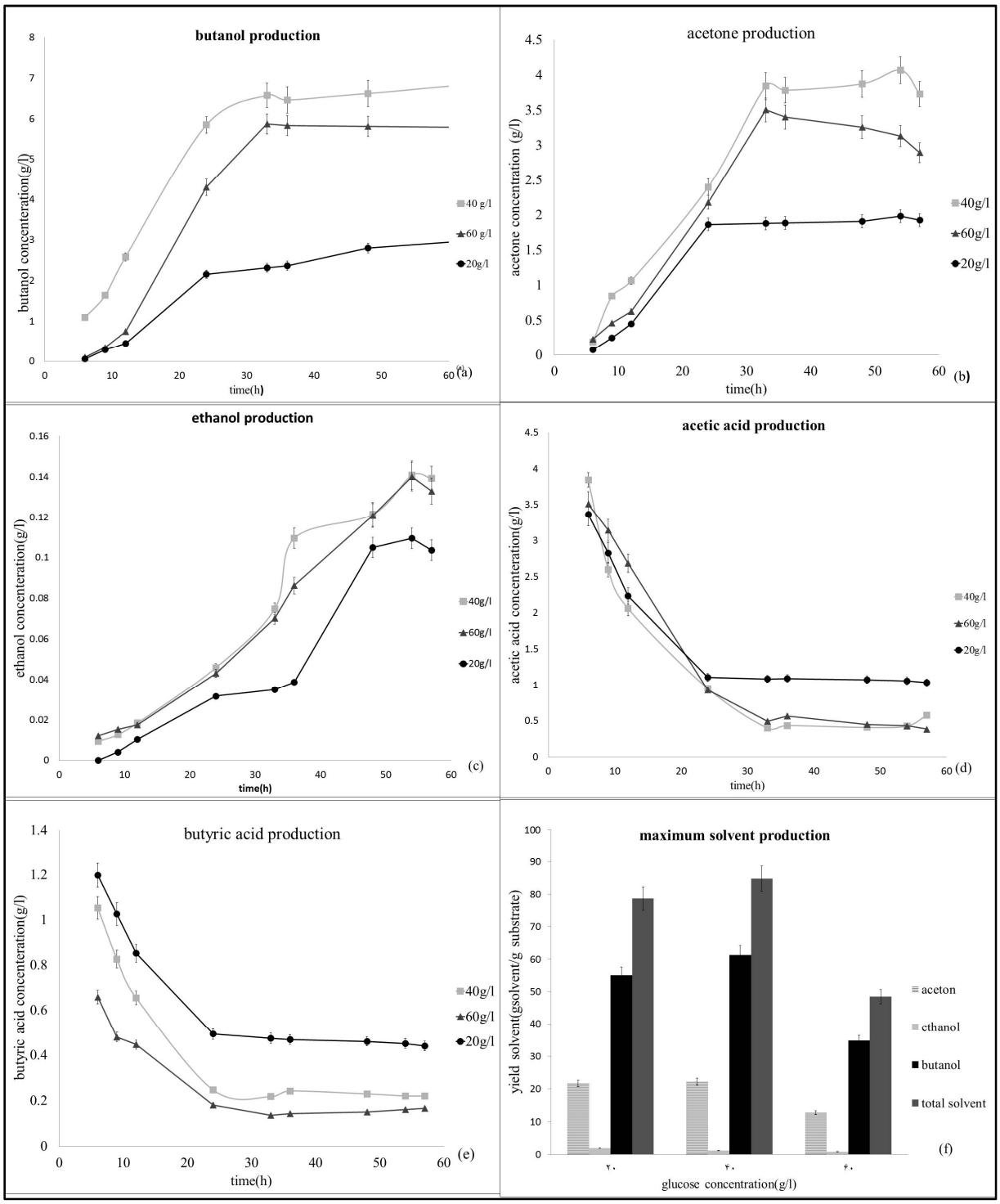
برای بررسی غلظت بهینه گلوکز، محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های 20 ، 40 و 60 گرم بر لیتر گلوکز در ویال‌های 60 سی‌سی تهیه گردید و با ثابت نگه داشتن سایر فاکتورهای مؤثر، میزان تولید بوتانل مقایسه شد. تمام

1. Freeze-Dried
2. Persian Type Culture Collection (PTCC)
3. Cooked Meat
4. Agilent Technologies 6890

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش‌ها با 2 تکرار همراه بودند. نتایج نشان داد که در غلظت 40 گرم بر لیتر از گلوکز حداکثر تولید حلال (11/1 گرم بر لیتر) وجود دارد (شکل 1)، در این غلظت مقدار بوتانل تولید شده نیز 6/8 گرم بر لیتر است که نسبت به مقدار تولید شده آن در غلظت‌های دیگر حداکثر می‌باشد.



شکل 1 a، b و c تولید حلال در غلظت‌های مختلف گلوکز، d و e تولید اسیدها و f حداکثر میزان تولید حلال در غلظت‌های مختلف گلوکز را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج همچنین نشان داد که در غلظت 20 گرم در لیتر از گلوکز نسبت تولید حلال تقریباً 50:1:49 به ترتیب (از راست)، استن، اتانل و بوتانل است. در غلظت 60 گرم در لیتر از گلوکز این نسبت‌ها تا حدودی به سمت تولید بوتانل افزایش یافت ولی در غلظت 40 گرم در لیتر نسبت‌ها در ساعات اولیه از 32:3:65 به سمت 62:1:37 پیش می‌رود. نمودارها نشان می‌دهد با افزایش میزان تولید حلال از مقادیر تولید اسیدها کاسته می‌شود (شکل 1). بیشینه اسید تولید شده در غلظت 20 گرم بر لیتر بود.

3-2- اثر وجود مواد مغذی

برای بررسی مواد مغذی از محیط PGY با غلظت قند 20 گرم بر لیتر استفاده شد. سپس محیط‌های PGY و PGY+P2 تلقیح و انکوبه شدند. به منظور بررسی رشد میکروارگانیسم در زمان‌های مختلف از محیط نمونه‌گیری گردید و چگالی بهینه آن در OD_{600} خوانده شد. تمام آزمایش‌ها با 4 بار تکرار انجام شدند. نتایج نشان داد که وجود محلول‌های بافر، ویتامین و معدنی برای تولید حلال ضروری بوده و در نبود آنها با وجود رشد کافی میکروارگانیسم، هیچ گونه حلالی تولید نمی‌شود، ولی در حضور محلول‌های p2 حلال تولید می‌گردد و با تغییر پارامترها، می‌توان تولید حلال را افزایش داد.

4- بحث و نتیجه‌گیری

اثر مواد مغذی و غلظت گلوکز به عنوان منبع کربن برای تولید بوتانل از باکتری کلستریدیوم استوبوتیلیکام بررسی شد. نتایج نشان داد که برای انتقال از فاز تولید اسید به فاز تولید حلال به مواد معدنی، بافر و ویتامین‌ها نیاز است. افزایش غلظت گلوکز در ابتدا باعث افزایش تولید بوتانل می‌شود ولی از یک غلظت مشخص، افزایش غلظت باعث کاهش تولید حلال شده است. این مسأله می‌تواند بدلیل اثر ممانعت کنندگی بوتانل [17،18] و همچنین به دلیل اثر ممانعت‌کنندگی گلوکز باشد. به‌خوبی ثابت شده است که بوتانل بر روی ساختار غشای باکتری تأثیر می‌گذارد و باعث تغییر در پروتئین‌های غشایی از قبیل انتقال دهنده‌های اجزا و کمپلکس ATPase می‌شود [19] و ممکن است با افزایش غلظت قند همراه با وجود بوتانل این پروتئین‌ها نتوانند گلوکز را وارد مسیر فسفو انول پیروات (PEP) برای جذب به‌وسیله باکتری کنند. یعنی با خارج کردن بوتانل از محیط باید توانایی استفاده از گلوکز و تولید محصول افزایش یابد.

5- منابع

[1] Edward M. G. (2011). Fermentative production of butanol-the industrial perspective. Current opinion in Biotechnology, 22, pp. 1-7.

[2] Kharkwal S., Karimi I.A., Chang M.W., Lee D.Y. (2009). Strain improvement and process development for biobutanol production. Recent Patents Biotechnology, 3, pp. 202-210.

[3] Jones, D.T., Woods, D.R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited, Microbiological Reviews, 50, pp. 484-524.

[4] Gabriel, C.L. (1928). Butanol fermentation process, Industrial and Engineering Chemistry, 20, pp. 1063-1067.

[5] McCoy E., Fred E.B., Peterson W.H. Hasting E.G. (1926). A cultural study of the acetone butyl alcohol organism, Journal of Infectious Diseases, 39, pp. 457-483.

[6] Jiang L., Wang J., Liang S.H., Wang X., Cen P., Xu Z.H. (2009). Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. Bioresource Technology, 100, pp. 3403–3409.

[7] Badr H.R., Toledo R., Hamdy M.K. (2001). Continuous acetone, ethanol, butanol fermentation by immobilized cells of Clostridium acetobutylicum. Biomass and Bioenergy, 20, pp. 119-132.

[8] Shamsudin S.,Yusoff W. (2006). duction of acetone, butanol and ethanol (ABE) by clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 with different immobilization systems. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9, pp. 1923-1928.

[9] Lee S.Y., Park J.H., Jang S.H., Nielsen L.K., Kim J., Jung K.S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia.

www.SID.ir

Archive of SID

Biotechnology and Bioengineering, 101, pp. 209-228.

[10] Frederic M., Jean-rene M., Henrt P., Robert G. (1982). Acetone and Butanol Production by Clostridium acetobutylicum in a Synthetic Medium. *Applied and* Enviromental Microbology, pp. 1318-1324

[11] مرادی ف. (2010). تولید بیولوژیکی استن، بوتانول واتانول از کاه برنج. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

[12] Bahl H., Gottwald M., Kuhn A., Rale V., Andersch W., Gottschalk G. (1986). Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by Clostridium acetobutylicum. Applied and Enviromental Microbology, 52, pp. 169-172.

[13] Soni B.K., Soucaille p., Goma G., (1987). Continuous acetone-butanol fermentation influence of vitamins on the metabolic activitiy of *Clostridium* acetobutylicum. Applied Microbiology and Biotechnology, 27, pp. 1-5.

[14] Ounine K., Petitdemange H., Raval G., Gay R.(1985). Regulation and Butanol Inhibition of D-Xylose and D-Glucose Uptake in Clostridium acetobutylicum. Applied and Enviromental Microbology, 49, pp. 874-878.

[15] Uchino Y., Ken-Ichiro S. (2011). A Simple Preparation of Liquid Media for the Cultivation of Strict Anaerobes, *Petroleum &* Environmental Biotechnology, 4, pp. 1-3.

[16] Dimitar K., Danka G., Ivan S.,(2003). A simple and rapid test for differentiation of aerobic from anaerobic bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19, pp. 233–238.

[17] Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. (2003). Production of butanol by Clostridium beijerinckii BA101 and in-situ recovery by gas stripping. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19, pp. 595–603.

[18] Qureshi N., Maddox I.S. (2005). Reduction in butanol inhibition by perstraction: Utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium* acetobutylicum to enhance butanol fermentation economics. Food and Bioproducts Processing, 83(C I), pp. 43-52.

[19] DU, P. (2001). Clostridia, Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim. pp. 50-51.

www.SID.ir