اثر تغییرات در مقدار ملاس و سلنیوم بر رشد مخمر *ساکارومایسس سروزیه* و میزان بیو-اتانول تولیدی

سارا فرامرزی[۱]، یونس انزابی[۲،۳*] و هدا جعفری‌زاده مالمیری[۴]

[۱] ایران، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی- گرایش میکروبیولوژی

[۲] ایران، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه پاتوبیولوژی

[۳] ایران، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

[۴] ایران، تبریز، دانشگاه صنعتی سهند، گروه مهندسی شیمی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۲۴

چکیده

امروزه بیواتانول به عنوان سوخت جایگزین برای کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی استفاده شده و امنیت انرژی را تضمین و تاثیرات منفی مصرف سوخت‌های فسیلی را به اقتصاد و محیط زیست کاهش می‌دهد. ملاس هم که به دلیل محتوای قندهای قابل اشتعال می‌تواند بدون هیچ تغییری به طور مستقیم برای عمل تخمیر مورد استفاده قرارگیرد، ماده بسیار خوبی برای تولید بیواتانول محسوب می‌شود. مخمر یک حامل مناسب برای بیوترانسفورماسیون سلنیوم بوده و یکی از اقتصادی‌ترین منابع سلنیوم آلی هم، مخمر رشد یافته در محیط کشت غنی شده با سلنیوم می‌باشد. لذا هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی اثر سلنیوم بر عملکرد تولید بیواتانول با بالاترین غلظت با استفاده از مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* و ملاس بود. بدین منظور سویه صنعتی مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* (SFO_6) با استفاده از بریکس‌های متفاوت ملاس به عنوان سوبسترا و کود اوره با غلظت ۲۵۰ppm و کود سوپرفسفات تری‌پل با غلظت ۵۰۰ppm به عنوان مواد مغذی تامین‌کننده منبع فسفر و نیتروژن و نیز با اضافه کردن مقادیر مختلف سلنیوم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری لازم، تاثیر مقادیر مختلف سلنیوم و ملاس بر رشد مخمر مذکور براساس میزان بیواتانول تولیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که حداکثر غلظت بیواتانول تولید شده (۸۰گرم در لیتر) با استفاده از بریکس ۲۵درصد ملاس چغندر قند و مقدار ۲۰ میکروگرم سلنیوم به دست می‌آید. لذا به نظر می‌رسد که سویه صنعتی مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* گزینه مناسبی برای افزایش راندمان تولید بیواتانول از ملاس چغندرقند غنی‌شده با سلنیوم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیواتانول، ملاس، *ساکارومایسس سروزیه*، سلنیوم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۱۳۴۱۳، پست الکترونیکی: anzabi@iaut.ac.ir

مقدمه

با توجه به کاهش منابع سوخت فسیلی، نیاز به منابع انرژی تجدیدپذیر که دارای قیمت مناسب بوده و فاقد آلودگی باشند، احساس می‌شود. 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 به جای MTBE (Methyl Tert-Butyl Ether) در بنزین و همچنین به عنوان حامل اکسیژن در گازوئیل به کار رود که سبب اکسیداسیون بهتر هیدروکربن‌ها و کاهش مقدار آلودگی گازهای رها شده به اتمسفر می‌شود (۹و۱۴). اتانول می‌تواند از ملاس نیشکر و

چغندرقند و هیدرولیز اسیدی نشاسته برخی از حبوبات از قبیل ذرت به دست آید که البته استفاده از ملاس کارخانجات چغندر قند به دلیل داشتن خاکستر و قند اینورت کمتر دارای مزیت نسبت به ملاس نیشکر می-باشد(۷). با توجه به این‌که ملاس تولیدی در جهان به بیش از ۳۵ میلیون تن و در ایران هم به بیش از ۳۲۰ هزار تن در سال می‌رسد، به همین دلیل این ماده که یکی از فراوان‌ترین پسماندها در صنایع تولید قند می‌باشد، در حال حاضر یکی از ارزان‌ترین منابع قندی محسوب می‌شود (۶).

در چند دهه گذشته، تولید اتانول با استفاده از فرایند میکروبی مورد توجه قرارگرفته است (۱۱). میکروارگانیسم‌های مختلفی نظیر *ساکارومایسس‌سروزیه*، گونه‌های کاندیدا و کلستریدیوم و نیز *زایمومونَاس-موبیلیس*، مناسب برای تبدیل میکروبی سلولز از راه تخمیر و تولید اتانول هستند. دمای بهینه برای رشد و تولید اتانول در مورد مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه*، ۳۰درجه‌سلسیوس می‌باشد درحالی که دماهای بالاتر از ۳۸-۳۵ درجه سلسیوس نیز برای این مخمر قابل تحمل می‌باشد. اهمیت این امر زمانی بیشتر نمایان می‌شود که توجه گردد که دماهای بالا، سرعت رشد، بازده اتانول و سرعت مرگ و میر مخمرها را تاثیر قرار می‌دهد (۱۹). همچنین در شرایط هوازی هم مخمر *ساکارومایسس سروزیه* به خوبی رشد می‌کند ولی مقدار کمتری الکل تولید می‌شود درحالی‌که تحت شرایط بی‌هوازی رشد این مخمر آهسته شده و پیروات موجود در مسیر کاتابولیکی توسط آنزیم پیروات دکربوکسیلاز به استالدئید و CO_2 تبدیل شده و در نهایت هم استالدئید به کمک $NADH_2$ احیا و به اتانول تبدیل می-شود. لازم به ذکر است که رشد این مخمر و تولید اتانول توسط آن، در محلول‌های با فشار اسمزی بالا متوقف می-شود که این عمل توقف رشد، در غلظت‌های بالای اتانول نیز صورت می‌پذیرد (۱۱و۱۰).

سلنیوم یکی از عناصر شیمیایی شبه‌فلزی است که خصوصیات فلزها و غیرفلزها را با هم دارد و همین موضوع در بحث سلامت و تغذیه انسان اهمیت خاصی را به این عنصر می‌دهد . شکل بیولوژیکی فعال سلنیوم، سلنوپروتئینی بنام گلوتاتیون‌پراکسیداز می‌باشد که آنزیمی است که در تجزیه هیدروپراکسیدهای آلی و آب اکسیژنه دخالت می‌نماید. امروزه تقاضای روز افزون برای استفاده از مکمل‌های سلنیوم به ویژه سلنیوم آلی وجود دارد به-طوری‌که با الگوبرداری از طبیعت در ساختار آمینواسیدهای گوگرددار پیکره مخمرها، سلنیوم جایگزین گوگرد می‌شود. از طرف دیگر تحقیقات مختلف نشان داده که برخی از میکروارگانیسم‌ها مخصوصا مخمرها می‌توانند با بهره‌گیری از قندهای محلول و اسیدهای آلی، توده سلولی با محتوای بالای پروتئینی تولیدکنند. در ضمن این موجودات می‌توانند سلنیوم معدنی را که دسترسی زیستی کمتری دارد و نیز بالقوه سمی است را به فرم آلی آن که ایمن‌تر بوده و از نظر زیستی نیز فعال‌تر است، تبدیل کنند. بنابراین مخمرها به عنوان یک حامل مناسب برای بیوترانسفورماسیون سلنیوم نیز محسوب می‌شوند(۸و۱۳).

با توجه به اهمیت روز افزون تولید بیولوژیکی بیواتانول و نیز مزایای ذکر شده از سلنیوم، در تحقیق حاضر به منظور افزایش راندمان تولید بیواتانول، بر آن شدیم که محیط کشت سویه صنعتی مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* را با استفاده از مقادیر مختلف سلنیوم غنی‌سازی کرده و شرایط بهینه تولید بیواتانول با غلظت بالا را ایجاد کنیم.

مواد و روشها

مخمر و ترکیبات استفاده شده در تحقیق: برای انجام تحقیق حاضر از سویه صنعتی مخمر *ساکارومایسس سروزیه* (سویه SFO6) استفاده شد که از شرکت ایران مایه (تهران-ایران) تهیه شده‌بود، استفاده گردید. همچنین به منظور غنی‌سازی محیط کشت مخمر مذکور از نمک سلنیت‌سدیم (مرک- آلمان) استفاده‌شد. کودهای اوره و فسفات لازم برای محیط کشت مذکور نیز از کارخانه

الکل‌سازی بیدستان قزوین (قزوین–ایران) تهیه شد. ملاس چغندر قند مورد نیاز هم به عنوان محیط رشد مخمر، به مقدار لازم از کارخانه قند خوی خریداری گردید. همچنین برای تنظیم میزان pH محیط کشت مذکور از اسیدسولفوریک۳۰درصد (مرک– آلمان) استفاده شد. دمای گرمخانه‌گذاری محیط کشت نیز ۳۰درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات انجام گرفته در تحقیق حاضر در دما و pH اپتی‌مم برای سویه صنعتی مخمر *ساکارومایسس سروزیه* انجام شده‌است.

خصوصیات فیزیکی ملاس استفاده شده در تحقیق حاضر در جدول شماره۱ ارائه شده‌است.

جدول ۱ – خصوصیات فیزیکی ملاس استفاده شده در فرآیند تخمیر در تحقیق حاضر

Parameter	Value
Density	1.385×10^3 (kg/m^3)
Ash	9.6% (w/w)
pH	6.16
Total reduced sugar	48.65% (w/w)
Brix	74.07 (°Bx)

آزمون بررسی زمان رشد مخمر: هدف از انجام این آزمون، دست یافتن به زمان ورود مخمر مورد آزمایش به فاز لگاریتمی رشد بود که در این صورت حداقل زمان لازم برای تهیه مایه تلقیح مورد نیاز برای افزودن به محیط کشت به دست می‌آمد. در واقع سنجش میزان کدورت محیط کشت مخمر مورد آزمایش به منظور تعیین فاز رشد لگاریتمی آن در دو بریکس ۱۰ و ۱۵ ملاس انجام یافت تا در زمان انتقال مایه تلقیح به سوبسترا، مخمر در فاز رشد خود قرار داشته باشد. لازم به ذکر است که برای بررسی تاثیر سلنیوم بر رشد مخمر، این آزمون یک بار بدون استفاده از سلنیوم و بار دیگر هم با استفاده از سلنیوم انجام پذیرفت. بدین منظور ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب ملاس مورد نظر به وسیله دستگاه اتوکلاو (RT-1, REYHAN TEB) در دمای ۱۲۱درجه سلسیوس و فشار ۱/۵بار به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. سپس بریکس آن توسط دستگاه رفراکتومتر (Instrument Index Ltd.، Kissimmee، FL، USA) برای دو مقدار ۱۰ و ۱۵ به طور جداگانه تنظیم شد. همچنین pH محلول‌ها نیز با استفاده از اسید سولفوریک به میزان ۴/۲ تنظیم شد. سپس مقدار ۰/۳ گرم از پودر مخمر مورد آزمایش به فلاکس حاوی آب ملاس مذکور اضافه شد. همچنین همزمان کودهای اوره و آمونیوم تری‌پل فسفات نیز به ترتیب به میزان ۵۰۰ و ۲۵۰ ppm اضافه گردید. در ادامه مخلوط حاصله درون گرمخانه شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. همزمان با رشد مخمر، میزان جذب نوری آب ملاس در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر (Jenway- UV- Vis- Spectrophotometer 6705, Staffordshire,UK) در بازه‌های زمانی یک ساعته اندازه-گیری شد. این آزمون در سه تکرار انجام و نمودار مربوطه ترسیم شد. در مرحله بعد میزان رشد مخمر در حضور سلنیوم بررسی شد که بدین منظور آب ملاس با بریکس ۱۵ را به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه کرده و pH آن نیز با استفاده از اسید سولفوریک به میزان ۴/۲ تنظیم گردید. سپس مقدار ۰/۳ گرم از پودر مخمر مورد نظر وزن شده و به فلاکس حاوی آب ملاس مذکور اضافه شد. همچنین همزمان کودهای اوره و آمونیوم تری‌پل فسفات نیز به ترتیب به میزان ۵۰۰ و ۲۵۰ ppm و نیز سلنیوم با مقادیر ۳۰–۲۵–۲۰–۱۵–۱۰–۸–۶–۴–۲–۰ میکروگرم به فلاکس‌ها اضافه گردیده و درون گرمخانه شیکردار با دمای ۳۰ درجه‌سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده‌شدند. میزان جذب این نمونه‌ها نیز با دستگاه اسپکتوفتومتر مذکور در بازه‌های زمانی یک ساعته اندازه گیری شده و نمودار مربوطه آن‌ها نیز ترسیم شد.

محاسبه مقدار بهینه میزان سلنیوم موجود در محیط کشت برای تولید بیواتانول توسط مخمر: این آزمایش با هدف یافتن مقدار بهینه سلنیوم برای تولید بیواتانول انجام پذیرفت. برای انجام این عمل۶۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مخمر (شامل ملاس با بریکس ۱۵ و مقادیر مشخص از کودهای اوره و آمونیوم تری پل فسفات که در قسمت قبل

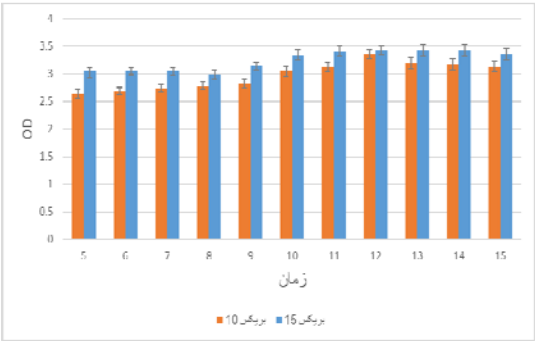
توضیح داده‌شده) با استفاده از استوانه مدرج برداشته شده و به فلاکس حاوی ۱۴۰ میلی‌لیتر آب ملاس با بریکس۱۰ انتقال داده شد. سپس مخلوط مذکور به گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سلسیوس انتقال داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، هوادهی متوقف شده و شرایط بی هوازی برای مخمر آماده شد. به این صورت فلاکس‌های تخمیر با حجم ۲۰۰ میلی-لیتر آماده شد به طوری‌که ۱۴۰ میلی‌لیتر از آن مربوط به آب ملاس و ۶۰ میلی‌لیتر آن‌هم مربوط به محیط کشت با مقادیر متفاوت سلنیوم (۲۵-۲۰-۱۵-۱۰-۵-۰ میکروگرم) بود. برای سنجش الکل تولیدی به روش هیدرومتری هم ابتدا ۲۰۰میلی‌لیتر از نمونه تخمیرشده را برداشته و به بالن تقطیر انتقال دادیم. سپس چند عدد سنگ جوش (برای توزیع دما به طور یکنواخت) درون محلول ریخته شد. الکل درون محلول بر اساس اختلاف دمای جوش آب و الکل تقطیر شده و درون بالن ژوژه با حجم ۱۰۰میلی‌لیتر منتقل گردید. سپس الکل به دست آمده، در درون بالن ژوژه به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه محلول مذکور به درون استوانه مدرج ریخته‌شده و به دمای ۲۰ درجه سلسیوس رسانده‌شد. (لازم به ذکر است که محدوده دمایی عملکرد الکل‌متر برای نشان دادن میزان الکل تولید شده، ۲۰ درجه سلسیوس می‌باشد). در نهایت هم میزان الکل موجود در محلول مذکور، توسط دستگاه الکل‌متر معین گردید.(۱۸)

بررسی تاثیر بریکس بر تولید بیواتانول توسط مخمر: بعد از انجام آزمایشات مربوط به تعیین میزان بهینه سلنیوم و با علم به تاثیر این ماده بر رشد مخمر و تولید بیواتانول، مقدار ۲۰ میکروگرم از سلنیوم انتخاب شد و ادامه آزمایشات برای تعیین میزان بهینه بریکس، با استفاده از آن انجام گرفت. در این مرحله آب ملاس را با بریکس‌های-۳۰-۲۵-۲۰-۱۵-۱۰ (از هر کدام به میزان ۱۰۰میلی‌لیتر) تهیه کرده و pH آن‌ها را نیز با استفاده از اسید سولفوریک به میزان ۴/۲ تنظیم کردیم. سپس مقدار ۰/۳ گرم از پودر مخمر مورد نظر وزن شده و به فلاکس حاوی آب ملاس مذکور اضافه شد. همچنین همزمان کودهای اوره و آمونیوم تری‌پل فسفات نیز به ترتیب به میزان ۵۰۰ و ۲۵۰ و همین طور سلنیوم با مقدار بهینه ۲۰میکروگرم، به مجموعه اضافه شد. سپس به منظور آماده سازی نمونه‌ها برای تخمیر، همانند مرحله قبل به نسبت ۳۰ به ۷۰ از محیط کشت و نمونه استفاده شد. در ادامه نمونه‌های مذکور به گرمخانه - شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس انتقال داده شدند که بعد از ۲۴ ساعت هوادهی، این عمل متوقف شده و در فلاسک‌های فوق شرایط بی‌هوازی مهیا گشت. بعد از گذشت یک هفته از شرایط بی‌هوازی ایجاد شده، میزان الکل تولید شده در هر یک از نمونه‌ها(آب ملاس با بریکس‌های مختلف)، براساس همان روش ذکر شده در قسمت قبل، سنجیده شد.

نتایج

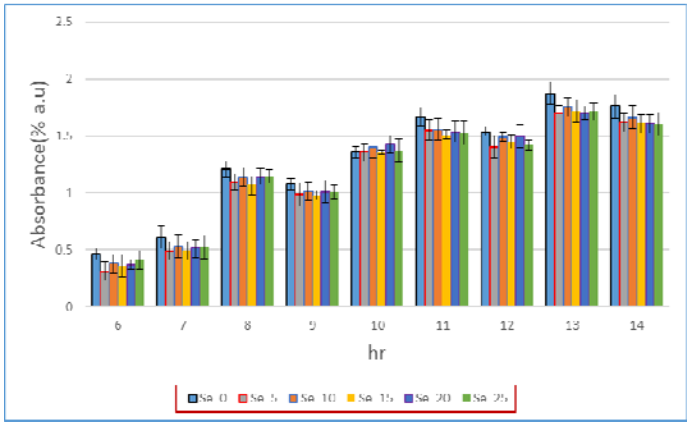
میزان رشد مخمر *ساکارومایسس سروزیه* در غلظت‌های مختلف ملاس: با توجه به این‌که مطابق نتایج ارائه شده در نمودار شماره۱ تحقیق حاضر مشخص گردید که مخمر مورد آزمایش، حداکثر طی ۱۴ساعت وارد فاز لگاریتمی شده‌است لذا این زمان برای تزریق مایه تلقیح انتخاب شد.

نمودار زیر روند تغییرات رشد سلولی در زمان سپری شده را نمایش می‌دهد. همانطور که در این نمودار مشخص شده در زمان‌های پایین اختلاف آماری معنی‌دار نبوده ($p>0.05$) اما در زمان‌های بالا اختلاف مذکور معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).



نمودار ۱ – روند تغییرات رشد مخمر در بریکس‌های ۱۰و ۱۵ ملاس

همانطور که در بخش روش کار عنوان شده‌است، برای تعیین فاز رشد لگاریتمی مخمر مورد آزمایش، بررسی رشد مخمر با نمونه‌های فاقد سلنیوم انجام گرفت اما در مرحله دوم کار، مشابه همان آزمایش ولی با حضور سلنیوم در محیط، رشد مخمر مورد بررسی قرار گرفت که نتایج تاثیرات این ماده بر روی رشد مخمر در نمودار شماره۲ تحقیق حاضر مشاهده می‌شود. همانطورکه در این نمودار هم مشاهده می‌شود در زمان‌های پایین اختلاف آماری مشاهده شده معنی‌دار می‌باشد($p<0.05$) درحالی‌که در زمان‌های بالا اختلاف مذکور معنی دار نمی‌باشد($p>0.05$). در واقع براساس نتایج ارائه شده در نمودار مذکور به نظر می‌رسد که ممکن است سلنیوم حالت بازدارنده‌ای بر روی رشد مخمر در قسمتی از مرحله رشد آن داشته است اما تاثیر مثبتی بر افزایش بیواتانول تولیدی دارد.



نمودار ۲ – بررسی میزان رشد مخمر در حضور مقادیر مختلف سلنیوم در محیط کشت

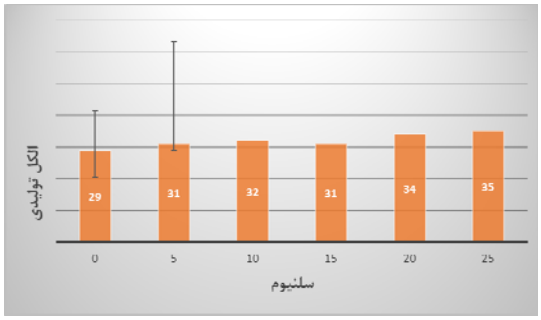
لازم به ذکر است که علی‌رغم این‌که نمودارهای ۱و۲ نشان می‌دهند که مخمر مورد آزمایش حتی قبل از طی شدن ۱۴-ساعت وارد فاز لگاریتمی شده‌است اما برای اطمینان بیشتر در طول این تحقیق زمان رشد لگاریتمی مخمر ۱۴ساعت در نظر گرفته‌شد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات مذکور مشخص گردید که سلنیوم تاثیر منفی بر روی رشد مخمر نداشته و زمان ۱۴ ساعت برای ورود به فاز رشد در این قسمت نیز مشاهده گردید.

از طرف دیگر یافته‌های پژوهش حاضر مطابق نتایج ثبت شده در جدول شماره ۲ مشخص کرد که افزایش میزان کدورت با گذشت زمان هوادهی نشان از رشد مخمر دارد.

جدول ۲ – نتایج کدورت‌سنجی مربوط به رشد مخمر *ساکارومایسس سروزیه* در حضور مقادیر مختلف سلنیوم در محیط

	OD = ۶۲۵nm					
Time	Se=0	Se=5	Se=10	Se=15	Se=20	Se=25
6	0/46	0/31	0/38	0/36	0/37	0/41
7	0/611	0/491	0/532	0/494	0/515	0/528
8	1/21	1/095	1/14	1/068	1/142	1/148
9	1/078	0/988	1/014	0/982	1/011	1/008
10	1/358	1/357	1/405	1/36	1/429	1/373
11	1/67	1/552	1/559	1/513	1/54	1/527
12	1/539	1/406	1/494	1/453	1/498	1/423
13	1/872	1/707	1/756	1/721	1/704	1/717
14	1/762	1/618	1/667	1/61	1/608	1/606

نتایج مربوط به روند تولید الکل در قبال حضور مقادیر مختلف سلنیوم در محیط: نمودار شماره ۳ نتایج تحقیق حاضر، حاکی از آن است که نمونه فاقد سلنیوم میزان ۲۹ گرم بر لیتر الکل اتیلیک (بیواتانول) تولید کرده‌است که در مقایسه با میزان الکل تولیدی در مورد نمونه‌های حاوی ۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵ میکروگرم بر لیتر سلنیوم در بریکس ۱۵-ملاس (به ترتیب ۳۱،۳۲،۳۱،۳۴،۳۵ گرم برلیتر)، میزان کمتری می‌باشد که این یافته مهم نشانگر اختلاف آماری معنی‌دار بوده ($p>0.05$) و نشان می‌دهد که وجود سلنیوم تاثیر مثبتی در رشد سویه صنعتی آزمایش شده مخمر *ساکارومایسس‌سرویزیه* داشته و همچنین در بهبود روند تولید الکل نیز موثر بوده‌است. در واقع نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش مقدار سلنیوم، میزان الکل تولیدی هم به طور معنی‌داری افزایش یافت($p>0.05$).



نمودار۳- منحنی تغییرات تولید بیواتانول(گرم درلیتر) در قبال مقادیر مختلف سلنیوم(میکروگرم بر لیتر)

روند تولید الکل در قبال استفاده از درصدهای مختلف ملاس: بر اساس فرمول استکیومتریک تبدیل گلوکز به اتانول درفرآیند تخمیر، یک مول گلوکز به ۲ مول دی-اکسیدکربن (که از سیستم خارج می‌شود) و ۲ مول اتانول تبدیل می‌شود: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH+2CO_2$ که این پدیده کاهش وزن را به دنبال دارد ولی می‌تواند میزان تولید اتانول را افزایش دهد. هر گرم از گلوکز به صورت تئوریک می‌تواند ۰/۵۱ گرم اتانول تولید کند بنابراین ۵۰درصد از گلوکز به اتانول و ۵۰درصد از آن به دی-اکسیدکربن تبدیل می‌شود. در تحقیق حاضر برای رسیدن به نقطه بهینه بریکس، مقادیر مختلف آن با درصدهای ۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵ مورد آزمون قرار گرفت که با توجه به نتایجی که در نمودار شماره ۴ ارائه شده، مشخص‌گردید که با افزایش غلظت ملاس، میزان تولید اتانول نیز افزایش چشمگیری داشته‌است به طوری میزان الکل تولیدی به ترتیب برای نمونه‌های ذکر شده ۴۰،۵۹،۸۰،۳۰،۳۴ ثبت گردید. در واقع هماهنگی بین کاهش غلظت قند کل با تولید بیشتر الکل بیانگر مصرف قند توسط مخمر و تولید بیواتانول می‌باشد. در واقع نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش میزان بریکس ملاس، الکل تولیدی هم به طور معنی‌داری افزایش یافته‌است($p>0.05$).

نمودار۴- منحنی تغییرات تولید بیواتانول در قبال استفاده از درصدهای مختلف ملاس

بحث و نتیجه‌گیری

شقاقی و همکاران در سال ۱۳۹۷ به بررسی قابلیت تولید الکل توسط ۵ نوع مخمر تجاری با استفاده از غلظت‌های مختلف ملاس به عنوان سوبسترا و کود اوره و دی آمونیوم فسفات به عنوان مواد ریز مغذی پرداختند که طبق نتایج بدست آمده دو سویه مخمر NCYC ۴۱۰۹ با میزان تولید الکل۵۹/۱۴g/L و SFO6 با میزان تولید الکل۵۸/۶۷g/L مخمرهای برتری از لحاظ تولید الکل معرفی شدند(۱۸). نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر هم در راستای تحقیق مذکور می‌باشد که نشان داد مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* سویه SFO6 راندمان تولید بیواتانول بالا یعنی برابر با g/L-۵۵ دارد که میزان قابل توجهی می‌باشد. حسنی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۵ مطالعه‌ای را تحت عنوان مقایسه تولید

اتانول از ملاس بوسیله *زایمومونا‌س‌موبیلیس* و *ساکارومایسس‌سرویزیه* انجام دادند. در این تحقیق، باکتری *زایمومونا‌س موبیلیس* از کشت عصاره تخمیر شده انگور بر روی محیط کشت حاوی ۱درصد نیستاتین در شرایط هوازی و دمای۳۰ درجه سلسیوس جداسازی و با استفاده از رنگ آمیزی گرم، آزمایشات بیوشیمیایی و رشد در حضور ۷درصد اتانول و نهایتاً ریبوتایپینگ شناسایی شد. همچنین برای بررسی میزان اتانول تولیدی از محیط ملاس ۱۰درصد استفاده گردید. میزان اتانول تولیدی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت در محیط مذکور، برای *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ATCC 10988، *Zymomonas mobili* subsp. *mobilis* IRMH52 و *ساکارومایسیس‌سرویزیه* به ترتیب برابر با ۱/۴۵، ۳/۴ و۵/۰۵ درصد بود (2) که نتایج تحقیق مذکور ضمن داشتن همخوانی با نتایج پژوهش حاضر، همچنین حاکی از صحت انتخاب میکروارگانیسم مناسب در این پژوهش می-باشد. همچنین قربانی و همکاران در سال ۱۳۸۸ سنتز زیستی اتانول توسط مخمر -(*Saccharomyces cerevisiae* PTCC5010) را با استفاده از ملاس نیشکر به عنوان سوبسترا، با روش ناپیوسته بررسی کردند. در این تحقیق، تخمیر در دمای محیط (۲۵درجه سلسیوس) و در pH ۴/۵ انجام یافت. همچنین از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گرم بر لیتر ملاس به عنوان منبع کربن جهت تخمیر استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان بیواتانول تولیدشده با افزایش غلظت ملاس افزایش یافته و بیشترین مقدار آن در فرآیند تخمیر پس از ۳۶ ساعت و با مصرف ۹۳/۲۷درصد از قندکل موجود در ملاس ۵۰ گرم بر لیتر به میزان ۹/۳ گرم بر لیتر ملاس و همچنین بیشترین میزان بازده تولید اتانول، به میزان ۰/۲۴ برگرم قندکل بوده‌است(۵). یافته‌های تحقیق حاضر هم در این خصوص ضمن تطابق کلی با نتایج پژوهش مذکور، حتی نتایج بهتری در زمینه بالا بردن راندمان تولید بیواتانول نشان داد که در نمودار شماره ۴ مشاهده می‌گردد.

درویشی و همکاران در سال ۱۳۹۷ تحقیقی با عنوان جداسازی سویه صنعتی ساکارومایسس سرویزیه با قابلیت تحمل بالا به اتانول از کارخانه های الکل سازی ایران انجام دادند که در آن با آزمایشهای ریختشناسی، بیوشیمیایی و مولکولی تایید کردند که سویه صنعتی مخمر جدا شده با ویژگیهای مناسب از لحاظ تولید و تحمل به اتانول میتواند برای مطالعات بعدی و افزایش تولید با روشهای بهینه سازی در سطح ارلن و بیوراکتور بکار رود (۳). این نتایج همگام با تحقیق حاضر بوده و نشان می دهد که مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه گونه مناسبی برای تولید بیواتانول می باشد.

زاهد و همکاران در سال ۱۳۹۴ در تحقیقی با عنوان بهینه سازی منبع ازت و میزان اکسیژن محلول برای تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا تروپیکالیس با بدست آوردن این نتایج که سویه منتخب *S. cerevisiae* در محیط کشت حاوی قند گلوکز (۱۴۰ گرم در لیتر)، توانایی تولید ۶۶ گرم در لیتر اتانول با بازدهی ۴۷/۰ (گرم اتانول تولید شده نسبت به گرم گلوکز استفاده شده) را دارد و سویه منتخب *C. tropicalis* نیز در محیط کشت حاوی (۲۰ گرم در لیتر زایلوز) قابلیت تولید حدود ۱۰ گرم در لیتر زایلیتول با بازدهی ۴۹/۰ (گرم زایلیتول تولید شده نسبت به گرم زایلوز استفاده شده) را دارد(۴). نتایج این تحقیق ضمن تطابق با تحقیق حاضر انتخاب صحیح مخمر ساکارومایسس‌سرویزیه را به عنوان گزینه مطلوب برای تولید بیواتانول نشان می د هد.

در سال ۲۰۰۸ کارپ و همکاران هم با هدف گسترش فرایند اقتصادی تولید بیواتانول از ملاس سویا، پژوهشی را در سطوح آزمایشگاهی و صنعتی انجام دادند. نامبردگان با انتخاب سویه‌ای از مخمر *ساکارومایسس‌سرویزیه* و سوبسترای ملاس سویا با غلظت مواد جامد حل شدنی ۳۰درصد(w/v) و بدون تنظیم اولیه pH و فراهم‌کردن مواد

مغذی معدنی برای محیط کشت، پارامترهای سینتیکی تولید بیواتانول را بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بهره‌وری تولید بیواتانول(g/Lh) ۸/۰۸ و میزان بازده محصول تولیدی به قند مصرفی ۴۵ درصد و میزان بازده بیومس تولیدی به قند مصرفی ۰/۸۱۵درصد در سطح آزمایشگاهی می‌باشد(۱۷). نتایج این تحقیق هم ضمن این-که انتخاب میکروارگانیسم مناسب برای تولید بیواتانول در تحقیق حاضر را تایید می‌کند، همچنین نشان می‌دهد که منطبق با یافته‌های پژوهش حاضر، بهینه‌سازی دما و pH و میزان سوبسترای مصرفی باعث بالاتر رفتن میزان تولید بیواتانول می‌گردد. لایس و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ با انجام پژوهشی به منظور بهینه سازی فرایند تولید بیواتانول برای کم کردن زمان تخمیر و رسیدن به غلظت بالائی از محصول فوق، اثر متغیرهای دما، غلظت مایه تلقیح و غلظت اولیه ساکاروز محیط کشت را با طراحی آزمایش به روش طراحی مرکب مرکزی بررسی کردند. با انجام این آزمایش مقادیر بهینه به‌دست آمده از مدل برای متغیرها، میزان ۲۰۰ گرم بر لیتر غلظت اولیه ساکاروز و مقدار ۴۰ گرم بر لیتر از میزان اولیه مایه تلقیح و دمای ۳۰ درجه سلسیوس را نشان داد. نامبردگان با استفاده از این مقادیر در پژوهش خود به میزان بیشینه بیواتانول به مقدار۸۰ گرم بر لیتر رسیدند که همخوانی با صحت مدل تحقیق حاضر را نشان می‌دهد(۱۲). همچنین نوفمل و همکاران در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، بهبود میزان تولید اتانول توسط مخمر *ساکارومایسس‌سرویزیه* را با بکارگیری آزمایشی به منظور پیدا کردن میزان بهینه مخمر هیدرولیز شده و اوره به عنوان منبع مغذی بررسی کردند. نامبردگان در طرح آزمایش انجام گرفته به این نتیجه رسیدند که میزان بهینه تولید بیواتانول در دمای ۳۵درجه سلسیوس و با غلظت مخمر هیدرولیز شده ۵ گرم برلیتر و اوره به میزان ۳ گرم برلیتر، حداکثر به مقدار(m/v) ۷ تا ۸ درصد با بهره‌وری ۷۶/۳ درصد خواهد رسید(۱۶). نتایج تحقیق حاضر هم حاکی از آن است که افزودن کودهای اوره و فسفات به عنوان ریز مغذی به محیط کشت مخمر، تاثیر مثبتی در رشد آن و نهایتا تولید بیواتانول داشته است به-طوری که میزان بیواتانول تولیدی به بیش از ۵۵ گرم درلیتر افزایش پیدا کرد.

موزدیاک و همکاران در سال ۲۰۱۷ درباره استفاده از مخمرها و دیگر میکروارگانیسم‌ها برای سنتز نانوذرات-سلنیوم، پژوهشی مروری را انجام دادند که طی این تحقیق مشخص گردیدکه اکثر مطالعات در این زمینه بر روی سویه‌های مختلف مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* بوده‌است چرا که این مخمر توانایی و ظرفیت جمع آوری مقادیر بالای سلنیوم در طی مرحله رشد را داراست(۱۵). اسمعیلی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۵ مطالعه‌ای تحت عنوان غنی-سازی مواد غذایی با مخمر غنی‌شده با سلنیوم انجام دادند. نامبردگان در تحقیق مذکور با بررسی یافته‌های مقالاتی از سال ۱۹۷۵ تا ۲۰۱۶ بیان کردند که مخمرها حامل مناسبی برای بیوترانسفورماسیون سلنیوم می‌باشند(1). با توجه به پژوهش‌های ذکر شده و مقایسه یافته‌های آن‌ها با نتایج به دست آمده از آزمایشات انجام شده در پژوهش حاضر، همخوانی بالائی مشاهده می‌شود چرا که مخمر غنی‌شده با سلنیوم نه تنها اثر منفی بر رشد مخمر *ساکارومایسس-سروزیه* نداشت(نمودار۳) بلکه باعث افزایش راندمان تولید نیز شد. نتیجه به دست آمده در تحقیق حاضر در خصوص اثرات حضور عنصر سلنیوم در محیط رشد مخمر *ساکارومایسس‌سروزیه* می‌تواند با این واقعیت توضیح داده-شود که گلوتامات موجود در مخمر، با تغییر ساختار میتوکندری تاثیر منفی بر روی میتوکندری می‌گذارد و میزان تولید انرژی و میزان تخمیر را کاهش می‌دهد. در واقع به نظر می‌رسد که مخمر مذکور با تبدیل سلنیوم به سلنوسیستئین، از این سلنوآمینواسید برای جلوگیری از اثر گلوتامات استفاده می‌کند و لذا از این نظر این مخمر می-تواند یک حامل مناسب برای بیوترانسفورماسیون سلنیوم - باشد.

نتیجه نهائی از یافته‌های تحقیق حاضر که درطی آن اثرات دو پارامتر دخیل در تخمیر، یعنی میزان سلنیوم ۵تا۲۵ میکروگرم و بریکس سوبسترائی۱۰تا۲۵، برغلظت گرم درلیتر بیواتانول تولید شده مورد بررسی قرار گرفت، حاکی از آن است که حداکثر غلظت بیواتانول (بالاتر از ۸۰ گرم بر لیتر) با استفاده از ۲۰ میکروگرم سلنیوم و نیز ملاس با بریکس ۲۵ درصد، به‌دست آمد. علاوه براین، یافته‌های مذکور نشان داد که بدون استفاده از سلنیوم در فرایند تخمیر بهینه شده، بیواتانول با غلظت ۲۹ گرم درلیتر تولید شد که بسیار پایین‌تر از موارد استفاده شده از محیط‌های حاوی سلنیوم بود. لذا به نظر می‌رسد که طرح پیشنهادی انجام گرفته در پژوهش حاضر، باعث افزایش راندمان تولید بیواتانول گردیده‌است.

سپاسگزاری

با توجه با این‌که یافته‌های مقاله حاضر برگرفته از بخشی از نتایج پایاننامه کارشناسی ارشد موصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در رشته زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی می‌باشد لذا بدینوسیله نویسندگان از حمایت‌های مادی و معنوی مسئولین این دانشگاه قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱- اسمعیلی، س. داودی، ح . فردوسی، ر.، ۱۳۹۵، غنی سازی مواد غذایی با مخمر غنی شده با سلنیوم، فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، (۳)۴۰، ۱۰۹ – ۱۱۷.

۲- حسنی، م . مقبلی، م .، ۱۳۹۵، مقایسه تولید اتانول از ملاس بوسیله زایموموناس موبیلیس و ساکارومایسس سرویزیه، زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس،(۱) ۷، ۱۵-۲۳.

۳- درویشی ف، ابوالحسن مقدمی ن، ۱۳۹۷، جداسازی سویه صنعتی ساکارومایسس سرویزیه با قابلیت تحمل بالا به اتانول از کارخانه های الکل سازی ایران ، پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۳۱، ۵۸۲ -۵۹۲۳۳ .

۴- زاهد ا، صالحی جوزانی غ، خداییان ف، ۱۳۹۴، بهینه سازی منبع ازت و میزان اکسیژن محلول برای تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا تروپیکالیس، پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۲۸، ۲۴۹- ۲۳۸ .

۵- قربانی، ف. یونسی، ح. اسماعیلی، ع.،۱۳۸۸، تولید سوخت اتانول با مخمر ساکارومایسس سرویزیه از ملاس پسماند کارخانه های قند در سیستم تخمیر ناپیوسته ، مجله علوم و تکنولوژی محیط زیست ، ۱۱(۴)، ۱۴۰-۱۴۸.

۶- موسوی نسب، م. فرقانی ، ز. سیدی ، آ . ،۱۳۹۲، ملاس و کاربردهای آن در صنایع تخمیری ، بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، ۱-۶.

7- Baptista C. M. S. G., Coias J. M. A., Oliveria A. C. M., Oliveria N. M. C., Rocha J. M. S., Dempsey M. J., Lannigan K. C., Benson P. S. (2006) Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production." Enzyme Microb. Technol. 40(1): 127-131.

8- Bjelakovic, G. Nikolova, D. Gluud, L. L. ,2015, Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases, Cochrane Database of Systematic Reviews, 133(2), 71-76.

9- Cardona Alzate C. A., Sánchez Toro O. J. (2006) Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. Energy 31(13): 2447-2459.

10- Caspetaa, L., Caro-Bermúdez M. A., (2014), "Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol", 113 (64), pp 277–286.

11- Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., (2006), Lidén G., "Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today" 24 (12), pp 549–556.

12- Jayus, N. Mayzuhroh, A .Arindhania, S. Caroencha, C.,2016, Studies on Bioethanol Production of Commercial Baker's and Alcohol Yeast under Aerated Culture Using Sugarcane

Molasses as the Media , Agriculture and Agricultural Science Procedia, 9 , 493-499.

13- Kieliszek, M. zejak, S. Bzducha-Wróbel, A.,2015, Influence of selenium content in the culture medium on protein profile of yeast cells Candida utilis ATCC 9950. Oxid, Med. Cell. Longev, 1–6.

14- Montesinos, T. and J. M. Navarro (2000) Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. 27(6):362-370.

15- Mozdziak, P. Shoeib, S. Golkar-Narenji, A.,2017, Biogenesis of Selenium Nanoparticles Using Green Chemistry, Topics in Current Chemistry , 375-388.

16- Nofemele, Z. Shukla, P. Trussler, A.,2012, Improvement of ethanol production from sugarcane molasses through enhanced nutrient supplementation using Saccharomyces cerevisiae, Journal of Brewing and Distilling, 3(2), 29-35.

17- Paula, F. SiqueiraaSusan, A. Karpa, G.,2008, Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae at laboratory, pilot and industrial scales , Bioresource Technology, 99(17), 8156-8163.

18- Shaghaghi-Moghadam R., Jafarizadeh-Malmiri H., Mehdikhani P., Jalalian S., Alijanianzadeh R.,2018 , Screening of the five different wild, traditional and industrial Saccharomyces cerevisiae strains to overproduce bioethanol in the batch submerged fermentation. Z. Naturforsch., 73, 361-366.

19- Zhanying Z., Wongb H. H., Albertsonb P. L., Harrison M. D., (2015), “Effects of glycerol on enzymatic hydrolysis and ethanol production using sugarcane bagasse pretreated by acidified glycerol solution”, 192 (10), pp 367–373.

Effect of changing in the amount of selenium and molasses on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and yield of the Bioethanol production

Faramarzi S.,[1] Anzabi Y.[2,3] and Jafarizadeh-Malmiri H.[4]

[1] Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Pathobiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. of Iran.

[3] Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. of Iran.

[4] Faculty of Chemical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

Bioethanol is used as substitute fuel to reduce dependency on fossil fuels, ensure energy security and reduce the negative impact of fossil fuel consumption to the economy and the environment sugar beet Malass are very good raw materials for ethanol production due to their content of fermentable sugars, which can be directly used for fermentation without any modification. Previous studies have shown that Selenium enriched yeast (Se-yeast) is a good carrier for selenium biotransformation. Therefore one of the most economical sources of organic selenium is yeast grown in a selenium-enriched culture medium. The main objectives of the present study were to evaluate the effect of selenium on the yield of bioethanol production and achieve the bioethanol with highest concentration, and compare the concentration of produced bioethanol, using S. cerevisiae, at obtained optimum condition with and without using selenium. For preparation of the growth media molasses was sterilized. After addition of the 0.3 g of the S. cerevisiae strain, SFO6 for the nutrition in molasses as fermentation media was enriched by addition of 500 and 250 ppm of (NH4)2HPO4 and urea, respectively and different amount of selenium (0, 5, 10, 15, 20 and 25 µg).The effect of different amounts of selenium and molasses on bioethanol yield was investigated. Obtained results revealed that maximum bioethanol concentration (80g/L) was achieved using 20-µg selenium and molasses with 25°Bx. *S. cerevisiae* is a good option for increasing bioethanol production efficiency from selenium-enriched sugar beet molasses.

Key words: Bioethanol, Molasses, *Saccharomyces cerevisiae*, Selenium.