دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی شیمی

بهبود تولید بیواتانول توسط قارچ های زیگومایست با استفاده از عصاره بیومس تولیدی

پایان‌نامه دکتری مهندسی شیمی

ریحانه عصاچی

استاد راهنما

دکتر کیخسرو کریمی

۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه‌ی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... شش

چکیده ۱

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۲

فصل دوم: اتانول

۲-۱ روشهای تولید اتانول ۶

۲-۱-۱ روش سنتزی ۶

۲-۱-۲ روش تخمیری ۷

۲-۲ میکروارگانیسمهای تولیدکننده اتانول ۸

۲-۲-۱ مخمرها ۱۰

۲-۲-۲ باکتریها ۱۰

۲-۲-۳ قارچها ۱۱

۲-۳ عوامل مؤثر بر تولید اتانول به روش تخمیر ۱۷

۲-۳-۱ غلظت قند (منبع کربنی) ۱۷

۲-۳-۲ اجزاء دیگر محیط کشت (منبع نیتروژنی و مواد معدنی) ۱۸

۲-۳-۳ دما ۱۹

۲-۳-۴ اثر pH ۱۹

۲-۳-۵ اثر حضور اکسیژن ۲۰

۲-۳-۶ فشار اسمزی ۲۰

۲-۳-۷ غلظت بیومس ۲۱

۲-۳-۸ غلظت اتانول ۲۱

۲-۳-۹ آلودگی باکتریایی ۲۲

۲-۴ مواد اولیه کربنی برای تولید بیواتانول ۲۳

۲-۴-۱ مواد قندی ۲۴

۲-۴-۲ مواد نشاسته‌ای ۲۴

۲-۴-۳ مواد لیگنوسلولزی ۲۷

۲-۵ تولید بیواتانول از مواد قندی ۳۰

۲-۶ تولید بیواتانول از مواد نشاسته دار ۳۰

۲-۶-۱ هیدرولیز آنزیمی نشاسته ۳۰

۲-۶-۲ قندسازی و تخمیر همزمان نشاسته ۳۱

۲-۷ تولید بیواتانول از مواد لیگنوسلولزی ۳۲
۲-۷-۱ پیش فرآوری ۳۲
۲-۷-۲ هیدرولیز آنزیمی ترکیبات لیگنوسلولزی ۳۵
۲-۸ فرآیند اتولیز ۳۸
۲-۸-۱ مکانیسم فرآیند اتولیز ۳۹
۲-۹ مروری بر مطالعات انجام شده ۴۱

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ مواد مورد استفاده ۴۷
۳-۱-۱ گندم ۴۷
۳-۱-۲ آنزیم ها ۴۷
۳-۱-۳ حلال نرمال متیل مورفولین نرمال اکسید (NMMO) ۴۸
۳-۱-۴ سایر مواد شیمیایی ۴۸
۳-۲ تجهیزات ۴۸
۳-۲-۱ اتوکلاو ۴۸
۳-۲-۲ اسپکتروفتومتر ۴۸
۳-۲-۳ آون ۴۹
۳-۲-۴ حمام آب شیکردار ۴۹
۳-۲-۵ حمام روغن ۴۹
۳-۲-۶ دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) ۴۹
۳-۲-۷ دستگاه جذب اتمی ۵۰
۳-۲-۸ دستگاه امواج فراصوت ۵۰
۳-۲-۹ سانتریفوژ ۵۰
۳-۲-۱۰ شیکر انکوباتور ۵۱
۳-۲-۱۱ کوره ۵۱
۳-۲-۱۲ هود میکروبی ۵۱
۳-۲-۱۳ pH متر ۵۱
۳-۳ میکروارگانیسم ۵۱
۳-۳-۱ کشت جامد ۵۲
۳-۳-۲ کشت مایع ۵۲
۳-۴ آزمایشات اتولیز ۵۳
۳-۴-۱ راندمان فرآیند اتولیز ۵۳
۳-۵ عملیات پیش فرآوری کاه گندم ۵۴
۳-۶ هیدرولیز آنزیمی ۵۴
۳-۶-۱ هیدرولیز آنزیمی کاه گندم ۵۴

۳-۶-۲ هیدرولیز آنزیمی آرد گندم ۵۵
۳-۷ آزمایشات تخمیر ۵۶
۳-۸ آنالیزها ۵۶
۳-۸-۱ آنالیز قندها و محصولات تخمیر ۵۶
۳-۸-۲ اندازه گیری بیومس قارچ ۵۷
۳-۸-۳ اندازه گیری آمینو نیتروژن ۵۷
۳-۸-۴ اندازه گیری فسفر ۵۸
۳-۸-۵ اندازه گیری نیتروژن کل ۵۹
۳-۸-۶ آنالیز کیتوزان ۶۱
۳-۸-۷ آنالیز کربوهیدراتهای کاه گندم ۶۳
فصل چهارم:نتایج و بحث پیرامون آنها
۴-۱ مقدمه ۶۵
۴-۲ بررسی جایگزینی بیومس قارچ موکور ایندیکوس و ترکیبات حاصل از آن به جای مواد مغذی مورد نیاز در فرآیند تخمیر و تاثیر آن بر تولید بیواتانول ۶۷
۴-۲-۱ تولید اتانول از محیط کشت کامل (غنی از مواد غذایی) ۶۷
۴-۲-۲ اثر افزودن بیومس قارچ موکور در محیط تخمیر بر تولید اتانول ۶۸
۴-۲-۳ اثر افزودن عصاره قارچ به محیط تخمیر بر تولید اتانول ۷۰
۴-۲-۴ اثر افزودن عصاره قارچ تولید شده از فرآیند اتولیز همراه با امواج فراصوت بر تولید اتانول ۷۴
۴-۲-۵ اثر افزودن مواد سلولی باقیمانده به محیط تخمیر بر تولید اتانول ۷۷
۴-۳ بررسی تولید کیتوزان از بیومس قارچ موکور و مواد سلولی باقیمانده پس از فرآیند اتولیز ۷۷
۴-۴ بررسی پارامترهای تأثیرگذار بر فرآیند اتولیز بیومس قارچ موکور برای تولید بهینه مواد مغذی ۷۹
۴-۴-۱ اثر پارامتر pH بر فرآیند اتولیز ۸۰
۴-۴-۲ اثر پارامتر دما بر فرآیند اتولیز ۸۱
۴-۴-۳ اثر غلظت اولیه بیومس قارچ بر فرآیند اتولیز ۸۵
۴-۵ تولید اتانول از دانه های گندم توسط قارچ موکور ایندیکوس و بررسی جایگزینی عصاره قارچ به عنوان ماده مغذی در فرآیند تخمیر (ترکیب نشاسته دار) ۸۷
۴-۵-۱ هیدرولیز آنزیمی آرد گندم ۸۷
۴-۵-۲ تولید اتانول از هیدرولیزیت آرد گندم ۸۸
۴-۶ تولید اتانول از کاه گندم توسط قارچ موکور ایندیکوس و بررسی جایگزینی عصاره قارچ به عنوان ماده مغذی در فرآیند تخمیر کاه گندم (ترکیب لیگنوسلولزی) ۹۳
۴-۶-۱ پیش فرآوری کاه گندم توسط حلال سلولزی NMMO ۹۳
۴-۶-۲ هیدرولیز آنزیمی کاه گندم ۹۴
۴-۶-۳ تولید اتانول از هیدرولیزیت کاه گندم ۹۵
فصل پنجم:نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵-۱ مقدمه ۹۷
۵-۲ نتیجه گیری ۹۸
۵-۳ پیشنهادات ۱۰۱
مراجع ۱۰۴

چکیده

در سال‌های اخیر تولید اتانول از منابع تجدید پذیر به عنوان یک منبع سوختی جایگزین یا به عنوان یک ترکیب افزودنی اکسیژن دار مورد بررسی و توجه قرار گرفته است. مواد خام مورد استفاده جهت تولید بیواتانول به سه دسته کلی قندهای ساده، مواد نشاسته‌ای و مواد لیگنوسلولزی تقسیم می‌شوند. یکی از مهمترین بخشهای فرآیند تولید اتانول به روش تخمیری میکروارگانیسم مورد استفاده می باشد. تعداد زیادی از مخمرها و قارچ‌ها در صنایع تخمیری کاربرد دارند. زیگومیست‌ها از جمله قارچ‌های فیلامنتوس هستند که قادر به تولید متابولیت‌های مختلف همچون اتانول و گلیسرول می‌باشند. قارچ موکور ایندیکوس از جمله قارچ‌های فیلامنتوس متعلق به رده زیگومیست‌ها می‌باشدکه علاوه بر تولید اتانول با راندمان بالا دارای بیومس با ارزشی برای تولید کیتوزان می‌باشد. تحقیقات قبلی نشان داده است که علی رغم توانایی بالای این قارچ برای تولید اتانول، این قارچ نیاز به مواد غذایی متنوع و گران قیمت از جمله عصاره مخمر دارد. در این تحقیق برای اولین بار، قابلیت و اثرات جایگزینی عصاره قارچ (مواد ریز مغذی قابل هضم و ضروری تولیدی از فرآیند اتولیز بیومس قارچ موکور) به جای مواد مغذی مورد نیاز (عصاره مخمر و مواد معدنی) برای رشد میکروارگانیسم و تولید بیواتانول مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره قارچ به تنهایی می تواند جایگزین عصاره مخمر و همه نمکهای معدنی (سولفات منیزیم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سولفات آمونیوم و کلرید کلسیم) در محیط کشت شود و به عنوان یک ماده غذایی کامل برای میکروارگانیسم برای تولید اتانول با راندمان بالای ۰/۴۷ گرم به ازای هر گرم گلوکز در فرآیند تخمیر مورد استفاده قرار گیرد. انجام فرآیند اتولیز در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، pH برابر ۵ و غلظت اولیه بیومس ۵۷ گرم بر لیتر منجر به تولید یک منبع غنی از انواع مواد غذایی با ارزش ومهم (عصاره قارچ) می شود. غلظت های آمینو نیتروژن و نیتروژن کل عصاره قارچ تولیدی در این شرایط به ترتیب معادل با غلظت های ۳۹/۱ و ۴۳/۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر در محیط کشت می باشند. همچنین جزء کیتوزان در AIM (جامدات غیر قابل حل در سود) مواد سلولی باقیمانده پس از فرآیند اتولیز نسبت به جزء کیتوزان اولیه موجود در AIM بیومس قارچ افزایش داشته است که می تواند به عنوان یک محصول با ارزش موردتوجه قرار گیرد. در ادامه این تحقیق، تولید بیواتانول از دانه‌های گندم به عنوان یک ترکیب نشاسته‌دار (غلظت‌های بالای گلوکز) توسط قارچ موکور ایندیکوس با هدف استفاده از عصاره قارچ به عنوان ماده مغذی جایگزین مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که قارچ موکور در غلظت های مختلف گلوکز (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم بر لیتر) از هیدرولیزیت آرد گندم در حضور عصاره قارچ نسبت به حضور عصاره مخمر، گلوکز را در مدت زمان کمتری (بیش از ۱/۴ تا ۲/۵ برابر بسته به غلظت اولیه گلوکز) مصرف می کند و اتانول را با ماکزیمم راندمان بالاتری تولید می کند. همچنین تولید بیواتانول از هیدرولیزیت کاه گندم به عنوان یک ترکیب لیگنوسلولزی توسط قارچ موکور ایندیکوس با هدف استفاده از عصاره قارچ به عنوان ماده مغذی جایگزین مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در اثر پیش فرآوری کاه گندم توسط حلال نرمال متیل مورفولین نرمال اکسید (NMMO)، راندمان هیدرولیز به بیش از ۶ برابر افزایش پیدا کرده و تقریباً در حدود ۹۳ درصد سلولز موجود در کاه گندم به گلوکز تبدیل شد. راندمان تولید اتانول برای کاه گندم پیش فرآوری شده با افزودن عصاره قارچ نسبت به حضور محیط کشت کامل (عصاره مخمر و مواد معدنی) به ۹۲/۱ درصد افزایش یافته است که این مقدار در حدود ۵/۲ برابر از راندمان تولید اتانول فرآیند تخمیر کاه گندم پیش فرآوری نشده بیشتر است. همچنین راندمان تولید گلیسرول با افزودن عصاره قارچ در تمامی فرآیندهای تخمیر (گلوکز، دانه های گندم و کاه گندم) نسبت به راندمان نتیجه شده در حضور محیط کشت کامل و یا افزودن عصاره مخمر کاهش یافته است. این نتیجه دلیل بر کارآمد بودن عصاره قارچ به عنوان یک ماده غذایی مناسب در محیط تخمیر می باشد که علاوه بر جایگزینی به جای تمام مواد غذایی موردنیاز (عصاره مخمر و نمکهای معدنی) برای میکروارگانیسم، باعث افزایش راندمان تولید اتانول (محصول اصلی) و کاهش راندمان تولید گلیسرول (محصول فرعی) در فرآیند تخمیر می شود.

کلمات کلیدی: ۱- بیواتانول ۲- قارچ موکور ایندیکوس ۳- عصاره قارچ ۴- کیتوزان ۵- گندم ۶- جایگزینی مواد غذایی در فرآیند تخمیر

فصل اول
مقدمه

۱-۱ مقدمه

مصرف کلان و گسترده انرژی حاصل از سوخت های فسیلی اگرچه رشد سریع اقتصادی جوامع پیشرفته صنعتی را به همراه داشته است، ولی به واسطه انتشار مواد آلاینده حاصل از احتراق و افزایش دی اکسیدکربن در جو و پیامدهای آن، جهان را با تغییرات فزاینده ای روبه رو کرده است، که افزایش دمای زمین، تغییرات آب و هوایی، بالا آمدن سطح آب دریاها و تشدید منازعات بین المللی از جمله این پیامدهاست. از سوی دیگر، پایان زودهنگام منابع فسیلی و پیش بینی افزایش قیمت ها، لزوم جانشینی انرژی های تجدیدپذیر مانند انرژی های بیولوژیک و اهمیت آنها را آشکارتر می کند [۱]. بیو اتانول به عنوان یکی از مهمترین سوخت های زیستی جایگزین مناسبی برای سوخت های فسیلی می باشد. اتانول خالص یک ماده بی‌رنگ، شفاف و فرار است. این ماده شیمیایی قابل اشتعال و سمی بوده و در ۷۸/۳۲ درجه سانتیگراد می‌جوشد. نقطه انجماد اتانول ۱۱۴/۱- درجه سانتیگراد و وزن مخصوص آن در ۲۰ درجه سانتیگراد حدود ۰/۷۸۹۳ گرم بر سانتیمتر مکعب می‌باشد [۲]. اتانول یک سوخت اکسیژن دار است که شامل ۳۵ درصد اکسیژن می باشد و انتشار ذرات و NO_x حاصل از احتراق در بنزین را کاهش می دهد. عدد اکتان آن بالاست بنابراین برای سوخت مخلوط با بنزین مناسب می باشد. از سوختن اتانول در موتور خودروها، بخار آب و گاز حاصل می شود و ترکیبات گوگردی، نیتروژنه، سرب، ترکیبات آروماتیک و دیگر ترکیبات سرطان‌زا تا حد زیادی از صفحه زندگی مردم حذف خواهد شد [۳].

اتانول دارای مصارف صنعتی بسیاری است که علاوه بر سوخت می‌توان به استفاده از آن به عنوان حلال، ماده ضدعفونی کننده و خوراک اولیه دیگر صنایع اشاره نمود. اتانول به دو روش سنتزی و تخمیری تولید می‌شود. کمتر از ۴ درصد اتانول تولیدی به روش سنتری (از نفت) و مابقی از روش تخمیر (توسط میکروارگانیسم) تولید می‌شود. اتانول تخمیری را می‌توان از سه دسته ماده خام اولیه تولید کرد [۴, ۵]:

- مواد قندی، همانند نیشکر، ملاس و سورگوم شیرین
- مواد نشاسته ای، نظیر گندم، ذرت و سیب زمینی
- مواد لیگنوسلولزی، نظیر چوب و ضایعات کشاورزی (کاه گندم، کاه برنج و ...)

با توجه به این موضوع کشورهای مختلف می‌توانند از مواد اولیه قابل دسترسی اتانول تولید کنند. به عنوان نمونه می‌توان از نیشکر در برزیل، ذرت در آمریکا، ضایعات چوب در سوئد و کانادا، ضایعات و اضافات مشروبات الکلی در ایتالیا و ملاس در ایران به عنوان پاره‌ای از مواد اولیه تولید اتانول نام برد.

میزان تولید جهانی اتانول سوختی در سال ۲۰۱۲، ۸۵/۱ میلیارد لیتر بوده است که از این میزان تولید، ۵۴/۵۸ میلیارد لیتر مربوط به ایالات متحده آمریکا (جایگاه نخست) و ۲۱/۳۳ میلیارد لیترمربوط به برزیل (جایگاه دوم) می باشد (جدول ۱-۱). همچنین براساس این رده بندی، پس از کشورهای قاره آمریکا که تولید کننده بیش از ۸۹ درصد اتانول سوختی جهان هستند، کشورهای اروپایی، آسیایی و آفریقا در جایگاه‌های بعدی تولید بیواتانول قرار گرفته‌اند [۶].

جدول ۱-۱- میزان تولیدی اتانول (میلیارد لیتر) از سال ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۲ میلادی [۶]

قاره	۲۰۰۶	۲۰۰۷	۲۰۰۸	۲۰۰۹	۲۰۱۰	۲۰۱۱	۲۰۱۲
اروپا	۱۶۲۷	۱۸۸۲	۲۸۵۵	۳۶۴۵	۴۲۵۴	۴۴۲۹	۴۹۷۳
آفریقا	۰	۵۵	۶۵	۱۰۰	۱۳۰	۱۵۰	۲۳۵
آمریکای شمالی (ایالات متحده)	۱۸۷۱۶	۲۵۲۷۱	۳۵۹۴۶	۴۲۱۴۱	۵۱۵۸۴	۵۴۷۶۵	۵۴۵۸۰
آمریکای جنوبی (برزیل)	۱۶۹۶۹	۲۰۲۷۵	۲۴۴۵۶	۲۴۲۷۵	۲۵۹۶۴	۲۱۶۳۷	۲۱۳۳۵
آسیا و اقیانوسیه	۱۹۴۰	۲۱۴۲	۲۷۵۳	۲۹۲۷	۳۱۱۵	۳۵۲۰	۳۹۶۵
جهانی (در کل)	۳۹۲۵۲	۴۹۶۲۵	۶۶۰۷۵	۷۳۰۸۸	۸۵۰۴۷	۸۴۵۰۱	۸۵۰۸۸

در حال حاضر تولید بیواتانول در جهان عمدتاً با استفاده از منابع نشاسته‌ای و منابع قندی می‌باشد. این امر باعث شده که مباحث زیادی بر سر تداخل منابع غذایی و منابع سوختی ایجاد شود. به همین دلیل محققان در پی یافتن منابع دیگری هستند که تداخلی با منابع غذایی نداشته باشد. استفاده از مواد لیگنوسلولزی[1] (که عمده مواد زاید گیاهی را تشکیل می‌دهد) برای تولید بیواتانول، می‌تواند راه حلی برای این مشکل باشد. مواد لیگنوسلولزی اغلب یکی از مهمترین اجزای تشکیل دهنده ضایعات ناشی از صنایع، جنگل ها، کشاورزی و پسماندهای شهری می‌باشد که به عنوان یک ماده خام ارزان به وفور قابل دسترس می باشد [۷, ۸].

هیدرولیز آنزیمی نشاسته وترکیبات لیگنوسلولزی نسبت به هیدرولیز اسیدی در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته و قیمت آنزیم نیز به مقدار زیادی کاهش یافته است. در هیدرولیز آنزیمی ترکیبات نشاسته دار ابتدا توسط آنزیم آلفاآمیلاز مولکول نشاسته به اجزاء کوچکتر هیدرولیز می شودو سپس مولکول‌های نیمه هیدرولیز شده نشاسته تحت اثر آنزیم گلوکوآمیلاز به مخلوطی از قندهای مونومر و دیمر تجزیه می شوند. در ادامه این مخلوط قندی قابل هضم توسط میکروارگانیسم در فرآیند تخمیر به بیواتانول تبدیل می‌شوند. در روش هیدرولیز آنزیمی، ترکیبات لیگنوسلولزی که قبلاً پیش فرآوری شده‌اند توسط مخلوطی از چند آنزیم اختصاصی به نام سلولاز و بتا گلوکوسیداز به قندهای قابل تخمیر تبدیل می شوند. در این روش سلولز موجود در این ترکیبات توسط آنزیم به گلوکز تبدیل می‌گردد و در ادامه گلوکز و دیگر قندهای حاصل از هیدرولیز توسط میکروارگانیسم به اتانول تبدیل می گردند [۸, ۹].

هم اکنون در برخی از جوامع صنعتی عمدتاً منابعی مانند گندم جهت تولید سوخت‌های زیستی کشت می شوند. به این منابع، گیاهان انرژی‌زا گفته می شود [۱۰, ۱۱].گیاهانی که بخشی ازآنها (دانه‌های گندم) نشاسته بوده و بخشی دیگر (کاه گندم) به عنوان یک منبع لیگنوسلولزی مهم به شمار می‌روند. دراین پروژه، استفاده از گندم به عنوان یک منبع حاوی مواد نشاسته‌دار و لیگنوسلولزی برای تولید بیواتانول مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. از جمله تحقیقاتی که در سال‌های اخیر در جهت شناسایی میکروارگانیسم‌های تولید کننده اتانول صورت گرفته است، می‌توان به شناسایی قارچ‌های زیگومایست اشاره نمود. قارچ‌های موکور ایندیکوس[2]، موکورهمیلیس[3] و همچنین قارچ رایزوپوس اورایزه[4] از جمله این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. نتیجه تحقیقات نشان می‌دهد که این قارچ‌ها اتانول را با بازدهی برابر یا بیش از مخمر ساکارومایسس سرویسیه[5] (پرکاربردترین مخمر در صنعت تولید اتانول) تولید

[1] Lignocellulosic materials
[2] *Mucor indicus*
[3] *Mucor hiemalis*
[4] *Rhizopus oryzae*
[5] *Saccharomyces cerevisiae*

می‌کند. از جمله مزایای این قارچ نسبت به مخمر ساکارومایسس سرویسیه می‌توان به توانایی تخمیر زایلوز، رشد در دماهای بالاتر و بیومس با ارزش آنها (حاوی کیتوزان و کیتین) اشاره کرد [۱۲-۱۴].

مواد مغذی خوراکی مورد نیاز برای زنده ماندن و رشد قارچ و تولید اتانول علاوه بر مواد قندی شامل نیتروژن، فسفات، منیزیم، کلسیم، عصاره مخمر، منیزیم، محلول فلزی، محلول ویتامین و غیره می باشد. عصاره مخمر نیز ترکیبی از مواد ریز مغذی مختلف می باشد که بیشترین تأثیر را در بین همه مواد بر روی تولید اتانول و رشد میکروارگانیسم دارد [۱۲, ۱۳, ۱۵]. اصولاً استفاده از عصاره مخمر به دلیل قیمت بالای آن در فرآیندهای صنعتی مقرون به صرفه نمی‌باشد و جایگزین کردن موادی مغذی ارزان قیمت و با کارایی بالا در محیط تخمیر موردنظر می‌باشد. با توجه به اطلاعات موجود، تاکنون مطالعه‌ای در مورد استفاده از مواد مغذی جایگزین در محیط تخمیر برای تولید اتانول توسط قارچ‌های زیگومایست از جمله قارچ موکور ایندیکوس صورت نگرفته است.

با توجه به مطالب فوق، در تحقیق حاضر جایگزینی بیومس قارچ موکور ایندیکوس تولیدی (به عنوان یک محصول جانبی فرآیند بیواتانول) به جای مواد مغذی موردنیاز برای رشد میکروارگانیسم و تولید اتانول مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور بیومس قارچ موکور تحت فرآیند فرآوری اتولیز قرار گرفت تا به مواد ریز مغذی قابل هضم برای میکروارگانیسم تبدیل شود. همچنین اثر پارامترهای عملیاتی و تأثیرگذار فرآیند اتولیز در تولید مواد ریز مغذی از بیومس قارچ مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تولید بیواتانول توسط قارچ موکور ایندیکوس برای اولین بار از دانه‌های گندم (ترکیب نشاسته‌دار) و همچنین کاه گندم (ترکیب لیگنوسلولزی) با هدف استفاده از بیومس قارچ زیگومایست به عنوان ماده مغذی جایگزین در فرآیند تخمیر مورد مطالعه قرار گرفت.

در این رساله در فصل دوم، مروری مختصر بر روش‌ها، میکروبیولوژی و بیوشیمی تولید بیواتانول انجام شده و همچنین به معرفی قارچ موکور و مواد خام اولیه تولید اتانول (قندی، نشاسته ای و لیگنوسلولزی) پرداخته شده است. همچنین در این فصل، مروری بر مطالعات صورت گرفته در زمینه‌های مشابه ارائه شده است. در فصل سوم، روش‌های انجام آزمایش و تجزیه و تحلیل توضیح داده شده است. نتایج حاصل از آزمایش‌ها و بحث پیرامون آنها در فصل چهارم ارائه شده‌اند و در نهایت فصل پنجم به نتیجه گیری نهایی و پیشنهادات اختصاص داده شده است.

فصل دوم
اتانول

۲-۱ روشهای تولید اتانول

به طور کلی اتانول به دو روش سنتزی و تخمیری تولید می‌شود:

۲-۱-۱ روش سنتزی

اتانول سنتزی از دو روش هیدراسیون مستقیم و غیرمستقیم اتیلن تولید می‌گردد. فرآیند هیدراسیون غیرمستقیم قدیمی‌تر از هیدراسیون مستقیم بوده و بیش از یکصد سال عمر دارد [۲].

استریفیکاسیون اتیلن به وسیله اسید سولفوریک

در این روش ابتدا خوراک هیدروکربوری شامل ۳۵ تا ۹۵ درصد اتیلن در معرض اسید سولفوریک ۹۵ تا ۹۸ درصد قرار می‌گیرد. مخلوط گاز اتیلن و اسید سولفوریک وارد برج‌های جذب می‌شود و عمل استریفیکاسیون در فشار ۱۰۰ psi و حرارت ۵۵ تا ۷۵ درجه سانتیگراد انجام می‌گیرد.

$$CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \longleftrightarrow SO_4H(C_2H_5) \qquad (۱-۲)$$

$$SO_4H(C_2H_5) + CH_2O = CH_2O \longleftrightarrow SO_4(C_2H_5)_2 \qquad (۲-۲)$$

سپس محصولات بدست آمده به کمک آب هیدرولیز شده و وارد ژنراتور می‌گردد تا اسید سولفوریک ۵۰ تا ۶۰ درصد از پایین برج و بخارهای اتانول تولیدی نیز از قسمت بالای برج خارج شود [۲].

$$SO_4H(C_2H_5) + SO_4(C_2H_5)_2 + 3H_2O \longleftrightarrow 2H_2SO_4 + 3C_2H_5OH \qquad (۳-۲)$$

هیدراتاسیون اتیلن

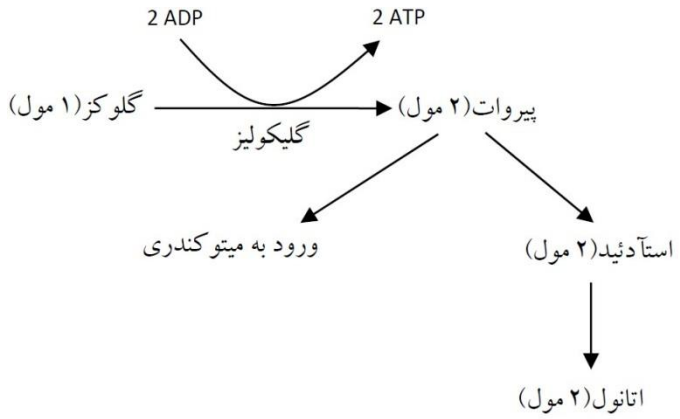
فرآیند هیدروژناسیون مستقیم در سال ۱۹۴۷ میلادی به طور صنعتی مورد بهره‌برداری قرار گرفت. در این فرآیند، گاز غنی از اتیلن با آب مخلوط شده و پس از عبور از کاتالیست به اتانول تبدیل می‌شود. پس از انجام و تکمیل واکنش، اتانول حاصله در راکتور به منظور رسیدن به خلوص ۹۵ درصد به برج تقطیر فرستاده می‌شود [۲].

$$CH_2 = CH_2 + H_2O \xrightarrow[\text{catalyst}]{H_3PO_4(H_2SO_4)} C_2H_5OH \qquad (۴-۲)$$

۲-۱-۲ روش تخمیری

اتانول با ترکیب شیمیائی C_2H_5OH ترکیبی است که بیشترین حجم تولید را در میان محصولات تخمیری دیگر به خود اختصاص داده است. از لحاظ فعالیتهای درون سلولی متابولیسم [۱] یا سوخت و ساز درون سلول به دو بخش تقسیم می شود یکی آنابولیسم [۲] یا تشکیل و تولید مواد حیاتی سلول و دیگری کاتابولیسم [۳] یا تخریب مواد غذائی ترکیبات درون سلول است. در میان متابولیسمهای مختلف سلولی جذب منبع کربنی و تولید انرژی مورد نیاز سلول از اهمیت ویژه ای برخوردار است و تحقیقات فراوانی بر روی آن انجام گرفته است [۴]. مسیر کلی کاتابولیسم گلوکز که در اثر پیشرفت آن در بسیاری از مخمر ها اتانول تولید می شود در شکل (۲-۱) نشان داده شده است:

[1] Metabolism
[2] Anabolism
[3] Catabolism



شکل ۲-۱- شمای کلی از مسیر تولید اتانول از گلوکز [۱۶]

در ابتدا قندهای گلوکز، مانوز، فروکتوز و گالاکتوز توسط انتقال تسهیل شده[1] وارد سلول می‌گردند. این قندها توسط مسیر امبدن مایروف[2] که معروف به گلیکولیز می‌باشد در درون سلول به پیروات تبدیل می‌گردد (شکل ۲-۱). در حالت بیهوازی پیروات در نهایت به اتانول تبدیل می گردد. واکنش کلی تولید اتانول از گلوکز در زیر آورده شده است:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 \qquad (۵-۲)$$

در حضور اکسیژن تمام یا قسمتی از پیروات وارد میتوکندری شده و وارد چرخه اسید سیتریک می‌گردد. در مورد جزئیات کنترل های متابولیکی و مراحل کنترل کننده سرعت در گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک و سایر واکنشهای درون سلولی بسیار پیچیده هستند و هنوز بطور کامل این واکنشها و عوامل موثر بر آنها شناخته نشده اند. ولی آنچه مسلم است سلول با انجام یک سری واکنشهائی بر روی گلوکز اتانول تولید می‌نماید. در حالت هوازی پیروات وارد میتوکندری سلول شده و علاوه بر تولید انرژی برخی حد واسطهای مورد نیاز بیوسنتز مواد مورد نیاز خود را تولید می نماید [۱۶].

۲-۲ میکروارگانیسمهای تولیدکننده اتانول

میکروارگانیسم‌های زیادی شامل دامنه وسیعی از مخمرها، باکتری ها، قارچ‌ها قادر به تولید اتانول به عنوان یکی از محصولات اصلی یا فرعی خود هستند، که از این میان تنها تعداد محدودی قادر به تولید این ترکیب به

[1] Facilitated transport
[2] Embden-Meyerhof pathway

عنوان اصلی‌ترین محصول بوده و جهت تولید صنعتی اتانول مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بر اساس تحقیقات انجام شده مخمرها و قارچ ها برای تولید اتانول نسبت به باکتریها برتری دارند. میکروارگانیسم هایی که در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند باید دارای ترکیبی از خصوصیات لازم برای استفاده در یک فرآیند و با توجه به تجهیزات مورد استفاده باشند. از طرف دیگر ویژگیهای مطلوب یک فرآیند صنعتی تولید اتانول تا حد زیادی به میکرواورگانیسم استفاده شده بستگی دارد. به طورکلی یک میکروارگانیسم مناسب برای استفاده در فرآیند تخمیر الکلی بهتر است که ویژگی‌های زیر را دارا باشد [۱۷]:

۱- بازده تولید اتانول آن بالا باشد.

۲- قابلیت تحمل اتانول آن بالا باشد.

۳- در مقابل بازدارنده‌های حاصل از هیدرولیز ترکیبات صنعتی مقاوم باشد.

۴- نیاز به اکسیژن نداشته باشد.

۵- برای انواع مختلف سوبسترا کاربرد داشته باشد.

۶- قابلیت مصرف قند آن بالا باشد.

۷- سرعت تولید اتانول آن بالا باشد.

۸- مواد مکمل غذایی کمتری استفاده کند.

۹- در مقابل تغییرات شرایط فیزیکی نظیر تغییرات دمایی و تنش برشی مقاوم باشد.

۱۰- میکروب بیماریزا برای انسان نباشد.

۱۱- توانایی رشد و تکثیر در pHهای پایین را داشته باشد.

میکروارگانیسم های مورد استفاده باید شرایط فوق را با توجه به فرآیند بکار گرفته شده و ترکیب مواد خام مصرفی در حد بهینه دارا باشند.

امروزه بیشترین تحقیقات در زمینه توسعه و دستیابی به بیوکاتالیست‌های جدیدی که بتوانند بطور مؤثر شربت‌های قندی مختلط و پیچیده را با بازده بالایی تخمیر نمایند، متمرکز شده است.

۲-۲-۱ مخمرها

استفاده از مخمرها در تولید صنعتی اتانول از مواد قند جایگاه مهمی در فرآیندهای صنعتی دارد. از مهمترین مخمرهایی که در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته اند می‌توان به ساکارومایسس سرویسیه[1]، ساکارومایسس-اواروم[2]، شیزوساکارومایسس پمبه[3] و سویه‌های کلورومایسس اشاره کرد. در تبدیل قند به اتانول باید از سویه مخمری استفاده کرد که بتواند غلظتهای بالای اتانول را تحمل کند، زیرا اتانول بر رشد و تخمیر اثر بازدارندگی دارد. مخمرها می‌توانند طیف وسیعی از سوبستراها را مصرف کنند. بطور کلی، آنها می‌توانند در pH های بین ۳/۵ تا ۶ و دمای بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی گراد رشد کرده و با راندمان بالایی اتانول تولید کنند [۱۷].

معروفترین میکروارگانیسمی که تاکنون برای تولید اتانول به کار رفته مخمر ساکارومایسیس سرویسیه می-باشد. مزیت عمده آن اینست که می‌تواند طیف وسیعی از سوبستراها را نظیر گلوکز، مالتوز، فروکتوز، ساکاروز و در برخی گونه ها گالاکتوز را مصرف کنند. این مخمر علی‌رغم داشتن مزایایی همچون سرعت بالا در تولید اتانول، تحمل اثر بسیاری از بازدارنده‌های موجود در سوبستراهای صنعتی قادر به مصرف قندهای پنج کربنه نظیر زایلوز نمی‌باشد [۱۸].

۲-۲-۲ باکتری‌ها

بسیاری از باکتری ها نیز قادرند اتانول تولید کنند. برخی از باکتری ها همراه با اتانول، محصولات دیگری نیز تولید می‌کنند. این محصولات عبارتند از: الکل های گوناگون (بوتانول، ایزوپروپیل الکل، ۲ و ۳ بوتان دی ال)، اسیدهای آلی (استیک، بوتیریک، فرمیک و لاکتیک اسید)، پلی ال ها (آرابیتول، گلیسرول و زایلیتول)، کتونها (استون) و یا گازهای مختلف (متان، دی اکسیدکرین و هیدروژن). برخی از این باکتری ها که به باکتری های تولید کننده اتانول معروفند اتانول رابه عنوان محصول اصلی تولید می‌کنند (بدین معنی که یک مول اتانول به ازای مصرف یک مول گلوکز تولید می شود) [۱۷, ۱۹].

در میان باکتری های مختلف باکتری زیمومونا موبیلیس به دلیل آنکه بطور عمده اتانول تولید کرده و خصوصیات مهم دیگری را نیز داراست، در این زمینه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری در شرایط هوازی نیز اتانول تولید کرده و از طرف دیگر مقاومت خوبی در برابر غلظتهای بالای اتانول و سوبسترا (به ویژه

---

[1] *Saccharomyces cerevisiae*
[2] *Saccharomyces uvarum*
[3] *Schizosaccharomyces pombe*

گلوکز) از خود نشان می‌دهد. همچنین این باکتری برخلاف بسیاری از باکتری های دیگر قابلیت مصرف ساکاروز را نیز دارد. البته مصرف ساکاروز باعث افزایش محصولات دیگر، نظیر اسید استیک و اسید لاکتیک می‌شود [۲۰].

از میان باکتری‌ها، باکتری زیموموناس‌موبیلیس یکی از میکروارگانیسمهای پیشنهاد شده برای تولید اتانول می‌باشد.هرچند این باکتری برای تولید اتانول نسبت به مخمرها دارای مزایایی همچون جذب بالاتر قند، بازده بالاتر تولید اتانول، کمتر بودن تولید بیومس و تحمل غلظت‌های بالاتر اتانول می‌باشد، ولی استفاده از این باکتری دارای معایبی است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- عدم توانایی آن برای مصرف کربوهیدرات‌های پلیمری

۲- تولید محصولات جانبی از قبیل سوربیتول، استوئین، گلیسرول و استیک اسید

۳- حساسیت نسبت به غلظت‌های بالای نمک

۴- عدم امکان جداسازی باکتری از مش در مقیاس صنعتی

۵- حساسیت باکتری نسبت به میکروارگانیسم‌های آلوده کننده

از این رو علی رغم بسیاری از مزایای باکتری زیموموناس موبیلیس، هنوز از این باکتری به صورت صنعتی در تولید اتانول استفاده نشده و بررسی آن محدود به موارد آزمایشگاهی بوده است [۱۷, ۲۰].

۲-۲-۳ قارچ‌ها

دسته وسیعی از قارچ‌ها متعلق به شاخه‌های بازیدیومیست، زیگومیست، آسکومیست و دئوترومیست از نوع قارچ‌های میسلیومی (ریسه‌ای) هستند [۲۱]. بحث جستجوی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اتانول از سوبستراهای صنعتی و همچنین کارهای ژنتیکی که روی میکروارگانیسم‌های معمولی به منظور افزایش بازده فرآیند تخمیر انجام می‌شود، از مباحث روز در حیطه تولید اتانول می‌باشد. ورود قارچ‌های زیگومایست به این عرصه از مباحث جدیدی است که اطلاعات در مورد آنها محدود می‌باشد.

بیش از نیم قرن است که از قارچ‌های زیگومایست در صنایع تخمیری به منظور تولید محصولات مختلف نظیر انواع آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، مایکوتوکسین‌ها و دیگر متابولیت‌ها نظیر انواع اسیدها و الکل‌ها استفاده می‌شود. همچنین بیومس این قارچ‌ها دارای غلظت نسبتاً زیادی کیتوزان است که با ارزش می‌باشد [۲۲].

از میان قارچ‌های زیگومایست تنها تعداد محدودی قادر به تولید اتانول به عنوان اصلی‌ترین محصول فرآیند بوده و جهت تولید صنعتی اتانول مورد بررسی قرار گرفته‌اند. فوساریوم[۱]، موکور[۲]، ریزیپوس[۳]، رایزوپوس[۴] و پاسیلومایسز[۵] و مونیلیا[۶] از گونه قارچ‌های ریسه‌ای هستند، که قادر به تولید اتانول از پنتوزها می‌باشند [۲۳]. همچنین برخی از قارچ‌های متعلق به شاخه زیگومیست‌ها قادر به تولید متابولیت‌های مختلف از جمله اتانول هستند. از میان سه گونه رایزوپوس، موکور که متعلق به شاخه زیگومیست می‌باشند، دو گونه موکور ایندیکوس و رایزوپوس بازده بالایی در تولید اتانول از گلوکز، زایلوز و هیدرولیزیت چوب از خود نشان داده‌اند [۱۲, ۱۳].

میلاتی و همکارانش [۱۳] در سال ۲۰۰۵ با بررسی اثر تولید اتانول روی ۹ گونه که شامل سه گونه از رایزوپوس اورایزه ، موکور کورتیکولوس، موکور همیلیس، موکور ایندیکوس، رایزو موکور پوسیلوس، رایزو موکور میهی و زیگومایست IT بودند، نشان دادند که قارچ موکور ایندیکوس دارای بیشترین راندمان تولید اتانول در بین ۹ گونه نام برده می باشد.

در صنایعی که از قارچ‌های زیگومایست استفاده می‌شود، بحث کنترل شرایط فرمانتور از اهمیت و پیچیدگی خاصی برخوردار است، که عمدتاً ناشی از شکل ریسه‌ای این قارچ‌ها می‌باشد. در این سیستم‌ها با پیشرفت فرآیند تخمیر و افزایش جرم سلولی، ویسکوزیته محیط کشت افزایش یافته و باعث ایجاد خلل در انتقال جرم، انتقال حرارت و انتقال ممنتوم می‌گردد [۲۴].

مزیت قارچ موکور نسبت به رایزوپوس، دیمرف بودن آن است.

همچنین از دیگر مزیت‌های این قارچ می‌توان به:

- قابلیت تخمیر طیف گسترده‌ای از قندها از جمله زایلوز
- توانایی رشد در دماهای بالاتری نسبت به مخمرهای معمولی
- بیومس با ارزش

اشاره نمود، که باعث شده در سال‌های اخیر به عنوان میکروارگانیسمی مناسب جهت تولید اتانول از سوبستراهای صنعتی مورد بررسی قرار گیرد. بیومس این قارچها دارای مقدار زیادی کیتوزان[۷] می‌باشد که دارای مصارف زیادی مانند تولید مواد فوق جاذب می‌باشد.

---

[1] *Fusarium*
[2] *Mucor*
[3] *Ryzypose*
[4] *Rhizopus*
[5] *Paecilomyces*
[6] *Monilia*
[7] Chitosan

اولین مورد در انتخاب نوع میکروارگانیسم نوع خوراک است. اخیراً با توجه به رویکرد به منابع غیر خوراکی و ضایعات لیگنوسلولزی نیاز به میکروارگانیسم های با قابلیت مصرف همزمان قند های پنجگانه و ششگانه وجود دارد [۱۲]. راه حل های متفاوتی مانند استفاده از باکتری زیموموناس موبیلیس، یا گونه های دستکاری ژنتیکی شده باکتری ایکولای یا مخمر ساکارومایسیس سرویسیه مطرح شده است. عوامل تعیین کننده دیگر میزان قابل اعتماد بودن میکروارگانیسم است. استفاده از باکتری ها به دلیل اندازه بسیار کوچکتر آنها و سایر خصوصیاتشان در صنعت بسیار مشکل بوده و در مقیاس صنعتی مشکلاتی بسیار بیشتر از مخمر ها دارند. از طرفی استفاده از گونه های دستکاری ژنتیکی شده نیاز به زمان برای شناخت گونه و مشخص شدن پایداری و رفتار آن در شرایط فرایندی دارد. به علاوه گونه هایی که بر روی آنها عملیات ژنتیکی انجام شده ممکن است برای انسان یا محیط زیست مشکلات ناشناخته ای به وجود آورد.

گونه های قارچ موکور

قارچ موکور از جمله قارچ‌های زیگومایست و متعلق به رده موکورها[1] می‌باشد. این قارچ اولین بار در سال ۱۶۶۵ میلادی توسط رابرت هوک به ثبت رسید و پس از آن در سال ۱۸۷۶ میلادی لوئیس پاستور به توانایی تغییر شکل شدید در گونه‌های قارچ موکور پی برد.گونه‌های موکور به دلیل توانایی در تجزیه قندها و پروتئین‌ها قادر به استفاده از انواع گوشت‌ها، غذاهای پخته، محصولات لبنی، میوه‌ها و سبزیجات فاسد می‌باشند. از جمله کاربردهای این قارچ می‌توان به تولید آمیلاز، رنین، اسیدهای آلی، مشروبات الکلی، الکل اتیلیک، انفیه، پنیر و تمپه[2] (نوعی غذا که مردمان کشورهای آسیا جنوب شرقی از قارچ موکورایندیکوس طبخ می‌کنند)، اشاره کرد. کلونی‌های موکور در ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد به سرعت رشد می‌کنند و با پرزهایی خاکستری رنگ که طولشان به چند سانتیمتر می‌رسد، سطح آگار را می‌پوشانند. این قارچ یک گونه اتمسفریک است که در بعضی موارد دمای بالاتر از ۴۰ درجه سانتیگراد را نیز تحمل می‌کند [۲۱, ۲۵].

مهمترین قارچی که برای تولید اتانول به روش تخمیر استفاده می‌شود قارچ موکور ایندیکوس می‌باشد که دارای بالاترین درصد تولید اتانول می‌باشد. این قارچ برای انسان بی‌ضرر بوده و از هگزوزها (قندهای ۶ کربنه) با راندمان مشابه مخمر ساکارومایسیس اتانول تولید می‌کند و همچنین این قارچ قادر است که زایلوز (قند ۵ کربنه) را جذب کند.

---

[1] *Mucorales*
[2] Tempeh