اثر قند زایلوز مغز باگاس بر سینتیک رشد مخمر در تولید محصولات زیستی

سیده شیدا شفیعی امریی[۱]
اسماعیل رسولی گرمارودی[۲]*
سید رحمان جعفری پطرودی[۳]
امید رمضانی[٤]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه مهندسی پالایش زیستی، پردیس ۱ دانشگاه شهید بهشتی، زیراب، سوادکوه، مازندران، ایران

[۲] استادیار گروه مهندسی پالایش زیستی، پردیس ۱ دانشگاه شهید بهشتی، زیراب، سوادکوه، مازندران، ایران

[۳] استادیار گروه مهندسی پالایش زیستی، پردیس ۱ دانشگاه شهید بهشتی، زیراب، سوادکوه، مازندران، ایران

[۴] استادیار گروه مهندسی پالایش زیستی، پردیس ۱ دانشگاه شهید بهشتی، زیراب، سوادکوه، مازندران، ایران

مسئول مکاتبات:
e_rasooly@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۹

چکیده

به‌منظور استخراج زایلان، مغزباگاس، پس از پیش‌تیمار قلیایی و رنگ‌بری با کلریت‌سدیم، با درصدهای مختلف سود تیمارگردید و پس از محاسبه درصد استخراج، مورد طیف‌سنجی FT-IR قرار گرفت. زایلان تولیدشده با استفاده از هیدرولیز اسیدی رقیق به قند زایلوز تبدیل شده و پس از تیمار با کربن فعال و اولتراسونیک، میزان قندها به‌وسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. سپس زایلوز تولیدشده به محیط کشت مخمرهای *Kluyveromyces Marxianus* و *Pichia Stipites* اضافه شد تا اثر آن بر سینتیک رشد آن‌ها مشخص شود. نتایج نشان داد که در مرحله استخراج، با افزایش مصرف سود از ۸ به ۱۴ درصد، مقدار استخراج زایلان افزایش می‌یابد. همچنین، فرایند هیدرولیز به‌تنهایی و بدون استفاده از کربن فعال و اولتراسونیک می‌تواند میزان قند بیشتری را تولید نماید. ارزیابی سینتیک رشد مخمرها نشان می‌دهد که سرعت رشد مخمر در محیط حاوی زایلوز بیشتر از گلوکز بوده و لذا کارایی این مخمرها برای قندهای ۵ کربنه بیشتر است بطوریکه از آن‌ها می‌توان برای تولید محصولات زیستی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: زایلان، مغز باگاس، استخراج، *Kluyveromyces marxianus*، *Pichia stipites*.

مقدمه

بر اساس آمار منتشرشده، میزان تولید باگاس در جهان معادل ۵۰۰ میلیون تن بوده که متعاقب آن میزان تولید پسماند مغز باگاس بجا مانده از آن حدود ۱۵۰ میلیون تن را شامل می‌شود [۱]. مغز باگاس یک ماده قندی است که در کارخانه‌های تولید شکر و کاغذ پس از فرایندی به نام مغززدائی از تفاله نیشکر (باگاس) به دست می‌آید که حدود ٪۳۵-۳۰ وزن آن را تشکیل می‌دهد [۲]. لذا با توجه به تولید مقدار زیادی از این پسماند بررسی پتانسیل‌های آن برای کاربردهای مختلف به لحاظ اقتصادی و زیست‌محیطی به‌ویژه از منظر پالایش زیستی می‌تواند از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشد.

مغز باگاس اساساً شامل دو بخش آوند و پارانشیم است [۲] که به خاطر ماهیت غیرفیبری و قندی، نمی‌تواند به‌عنوان ماده اولیه مناسب برای تولید کاغذ باشد زیرا مشکلات فرایندی متعددی ازجمله مصرف زیاد مواد شیمیایی در پخت و رنگ‌بری، کیفیت پایین خمیر و کاغذ، کاهش نرخ آبگیری در ماشین کاغذ و دیگر اثرات منفی

زیســت‌محیطی در فرآیند تولید کاغذ ایجاد می‌نماید [۳]. به دلایل ذکرشــده کارخانه‌های کاغذســازی ســعی بر آن دارنـد تـا حـد امکان مغز را از مجموعه باگاس جدا نمایند. مغز جداشـده به دلیل ماهیت قندی و فسادپذیر آن خیلی قابل‌اسـتفاده نبوده و به‌صورت محدود به‌عنوان خوراک دام و نیز سوزانیدن برای تأمین انرژی گرمائی مورداستفاده قرار می‌گیرد. این در حالی اســت که مغز باگاس به دلیل اینکه ســاختار شــیمیایی آن حاوی بیش از ٪۷۰ کربوهیدرات اســت، می‌توانـد بـه‌عنوان یـک منبع بـالقوه برای تولیـد فـراورده‌هـای بـا ارزش‌افـزوده بیشــتر نظیر بیواتـانول مورداستفاده قرار گیرد [۴].

بررســی ترکیبات شیمیایی موجود در مغز باگاس نشان مـی‌دهـد (جـدول ۱) کـه علاوه بر ترکیبـات متـداول هولوسلولزی، دارای بیش از ٪۳۰ پنتوزان است که به‌عنوان یک قند ۵ کربنه بوده و دارای پتانســیل‌های بالقوه‌ای برای تولید محصـولات زیست‌پایه است، بطوریکه با استخراج آن از مغز بـاگـاس می‌توان برای تولیـد طیف وســیعی از محصـولات زیست‌پایه در حوزه پالایش زیستی بکار گرفت [۵].

جدول ۱-درصد حضور مونوساکاریدها در بخش‌های مختلف باگاس [۵]

ترکیبات شیمیایی مونوساکاریدها	جزء فیبری (٪)	جزء مغزی (٪)
آرابینوز	۱/۶۸	۲/۶۷
گالاکتوز	۱۱/۱۴	۵/۹۵
گلوکز	۴۴/۳۰	۴۳/۹۱
زایلوز	۲۲/۰۷	۲۳/۰۵

اســتفاده از هیدروکســید ســدیم و پتاســیم به‌عنوان مهم‌ترین روش‌هـای اســتخراج قلیایی همی ســلولزها از گذشــته مطرح بوده اســت که در حال حاضـر اسـتفاده از هیدروکسـید سدیم به دلیل قیمت کمتر متداول‌تر و ازنظر صـنعتی نیز این روش پیشـنهاد شده است. تحقیقات اخیر نشــان داده اســت که هیدروکســید ســدیم می‌تواند در استخراج همی سلولزها به‌ویژه همی سلولز باگاس (زایلان) بســیار مؤثر بوده بطوریکه راندمان اســتخراج بیش از ۹۰ درصــد نیز برای آن گزارش گردیده اســت [۶]. به‌منظور تولید محصـولات زیسـتی از منابع لیگنوسـلولزی، یکی از متداول‌ترین روش‌ها هیدرولیز اسیدی است [۷]. هیدرولیز با اسـید رقیق، دارای سـرعت بالای واکنش در فرآیندهای پیوسته بوده ولی بزرگ‌ترین عیب آن راندمان پائین تبدیل قند اسـت. اسـتفاده از اسید غلیظ به فشار و دمای معمولی تا متوسط احتیاج دارد که این شرایط باعث می‌شود تجزیه و تبدیل مواد قندی به مواد شــیمیایی دیگر کاهش یابد. اولین مزیت این روش راندمان بالای تولید قند اســت که بیش از ۹۰ درصـد برای سـلولز و همی‌سلولزها است. عیب این روش، زمان واکنش طولانی آن بوده و بازیافت اســید غلیظ شــرایط عملیاتی هزینه‌بری را تحمیل می‌کند [۸]. ازجـملـه روش‌هـای دیـگـر در زمـیـنـه تـبـدیـل مواد زیســت‌تجدیدپذیر، روش فراصـوت (Ultrasound) است که بـه‌عنوان یکی از روش‌هـای پیش تیمـار مکـانیکی برای افزایش تبدیل پلی ســاکاریدها به قندهای ســازنده آن و همچنین افزایش بازده کلی محصولات زیستی نظیر اتانول دارای پتانســیل خوبی بوده و در دو مرحله پیش‌تیمار (که بـاعث افزایش قندســازی می‌شــود) و همراه با هیدرولیز زیســت‌توده‌ها قابل‌اسـتفاده است [۹ و ۱۰]. ماده اولیه پس از پیش تیمار با هرکدام از روش‌های فوق‌الذکر به قندهای سـازنده آن تبدیل می‌شود که برای دستیابی به محصولات زیستی نظیر اتانول، این قندها بایستی تحت فرایند دیگری بنـام تخمیر قرار گیرند. تولید بیوتکنولوژیکی اتانول مبتنی بر تبدیل آنزیمی قندها به الکل به‌وسـیله میکروارگانیسم‌ها است [۱۱].

یـک چـالش کلیـدی در توســعـه فرآیند تبدیل مؤثر زیســت‌توده لیگنوســلولزی، انتخاب یک میکروارگانیســم

مناسب تولیدکننده اتانول است که مقاوم به همه عوامل بازدارنده در فرآورده‌های هیدرولیزی بوده و قادر به تخمیر همه قندها (هگزوزها و پنتوزها) به اتانول باشد [۱۲] و [۱۳]. ازاین‌رو، ترکیب شیمیایی مایعات هیدرولیزی که به‌شدت به نوع ماده اولیه در فرآیند پیش تیمار و روش پیش تیمار وابسته است، می‌تواند یک عامل مؤثر در انتخاب میکروارگانیسم باشد [۱۴].

در این خصوص یکی از میکروارگانیسم‌هایی که قابلیت خوبی از خود نشان داده مخمر *Pichia stipitis* است که علاوه بر قابلیت تخمیر قندهای پنج کربنه به‌ویژه زایلوز دارای ویژگی‌های نظیر قابلیت استفاده صنعتی، سرعت بالای تخمیر زایلوز، بازده بالای تولید اتانول بوده و ... است. با وجود مزایای فوق‌الذکر، برخی از ویژگی‌های آن با معایبی مواجه است. ازجمله آنکه همواره پس از مدت‌زمانی مشخص (۹۶ ساعت) دیگر قادر به مصرف زایلان نبوده بطوریکه بخشی از زایلان (۵٪) به‌صورت مصرف نشده باقی می‌ماند [۱۵]. در حوزه تولید بیواتانول از زایلان، مخمر دیگری که به‌صورت موفقیت‌آمیزی عمل نموده *Kluyveromyces marxianus* است که علاوه بر قابلیت استفاده صنعتی، می‌تواند زایلان را به‌طور کامل مصرف نموده و بازده تولید اتانول آن نیز بالاتر از *Pichia stipitis* بوده است [۱۶].

پیش تیمار مغز باگاس با اسید رقیق در دمای پایین با متغیرهای فرایندی نظیر نسبت جرم مایع به جامد، دمای واکنش و غلظت اسید، به‌منظور تبدیل مؤثر همی سلولز به قند قابل تخمیر، حاکی از آن است که پیش تیمار اسید رقیق می‌تواند برای دستیابی به میزان زیاد زایلوز از مغز باگاس و مقادیر کمتر بازدارنده‌ها استفاده شود [۱۷]. همچنین، طراحی و بهینه‌سازی تولید اتانول از هیدرولیز مغز باگاس توسط مخمر حساس به دمای Kluyveromyces marxianus با استفاده از روش RSM[۱] و متغیرهای غلظت مواد، pH، زمان تخمیر و غلظت Na_2HPO_4، به میزان اتانول ۷/۴۴ g/l دست یافت که این میزان ۸۸٪ میزان اتانول تئوری است [۱۸].

در حال حاضر، پسماند باگاس تولیدشده در کشور معادل ۴/۳ میلیون تن در سال است که در صورت استفاده کامل از باگاس در کارخانه‌های تولید شکر و فرایندهای کاغذسازی، می‌توان حدود ۱/۳ میلیون تن مغز از آن جدا نمود [۱۹]؛ که در حال حاضر تنها بخش اندکی از آن به قیمت ناچیز کیلویی ۹۰ تومان، به مصرف خوراک دام رسیده و باقیمانده سوزانیده می‌شود و کاربرد تجاری و اقتصادی دیگری نیز برای آن تعریف نشده است. لذا با توجه به پتانسیل تولید مغز باگاس در دنیا و نیز ماهیت ذاتی آن که سرشار از قندهای کربوهیدراتی است، می‌تواند به‌عنوان یک ماده باارزش برای تولید محصولات زیست‌پایه با ارزش‌افزوده بالاتر نظیر بیواتانول در قالب مفهوم پالایش زیستی مطرح شود که علاوه بر جذابیت‌های اقتصادی برای صنایع خمیر و کاغذ، می‌تواند از مطلوبیت‌های زیست‌محیطی نیز برخوردار باشد. در این خصوص لازم است که اثر قندهای مذکور بر فرایندهای تخمیری (بخش اصلی فرایند تولید محصولات زیستی) موردبررسی قرار گیرد تا قابلیت‌های کاربردی آن هر چه بیشتر مشخص شود. لذا تحقیق حاضر بر بررسی اثر قند زایلوز موجود در مغز باگاس بر سینتیک رشد مخمر متمرکز گردیده تا بتوان قابلیت‌های آن را برای تولید محصولات زیستی مختلف نظیر اتانول زیستی بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

ماده اولیه مورداستفاده در این تحقیق، به‌صورت مغز تازه باگاس از کارخانه کاغذسازی پارس واقع در هفت‌تپه استان خوزستان با رطوبت ۱۰ درصد تهیه شد که پس از شستشو هوا خشک شده و سپس به‌وسیله آسیاب خانگی به پودر تبدیل شد. همچنین، مخمرهای موردنیاز (*Kluyveromyces marxianus* و *Pichia stipites*) به‌صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از کلکسیون قارچ‌ها و مخمرهای سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند.

به‌منظور خروج حداکثری لیگنین و سهولت دستیابی و کیفیت و کمیت بالاتر زایلان، مغز باگاس طی دو فرایند مورد پیش تیمار قلیایی (سود ۸٪، دمای ۱۱۰ °C، زمان ۵

[۱] Response Surface Methodology

دقیقه) و رنگ‌بری ۶ مرحله‌ای با کلریت سدیم [۲۰] قرار گرفته و سپس عملیات استخراج بر روی آن‌ها انجام شد.

برای استخراج زایلان از مغز باگاس، ۲۰ گرم خمیر رنگ‌بری شده مغز باگاس در سود ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد و در دمای محیط (۳۰ درجه سانتی گراد) با L:W=۲۰:۱، به مدت ۹۰ دقیقه هم زده شد. پس از آبگیری محلول فوق روی قیف بوخنر، مواد جامد باقیمانده توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر سود ۲ درصد شست‌وشو شد. محلول غنی از زایلان به‌دست‌آمده به بشر منتقل و دو برابر حجم آن اتانول اضافه گردید و توسط اسید استیک ۱۰ درصد، pH محلول به ۶ رسانده شد که در این مرحله رسوبی تشکیل می‌گردد که همان زایلان است. درنهایت زایلان ته‌نشین شده روی قیف بوخنر صاف شد و توسط اتانول و اتیل اتر شست‌وشو داده شد [۶]. سپس درصد زایلان استخراج‌شده بر اساس رابطه ۱ محاسبه گردیده و نمونه‌های زایلان استخراج‌شده به‌وسیله دستگاه FT-IR مورد ارزیابی قرار گرفت.

$$\text{درصد زایلان} = \frac{\text{وزن زایلان خشک استخراج‌شده}}{\text{وزن خمیر اولیه}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

به‌منظور تولید قند زایلوز از زایلان استخراج‌شده فوق‌الذکر برای فرایند تخمیر بعدی، عملیات هیدرولیز اسیدی در شرایط ۸ درصد اسیدسولفوریک (بر مبنای وزن خشک زایلان)، ۹۰ دقیقه و در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد با L: W = ۸:۱ درون دایجستر کوچک در آون انجام گرفت و برای همگن‌سازی شرایط هر ۵ دقیقه دایجستر تکان داده شد [۴] در انتها pH محلول هیدرولیز را توسط $Ca(OH)_2$ در دمای ۶۰ درجه به ۱۰ و در ادامه توسط H_2SO_4 به ۵/۵ رسانده شد [۲۱].

سپس این نمونه توسط کربن فعال به‌منظور کاهش مقادیر بازدارنده‌هایی نظیر فورفورال، هیدروکسی‌متیل فورفورال و اسید استیک تیمار گردید. در این بخش، ٪۲/۴ (w/v)کربن فعال به محلول هیدرولیز اضافه شد. سپس به مدت یک ساعت در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ °C و ۲۰۰rpm قرار گرفته و صاف شد [۲۲]. بعدازآن، نمونه حاصل تحت تیمار اولتراسونیک به مدت ۱۵ دقیقه با شدت ۱۰۰Am قرار گرفت. نمونه‌های حاصل از هر مرحله (هیدرولیز اسیدی، بعد از تیمار با کربن فعال و بعد از اولتراسونیک) به‌صورت مجزا توسط دستگاه HPLC به‌منظور تعیین قندهای موجود در آن مورد ارزیابی قرار گرفت [۴]. شایان‌ذکر است که برای این کار از دستگاه مدل KNAUER Smartline Series دارای ستون Eurokat و آشکارساز RI، با سرعت جریان ۰/۳ میلی‌لیتر بر دقیقه، دمای ستون ۶۰°C و مدت‌زمان جداسازی ۶۰ دقیقه استفاده شد. غلظت قندها نیز از روابط ۲ محاسبه گردیدند.

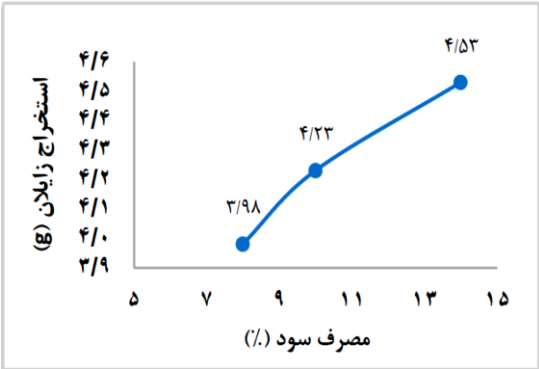
$$\text{غلظت قند}\left(\frac{g}{l}\right) = \left(\frac{\text{سطح پیک}}{162105}\right) \times 100 \qquad (۲)$$

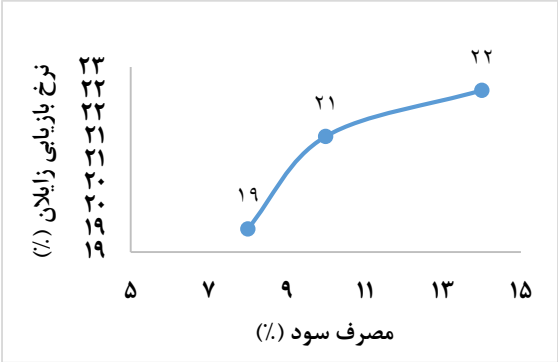
برای بررسی اثر قند زایلوز به‌دست‌آمده از مغز باگاس بر روی سینتیک رشد مخمرهای موردبررسی در فرایند تخمیر، آمپول لیوفیلیزیه هر مخمر پس از فعال‌سازی در محلول نرمال سالین، درون پتری دیش‌های مجزا و با محیط کشت استاندارد اعلام‌شده سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (آگار ۲۰ g/l، گلوکز ۱۰ g/l، پپتون ۵ g/l، عصاره مخمر ۳ g/l، عصاره مالت ۳ g/l و pH =۶/۲ ±۰/۲) و با کمک گرفتن از مواد معدنی ریزمغذی (trace element) (۰/۰۹ g/l سولفات منیزیم، ۳ g/l آمونیوم سولفات، ۰/۳g/l سدیم دی هیدروژن فسفات و ۰/۳ g/l پتاسیم هیدروژن فسفات) کشت داده شد. پتری دیش‌ها پس از قرار گرفتن در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز به سطح رشد مناسبی رسیدند. یک sub-culture از مخمرهای رشد کرده در پتری دیش به قطر نیم سانتیمتر در محیط مایع حاوی مواد فوق‌الذکر به‌استثنای آگار ریخته شده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰ rpm قرار گرفت. پس از گذشت حدود ۱۲ ساعت و کدرشدن مایع (رشد اولیه مخمرها)، به‌طور تناوبی هر یک ساعت یک‌بار اقدام به نمونه‌گیری گردید و پس از هر ساعت میزان جذب نمونه‌ها (دانسیته سلولی (cell density) در سوبستراهای مایع که گویای تعداد سلول‌های مخمر است) در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه UV-Vis اندازه‌گیری شد [۲۳]. این عملیات تا زمان ثابت شدن عدد قرائت‌شده جذب ادامه یافت. سپس نمودار منحنی رشد برای هر دو مخمر توسط نرم‌افزار Excel ترسیم گردید. این فرایند یک‌بار دیگر با استفاده از زایلوز استخراج‌شده از زایلان مغز باگاس بجای گلوکز در محیط کشت استاندارد برای هر مخمر تکرار و

نتایج هر دو حالت بر روی سینتیک هر مخمر مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

شکل ۱ میزان زایلان استخراج‌شده از مغز باگاس و نرخ بازیابی آن را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود با افزایش میزان غلظت سود از ۸ به ۱۴ درصد در مرحله استخراج، میزان نرخ بازیابی زایلان حدود ۳٪ افزایش می‌یابد. هم‌راستا با این موضوع ملاحظه می‌شود که مقدار زایلان از کمتر از ۴ گرم به بیش از ۴/۵ گرم افزایش می‌یابد.





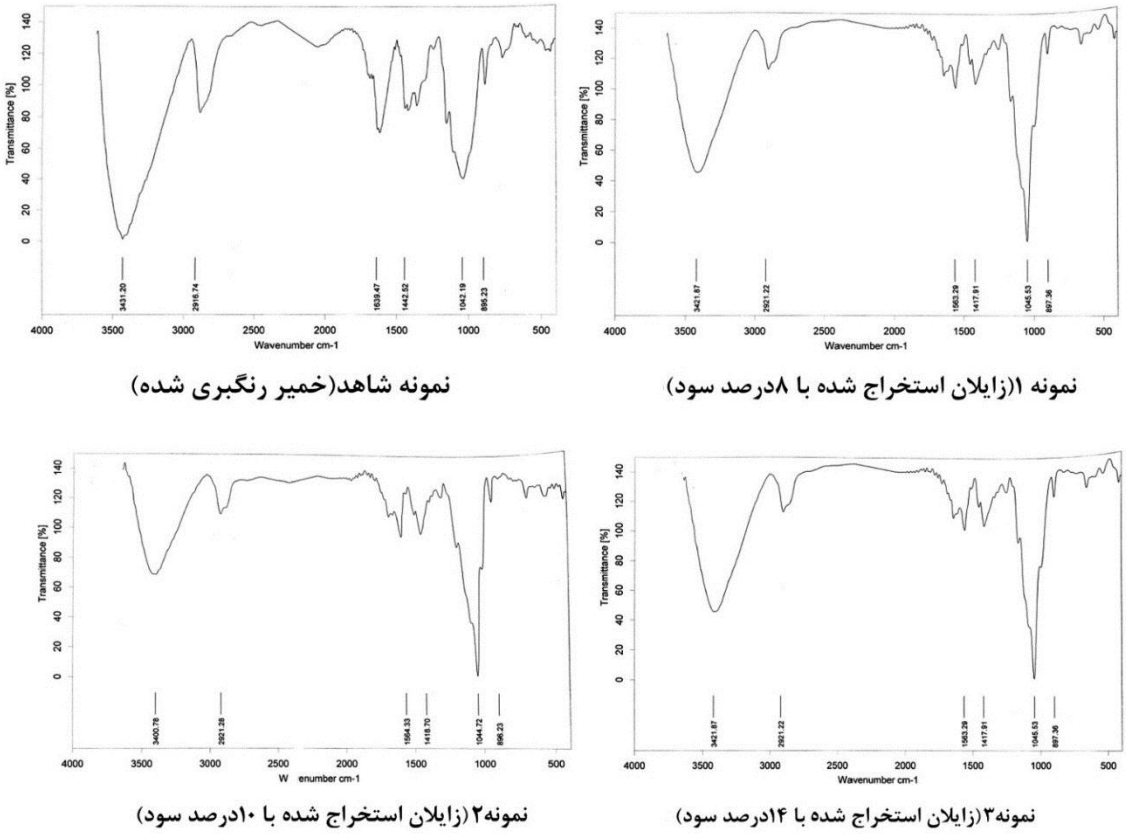
شکل ۱- نرخ بازیابی و مقدار زایلان استخراج‌شده از مغز باگاس پیش تیمار شده

طیف‌سنجی FT-IR نمونه‌های مغز باگاس تیمار شده (شاهد) و زایلان های استخراج‌شده در غلظت‌های مختلف سود (۸، ۱۰ و ۱۴ درصد) نیز در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود باند cm^{-1} ۸۹۵ بیانگر پیوندهای گلیکوزیدی از نوع β بین واحدهای مونومری قندی شامل زایلوز و گلوکز است [۲۴ و ۲۵]. همچنین، باند cm^{-1} ۱۰۴۰ گویای شاخص مونومری زایلان (β -D- زایلوپیرانوز) است [۲۶ و ۲۷]؛ که با افزایش غلظت سود بر شدت این پیک افزوده می‌شود که این موضوع در تطابق کامل با افزایش نرخ بازیابی و درصد زایلان استخراج‌شده است (شکل ۱). باند cm^{-1} ۱۴۴۲ گویای پیوندهای C-H و cm^{-1} ۱۶۳۹ مربوط به حضور آب در نمونه است [۲۷]. باندهای ۲۹۱۶ و cm^{-1} ۳۴۳۰ به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H و OH می‌باشند [۲۷ و ۲۸]؛ که بر این اساس شدت این پیک‌ها همگام با کاهش غلظت گلوکز و افزایش غلظت زایلوز کاهش یافته است. عدم وجود باند cm^{-1} ۱۵۲۰ که مربوط به گروه‌های کربنیل در ساختار آروماتیک لیگنین است، بیانگر آن است که پیش تیمار قلیایی و متعاقب آن رنگ‌بری با کلریت سدیم توانسته‌اند قسمت اعظم لیگنین را حذف کنند [۲۸].

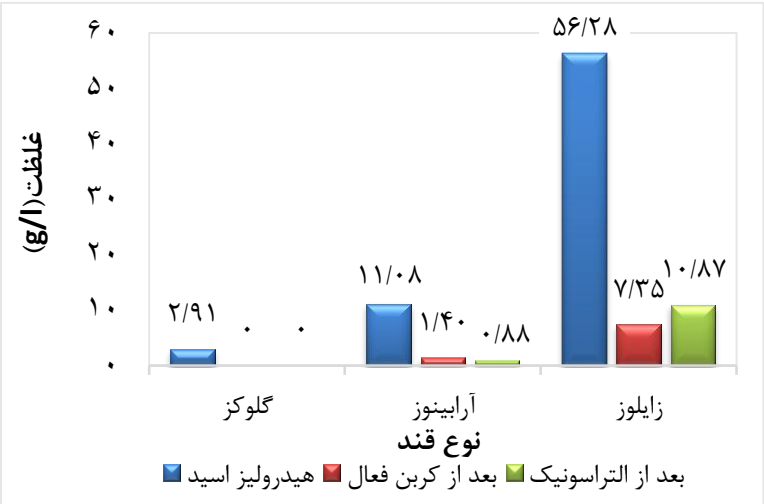
شکل ۳ مقادیر قند آزاده شده در اثر مراحل مختلف فرایندی را نشان می‌دهد. بطوریکه پس از فرایند هیدرولیز مقدار زایلوز به‌دست‌آمده ۵۶/۲۸۵، گلوکز ۲/۹۱۴ و آرابینوز ۱۱/۰۸۱ گرم بر لیتر بوده و این مقادیر پس از جذب با کربن فعال به ترتیب به ۷/۳۵۷، ۰/۰۰۰ و ۱/۴۰۶ و بعد از تیمار التراسونیک به ۱۰/۸۷۷، ۰/۰۰۰ و ۰/۸۸۰ رسیده است.

ارزیابی قند حاصل از هر مرحله بیانگر آن است که فرایند هیدرولیز اسیدی رقیق به‌تنهایی توانسته میزان تولید قند بالاتری را ارائه نماید. همچنین استفاده از کربن فعال به‌منظور جذب مواد بازدارنده جنبی که حین هیدرولیز احتمال تشکیل آن‌ها می‌رود، به‌صورت منفی عمل می‌نماید و تا حدود ۸ برابر از میزان قندهای تولیدشده نظیر زایلوز کم می‌نماید. از سوی دیگر، استفاده از تیمار مکانیکی اولتراسونیک بعد از مرحله کربن فعال می‌تواند تا حدود ۳۰ درصد بر میزان قند زایلوز بیفزاید. بعلاوه، بازبینی پیک‌های به‌دست‌آمده از دستگاه HPLC در شکل ۴ حاکی از آن است که تیمارهای کربن فعال و اولتراسونیک قویاً باعث ایجاد گروه‌های بازدارنده می‌شوند (پیک تیز سمت چپ همه منحنی‌ها) که در مقایسه با

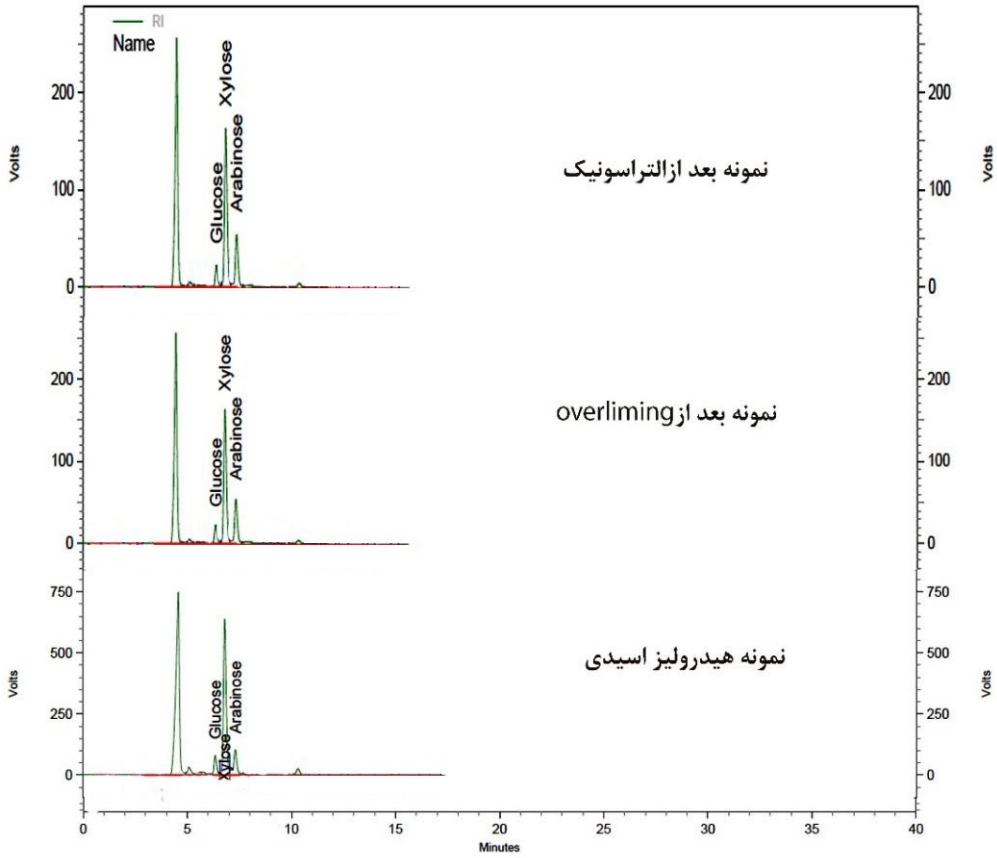
مرحلـه هیدرولیز پیک مربوطه با فاصـــله زیادتری از پیک زایلوز خودش را نشان می‌دهد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که در مورد ماده اولیه مغز باگاس استفاده از مرحله کربن فعال و اولتراسـونیک به‌صـورت متوالی، به دلیل کاسـتن از بازده قند تولیدشده و ایجاد عوامل بازدارنده، موردنیاز نیست.



شکل ۲- طیف FT-IR نمونه‌های زایلان استخراج‌شده از مغز باگاس در غلظت‌های مختلف سود



شکل ۳- غلظت قندهای تولیدشده بعد از تیمارهای مختلف همی سلولز زایلان استخراج‌شده

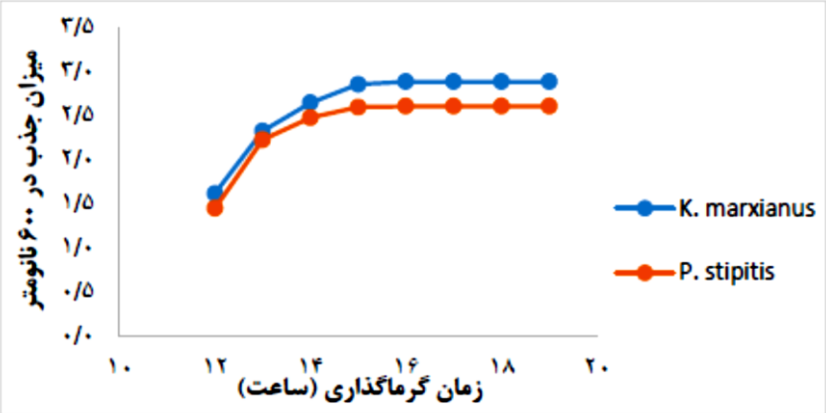


شکل ۴ -ارزیابی قندهای موجود در مایع هیدرولیز پس از فرایندهای مختلف توسط دستگاه HPLC

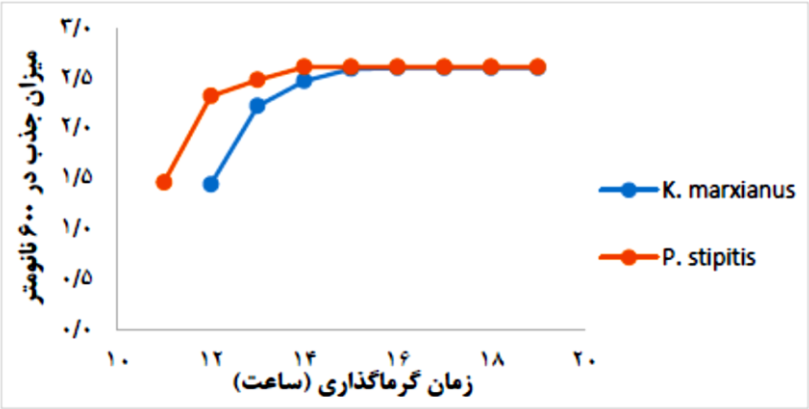
Jain و همکاران در سال ۲۰۱۱ با پیش تیمار اسیدی مغز باگاس با شرایط مختلف بهینه دما (۱۲۰ درجه سانتی‌گراد)، غلظت اسید (۸٪) و زمان (۹۰ دقیقه)، بیشترین بازده قند را معادل ۳۸٪ گزارش کردند. حال با توجه به اینکه بیشترین میزان قند زایلوز و کمترین میزان مواد بازدارنده مربوط به مایع هیدرولیز پس از فرایند هیدرولیز اسیدی به‌تنهایی است، لذا این تیمار به‌عنوان اساس انجام آزمایش‌ها تولید بیواتانول در فرایند تخمیر انتخاب گردید [۴].

به‌منظور انجام فرایند تخمیر محلول سرشار از زایلوز مرحله هیدرولیز اسیدی، از دو نوع مخمر *Kluyveromyces marxianus* و *Pichia stipites* استفاده شد. شکل ۶ سینتیک رشد مخمرهای مذکور در ۲۰ ساعت اول بعد از کشت در محیط کشت استاندارد و محیط کشت حاوی منبع کربنی زایلوز را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود رشد مخمر در محیط کشت استاندارد، *Kluyveromyces marxianus* از ۱۶ ساعت به بعد و مخمر *Pichia stipites* از ۱۵ ساعت به بعد ثابت شده است.

این موضوع بیانگر آن است که مخمرهای فوق در محیط کشت استاندارد تقریباً در زمان ۱۳ ساعت (میانه فاز لگاریتمی)، مناسب برای برداشتن کشت فعال اولیه برای افزودن به محیط آماده‌شده برای تولید اتانول می‌باشند. با جایگزین نمودن زایلوز به‌جای گلوکز در محیط کشت استاندارد، رشد مخمر *Kluyveromyces marxianus* از ۱۵ ساعت به بعد و مخمر *Pichia stipites* از ۱۴ ساعت به بعد ثابت شده است. این موضوع حاکی از آن است که مخمرهای فوق در محیط کشت حاوی زایلوز تقریباً در زمان ۱۲-۱۳ ساعت (میانه فاز لگاریتمی)، مناسب برای برداشتن کشت فعال اولیه برای افزودن به محیط آماده شده برای تولید اتانول می‌باشند.



شکل ۵- سینتیک رشد مخمرهای مختلف در محیط کشت استاندارد



شکل ۶- سینتیک رشد مخمرهای مختلف در محیط کشت حاوی زایلوز

بررسی سینتیک رشد مخمرها در محیط کشت استاندارد و کشت جایگزین (حاوی زایلوز استخراج‌شده از مغز باگاس) نشان می‌دهد که سرعت رشد مخمرهای موردبررسی در محیط‌های حاوی زایلوز بیشتر است. لذا می‌توان گفت که کارایی این مخمرها برای تبدیل قند ۵ کربنه می‌تواند بیشتر باشد که در مراحل بعدی تولید محصولات زیست‌پایه با ارزش افزوده بالاتر نظیر بیو اتانول قابل‌استفاده خواهد بود.

نتیجه‌گیری

این تحقیق با هدف بررسی اثر قند زایلوز استخراج‌شده از پسماند مغز باگاس بر سینتیک رشد مخمرهای *Kluyveromyces marxianus* و *Pichia stipites* و در راستای بررسی پتانسیل‌های پسماند فوق‌الذکر در تولید محصولات زیستی با ارزش‌افزوده بالاتر انجام شد که نتایج زیر را در برداشته است:

- استخراج زایلان توسط سود ۱۴ درصد با بالاترین درصد زایلان استخراج‌شده به‌عنوان بهینه استخراج حاصل گردید.
- فرایند هیدرولیز اسیدی رقیق به‌تنهایی می‌تواند میزان تولید قند بالاتری را ارائه نماید.
- به‌کارگیری مرحله کربن فعال و اولتراسونیک به‌صورت متوالی، به دلیل کاستن از بازده قند تولیدشده، موردنیاز نیست.
- استفاده از کربن فعال به‌منظور جذب مواد بازدارنده جنبی تا حدود ۸ برابر از میزان قندهای تولیدشده نظیر زایلوز کم می‌نماید.
- استفاده از تیمار مکانیکی اولتراسونیک به‌طور متوالی بعد از مرحله کربن فعال می‌تواند تا حدود ۳۰ درصد

بر میزان قند زایلوز بیفزاید.

- در محیط کشت استاندارد هر دو مخمر تقریباً در زمان ۱۲ ساعت بیشترین میزان کارایی خود را داشته‌اند.
- در محیط کشت حاوی زایلوز هر دو مخمر تقریباً در زمان ۱۱ ساعت بیشترین میزان کارایی خود را داشته‌اند.
- سرعت رشد مخمر در محیط حاوی زایلوز بیش‌تر از گلوکز است لذا کارایی این مخمرها برای قندهای ۵ کربنه بیش‌تر است.

منابع

[1] Chandel, A. K., da Silva, S. S., Carvalhoa, W. and Singh, O. V., 2012. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87: 11–20.

[2] Rafiei, A. and Jonoobi, M., 2006. Sugar cane; industrial plant. Monthly Journal of Wood and Paper, 21: 24-27. (In Persian).

[3] Lois-Correa, J. A., 2012. Depithers for efficient preparation of sugar cane bagasse fibers in pulp and paper industry. Ingeniería Investigación y Tecnología, 13(4): 417-424.

[4] Jain, R. K., 2011. Bioethanol from bagasse pith a lignocellulosic waste biomass from paper/suger industry. Indian Pulp & Paper Technical Association journal, 23(1): 169-173.

[5] Sanjuan, R., Anzaldo, J., Vargas, J., Turrado, J. and Patt, R., 2001. Morphological and chemical composition of pith and fibres from mexican sugarcane bagasse. Holzals Roh-und Werkstoff, 59: 447–450.

[6] Djafari Petroudy, S. R., Ghasemian, A., Resalati, H., Syverud, K. and Chinga-Carrasco, G., 2015. The effect of xylan on the fibrillation efficiency of DED bleached soda bagasse pulp and on nanopaper characteristics. Cellulose, 22: 385-395.

[7] Dadi, A., Varanasi, S. and Schall, C., 2006. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. Biotechnology and Bioengineering, 95: 904-910.

[8] Fakour Jannati, S., Fanaee shekholeslami, M. and Maskooki A., 2010. Production of bio-ethanol from lignicellulosic waste: optimization of pre-treatment stage by concentrated acid, 1st conference of separation science and engineering, Shahid Bahonar University, May 19-21, Kerman, Iran, p. 1-8. (In Persian).

[9] Nikolic, S., Mojovic, L., Rakin, M., Pejin, D. and Pejin, J., 2011. Utilization of microwave and ultrasound pretreatments in the production of bioethanol from corn, Clean Technologies and Environmental Policy, 13: 587–594 .

[10] Toma, M., Bandow, H., Vinatoru, M. and Maeda, Y., 2006. Ultrasonically Assisted Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, In: Proceedings of AIChE Annual Meeting Conference, Nov. 12-17, San Francisco, United States, 701a: l-7.

[11] Stabnikova, O., Wang, J-Y. and Ivanov, V., 2010. Value-Added Biotechnological Products from Organic Wastes. Handbook of Environmental Engineering, Volume 10: Environmental Biotechnology, Springer Science + Business Media, p. 343-394.

[12] Harner, N. K., Bajwa, P. K., Habash, M. B., Trevors, J. T., Austin, G. D. and Lee, H., 2014. Mutants of the pentose-fermenting yeast Pachysolen tannophilus tolerant to hardwood spent sulfite liquor and acetic acid. Antonie van Leeuwenhoek, 105(1): 29–43

[13] Bajwa, P. K., Shireen, T., D'Aoust, F., Pinel, D., Martin, V. J. J., Trevors, J. T. and Lee, H., 2009. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor. Biotechnology and Bioengineering, 104(5): 892–900

[14] Sixta, H., 2006. Handbook of Pulp. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 1101p.

[15] McMillan, J. D., 1993. Xylose Fermentation to Ethanol: A Reveiw, National Renewable Energy Laboratory, USA, 45 p.

[16] Hamidimotlagh R., Nahvi I., Emtiazi G. and Ghezelbash, Gh., 2009. Isolation and Identification of Ethanol Producer Yeasts from D-Xylose. Iranian Journal of Biology, 22(1): 46-52. (In Persian).

[17] Bianfang, L., Zh. S., Wang, G., Chen, Y., Ren, Zh., Xu, Q. and Yan, Y., 2013. Acid pretreatment of bagasse pith at low temperature with steam-assisted heating. Journal of Renewable and Sustainable Energy, 5(4): 1-9

[18] Dasgupta, D., Suman, S. K., Pandey, D., Ghosh, D., Khan, R., Agrawal, D., Jain R. K., Vadde, V. T. and Adhikari D. K., 2013. Design and optimization of ethanol production from bagasse pith hydrolyzate by a thermotolerant yeast Kluyveromyces sp. IIPE453 using response surface methodology, Springer Plus, 2:159

[19] Najafi, G., Ghobadian, B., Tavakoli, T. and Yusaf, T., 2009. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. Renewable and Sustainable Energy, 13(6/7): 1418-1427.

[20] Wise, L. E., Murphy, M., D'Addieco, A. A., Pap. and Trade J., 1946. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses. Paper Trade Journal, 122(2): 35-43.

[21] Converti, A., Dominguez, J. M., Perego, P., Da Silva, S. S. and Zilli, M., 2000. Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. Chemical Engineering and Technology, 23(11): 1013-1020.

[22] Sene, L., Vitolo, M., Felipe, M. G. A. and Silva, S. S., 2000. Effects of Environmental Conditions On xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Production by Candida guilermondii, Application of Biochemical Bioengineering, 84-86: 371-380.

[23] Caputir A. and Ueda M., 1968 Spectrophotometric determination of ethanol in wine. American Journal of Enology and Viticulture, 19 (3): 160-165.

[24] Sun, R. C.and Tomkinson, J., 2002. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. Carbohydrate Polymers, 50: 263–271.

[25] Wang, B., Wang, X. and Feng, H., 2010. Deconstructing recalcitrant miscanthus with alkaline peroxide and electrolyzed water. Bioresource Technology, 101: 752–760.

[26] Egues, I., Sanchez, C., Mondragon, I. and Labidi, J., 2012. Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. Bioresource Technology, 103: 239-248.

[27] Sun, R. C. and Tomkinson, J., 2002. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. Carbohydrate Polymers, 50: 263–271.

[28] Oh, S. Y., Yoo, D. I., Shin, Y., Kim, H. C., Kim, H. C., Chung, Y. S., Park, W. H. and Youk, J. H., 2005. Crystalline structure analysis of cellulose treated sodium hydroxide and carbon dioxide by mean of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. Carbohydrate Research, 340: 2376–2391.

The effect of bagasse pith xylose on yeast growth kinetic in bio-products manufacture

S. Sh. Shafiei Amrehei[1]
E. Rasooly Garmaroody[2]
S. R. Djafari Petroudy[3]
O.Ramezani[4]

[1] M. SC. Graduated, Department of bio-refinery engineering, Faculty of new technologies, Zirab campus, Shahid Beheshti university, Savadkooh, Iran

[2] Assistant Prof., Department of bio-refinery engineering, Faculty of new technologies, Zirab campus, Shahid Beheshti university, Savadkooh, Iran

[3] Assistant Prof., Department of bio-refinery engineering, Faculty of new technologies, Zirab campus, Shahid Beheshti university, Savadkooh, Iran

[4] Assistant Prof., Department of bio-refinery engineering, Faculty of new technologies, Zirab campus, Shahid Beheshti University, Savadkooh, Iran

Corresponding author:
e_rasooly@sbu.ac.ir

Received: 2017/05/02
Accepted: 2017/08/20

Abstract

In order to extract xylan, bagasse pith was treated with different dosage of soda after alkaline pre-treatment and sodium chlorite bleaching. Extraction percentage was calculated and after that, samples were characterized by using FT-IR. Produced xylan was converted to xylose with diluted acid hydrolysis and after treatment with active carbon and ultrasonic, reduced sugar was measured by HPLC. Then, extracted xylose was added into yeasts media of *kluyveromyces marxianus* and *Pichia stipites* to evaluate its effects on their growth kinetic. Results showed that by increasing soda dosage, xylan extraction percentage increased. Also, hydrolysis-alone process -without active carbon and ultrasonic- can produce more sugar. Evaluation of yeast's growth kinetic showed that the speed of yeast growth in media including xylose was more than glucose; hence, the efficiency of these yeasts is more for C_5 sugar and it can be used for bio-products manufacturing.

Key words: xylan, bagasse pith, dilute acid, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipites*.