

## سم زدایی هیدرولیزات باگاس نیشکر توسط آهک اشباع به منظور تولید اتانول زیستی

سپیده شگری خانقاه<sup>۱</sup>، مهرداد آذین\*<sup>۲</sup>، هاتف آجودانی فر<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۰۶

تاریخ تصویب: ۹۵/۰۳/۰۹

### چکیده

در طی فرآیند پیش تیمار اسیدی باگاس نیشکر محصولات ناخواسته ای مانند فوران‌ها و ترکیبات فنولی تولید می‌شوند که اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد میکروارگانیسم‌ها دارند. در این تحقیق تأثیر سمیت زدایی با استفاده از آهک اشباع به منظور بررسی اثر فاکتورهای pH، دما و مدت زمان واکنش به روش آماری فاکتوریل کامل مورد بررسی قرار گرفت و مقدار اتانول تولید شده توسط مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در تمام شرایط سمیت زدایی مورد بررسی قرار گرفت. سمیت زدایی به روش آهک اشباع در pH های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ در دماهای ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه و پس از آن رساندن pH به ۵ توسط اسیدسولفوریک انجام شد.

۱ فارغ التحصیل کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان

\*۲ دانشیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران (نویسنده مسئول (Azin@irost.ir)

۳ استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان

سپس سویه موتان *Saccharomyces cerevisiae* 5052PTCC در محیط حاوی هیدرولیزات باگاس سمیت زدایی شده و نشده کشت داده شد. نتایج نشان می‌دهد افزایش pH، دما و مدت زمان سمیت زدایی سبب افزایش حذف فورفورال و در نتیجه افزایش توان تخمیری ساکارومایسس شده است، به طوری که سمیت زدایی در pH ۱ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، سبب ۷۳٪ کاهش غلظت فورفورال و از طرفی ۸۱٪ افزایش بازده تولید اتانول، در مدت زمان ۱۸ ساعت، شده است. اما از طرف دیگر کاهش غلظت قند طی سمیت زدایی به روش آهک اشباع در pH و دمای بالا، اصلی‌ترین مشکل در طی این فرایند می‌باشد، به طوری که در pH ۱ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، به ترتیب ۴۷٪ و ۷۳٪ کاهش در غلظت قند کل و گلوکز مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** پیش تیمار اسیدی، باگاس نیشکر، فوران، فنول، سمیت زدایی، آهک اشباع، فاکتوریل کامل.

## مقدمه

امروزه سوخت‌های جایگزین به علت محدود بودن سوخت‌های فسیلی، گرم‌تر شدن زمین و افزایش جمعیت جهان مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین انواع سوخت‌های جایگزین، اتانول می‌باشد که نه تنها سبب اضافه شدن CO<sub>2</sub> جو و در نتیجه گرم‌تر شدن زمین نمی‌شود بلکه مخلوط آن با بنزین مقدار کمتری از اکسیدهای نیتروژن و مونواکسید کربن را نسبت به بنزین معمولی آزاد می‌کند (Cardona et al., 2011 ، Kent Hoekman, (2009) و (2005) Demirbas). از طرفی دیگر جهت جایگزین نمودن اتانول به عنوان سوخت تنها عامل محیط زیستی کافی نمی‌باشد بلکه هزینه تولید آن باید کمتر یا مشابه با سوخت‌هایی مانند بنزین باشد. در هنگام تولید اتانول از موادی مانند ذرت و عصاره نیشکر، ۴۰-۷۰٪ هزینه‌های تولید مربوط به ماده اولیه مورد استفاده می‌باشد در نتیجه استفاده از ترکیبات لیگنوسلولزی از جمله باقیمانده محصولات کشاورزی مانند باگاس نیشکر سبب کاهش قابل توجهی در هزینه‌ها می‌شود (Quintero et al., Oscar و Carlos et al., (2007) ، (2008) et al., 2008).

اولیه (pretreatment) جهت جداسازی لیگنین و همی سلولز از سلولز، ایجاد تخلخل و برهم زدن ساختار کریستالی سلولز می‌باشند (Singh et al., 1984). تا کنون تحقیقات گسترده‌ای بر روی انواع مختلف روش‌های پیش تیمار اولیه بر روی باگاس نیشکر انجام شده است (Singh & Cheng, 2002) و (Taherzadeh & Eklund, 1997). تیمار اسیدی جزء رایج‌ترین و کارآمدترین روش‌های پیش تیمار اولیه می‌باشد، که به طور جداگانه و یا در دو مرحله و یا به صورت ادغامی با روش‌های هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Taherzadeh & Karimi, 2008). ترکیبات حاصل از هیدرولیز اسیدی مواد لیگنوسلولزی شامل قندهای گلوکز، زایلوز و گالاکتوز می‌باشد (Ashori et al., 2011). یکی دیگر از مشتقات حاصل از تیمار اسیدی مواد لیگنوسلولزی ترکیبات فنولی از جمله وانیلین و ۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید می‌باشند. اثر ممانعت‌کنندگی این ترکیبات هنوز به طور کامل شناخته نشده است. اما به دلیل حلالیت کم این ترکیبات در آب اثر مهارکنندگی آن کاهش می‌یابد (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000) و (Taherzadeh & Eklund, 1997). اسیدهای آلیفاتیک نیز از تخریب فراتر لیگنین و قندها در اثر تیمار اسیدی ترکیبات لیگنوسلولزی حاصل می‌گردد. از جمله

با این حال به علت ساختار محکم مواد لیگنوسلولزی این مواد نیازمند پیش تیمار

آنان می‌توان استیک اسید، فرمیک اسید و لیوولینیک اسید را نام برد (Taherzadeh & Gustaffson, (2000) و Modig et al., (2002) کنندگی آن به اندازه فورفورال نمی‌باشد (1999) et al., (2000).

فورفورال و ۵- هیدروکسی متیل فورفورال (HMF) دو فوران مشتق شده از ترکیبات لیگنوسلولزی می‌باشند که به ترتیب در اثر هیدرولیز فراتر قندهای پنج و شش کربنه حاصل شده‌اند.

فورفورال و هیدروکسی متیل فورفورال، اصلی‌ترین محصولات حاصل از تجزیه فراتر قندها می‌باشند که در ارتباط مستقیم با غلظت اسید و دمای واکنش تیمار اسیدی می‌باشند (Sun & Cheng, (2002) ترکیبات فورانی حاصل، جزوه عوامل اصلی ممانعت کننده رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند، در نتیجه هیدرولیزات حاصل در صورتی می‌توانند به عنوان محیط کشت تخمیر استفاده شوند که مقدار این ترکیبات در محیط کشت کاهش یابد (Taherzade & Eklund, (1997) فورفورال توسط الکل دهیدروژناز و آلدئید دهیدروژناز و با مصرف NADH و NAD<sup>+</sup> سلولی تبدیل به فورفوریل الکل (در شرایط بی‌هوازی) و فوروئیک اسید (در شرایط هوازی) می‌گردد و تا زمانی که تمام فورفورال تبدیل نشده باشد، رشد سلول متوقف می‌گردد. هیدروکسی متیل فورفورال نیز به فرم الکی و اسیدی خود در سلول مخمر تبدیل شده اما اثر ممانعت

جهت کنترل و کاهش اثر مواد ممانعت کننده رشد روش‌های متداول بسیاری معرفی شده است، که از جمله آن‌ها می‌توان: جذب با ذغال فعال، خنثی سازی، استفاده از آهک اشباع، الکترودیالیز، تبادل یونی و تیمار آنزیمی را نام برد (Larsoson & Reimann, (1999) استفاده از آهک اشباع (Overliming) جهت کاهش مواد سمی، به علت کم هزینه بودن و همچنین عملکرد بالای آن بر روی مواد ممانعت کننده رشد مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Martinez et al., (2001) در این روش به محلول حاوی هیدرولیزات مواد لیگنوسلولزی تا pH ۱۰-۱۲ آهک اشباع افزوده می‌شود و در ادامه، واکنش در مدت زمان‌های مختلف و دماهای متفاوت بر حسب نوع ماده لیگنوسلولزی و مقدار مواد ممانعت کننده انجام می‌گردد و (Millati et al., (2002) Purwadi et al., (2004) یکی از مضرات این روش، کاهش همزمان قند و مواد ممانعت کننده در طی واکنش اعلام شده است که می‌تواند سبب کاهش دامنه استفاده از این روش گردد (Rabelo et al., (2009) در تحقیق حاضر اثر سمیت زدایی توسط

آلک-شیکر با اندازه ۳۵-۸۰ MESH (۰,۵-۰,۱۷۵ میلی متر) غربال شد، سپس مخلوط ۱۰% w/v باگاس نیشکر حاوی ۰,۶% اسید سولفوریک غلیظ در دستگاه Microwave BatchSynth® (شرکت Milestone ایتالیا) در دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰,۶۳ دقیقه قرار داده شد. نمونه‌ها بعد از خارج شدن از دستگاه توسط سود ۱۰ نرمال خنثی، و pH آن به ۸,۴ رسانده شدند.

آهک بر روی هیدرولیزات حاصل از تیمار اسیدی باگاس نیشکر مورد بررسی قرار گرفت. اثر سه متغیر pH، دما و مدت زمان فرآیند سمیت زدایی بر روی غلظت مواد سمی و قند موجود در محیط و در ادامه اثر آن بر روی تولید اتانول و توان تخمیر سویه موتان ساکارومایسس سروویزه در شرایط کشت بسته بی هوازی مورد آزمایش قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### هیدرولیز اسیدی:

۲-۲-هیدرولیز آنزیمی: باقیمانده باگاس توسط کاغذ فیلتر mm110MN و فیلتر خلاء از مایع رویی جدا شد. با در نظر گرفتن اینکه ۴۰% w/w باگاس از سلولز تشکیل شده است نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در

هیدرولیزات مورد استفاده در این تحقیق از تیمار دو مرحله ای باگاس نیشکر تهیه شده از شرکت کشت و صنعت کارون به دست آمد. ذرات باگاس نیشکر در دستگاه

#### جدول ۱: طراحی فاکتوریل کامل جهت بررسی اثر شرایط سمیت زدایی

آزمایش	pH	Temperature(°C)	time(min)
۱*	۵	Non-Detoxified	
۲	۱۰	۴۰	۳۰
۳	۱۰	۴۰	۶۰
۴	۱۰	۶۰	۳۰
۵	۱۰	۶۰	۶۰
۶	۱۱	۴۰	۳۰
۷	۱۱	۴۰	۶۰
۸	۱۱	۶۰	۳۰
۹	۱۱	۶۰	۶۰
۱۰	۱۲	۴۰	۳۰
۱۱	۱۲	۴۰	۶۰
۱۲	۱۲	۶۰	۳۰
۱۳	۱۲	۶۰	۶۰

\*تیمار شماره ۱ بدون سم زدایی انجام شد.

مجاورت ۱۰۰ میلی لیتر بافر سیترات ۰,۵ میلی مولار و pH ۴,۸ و آنزیم Cellubrix L (محصول شرکت Novozyme دانمارک)، به میزان ۱۸ FPU به ازای هر گرم سلولز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری-شیکر قرار داده شد (Ashori et al., 2011). در انتها هیدرولیزات حاصل از دو مرحله تیمار اسیدی و آنزیمی با یکدیگر ادغام شدند.

#### سم زدایی:

سمیت زدایی نمونه‌ها درون بشرهای ۲۵۰ میلی لیتر بر روی همزن مغناطیسی انجام شد. جهت سمیت زدایی هیدرولیزات، pH نمونه‌ها با افزودن پودر آهک به ۱۰,۱۱ و ۱۲ رسانده و به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه در در دماهای ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون بن ماری-شیکر قرار داده شدند. سپس آهک نمونه‌ها توسط فیلتر mm110MN و تحت خلاء از هیدرولیزات جدا شد و محلول باقیمانده توسط اسید سولفوریک ۹۸٪ به pH ۵,۵ رسانده شد. طراحی آزمایش‌ها به روش فاکتوریل کامل با استفاده از برنامه Minitab v ۱۶ (محصول شرکت Minitab Inc. آمریکا) انجام شد (Gerry & Keough, 2011). جدول ۱ تمام تیمارهای مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

#### سویه مخمر:

سویه موتان *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این سویه حاصل جهش سویه بومی *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5315 جدا شده از خاک کارخانجات تولید اتانول، توسط اشعه UV می‌باشد. جهش در این سویه در جهت افزایش بازده تولید اتانول و مقاومت به فورفورال انجام شده است.

#### محیط کشت و پیش کشت:

محیط پیش کشت حاوی ۲% (w/v) گلوکز، ۱.۲% آمونیوم سولفات، ۰.۰۶% آمونیوم فسفات و ۱% پودر خیسانده عصاره ذرت بود. گلوکز به طور جداگانه از سایر مواد محیط استریل شد و سپس به سایر مواد محیط کشت اضافه شد.

محیط کشت تخمیری حاوی ۱.۲% (w/v) آمونیوم سولفات، ۰.۰۶% آمونیوم فسفات و ۱% پودر خیسانده عصاره ذرت بود. جهت تهیه منبع قند (منبع کربن) محیط کشت، ابتدا غلظت قند کل هیدرولیزات حاصل از سمیت زدایی در شرایط مختلف، اندازه‌گیری شد و سپس با افزودن گلوکز صنعتی به ۵۳ g/l رسانده شد. محلول قندی به دست آمده مانند محیط پیش کشت به طور جداگانه استریل و به سایر مواد محیط اضافه گردید. محیط کشت

اصلی در حجم ۴۰ میلی لیتر در ویال های دارای درپوش لاستیکی ۵۰ میلی لیتری تقسیم شد.

۲۰ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور با دور 150 rev.min-1

انکوبه شد. تلقیح به محیط کشت اصلی به میزان 10% v/v انجام شد.

نمونه ها به انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. پس از ۱۸ و ۳۶ ساعت، نمونه ها

از نظر تعداد سلول های مخمر، مقدار قند

کل، گلوکز باقیمانده و مقدار اتانول تولیدی

**تلقیح محیط کشت:**

بدین منظور ابتدا یک لوپ کامل از مخمر

به ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی

لیتر محیط پیش کشت، تلقیح و به مدت

## جدول ۲: ترکیبات حاصل از دو مرحله هیدرولیز

ترکیب	غلظت (g/l)
قند کل	۲۹,۵۷۱
گلوکز	۱۴,۵۱۶
فورفورال	۴,۲۰۸
فنول	۱,۲۱۹

(۲۵). اتانول تولید شده در طی مراحل

تخمیر نیز توسط روش دی کرومات پتاسیم

مورد بررسی قرار گرفت Manivannan et

al., (2006).

نرم افزار: به منظور طراحی آزمایشات

به روش فاکتوریل کامل، از نرم افزار

Minitab 16® محصول شرکت

Inc. آمریکا استفاده شد.

## نتایج

### ترکیبات حاصل از هیدرولیز:

ترکیبات حاصل از ادغام هیدرولیزات ناشی

از دو مرحله هیدرولیز اسیدی و آنزیمی در

مورد بررسی قرار گرفت.

### روش های سنجش:

شمارش تعداد سلول های مخمر توسط لام

نئوبار انجام شد. غلظت کل قندهای احیاء

کننده به روش DNS (دی نیترو سالیسیلیک

اسید) سنجش شد (Ghose, 1987). غلظت

گلوکز توسط کیت اختصاصی گلوکز

(محصول شرکت پارس آزمون ایران)

سنجش شد. مقدار فنول توسط روش

Folin-Ciocalteu Micro Method اندازه

گیری شد (Waterhouse, 2001). مقدار

فورفورال توسط روش اسپکتروفوتومتری

جذب UV مورد اندازه گیری قرار گرفت

## جدول ۳: نتایج حاصل از سمیت زدایی هیدرولیزات باگاس نیشکر.

آزمایش	pH	Temperature (°c)	Time (min)	Furfural (g/l)	Sugar (g/l)	Glucose (g/l)	phenol (g/l)
۱	non-Detoxified			۴,۲۰۸	۲۹,۵۷۱	۱۴,۵۱۶	۱,۲۱۹
۲	۱۰	۴۰	۳۰	۳,۸۱۸	۲۳,۸۱۳	۱۲,۱۴۵	۱,۲۵۴
۳	۱۰	۴۰	۶۰	۳,۴۵۷	۲۴,۲۱۴	۱۲,۲۹۰	۱,۲۱۳
۴	۱۰	۶۰	۳۰	۳,۶۳۱	۲۳,۶۷۹	۱۳,۳۰۶	۱,۳۰۶
۵	۱۰	۶۰	۶۰	۳,۳۳۷	۲۴,۷۵۰	۱۲,۹۶۸	۱,۱۵۴
۶	۱۱	۴۰	۳۰	۳,۲۵۳	۲۵,۱۵۲	۱۳,۲۱۰	۱,۳۳۰
۷	۱۱	۴۰	۶۰	۳,۱۷۶	۲۵,۸۲۱	۱۳,۰۶۵	۱,۲۸۹
۸	۱۱	۶۰	۳۰	۲,۶۸۵	۲۲,۲۰۵	۱۰,۷۴۲	۱,۶۸۱
۹	۱۱	۶۰	۶۰	۲,۲۹۱	۲۱,۶۷۰	۱۰,۰۱۶	۱,۷۱۱
۱۰	۱۲	۴۰	۳۰	۱,۸۰۰	۲۱,۱۳۴	۱۰,۲۱۰	۱,۷۴۶
۱۱	۱۲	۴۰	۶۰	۱,۱۹۹	۲۱,۴۰۲	۸,۱۷۷	۱,۸۴۵
۱۲	۱۲	۶۰	۳۰	۱,۲۸۶	۱۸,۵۸۹	۴,۹۳۵	۲,۵۸۴
۱۳	۱۲	۶۰	۶۰	۱,۱۲۲	۱۵,۵۰۹	۳,۱۹۴	۲,۴۰۸

جدول ۱ آورده شده است.

هیدرولیزات به ۱۰، ۱۱ و ۱۲ توسط پودر

### سمیت زدایی:

آهک و ثابت نگه داشتن آن در دماهای

در تحقیق حاضر اثر ۳ متغیر pH، دما و

۴۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ و

مدت زمان واکنش سمیت زدایی توسط

۶۰ دقیقه و سپس کاهش pH تا مقدار ۵,۵

پودر آهک بر روی غلظت فورفورال،

انجام شد.

فنول، قند کل و گلوکز هیدرولیزات حاصل

نتایج حاصل از انجام آزمایشات طراحی

از تیمار باگاس نیشکر مورد بررسی قرار

شده به روش فاکتوریل کامل فاکتورهای

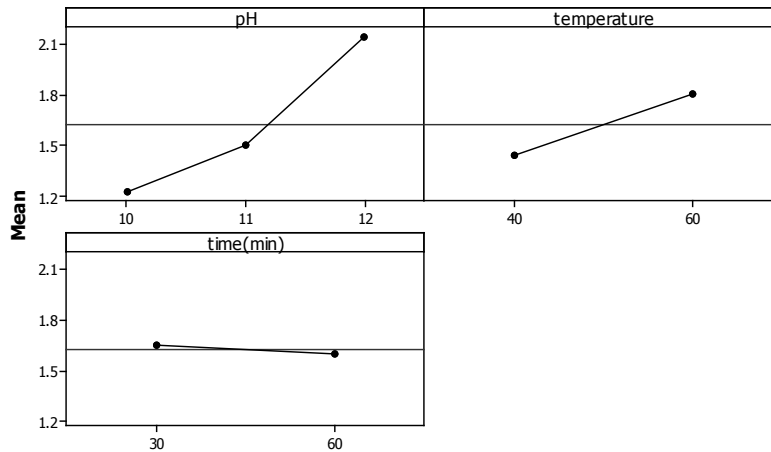
گرفت. سمیت زدایی توسط رساندن pH

دارای بیشترین و کمترین تاثیر را بر روی



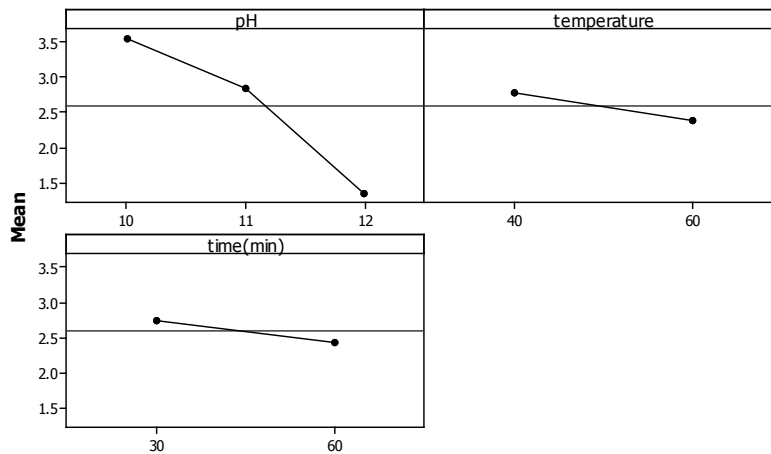
### Main Effects Plot for Phenol (g/l)

Data Means



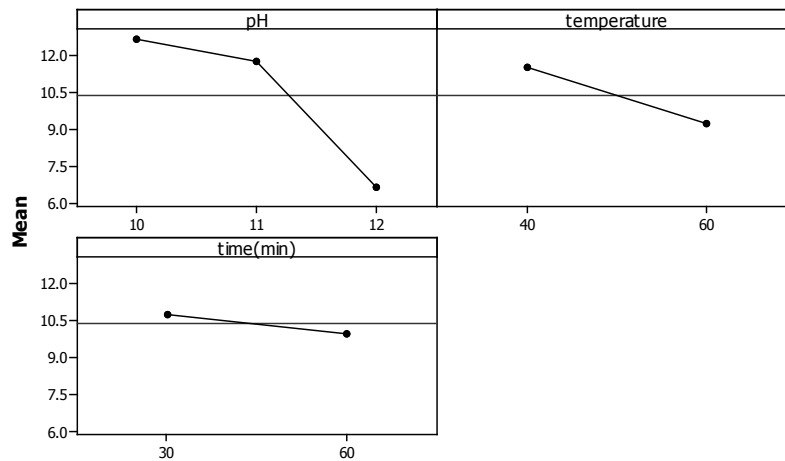
### Main Effects Plot for Furfural (g/l)

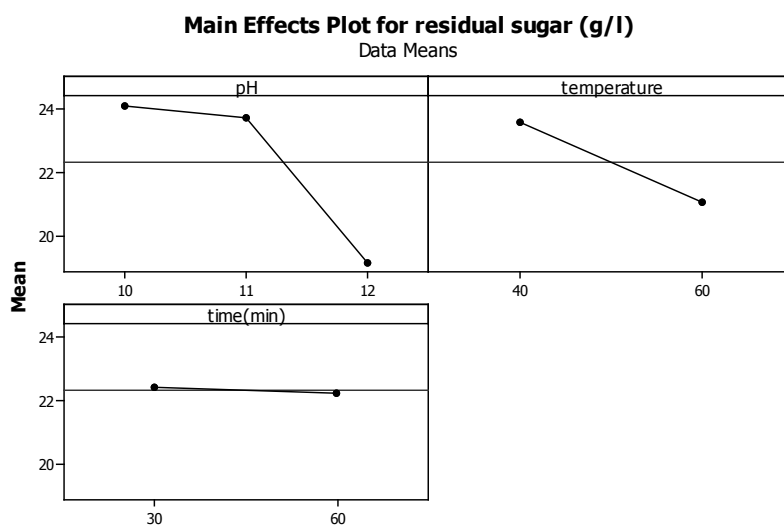
Data Means



### Main Effects Plot for residual glucose (g/l)

Data Means

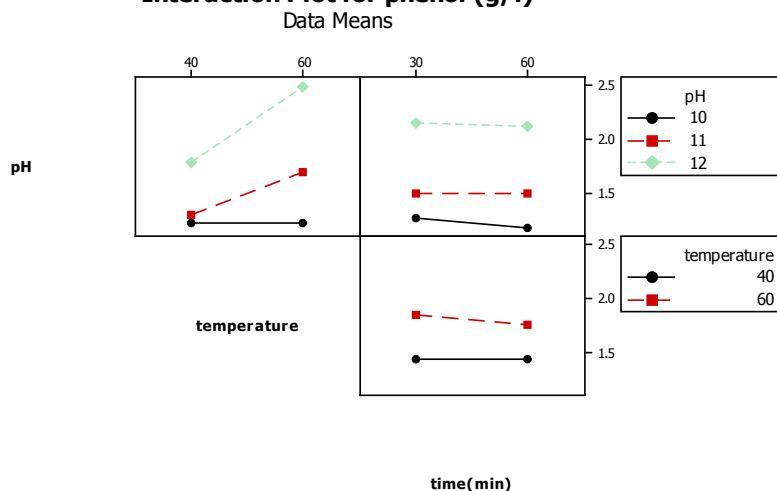




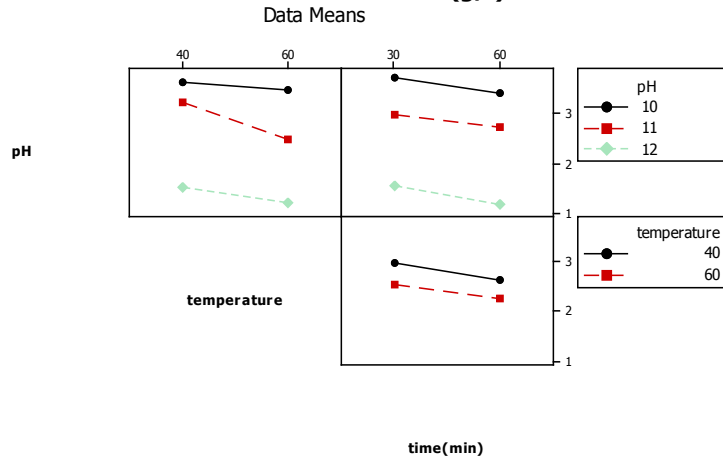
شکل ۱: اثرات اصلی فاکتورها بر روی کاهش فورفورال در شرایط مختلف سمیت زدایی.

میزان کاهش قند نشان داد. جدول ۳ با pH و دمای واکنش سمیت زدایی می باشد به طوریکه بیشترین مقدار کاهش در مقدار فورفورال و قند کل محیط در pH ۱۲ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه حاصل شده است که به ترتیب باعث کاهش ۷۳,۳% و ۴۷,۵% از مقدار اولیه این دو ماده شده است. نتایج بررسی آثار اصلی هر یک از تمام حالت های مورد آزمایش به روش فاکتوریل کامل همراه با نتایج آن می باشد را نشان می دهد. مقایسه نتایج حاصل از تیمار سم زدایی نشده با تیمارهای مختلف سم زدایی نشان میدهد غلظت فورفورال و قند کل به طور قابل مشاهده ای در ارتباط مستقیم

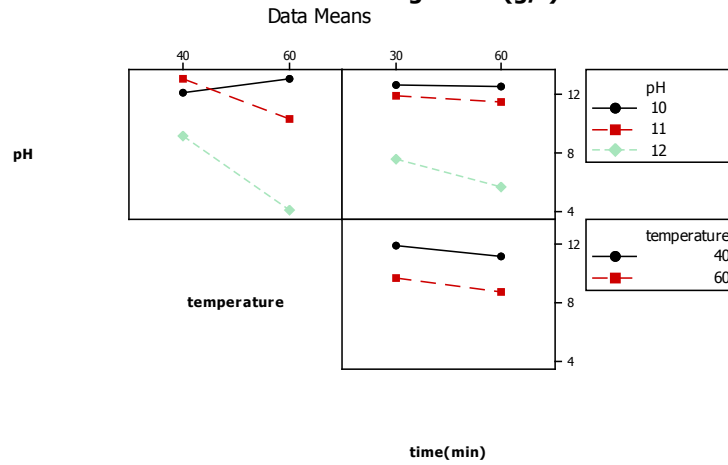
**Interaction Plot for phenol (g/l)**



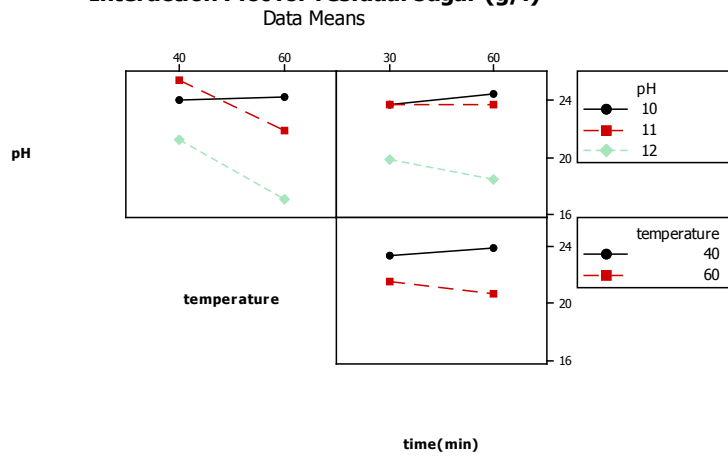
### Interaction Plot for Furfural (g/l)



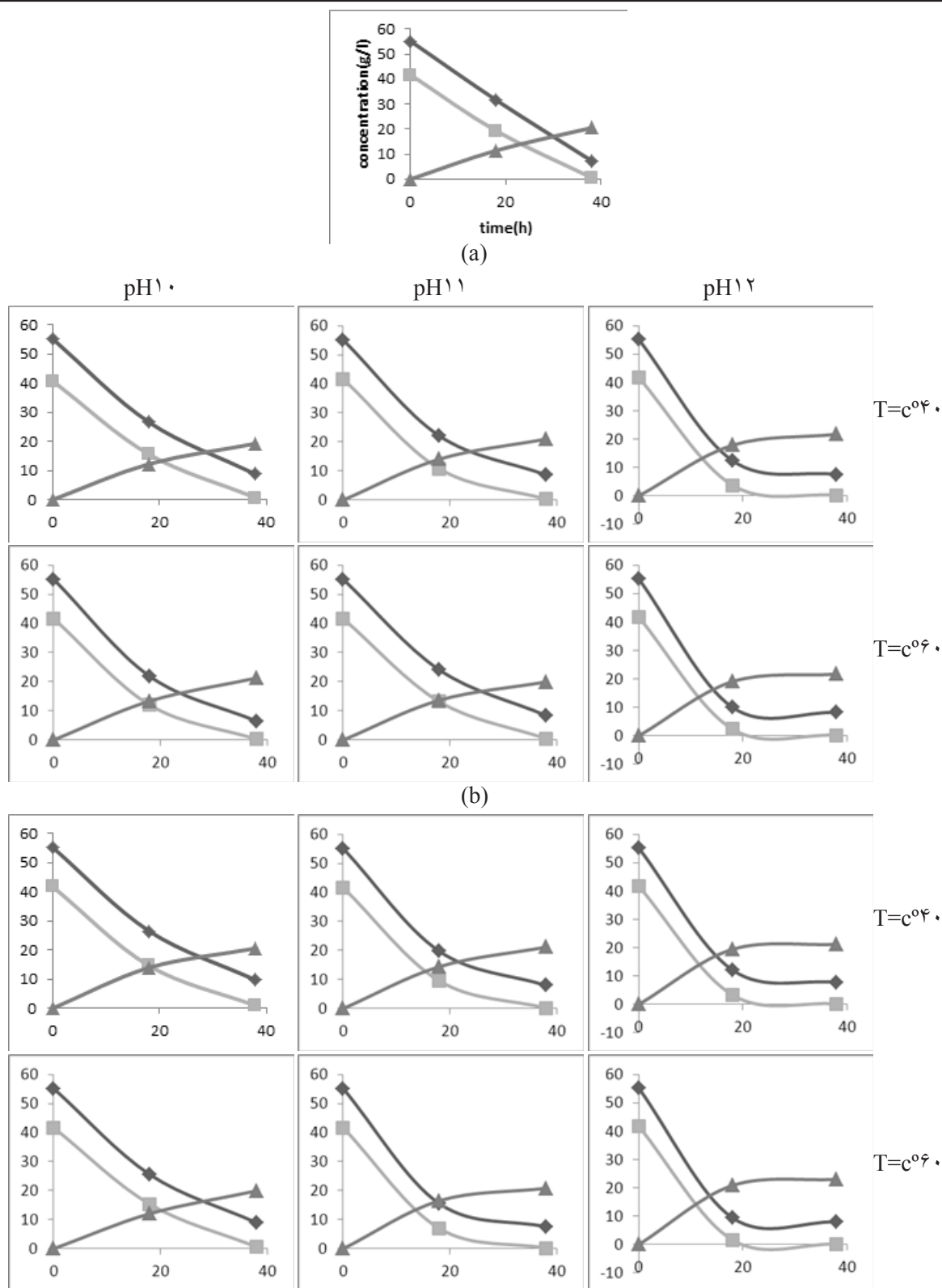
### Interaction Plot for residual glucose (g/l)



### Interaction Plot for residual sugar (g/l)



شکل ۲: واکنش متقابل عوامل مورد آزمایش با یکدیگر



شکل ۵: تغییرات (گرم در لیتر) غلظت قند کل (◆)، گلوکز (■) و اتانول (▲) در شرایط مختلف سمیت زدایی با آهک اشباع در هیدرولیزات باگاس نیشکر در طول زمان (بر حسب دقیقه). a) هیدرولیزات باگاس بدون سمیت زدایی. b) سمیت زدایی پس از ۳۰ دقیقه. c) سمیت زدایی پس از ۶۰ دقیقه.

شده است. این نمودارها اثرات متقابل بین عوامل را نشان می‌دهد. در صورتی که خطوط یا امتداد آن‌ها نسبت به یکدیگر حالت متقاطع داشته باشند، نشانگر آن است که بین عوامل اثرات متقابل وجود دارد و اگر متقاطع نباشد، یعنی بین آن‌ها اثر متقابلی وجود ندارد.

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است در pH های ۱۱ و ۱۲ با افزایش دما در مقدار قند کاهش چشمگیری مشاهده می‌شود اما در pH ۱۰ با افزایش دما در مقدار قند تغییر محسوسی مشاهده نمی‌شود، در نتیجه می‌توان گفت که

فاکتورها بر روی تغییرات مقدار فنول، فورفورال، قند کل و گلوکز به روش فاکتوریل کامل در شکل شماره ۱ آورده شده است. چنانچه از این شکل بر می‌آید، از سه فاکتور بررسی شده، افزایش pH بیشترین اثر را بر روی کاهش غلظت فورفورال، گلوکز و قند کل محیط داشته است، و در مقابل، باعث افزایش فنول گردیده است. زمان اثر ملموسی بر پاسخها نداشته است. افزایش حرارت نیز، بجز در مورد فنول، باعث کاهش مقدار گلوکز، قند کل و فورفورال شده است. اثرات متقابل بین عوامل در شکل ۲ آورده

### جدول ۳: بازده و بهره‌وری تولید اتانول.

آزمایش	بازده وزنی (w/w%)		بهره‌وری (g/l/h)	
	۱۸(h)	۳۶(h)	۱۸(h)	۳۶(h)
۱	۲۱,۶۳	۳۸,۶۴	۰,۶۴	۰,۵۷
۲	۲۳,۱۱	۳۶,۳۳	۰,۶۸	۰,۵۳
۳	۲۶,۲۵	۳۸,۸۱	۰,۷۷	۰,۵۷
۴	۲۵,۷۶	۳۷,۶۵	۰,۷۶	۰,۵۵
۵	۲۲,۷۸	۳۷,۶۵	۰,۶۷	۰,۵۵
۶	۲۶,۵۸	۳۹,۶۳	۰,۷۸	۰,۵۸
۷	۲۷,۲۴	۳۹,۹۶	۰,۸۰	۰,۵۹
۸	۲۵,۲۶	۴۰,۱۳	۰,۷۴	۰,۵۹
۹	۳۱,۲۱	۳۹,۳۰	۰,۹۲	۰,۵۸
۱۰	۳۳,۶۸	۴۰,۹۵	۰,۹۹	۰,۶۰
۱۱	۳۶,۶۶	۳۹,۹۶	۱,۰۸	۰,۵۹
۱۲	۳۶,۰۰	۴۰,۹۵	۱,۰۶	۰,۶۰
۱۳	۳۹,۳۰	۴۳,۴۳	۱,۱۶	۰,۶۴

سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه مشاهده می‌شود، که موجب ۱,۸۱ برابر شدن بازده (yield %) و بهره‌وری تولید اتانول (g.l-1) نسبت به باگاس بدون سمیت زدایی، شده است. با اینحال با توجه به نتایج به دست آمده پس از ۳۶ ساعت، از آنجائیکه زمان کافی در اختیار مخمر بوده است بازده و بهره‌وری مشابهی در تمام نمونه‌ها مشاهده می‌شود، که نشان می‌دهد اثر مستقیم سمیت زدایی به روش آهک اشباع بر روی کاهش مدت زمان تخمیر و در نتیجه افزایش بهره‌وری آن بوده است.

#### بحث

تاکنون روش‌های گوناگونی جهت سمیت زدایی هیدرولیزات حاصل از ترکیبات لیگنوسلولزی ارائه شده است که از جمله آن‌ها می‌توان: جذب با ذغال فعال، خنثی سازی، آهک اشباع، الکترودیالیز، تبادل یونی و روش‌های آنزیمی را نام برد. استفاده از آهک اشباع (Overliming) جزوه کارآمدترین و همچنین ارزان‌ترین روش‌های سمیت زدایی می‌باشد. سمیت زدایی توسط آهک جزوه روش‌های جدید سمیت زدایی نمی‌باشد به طوریکه Leonard و Hajny در سال ۱۹۴۵ گزارشی مبنی بر افزایش pH تا بالاتر از ۱۰ توسط آهک اشباع و بررسی اثر آن بر روی تخمیر

عامل pH در سطوح ۱۱ و ۱۲ با عامل دما واکنش بالایی دارد و عملکرد دما در pH های بالاتر قابل مشاهده است.

#### تخمیر هیدرولیزات حاصل از سمیت زدایی:

غلظت قند کل تمام نمونه‌های هیدرولیزات حاصل از سمیت زدایی با افزودن گلوکز صنعتی به g/155 رسانده شد. نمونه‌ها در شرایط بی‌هوازی در دو تکرار توسط سویه ساکارومایسس سروویزه کشت داده شدند. شمارش سلولی نمونه‌ها در زمان اولیه تلقیح  $107 \times 2$  cell/ml بود.

نتایج مصرف قند کل، گلوکز و تولید اتانول در زمان‌های ۱۸ و ۳۶ به ترتیب در شکل ۳ آورده شده است. شکل ۳ بخش a شیب مصرف قند و تولید اتانول را در هیدرولیزات باگاس بدون سمیت زدایی نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل‌های یاد شده مشاهده می‌شود، هر قدر pH، دما و مدت زمان واکنش سمیت زدایی با آهک اشباع افزایش می‌یابد شیب مصرف قند و تولید اتانول افزایش می‌یابد.

در ادامه، نتایج به دست آمده از بازده و بهره‌وری تولید اتانول در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین مقدار بازده و بهره‌وری تولید اتانول پس از ۱۸ ساعت اولیه تخمیر در هیدرولیزات باگاس سمیت زدایی شده در pH ۱۲ و دمای ۶۰ درجه

می‌گردد، اما از طرفی سبب کاهش غلظت قند محیط نیز می‌شود.

۲. فرآیند سمیت زدایی روند سریعی نمی‌باشد. با این حال، مدت زمان این فرآیند نقش مهمی بر کاهش غلظت مواد ندارد.

۳. اثر دما بر روی سمیت زدایی به اندازه عملکرد pH نمی‌باشد. با این حال، افزایش دما نیز سبب بهتر شدن توان تخمیری هیدرولیزات می‌گردد.

بر حسب نتایج مشاهده شده در جدول ۱ اثر سمیت زدایی در کاهش غلظت فورفورال بدیهی می‌باشد، هرچند در غلظت فنول افزایش جزئی مشاهده می‌شود. احتمال می‌رود لیگنین در شرایط قلیایی شروع به حل شدن می‌کند، در نتیجه افزایش مقدار مواد فنولی می‌تواند ناشی از این موضوع باشد.

در نتیجه شرایط سمیت زدایی که در این مرحله انتخاب گردید عبارت بود از ۶۰ دقیقه تیمار نمونه‌ها در pH ۱۲ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، البته در این شرایط علاوه بر کاهش مقدار فورفورال محیط، و در نتیجه افزایش بهره‌وری تولید اتانول، از مقدار قند اولیه موجود در محیط کمتر کاسته شده است، به طوری که به ترتیب ۷۰٪ و ۲۷٪ کاهش در مقدار فورفورال و قند کل محیط و در نهایت، ۱،۶۸ برابر افزایش در بهره‌وری تولید اتانول مشاهده شد.

را اعلام نموده اند Leonard & Hajni (1945). در تحقیقات دیگری که توسط Millati و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی هیدرولیزات حاصل از تیمار اسیدی درختان کاج انجام شد اثر pH، دما و مدت زمان واکنش را بر روی ترکیبات حاصل از هیدرولیز اسیدی مورد بررسی قرار داد. نتایج تمام این تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات فورانی به طور مستقیم تحت تاثیر سمیت زدایی به روش آهک اشباع قرار می‌گیرند و به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابند، از طرفی غلظت ترکیبات فنولی در محیط گاهی کاهش و گاهی افزایش می‌یابد. با این حال، اصلی‌ترین مشکل استفاده از این روش کاهش ترکیبات قندی همزمان با کاهش ترکیبات فورانی می‌باشد (Millati et al., 2002) و Purwadi et al., (2004).

نتایج به دست آمده در این تحقیق اهمیت انتخاب مقدار هر یک از عوامل pH، دما و مدت زمان واکنش سمیت زدایی را نشان می‌دهد. هر یک از این متغیرها اثرات مستقیمی بر روی نتایج سمیت زدایی و مقدار قند حاصل از هیدرولیز را دارد. به طور کلی اثرات هر یک از عوامل را می‌توان به شرح زیر بیان نمود:

۱. هرگونه افزایش در pH سبب افزایش عملکرد سمیت زدایی و افزایش توان تخمیری هیدرولیزات باگاس نیشکر

افزایش توان تخمیری هیدرولیزات سمیت زدایی شده در شکل ۵ قابل مشاهده است. افزایش pH و دما اثر مستقیمی بر روی کاهش سریع شیب مصرف قند و در نتیجه افزایش شیب تولید اتانول داشته است. به طوریکه اتانول تولید شده در ۶۰ دقیقه تیمار نمونه ها در ۱۲pH و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۱۸ ساعت معادل اتانول تولید شده در مدت زمان ۳۶ ساعت در نمونه تخمیری بدون سمیت زدایی شده است. نتایج به دست آمده در این تحقیق در راستای گزارشات اعلام شده از سمیت زدایی مواد مختلف لیگنوسلولزی می باشد (Purwadi و Millati et al., (2002) et al., (2004). در نتیجه می توان گفت،

استفاده از سمیت زدایی توسط آهک نه تنها سبب کاهش زمان تخمیر و در نتیجه افزایش بهره‌وری تولید اتانول (g.l-1.h-1) می شود، بلکه به علت ارزان و در دسترس بودن می تواند به طور گسترده ای در صنعت بیواتانول مورد استفاده قرار گیرد.

#### سپاسگزاری

نویسندگان از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخاطر تامین محل انجام تحقیقات، تجهیزات و بخشی از مواد آزمایشگاهی، وزارت صنایع، معادن و تجارت و کنسرسیوم تحقیقاتی تولید بیواتانل بخاطر تامین هزینه های انجام طرح سپاسگزاری می نمایند.

#### منابع

- Cardona C. Quintero J. Paz I. (2011) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource technology*. 101:4754-4766.
- Quintero J. Montoya M. Sanchez O. Giraldo O. Cardona C. (2008) Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for Colombian case. *Energy*. 33:385-399.
- Carlos A. Cardona C. Oscar J. Sanchez O. (2007) Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*. 98:2415-2457.
- Oscar J. Sanchez O. Carlos A. Cardona C. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*. 99:5270-5295.



- Taherzadeh M. Karimi K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*. 9:1621-1651.
- Palmqvist E. Hahn-hagerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*. 74:25-33.
- Modig T. Liden G. Taherzadeh M. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 363:769-776.
- Taherzadeh M. Gustafsson I. (2000) Physiological effects of 5-hydroxy methyl furfural on *saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and biotechnology*. 53:701-708.
- Kent Hoekman S. (2009) Biofuels in the U.S. – Challenges and Opportunities. *Renewable Energy*. 34:14-22.
- Taherzade M. Eklund R. (1997) Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & engineering chemistry research*; 36:4659-4665.
- Larsoson S. Reimann. (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Biochemistry and biotechnology*. 77:91-103.
- Martinez A. Rodriguez M. Well M. York S. Oreston J. Ingram L. (2001) Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology progress*. 17:287-293.
- Millati R. Niklasson C. Taherzadeh M. (2002) Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 38(4):525-522.
- Purwadi R. Niklasson C. Taherzadeh M. (2004) Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . *Biotechnology*. 114:187-198.
- Rabelo S. Filho R. Costa A. (2009) Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*. 153:139-

---

150.

- Gerry P. Keough J. (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University press. ISBN 9780521009768
- Singh A. Das K. Sharma D. (1984) Integrated process for production of xylose, furfural, and glucose from bagasse by two-step acid hydrolysis. *Industrial & engineering chemistry product research and development*. 23:257-262.
- Sun Y. Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*. 83:1-11.
- Taherzadeh M. Ekund R. (1997) Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & engineering chemistry research*. 36:4659-4665.
- Demirbas A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy sources*. 27:327-337.
- Ashori A. Hamzeh Y. Amani F. (2011) Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Stalk: Chemical Composition and Fiber Morphology. *Journal of Polymers and the Environment*. 19:297-300.
- Taherzadeh M. Niklasson C. Liden G. (1999) Conversion of dilute-Acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. *Bioresource Technology*. 69:59-66.
- Ghose T. (1987) Measurement of cellulose activities. *Applied chemistry division commission on Biotechnology*. 59(2):257-268.
- Waterhouse A. (2001) Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Martinez A. Rodriguea M. York S. Prestone J. Ingram L. (2000) Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnology progress*. 16:637-641.
- Manivannan A. Jayarani P. Narendhirakannan. (2012) Enhance acid hydrolysis for Bioethanol production from water hyacinth using fermentating yeast *Candida intermedia* NRRL Y-981. *Scientific and industrial research*. 71(1):51-56.

Ahi M. Azin M. Shojaosadat Ebrahimi A. Nosrati M. (2013) Optimization of sugarcane bagasse hydrolysis by Microwave-Assisted Pretreatment for Bioethanol Production. *Chemical Engineering Technology*. 36(11):1997-2005.

Leonard R. Hajny G. (1945) Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. *Industrial & engineering chemistry research*. 37:390-395.

