فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۱- ۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

استفاده از نشاسته تصفیه نشده برای تولید بوتانول توسط باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم*

مریم خیراندیش: دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، maryamkheyrandish@yahoo.com
محمد علی اسداللهی *: استادیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، ma.asadollahi@ast.ui.ac.ir
اعظم جیحانی‌پور: استادیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، a.jeihanipour@gmail.com
کیخسرو کریمی: استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران، karimi@cc.iut.ac.ir
حمید ریسمانی یزدی: دکتری بیوتکنولوژی صنعتی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه MIT، کمبریج، ایالات متحده آمریکا، hrismani@mit.edu

چکیده

مقدمه: مشکلات ناشی از پدیده گلخانه‌ای و آلودگی محیط زیست، افزایش تقاضای جهانی انرژی و کاهش منابع سوخت‌های فسیلی، پژوهش‌های زیادی در زمینه تولید انرژی‌های تجدیدپذیر از جمله سوخت‌های زیستی را در سال‌های اخیر به دنبال داشته است. به تازگی از میان سوخت‌های زیستی، بوتانول به عنوان یک سوخت مایع جایگزین بنزین و گازوئیل معرفی شده است. باکتری‌های بی‌هوازی مانند *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* توانایی تولید استن، اتانول و بوتانول را از منابع قندی مختلف دارند. این باکتری به علت دارا بودن آنزیم آلفا- آمیلاز قادر به هیدرولیز نشاسته و استفاده مستقیم از آن به عنوان سوبسترا است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از سوبستراهای گلوکز، نشاسته تصفیه شده و نشاسته تصفیه نشده در غلظت‌های متفاوت برای تولید بوتانول توسط باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* PTCC ۱۴۹۲ به روش بی هوازی استفاده شد.

نتایج: برای هر سه منبع کربنی استفاده شده، غلظت بهینه سوبسترا ۶۰ گرم بر لیتر به دست آمد. نتایج نشان داد که این باکتری توانایی تولید بوتانول با استفاده از هر سه منبع کربن بدون هیچ‌گونه پیش تیماری را دارد. غلظت بوتانول تولیدی با استفاده از نشاسته تصفیه نشده، نشاسته تصفیه شده و گلوکز به ترتیب برابر با ۶/۴۵، ۵/۸۱ و ۴/۶۴ گرم بر لیتر بود که نشان داد نشاسته تصفیه نشده به خوبی توانایی تولید بوتانول را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که امکان استفاده از نشاسته بدون هیدرولیز به عنوان منبع کربن برای تولید بوتانول وجود دارد. همچنین، نتایج نشان داد که نشاسته تصفیه نشده بوتانول بیشتری نسبت به نشاسته تصفیه شده تولید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بوتانول، *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم*، نشاسته، سوخت زیستی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

در سال‌های اخیر،کاهش چشمگیر منابع انرژی، افزایش شدید آلودگی‌های ناشی از سوخت‌های فسیلی، افزایش آگاهی درباره اثرات شدید و مضر آلودگی محیط‌زیست، گرمایش جهانی و صعود دایمی قیمت نفت خام به عنوان منبع اصلی انرژی، باعث شده که یافتن سوخت‌های جایگزین با خاصیت تجدیدپذیری و سازگاری با طبیعت به یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های پژوهشگران تبدیل شود. از این رو پژوهش‌های وسیعی در زمینه یافتن منابع انرژی جایگزین سوخت‌های فسیلی انجام شده ودر نتیجه، سوخت‌های زیستی[1] به عنوان یکی از جایگزین‌های مناسب برای سوخت‌های فسیلی معرفی شده‌اند (۱). از میان سوخت‌های زیستی، تاکنون اتانول بیش‌ترین سهم تولید را به خود اختصاص داده و هم اکنون در بسیاری از کشورهای توسعه یافته جهان به عنوان سوخت خودرو استفاده می‌شود (۲ و ۳). بوتانول نیز از دیگر سوخت‌های زیستی است که به علت مزایایی مانند محتوای انرژی بالاتر، فراریت و خورندگی کمتر و امکان ترکیب با بنزین به هر نسبت، در سال‌های اخیر مورد توجه جدی قرار گرفته است (۴). بر اساس پژوهش‌ها و نتایج به دست آمده که نشان دهنده اقتصادی بودن تولید بوتانول با روش تخمیر است، شرکت گوو[2] در سال ۲۰۱۱ نخستین مقیاس تجاری تولید بیوبوتانول با ظرفیت ۱۸ میلیون گالن در سال را با تجهیزات تولید کننده اتانول ایجاد کرد (۵).

دو شرکت بزرگ نفتی، شرکت دیوپونت[3] آمریکا و شرکت بریتیش پترولیوم[4] انگلیس آمادگی خود را برای تولید و تجاری‌کردن بوتانول بر پایه سوبسترای زیستی اعلام کرده‌اند (۶ و ۷).

در سال‌های اخیر، با افزایش قیمت سوخت‌های فسیلی و همچنین پیشرفت‌های به وجود آمده در زمینه تولید زیستی بوتانول، استفاده از فرآیندهای تخمیری برای تولید بوتانول مورد توجه قرار گرفته است. از آنجا که منبع کربن استفاده شده در محیط کشت سهم زیادی در قیمت تمام شده فراورده‌های زیستی با ارزش افزوده کمابیش پایین مانند بوتانول دارد، کاهش هزینه منبع کربن می‌تواند موجب کاهش قیمت و در نتیجه اقتصادی شدن فرآیند شود (۸ و ۹). با توجه به حجم زیاد و در دسترس بودن نشاسته تصفیه نشده، قیمت ارزان آن و نیز توانایی باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* برای هیدرولیز نشاسته، در این پژوهش تولید بوتانول توسط این باکتری و با استفاده از نشاسته تصفیه نشده، نشاسته تصفیه شده و گلوکز بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

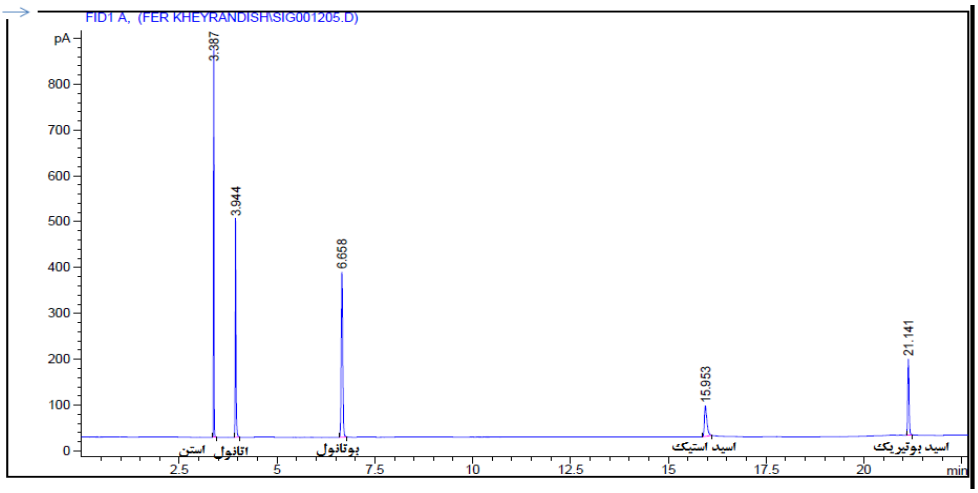
میکروارگانیسم، شرایط کشت، نگهداری و تخمیر: باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* با شماره ۱۴۹۲ PTCC به شکل لیوفیلیزه ازکلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.این باکتری در محیط کشت گوشت پخته[5] در میکرتیوب های ۱/۵ میلی لیتری در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی (گرم بر لیتر): پپتون ۳، عصاره مخمر ۱ و گلوکز ۲۰ (محیط کشت پپتون، عصاره مخمر و گلوکز یا به اختصار:PGY) همراه با ۰/۰۵ درصد (حجمی/ حجمی) محلول ۰/۰۳، L- سیستئین در ویال‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری که قبل از تلقیح توسط عبور جریان گاز نیتروژن عاری از اکسیژن (عبور داده شده از ستون داغ مس برای حذف اکسیژن) کاملا بی هوازی شده بود، ریخته شد. پس از بی‌هوازی کردن، ویال‌های حاوی سیستئین در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و ویال‌های حاوی محیط کشت در دمای ۱۱۵ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد. از هر یک از محلول‌های بافر، ویتامین و مواد معدنی (محلول‌های P2) که توسط فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شده بود، به ویال‌ها اضافه شد. این محیط (PGY+P2) به عنوان پیش کشت استفاده شد. برای بررسی سوبستراهای مختلف و غلظت آن‌ها، محلول‌های P2 و پپتون و عصاره مخمر مثل محلول پیش کشت تهیه و سپس، غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ از سه سوبسترا به محلول اضافه شد. تخمیر در شرایط کاملا بی‌هوازی و به مدت ۹۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ دور بر دقیقه با اسیدیته اولیه ۶/۸ انجام شد. در حین تخمیر برای اطمینان از بی‌هوازی بودن شرایط کشت از شناساگر رزازورین استفاده شد. این شناساگر در شرایط هوازی دارای رنگ صورتی است و با تغییر شرایط به شکل بی هوازی، رزازورین بی‌رنگ می‌شود (۱۰). همچنین با استفاده از رنگ آمیزی گرم از عدم آلودگی محیط کشت اطمینان حاصل شد.

محلول‌های P2: محلول بافر: این محلول شامل (گرم در لیتر): پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۵۰، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۵۰، آمونیوم استات ۲۲۰. محلول ویتامین: این محلول شامل (گرم در لیتر): بیوتین ۰/۰۰۱، تیامین ۰/۱ و پارا آمینوبنزوئیک اسید ۰/۱ محلول معدنی: این محلول شامل (گرم در لیتر): سولفات منیزیم هفت آبه ۲۰، سولفات منگنز یک آبه ۱، سولفات آهن دو ظرفیتی هفت آبه ۱ و کلرید سدیم ۱ است.

روش تحلیل: در ساعات مختلف پس از شروع تخمیر، از هریک از ویال‌ها نمونه‌گیری شد. حلال‌ها (استن، اتانول و بوتانول) و اسیدهای موجود در محیط گشت با کروماتوگرافی گازی ساخت شرکت اجیلنت مدل ۶۸۹۰ مجهز به آشکارساز FID و ستون اینوواکس[۶] اندازه گیری شد. دمای آون از ۸۰ تا ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت. دمای ورودی و آشکارساز در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. از نیتروژن به عنوان گاز حامل با شدت جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. پیک‌های مربوط به استن، اتانول، بوتانول، اسید استیک و اسید بوتیریک به ترتیب در زمان‌های اقامت ۳/۴، ۳/۹، ۶/۶، ۱۵/۹ و ۲۱/۱ دقیقه پس از تزریق مشاهده شد (شکل ۱).

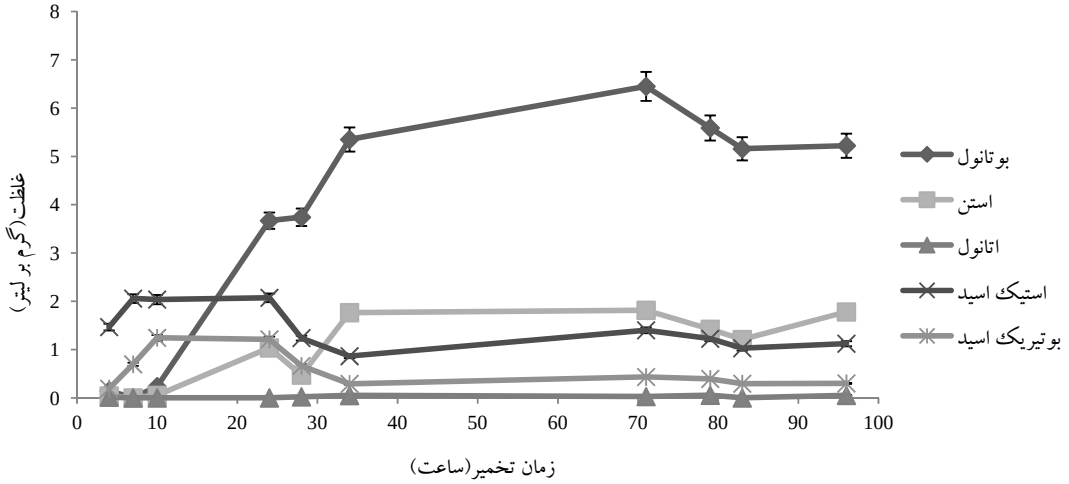
مقدار نشاسته موجود در نشاسته تصفیه نشده با استفاده از روش ان رل[۷] برابر با ٪۲ ± ۹۲/۴ مشخص شد (۱۱).



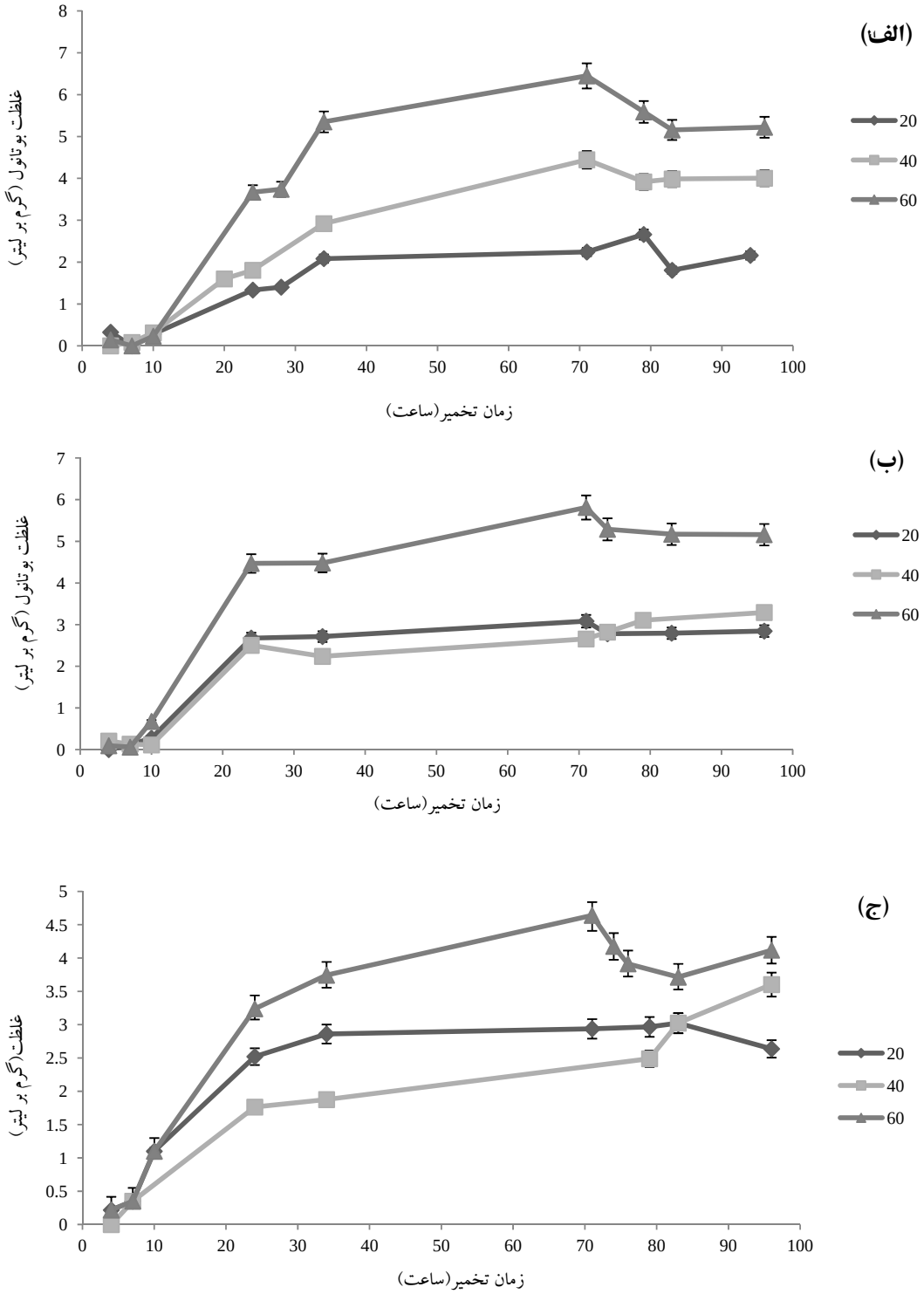
شکل ۱- کروماتوگرام حلال‌ها و اسیدها

نتایج

بررسی سوبستراهای مختلف: مهم‌ترین عامل اقتصادی در تخمیر بوتانول مربوط به هزینه سوبستراست، که در حدود ۶۰ درصد هزینه تولید را در برمی‌گیرد (۱۲). بنابراین، استفاده از مواد ارزان قیمت مانند نشاسته، در اقتصادی شدن فرآیند سهم به سزایی دارد. به منظور بررسی سوبستراها و تعیین غلظت بهینه آن‌ها، محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم بر لیتر از گلوکز، نشاسته تصفیه نشده و نشاسته تصفیه شده در ویال های ۱۲۵ میلی‌لیتر تهیه و با ثابت نگه داشتن سایر عوامل مؤثر، میزان تولید بوتانول مقایسه شد. فرآیند تخمیر استن- بوتانول- اتانول (ABE) به شکل مشخص به دو مرحله تولید اسید و تولید حلال تقسیم می‌شود. مرحله تولید اسید در ۱۶ ساعت اولیه تخمیر مشاهده شد که در آن تولید توده سلولی و اسیدهای آلی به سرعت رخ می‌دهد. حداکثر میزان تولید اسید ۱ گرم بر لیتر بود. تولید زیاد اسید در مرحله تولید اسید سبب کاهش اسیدیته از ۶/۵ به ۴/۵ شد و مقدار اندکی حلال نیز تولید شد. هنگامی که سلول‌ها به فاز سکون رشد خود رسیدند، مرحله تولید حلال شروع شد. در این مرحله، اسیدهای تولید شده در مرحله قبل برای تولید حلال استفاده شدند و به تدریج اسیدیته محیط افزایش یافت (شکل ۲). نتایج نشان داد که حداکثر تولید بوتانول به ترتیب در نشاسته تصفیه نشده، نشاسته تصفیه شده و گلوکز با غلظت ۶۰ گرم بر لیتر، برابر با ۶/۴۵، ۵/۸۱ و ۴/۶۴ گرم در لیتر بوده و این بیشینه تولید ۷۱ ساعت پس از شروع فرآیند تخمیر رخ می‌دهد (شکل ۳). همچنین، بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش تولید حلال، تولید اسیدها کاهش یافت (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات غلظت حلال و اسیدهای تولیدشده بر حسب زمان در غلظت ۶۰ گرم بر لیتر از نشاسته تصفیه نشده با استفاده از باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم*



شکل ۳- تغییرات غلظت بوتانول تولید شده بر حسب زمان توسط باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* در غلظت های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ گرم بر لیتر سوبستراهای الف) نشاسته تصفیه نشده ب) نشاسته تصفیه شده ج) گلوکز (اعداد حاصل ۲ بار تکرار هستند).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که مقدار بوتانول تولیدی با استفاده از نشاسته تصفیه نشده بیشتر از سوبستراهای دیگر است. بالاتر بودن میزان تولید بوتانول با استفاده از نشاسته تصفیه نشده در مقایسه با دو سوبسترای دیگر را می‌توان به محتوای نیتروژن نشاسته تصفیه نشده (۰/۷ درصد) نسبت داد زیرا پژوهش‌های انجام شده نشان دهنده اثر مثبت نیتروژن اضافی روی تولید بوتانول بوده است (۱۳). استفاده از منابع نشاسته‌ای برای تولید بوتانول توسط دیگران نیز بررسی شده است. برای مثال، جسه[۸] و همکاران موفق به تولید بوتانول با بازده ۲۳/۶ درصد با استفاده از نشاسته بادام زمینی توسط *کلستریدیوم بیجرینکی* شدند (۱۴). لی[۹] و همکاران نیز با استفاده از *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* جهش یافته نشاسته کاساوا را به طور مستقیم به بوتانول تبدیل کردند و ۳۱ درصد بوتانول نسبت به سوبسترا تولید کردند (۱۵). در این مطالعه بازده تولید بوتانول توسط نشاسته تصفیه شده و تصفیه نشده به ترتیب به میزان ۲۵ و ۳۹ درصد افزایش یافت که نسبت به کارهای قبل مقادیر قابل ملاحظه‌ای هستند. همچنین، کاهش بوتانول تولیدی در انتهای تخمیر احتمالا به علت تبخیر از محیط است و به علت اینکه نمونه‌گیری از ویال‌های حاوی نشاسته با سرسرنگ بزرگتر انجام می‌شد، در انتهای تخمیر تبخیر انجام شده است.

بنابراین، نشاسته پتانسیل خوبی به عنوان منبع کربن ارزان قیمت و در دسترس برای تولید بوتانول توسط باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* دارد.

References

(1) Davis S., Morton III S. Investigation of ionic liquids for the separation of butanol and water. *Separation Science and Technology* 2008; 43 (9- 10): 2460- 72.

(2) Imani H., Jeihanipour A., Asadollahi M.A. Application of activated sludge as a complementary in bioethanol production. *Biological Journal of Microorganisms* 2015; 4 (13): 83- 92.

(3) Ahi M., Azin M., Shojaosadati S.A., Farahani E.V., Nosrati M. Optimization of media for bioethanol production by *Pichia stipitis* from sugarcane bagasse pretreated by dilute acid. *Biological Journal of Microorganisms* 2014; 3 (9): 11- 20.

(4) Kheyrandish M., Asadollahi M.A., Jeihanipour A., Doostmohammadi M., Rismani-Yazdi H., Karimi K. Direct production of acetone-bitanol-ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Fuel* 2015; 142: 129- 33.

(5) Edward M. Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology* 2011; 22 (3): 337- 43.

(6) Cascone R. Biobutanol--A Replacement for Bioethanol? *Chemical Engineering Progress* 2008; 104 (8): 4.

(7) Shapovalov O., Ashkinazi L. Biobutanol: Biofuel of second generation. *Russian Journal of Applied Chemistry* 2008; 81 (12): 2232- 6.

(8) Jones D.T., Woods D.R. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* 1986; 50 (4): 484- 524.

(9) Niknezhad S.V., Asadollahi M.A., Biria D., Zamani A. Optimization of microbial production of xanthan gum by the bacterium *Xanthomonas* campestris using the hydrolyzed starch. *Biological Journal of Microorganisms* 2013; 2 (5): 1- 10.

(10) Dimitar K., Danka G., Ivan S. A simple and rapid test for differentiation of aerobic from anaerobic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003; 19: 233- 8.

(11) Sluiter A., Sluiter J. Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC 2008 Technical Report NREL/ TP-510-42624.

(12) Ennis B.M., Gutierrez N.A., Maddox IS. The acetone-butanol-ethanol fermentation: A current assesment. *Process Biochemistry* 1986; 21: 131- 46.

(13) Madihah M., Ariff A., Sahaid K., Suraini A., Karim M. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2001; 17 (6): 567- 76.

(14) Jesse TW., Ezeji TC., Qureshi N., Blaschek HP. Production of butanol from starch-based waste packing peanuts and agricultural waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002; 29 (3): 117- 23.

(15) Li HG., Luo W., Wang Q., Yu XB. Direct fermentation of gelatinized cassava starch to acetone, butanol, and ethanol using *Clostridium acetobutylicum* mutant obtained by atmospheric and room temperature plasma. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014; 172 (7): 3330- 41.

[1]- Biofuel
[2]- GEVO
[3]- Dupont
[4]- British petroleum (BP)
[5]- Cooked meat
[6]- Innowax
[7]- NREL
[8]- Jesse
[9]- Li

The use of non- treated starch for butanol production by *Clostridium acetobutylicum*

Maryam Kheyrandish
M.Sc. Student in Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, maryamkheyrandish@yahoo.com
Mohammad Ali Asadollahi *
Assistant Professor of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, ma.asadollahi@ast.ui.ac.ir
Azam Jeihanipour
Assistant Professor of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, a.jeihanipour@gmail.com
Keikhosro Karimi
Assistant Professor of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, karimi@cc.iut.ac.ir
Hamid Rismani-Yazdi
Ph.D. in Industrial Biotechnology, Massachusetts Institute of Technology, hrismani@mit.edu

Abstract

Introduction: Greenhouse effect problems, environmental pollution, global increase in oil demand, and reduced fossil fuel resources have boosted research on the production of renewable energies such as bioenegries in recent years. Amongst various biofuels, biobutanol has been recently introduced as a replacement liquid fuel for gasoline and gas oil. Anaerobic bacteria such as *Clostridium acetobutylicum* are able to produce acetone, butanol, and ethanol using different sugar sources. This bacterium exhibits amylolytic activity and therefore is able to hydrolyzes starch to glucose and use it directly as carbon source.

Materials and methods: In this study, three substrates including glucose, treated starch and starch were used in different concentrations to produce butanol by *Clostridium acetobutylicum* PTCC 1492.

Results: For all three carbon sources, 60 g/ l of substrate was found as the optimum concentration. The results revealed that this bacterium is capable of producing butanol using all three carbon sources without any treatment. Butanol concentrations of 6.45, 5.81, and 4.64 g/ l were obtained using non-treated starch, treated starch, and glucose as carbon sources, respectively.

Discussion and conclusion: The results suggested the possibility of using non-hydrolyzed starch as carbon source for butanol production. Also it was shown that non-treated starch produces more butanol compared to the treated starch.

Key words: Butanol, *Clostridium acetobutylicum*, Starch, Biofuel

* Corresponding author
Received: April 19, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014