DOI: 10.22059/ijbse.2020.271766.665133 مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۲۹۳-۲۸۵)

Acidic Hydrolysis of Bread Waste for Bio-ethanol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*

SAMANE TORABI[1], SEYED REZA HASSAN-BEYGI[3]SATTARI, BEHZAD [2]GHOBADIAN, BARAT [1*]

1. Department of Agro-technology, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Biosystem Engineering, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Department of Food Industry, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
(Received: Jan. 20, 2019- Revised: Jan. 20, 2020- Accepted: Jan. 25, 2020)

ABSTRACT

In-spite of large amounts production of bread waste annually, this waste is not suitable for food and animal feed applications due to aflatoxin contamination. In this study, bio-ethanol production from bread waste by *Saccharomyces cerevisiae* was investigated using acidic hydrolysis method. The acidic hydrolysis was performed by an autoclave apparatus. The effect of acidic solution concentration and time on amount of glucose was investigated. The experiments were carried out at loading of 160 g/l. Reduction of aflatoxin was measured for the sample with the greatest yield in acid hydrolysis. The sample obtained from hydrolysis was used for the production of bio-ethanol using *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that the effect of concentration of acid and time was significant at 1% level on the amount of glucose. Hydrolysis liberated the greatest amount of carbohydrate (80.64 g/l glucose) at the acidic solution concentration of 1% and time of 20 minutes. Also, acidic hydrolysis reduced aflatoxin B_1 and B_2 by 100% and 20.70%, respectively. The greatest percentage of bio-ethanol production in the fermentation phase of hydrolysis samples was 4.7 (v / v%).

Keywords: Aflatoxin, Bio-fuel, Bio-Fermentation, Glucose.

* Corresponding Author's Email: rhbeigi@ut.ac.ir

هیدرولیز اسیدی ضایعات نان برای تولید بیواتانول توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)

سمانه ترابی[۱]، سیدرضا حسن‌بیگی[۱*]، برات قبادیان[۲]، بهزاد ستاری[۳]

۱. گروه مهندسی فنی کشاورزی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. گروه فناوری صنایع غذایی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۳- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۱۰/۳۰- تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۱/۵)

چکیده

در حالی‌که به میزان زیادی ضایعات نان هر ساله تولید می‌شود، به دلیل آلودگی به افلاتوکسین، این ضایعات مناسب مصارف غذایی و خوراک دام نیستند. در این پژوهش تولید بیواتانول از ضایعات نان توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه[۱] به روش هیدرولیز اسیدی مورد تحقیق قرار گرفت. هیدرولیز اسیدی در دستگاه اتوکلاو انجام شد. اثر غلظت محلول اسیدی و زمان بر میزان گلوکز بررسی گردید. آزمایش‌ها در بارگذاری ۱۶۰ گرم بر لیتر انجام شد. کاهش آلودگی به آفلاتوکسین برای نمونه با بیش‌ترین بازده در هیدرولیز اسیدی مورد سنجش قرارگرفت. محلول حاصل از هیدرولیز با استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه برای تولید بیواتانول استفاده‌گردید. نتایج نشان داد که اثر متغیرهای غلظت اسید و زمان بر میزان گلوکز در سطح ۱٪ معنی‌دار است. هیدرولیز در غلظت محلول اسیدی ۱ درصد و زمان ۲۰ دقیقه با گلوکز تولیدی ۸۰/۶۴ گرم بر لیتر بیش‌ترین مقدار کربوهیدرات را آزاد می‌کند. همچنین هیدرولیز اسیدی به ترتیب باعث کاهش ۱۰۰ درصد و ۲۰/۷۰ درصدی آفلاتوکسین B_1 و B_2 شده است. بیشترین درصد تولید بیواتانول در فاز تخمیر نمونه‌های هیدرولیز، مقدار ۴/۷ (v/v٪) بود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، تخمیر زیستی، گلوکز، زیست سوخت.

مقدمه

استفاده از زیست سوخت‌ها، به ایران یک فرصت بهتر جهت استفاده از منابع انرژی غیرفسیلی می‌دهد و باعث کاهش مصرف سوخت‌های فسیلی و آلایندگی‌های مرتبط می‌شود (Najafi *et al.*, 2009). زیست سوخت‌ها را می‌توان به انواع زیست سوخت-های مایع (بیودیزل و بیواتانول)، گازی (بیوگاز) و جامد تقسیم-بندی نمود. تولید و مصرف زیست سوخت‌های مایع مانند بیواتانول و بیودیزل از مواد گیاهی در بخش حمل و نقل کشورهای مختلف جهان رواج یافته است (Hassan-beygi *et al.*, 2013)؛ اما تولید زیست سوخت‌ها نیاز به توسعه زیر ساخت‌های خاص خود را دارد که یکی از اساسی‌ترین آن‌ها مواد گیاهی است که از آن‌ها بتوان زیست سوخت تولید نمود. از مواد گیاهی مختلفی می‌توان جهت تولید زیست سوخت‌ها استفاده نمود. امروزه تلاش محققان بر استفاده نکردن از مواد گیاهی قابل خوراک برای انسان و دام جهت تولید زیست سوخت‌ها متمرکز است؛ زیرا استفاده از این گیاهان برای تهیه سوخت می‌تواند در آینده منجر به از بین رفتن ذخایر خوراکی برای بشر و دام در سراسر کره خاکی شود (Ebrahimi & Rahmani, 2012). به علاوه استفاده از گیاهان خوراکی باعث افزایش قیمت محصولات کشاورزی و متعاقبا قیمت غذا به خاطر افزایش قیمت مواد اولیه می‌شوند (Obeidavi, 2014). امروزه کشت گیاهان غیرخوراکی برای استفاده جهت تولید زیست سوخت‌ها مورد توجه است. با این حال، کشت این گیاهان می‌تواند موجب مخاطرات زیست محیطی در حوزه تولید کشاورزی شود. به عنوان مثال گسترش پهنه‌های کشاورزی و در نتیجه کاهش سطح جنگل‌ها، مراتع و تنوع زیستی یک نگرانی عمده در این زمینه است. بهترین راهکار تولید زیست سوخت‌ها مانند بیواتانول از زیست توده می‌باشد. تعاریف گوناگونی از زیست توده در منابع ذکر شده است. مطابق تعریف اتحادیه اروپا، زیست توده به اجزای قابل تجزیه زیستی از پسماندها، مواد زائد کشاورزی، مواد گیاهی و دامی، جنگل‌ها و صنایع وابسته و همچنین مواد زائد صنعتی و شهری قابل تجزیه گفته می-شود (Duku *et al.*, 2011).

اتانول دارای فرمول شیمیایی C_2H_5OH می‌باشد و الکل اتیلیک و الکل نوع دوم نیز نامیده می‌شود. این الکل را می‌توان به

* نویسنده مسئول: rhbeigi@ut.ac.ir

1. *Saccharomyces cerevisiae*

روش‌های مختلفی از جمله سنتز شیمیایی و تخمیر تولید نمود. اتانولی که از تخمیر مواد گیاهی تولید می‌شود را بیواتانول می‌نامند. بیواتانول علاوه بر قابلیت استفاده در موتورهای درونسوز به عنوان یک سوخت زیستی تجدیدپذیر، قابلیت استفاده در صنایع صنعتی، صنایع شیمیایی، لاستیک‌سازی، صنایع دارویی، به عنوان ضدعفونی کننده و ... را دارد (Licths, 2001). وجود آفلاتوکسین در کاربرد بیواتانول به عنوان سوخت مشکلی ایجاد نمی‌کند؛ ولی حضور آن در بیواتانول برای استفاده‌های دارویی می‌تواند مشکل آفرین باشد. به علاوه اگر از قند تولیدی در مصارف صنایع غذایی استفاده شود افلاتوکسین می‌تواند مشکل‌ساز شود. بیواتانول را می‌توان از مواد قندی، نشاسته‌ای و مواد سلولزی تولید نمود. در حال حاضر عمده تولید بیواتانول در دنیا از مواد قندی و نشاسته‌ای است، فناوری‌های مرتبط با تولید بیواتانول از مواد سلولزی به طور اقتصادی توسعه نیافته است (Chiaramonti, 2007). استفاده از مواد زیست توده با ترکیبات قندی و نشاسته‌ای برای تولید بیواتانول جهت کاهش هزینه‌های مواد خام بسیار ضروری است. از آن‌جایی‌که تجمع ضایعات بخش‌های مختلف همچون آشپزخانه، صنعت، کشاورزی، نانوایی‌ها باعث بروز مشکلات برای محیط زیست و سلامت انسان می‌شود؛ لذا استفاده از آن‌ها به علت گستردگی، در دسترس بودن و قیمت کم به عنوان منابع برای تولید بیواتانول می‌تواند سبب کاهش هزینه‌های تولید بیواتانول و کاهش اثرات مخرب این ضایعات برای محیط زیست گردد (Valentine *et al.*, 2012). تاینر و همکاران گزارش کردند که یکی از مناسب‌ترین و ارزان‌ترین مواد برای خوراک تخمیر جهت تولید بیواتانول، ضایعات مواد غذایی باشد (Tyner *et al.*, 2013). ضایعات مواد غذایی شامل گوشت، میوه، سبزی و تولیدات نانوایی‌ها می‌باشد که از بین این موارد بیشترین ضایعات مربوط به ضایعات نان است (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2015).

تخمیر یکی از قدیمی‌ترین روش‌ها برای تولید بیواتانول می‌باشد که توسط انسان به کار برده شده‌است (Chambers & Pretorius, 2010). تخمیر، تنفس سلولی بی‌هوازی سلول‌های مخمر است. رایج‌ترین میکرو ارگانیسمی که تاکنون برای تولید بیواتانول به کار رفته مخمر ساکارومایسیس سرویزیه می‌باشد. جنس ساکارومایسس شامل دو گونه مشهور ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی[1] است. ساکارومایسس سرویزیه که به مخمر نان نیز معروف است، یک میکروارگانیسم تک سلولی است که در تخمیر الکلی خمیر نان و آبجو و دیگر منابع کربوهیدراتی نقش دارد و به عنوان ارگانیسم ایمن شناخته می‌شود (Abedi., 2012). ساکارومایسس سرویزیه در طی فرایند تخمیر با تغذیه از قند، الکل و دی‌اکسید کربن تولید می‌کند. ساکارومایسس بولاردی به عنوان یک مکمل پروبیوتیک در پزشکی کاربرد دارد. مزیت عمده مخمر ساکارومایسس سرویزیه این است که می‌تواند طیف وسیعی از مواد اولیه را نظیر گلوکز، مالتوز، فروکتوز، ساکاروز را مصرف کند (Chambers & Pretorius, 2010).

نان جز اصلی وعده‌های غذایی مردم ایران و بسیاری از کشورها است. سالانه حدود ۱۰۰ میلیون تن نان در جهان تولید می‌شود که حدود ۱۰ درصد آن به ضایعات تبدیل می‌شود (Mena *et al.*, 2011; Melikoglu & Webb, 2013). علت ضایعات نان می‌تواند مربوط به کیفیت کم گندم، نقص در فن‌آوری نانوایی و پخت، همچنین روش ذخیره‌سازی باشد (Shahnoushi *et al.*, 2011). متاسفانه اکثر ضایعات نان آلوده به کپک و مخمر بوده و به دلیل ارزان بودن نان ضایعاتی، در ایران در دامداری‌ها به عنوان خوراک دام استفاده می‌گردد. باتوجه به کپک‌زدگی نان احتمال وجود مایکوتوکسین‌ها در آن‌ها بسیار زیاد می‌باشد. مایکوتوکسین‌ها سموم قارچی هستند که در حیوانات و انسان خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی دارند. در بین مایکوتوکسین‌ها ۱۴ نوع سرطان‌زا وجود دارد که آفلاتوکسین‌ها قوی‌ترین و خطرناک‌ترین آن‌ها هستند. وجود آفلاتوکسین‌ها در غذای دام سبب وارد شدن آن‌ها به شیر دام شده و از طریق مصرف شیر و دیگر فراورده‌های لبنی وارد بدن انسان می‌شوند. از طرفی باتوجه به آلوده‌بودن درصد زیادی از شیرهای تولیدی کشور ما به آفلاتوکسین‌ها امکان عرضه شیر و فراورده‌های لبنی در بازارهای بین‌المللی وجود ندارد (Masumiyan *et al.*, 2015 ; Khoshpey *et al.*, 2011).

بر اساس تحقیقات انجام شده در مورد تولید بیواتانول از ملاس (پسماند کارخانه‌های قند) مشخص‌شد که در اثر افزایش غلظت ملاس و اتانول تولیدی در محیط تخمیر، تولید بیواتانول کاهش می‌یابد (به علت این‌که سلول‌های مخمر تا حد غلظت معینی توانایی تحمل اتانول در محیط را دارند) و بیش‌ترین میزان اتانول تولیدی ۹/۳ گرم بر لیتر می‌باشد (Ghorbani *et al.*, 2009). بررسی مقایسه‌ای دو روش هیدرولیز اسیدی و آنزیمی ضایعات سیب‌زمینی نشان دادکه سرعت رشد مخمر در تخمیر به علت فشار اسمزی ایجاد شده در هیدرولیز اسیدی پایین‌تر می باشد. در این مطالعه مقدار بیواتانول با روش هیدرولیز اسیدی به میزان ۳ درصد حجمی و با هیدرولیز آنزیمی ۶/۷ درصد حجمی بدست آمد (Abedi, 2012). در بررسی تولید بیواتانول از ضایعات نان گندم-چاودار، به وسیله‌ی ساکاریفیکاسیون و تخمیر همزمان،

1. *Saccharomyces boulardii*

غلظت اتانول ۱۲۸/۰۱ گرم بر لیتر (۴۲۵/۰۴ گرم بر کیلوگرم ماده خشک) و بازده ۹۵/۹۳ درصد بدست آمد (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2015). در تحقیقی گزارش شد که با تجزیه‌ی ضایعات مواد غذایی برای تولید بیواتانول و اسید لاکتیک با مخمر، با بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز به ۱۱ گرم بر لیتر اتانول از ۲۴ گرم بر لیتر قند می‌توان دست‌یافت (Kim *et al.*, 2018).

از روش‌های هیدرولیز اسیدی و آنزیمی می‌توان برای تجزیه کربوهیدرات‌های موجود در ضایعات نان استفاده نمود. با توجه به وجود کپک در ضایعات نان، در این تحقیق از روش هیدرولیز اسیدی به علت اقتصادی بودن استفاده شد. هدف از این پژوهش بررسی متغیرهای هیدرولیز اسیدی (شامل غلظت اسید و زمان) ضایعات نان بر میزان تولید بیواتانول توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه و همچنین میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پیش‌فراوری ضایعات نان

ضایعات نان به وسیله‌ی آسیاب با توان ۱۶۰ وات خرد گردید و سپس اندازه ذرات آن با عبور از الک (با اندازه ذرات ۲ میلی متر، معادل مش ۱۰) در محدوده‌ی کمتر از ۲ میلی‌متری غربال گردید. برای تعیین محتوای رطوبت ضایعات نان سه نمونه ۵۰ گرمی درون آون در دمای ۳±۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت خشک گردید، پس از وزن کردن ثانویه‌ی نان خشک شده با استفاده از رابطه زیر رطوبت نمونه‌ها تعیین‌شد (Acanski *et al.*, 2014):

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

که در این رابطه: M_1= جرم اولیه ضایعات نان (g) و M_2= جرم ثانویه نان (g) می‌باشد. درصد محتوای رطوبت برای ضایعات نان ۹/۸ درصد (بر مبنای تر) بدست آمد.

هیدرولیز اسیدی

برای آزمایش هیدرولیز اسیدی از دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استفاده‌گردید. متغیرهای مستقل شامل هیدرولیز اسیدی، غلظت محلول اسیدی (هیدروکلریک اسید ۳۷٪، ساخت شرکت مرک[1]) در سه سطح (۰/۳۲درصد، ۱ درصد و ۲ درصد)، زمان در سه سطح (صفر، ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه) و متغیر وابسته میزان گلوکز بود. آزمایش‌ها در بارگذاری ۱۶۰ گرم بر لیتر (نسبت نان به اسید) انجام شد. پس از انجام آزمایش‌ها گلوکز هر نمونه به وسیله دستگاه کیت گلوکز اندازه‌گیری گردید. اثر متغیرهای هیدرولیز اسیدی بر میزان گلوکز توسط آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی بررسی گردید. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

اندازه‌گیری قند به روش کیت گلوکز

در این تحقیق برای اندازه‌گیری گلوکز از کیت اندازه‌گیری گلوکز، ساخته شده توسط شرکت زیست‌شیمی استفاده گردید. اساس این روش بدین نحو است که گلوکز تحت تاثیر آنزیم گلوکز اکسیداز آب اکسیژنه آزاد می‌کند و در مجاورت آنزیم پراکسیداز با فنل و ۴-آمینو آنتی پیرین تشکیل کمپلکس رنگی کینونیمین می‌دهد. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار گلوکز موجود در نمونه می‌باشد که در طول موج ۴۹۰-۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. روش اندازه‌گیری در این تحقیق بدین صورت بود که به ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف (آنزیمی، ساخت شرکت زیست‌شیمی) اضافه گردید. به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. سپس جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک معرف در طول موج ۵۰۰ نانومتر ۱ اندازه‌گیری شد (Anon., 2017).

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در نمونه‌ی هیدرولیز اسیدی

میزان آفلاتوکسین ضایعات نان به عنوان شاهد و نمونه‌ی بهینه حاصل از فرایند هیدرولیز اسیدی اندازه‌گیری شد. پس از انجام آزمون‌های هیدرولیز اسیدی، یک نمونه که در آن میزان کلوگز تولید شده توسط هیدرولیز اسیدی بیشتر از سایر نمونه‌ها بود به عنوان نمونه با شرایط بهینه انتخاب شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ی شاهد، ابتدا یک لیتر آب مقطر در اتوکلاو استریل گردید. مقدار ۱۶۰ گرم ضایعات نان کپک‌زده به آن اضافه‌شد. دو نمونه جهت اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین به آزمایشگاه سنجش مایکوتوکسین انتقال داده شدند. آزمون مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ سال ۱۳۹۰ انجام شد (ISIRI 6872, 2011). طبق این استاندارد اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد.

برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters e2695) مجهز به آشکار ساز فلورسنس[2] (Waters 2475) و ۲ ستون کرومولوکس[3] در ابعاد ۴/۶ mm× ۱۰۰ mm × ۱۰ cm استفاده‌شد. دمای ستون ۵۰ درجه سلسیوس و دبی جریان در ml/min ۳-۲ تنظیم گردید. برای فاز جاری متانول، آب و استونیتریل (C_2H_3N, H_2O, CH_3OH) به کار برده شد.

1. Merck
2. Fluorescence
3. Cromolux

تخمیر

مرحله‌ی نهایی در تولید بیواتانول، استفاده از مخمر و تخمیر نمونه‌های حاصل از هیدرولیز می‌باشد. به این منظور از مخمر ساکارومایسیس سرویزیه جهت فرآیند تخمیر استفاده شد. به منظور بررسی روند تخمیر، تخمیر در محیط کشت متعارف YEPD[1] انجام‌گرفت. برای تخمیر نمونه‌های هیدرولیز مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های هیدرولیز شده داخل ارلن با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر ریخته‌شد. مقدار ۰/۲درصد پپتون و ۰/۱ درصد عصاره‌مخمر به عنوان منبع نیتروژن و فسفر مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها به محیط‌ها اضافه گردید. بعد از استریل کردن محیط‌ها توسط اتوکلاو، لازم است pH محیط‌های کشت در ۵/۶ تنظیم‌گردد. از آن‌جایی که در محلول هیدرولیزاسیدی به دلیل استفاده از هیدروکلریک اسید pH محیط پایین است، برای تنظیم pH از محلول سدیم هیدروکسید ۱۰ مولار استفاده‌گردید. میزان تلقیح مخمر به محیط هیدرولیز شده نیز ۴ میلی‌لیتر در نظر گرفته‌شد. فلاسک‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۹۶ ساعت گرماگذاری شدند (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2014).

اندازه‌گیری الکل نمونه‌های حاصل از تخمیر

برای تعیین درصد بیواتانول تولیدی در نمونه‌ها از معرف پتاسیم دی‌کرومات استفاده شد (Caputi et al., 1968). به این صورت که ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تخمیر با معرف اسیدی پتاسیم دی-کرومات مخلوط (وجود الکل باعث حاصل‌شدن رنگ سبز می-گردد) و بعد از سردسازی در دمای محیط، جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت مقدار بیواتانول تولیدی با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده محاسبه‌گردید. محلول‌های استاندارد بیواتانول با استفاده از محلول بیواتانول-آب در محدوده ۲۰٪-۰ بیواتانول (v/v) تهیه شد. برای تهیه‌ی محلول پتاسیم دی‌کرومات ابتدا ۳۲۵ میلی‌لیتر H_2SO_4 (با خلوص ۹۸٪، ساخت شرکت مرک) به ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. پس از آن ۳۳/۷۷ گرم $K_2Cr_2O_7$ به محلول اضافه‌شد و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از آن سردسازی شده و به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

جهت اندازه‌گیری الکل در نمونه‌ها یک میلی‌لیتر از نمونه-های تخمیر با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. ۲۰ میلی‌لیتر نمونه‌ی رقیق‌شده در مرحله‌ی قبل به یک فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی-لیتر محلول پتاسیم دی‌کرومات اضافه‌گردید. محتویات فلاسک در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در حمام آب به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد و حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از مخلوط‌کردن و خنک‌کردن محتویات فلاسک، جذب در ۶۰۰ نانومتر طبق شکل ۱ ثبت شد. مقدار بیواتانول در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بیواتانول تعیین شد.

(الف) (ب) (ج)

شکل ۱- الف: تنظیم pH نمونه‌های حاصل از هیدرولیز و سانتریفیوژ شده. ب: معرف پتاسیم دی‌کرومات ج: نمونه‌های حاوی الکل اضافه شده به معرف پتاسیم دی‌کرومات که به رنگ سبز لجنی در آمده‌است.

نتایج و بحث

هیدرولیز اسیدی ضایعات نان

تاثیر پارامترهای غلظت اسید و زمان بر روی میزان تولید گلوکز در هیدرولیز اسیدی توسط آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی بررسی شد که نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت. همانطور که از جدول ۱ پیداست اثرات اصلی عوامل غلظت اسید و زمان همچنین اثر متقابل غلظت اسید و زمان بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز اسیدی ضایعات نان همگی در سطح آماری ۱٪ معنی‌دار هستند.

1. Yeast Extract Peptone Dextrose

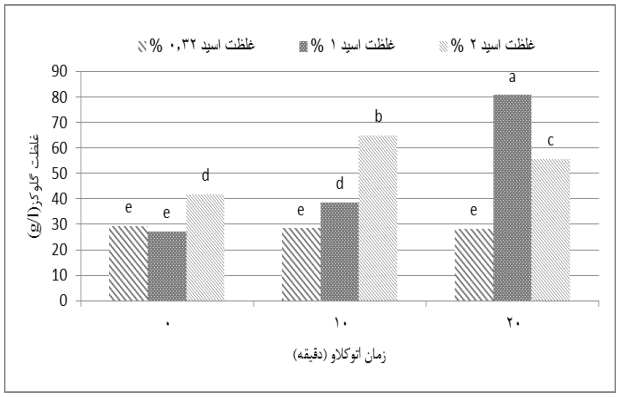
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت اسید و زمان هیدرولیز اسیدی بر میزان گلوکز تولید شده

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
غلظت اسید	۲	۳۲۴۵/۳۲۵۷۴۱**
زمان	۲	۲۱۸۶/۶۹۶۰۰۷**
غلظت اسید×زمان	۴	۳۳۸۰/۰۹۹۵۷۰**
خطا	۱۶	۴/۳۱۳۶۶
ضریب تغییرات	-	۴/۷۴

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

اثر متقابل غلظت اسید و زمان بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز اسیدی ضایعات نان در شکل ۲ نشان داده شده‌است. همانگونه که از این شکل پیداست برای غلظت محلول اسیدی ۰/۳۲ (v/v٪) میانگین غلظت گلوکز تولیدی با افزایش زمان هیدرولیز از صفر تا ۲۰ دقیقه تغییر معنی‌داری ندارد. این در حالی است که در غلظت اسید ۱ (v/v٪)، افزایش زمان هیدرولیز از صفر تا ۲۰ دقیقه سبب افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز تولیدی از ۲۷/۱۹ گرم بر لیتر به ۸۰/۶۴ گرم بر لیتر می‌شود. در غلظت محلول اسیدی ۲ (v/v٪) میانگین غلظت گلوکز تولیدی با افزایش زمان از صفر به ۱۰ دقیقه افزایش و با افزایش بیشتر زمان از ۱۰ دقیقه به ۲۰ دقیقه کاهش یافته است که علت آن می‌تواند مربوط به تخریب و از بین رفتن قندهای تولیدی در نتیجه افزایش غلظت اسید در زمان ۲۰ دقیقه باشد. از شکل ۲ همچنین پیداست که در زمان صفر، افزایش غلظت محلول اسیدی از ۰/۳۲ به ۱ (v/v٪) تغییر معنی‌داری در غلظت گلوکز ایجاد نمی‌کند در حالی‌که افزایش غلظت محلول اسیدی از ۱ به ۲ (v/v٪) سبب افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز تولیدی شده است، در زمان ۱۰ دقیقه افزایش غلظت اسید در تمام سطوح باعث افزایش معنی‌دار میزان گلوکز تولیدی شده است. در زمان ۲۰ دقیقه افزایش غلظت محلول اسیدی از ۰/۳۲ به ۱ (v/v٪) باعث افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز و افزایش بیشتر غلظت محلول اسیدی از ۱ به ۲ (v/v٪) باعث کاهش غلظت گلوکز شده است. بیشترین میانگین غلظت گلوکز تولیدی در زمان ۲۰ دقیقه و غلظت اسید ۱ درصد با میزان ۸۰/۳±۶۴/۴۲ گرم بر لیتر و کمترین غلظت مربوط به آزمایش در زمان صفر و غلظت اسید ۱ درصد با میزان گلوکز تولیدی ۲۷/۱±۱۹/۰۸ گرم بر لیتر می‌باشد.

پیشینه تحقیق نشان داد که تحقیقات درخصوص هیدرولیز اسید رقیق ضایعات نان نادر است. حداکثر بازده گلوکز حاصل از ضایعات نان در مطالعه حاضر بیشتر از نتایج تحقیقی بود که با استفاده از هیدرولیز (هیدروکلریک اسید ۱ مولار) در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه حداکثر ۳۶۰ گرم قند را از ضایعات نشاسته رستوران (اساس ماده خشک) بدست آوردند (Hashem et al., 2018). حداکثر بازده مربوط به گلوکز ۲۳ ± ۴۵۰ گرم در هر کیلوگرم ضایعات نان خشک در این مطالعه بدست آمد. طی تحقیق در خصوص هیدرولیز اسیدی نشاسته‌ی گندم، میزان تولید قند ساده ۵ گرم برلیتر برای شرایط pH= ۳، دمای ۹۰ درجه سلسیوس و مدت زمان ۱۵ دقیقه گزارش شد (Kapdan *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای میزان تولید گلوکز با روش هیدرولیز اسیدی از نشاسته‌ی سیب زمینی، به مقدار ۱۲۳/۵۲ گرم بر لیتر در دمای ۱۲۸ درجه سلسیوس با غلظت اسید ۲ (w/v%) گزارش گردید (Abedi, 2012). در تحقیقی میزان گلوکز تولیدی از ضایعات شهری نشاسته‌ای با استفاده از محلول اسیدی ۱٪، زمان ۶۰ دقیقه و دمای ۱۳۰ درجه‌ی سلسیوس، به مقدار ۴۳/۲ گرم بر لیتر بدست آمد (Mahmoodi *et al.*, 2018).



شکل ۲- اثر متقابل غلظت اسید و زمان اتوکلاو بر تولید گلوکز در طی فرایند هیدرولیز اسیدی

مقایسه میزان آفلاتوکسین در هیدرولیز اسیدی با نمونه‌ی شاهد

میزان سم آفلاتوکسین B_1 و B_2 موجود در نمونه هیدرولیز اسیدی با نمونه‌ی شاهد در شکل ۳ مقایسه شده است. این شکل نشان دهنده‌ی تاثیر بسیار موثر هیدرولیز اسیدی بر آفلاتوکسین نوع B_1 می‌باشد. میزان آفلاتوکسین نوع B_1 پس از هیدرولیز اسیدی به صفر رسیده است؛ اما در مورد آفلاتوکسین نوع B_2 کاهش ناچیزی مشاهده می‌شود. میزان کاهش آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 در فرایند هیدرولیز اسیدی به ترتیب ۹۲/۶۰ و ۰/۵۸ نانوگرم بر میلی لیتر می‌باشد.

اثر چهار نوع اسید، سیتریک اسید، لاکتیک اسید، سوکسینیک اسید و تارتاریک اسید با غلظت یک نرمال، به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق، بر میزان کاهش آفلاتوکسین B_1 سویا به ترتیب ۹۴/۱٪، ۹۲/۷٪، ۶۲/۰٪، ۹۵/۱٪ نشان داده شد (Lee *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای مشخص شد که می‌توان با استفاده از ۳۰ میلی‌لیتر آب، ۳۰ میلی‌لیتر آب‌لیمو و ۶ گرم سیتریک اسید

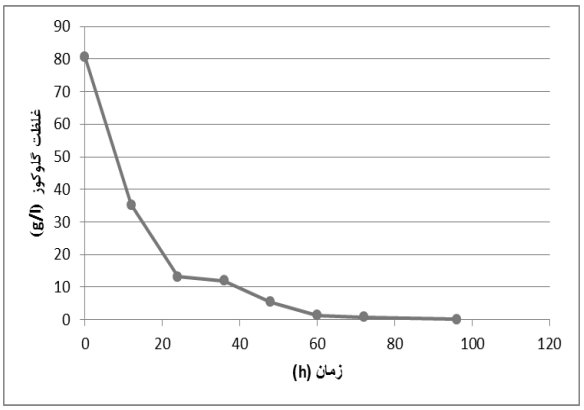
در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت، آفلاتوکسین B_1 موجود در پسته را به میزان ۹۳/۱ درصد کاهش داد (Rastegar *et al.*, 2017).

شکل ۳- میزان آفلاتوکسین موجود در نمونه‌های شاهد و هیدرولیز اسیدی

براورد الکل نمونه‌های تخمیر

تغییرات غلظت گلوکز مصرفی در طی فرآیند تخمیر با زمان در شکل ۴ نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود در ۱۲ ساعت اول آزمایش، مقدار گلوکز باقی مانده از ۸۰/۶۴ گرم بر لیتر به ۳۵/۲۱ گرم بر لیتر رسیده است و در پایان روز اول مقدار گلوکز باقی مانده ۱۳/۱۸ گرم بر لیتر می‌باشد. همچنین در روزهای بعد روند کاهش گلوکز بسیار ناچیز بوده، طوری که در پایان روز دوم ۵/۳۶ گرم بر لیتر گلوکز باقی مانده است و در روزهای آخر به ۰/۱ گرم بر لیتر می‌رسد. سیر گلیکولیز مهم‌ترین مسیری است که در تخمیر بیواتانول درگیر است. فرآیند گلیکولیز به دو فاز تقسیم می‌شود که مربوط به تولید و مصرف انرژی است. بنابر این در این چرخه ضمن تبدیل گلوکز به پیرووات، انرژی لازم برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم نیز فراهم می‌شود. سپس پیرووات طبق واکنش دو مرحله‌ای (پیروات به استالدئید سپس به بیواتانول) به بیواتانول تبدیل می‌شود (Satari & Karimi, 2018). در واقع حین فرایند تخمیر، با رشد مخمر و افزایش مقدار توده زیستی و همچنین تغییرات فیزیکی محیط کشت، مقدار اکسیژن محلول در محیط کشت کاهش می‌یابد. به این ترتیب، مخمر که در ابتدا با مصرف منابع کربنی از جمله ۸۰/۶۴ گرم بر لیتر گلوکز در ابتدای فرایند توسط فرایند گلیکولیز و ادامه آن چرخه کربن چرخه رشد خود را طی کرده با کمبود مقدار اکسیژن محلول روند متابولیکی خود را تغییر داده و پیروات‌های تولیدی از چرخه گلیکولیز وارد چرخه تنفس بی-هوازی و تولید بیواتانول می‌گردد. به گونه‌ای که در ساعت‌های پایانی تکمیل تخمیر مقدار گلوکز باقی مانده به ۰/۱ گرم بر لیتر رسیده است.

در تحقیقی با انجام فرایند تخمیر ضایعات نان در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه و مدت زمان ۹۶ ساعت، کاهش در گلوکز مصرف شده از حدود ۹۰ گرم بر لیتر به کمتر از ۱۶ گرم بر لیتر مشاهده شد (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2015).

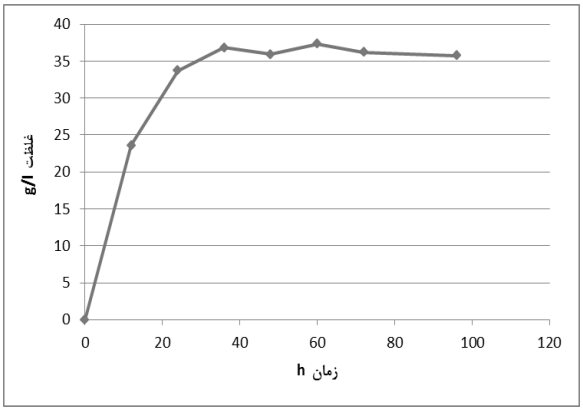


شکل ۴- تغییرات غلظت گلوکز مصرفی در طی تخمیر نمونه هیدرولیز شده

شکل ۵ تغییرات غلظت بیواتانول تولیدی از ضایعات نان در حین فرآیند تخمیر را نشان می‌دهد. همانگونه که از شکل ۵ پیداست، مقدار تولید الکل در ابتدای فرایند صفر می‌باشد، اما در ۱۲ ساعت اولیه با مصرف گلوکز موجود در محیط، الکل تولید شده ۲۳/۵۸ گرم بر لیتر، پس از آن مقدار الکل تولید شده در پایان روز اول ۳۳/۷۴ گرم بر لیتر و در روز دوم به ۳۶/۸۰ گرم بر لیتر رسیده و در ساعات بعدی تقریبا به حالت سکون می‌رسد، به گونه‌ای که بیشترین الکل تولید شده ۳۷/۳۵ گرم بر لیتر در روز سوم می‌باشد و پس از آن تغییر قابل ملاحظه‌ای در الکل تولیدی مشاهده نمی‌شود. در واقع سرعت تولید الکل در روزهای اول تا چهارم یکسان نبوده و در روزهای اولیه سرعت بیشتر از روزهای بعدی بوده است. سرعت تولید الکل به میزان گلوکز باقی‌مانده، فعالیت مخمر و میزان الکل تولید شده بستگی دارد. در روز اول میزان گلوکز زیاد، درصد الکل کم بوده و در نتیجه مخمر بسیار فعال می‌باشد. بنابراین سرعت تولید الکل زیاد است. هرچه تخمیر پیشرفت‌کند، از میزان قند کاسته‌شده و به میزان الکل افزوده می‌شود. در نتیجه فعالیت مخمر و به تبع آن سرعت تولید الکل کاهش می‌یابد. بیشترین میزان الکل تولید شده حین فرایند ۳۷/۳۵ گرم بر لیتر مربوط به روز سوم می‌باشد. طبق نتایج بدست‌آمده از زمان ۶۰ ساعت به بعد با توجه به جزئی بودن تغییرات، احتیاج به ادامه‌ی فرایند نمی‌باشد.

در مطالعه‌ای مشخص شد که در شرایط بهینه هیدرولیز شیمیایی در دمای ۱۲۸ درجه سلسیوس، غلظت محلول هیدروکلریک اسید ۲ مولار و نسبت سیب‌زمینی به محلول اسیدی

۱:۱، مقدار گلوکز به میزان ۱۲۳/۸ گرم بر لیتر و بیواتانول به میزان ۳ ٪ (v/v) می‌باشد (Abedi, 2012). در تحقیقی با بارگذاری ۱۵۰ گرم بر کیلوگرم سوبسترای ضایعات نان بازده تولید بیواتانول طی تخمیر و هیدرولیز جداگانه ۸۰٪ گزارش گردید (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2014).



شکل ۵- تغییرات تولید بیواتانول در حین فرایند تخمیر

نتیجه‌گیری کلی

۱. اثر عوامل غلظت اسید و زمان همچنین اثر متقابل این عوامل بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز اسیدی ضایعات نان در سطح آماری ۱٪ معنی‌دار بودند.

۲. افزایش زمان باعث افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز از ۳۲/۷۳ گرم بر لیتر به ۵۴/۷۷ گرم بر لیتر شده است.

۳. با افزایش غلظت اسید از ۰/۳۲ به ۱ میزان غلظت گلوکز به طور معنی‌داری از ۲۸/۵۹ گرم بر لیتر به ۵۴/۰۲ گرم بر لیتر افزایش یافت؛ اما افزایش بیشتر غلظت اسید سبب افزایش غلظت گلوکز نشد.

۴. بیشترین میزان بازده گلوکز در شرایط غلظت هیدروکلریک اسید ۱٪ و زمان ۲۰ دقیقه با مقدار گلوکز تولیدی برابر با ۸۰/۶۴ گرم بر لیتر بدست آمد.

۵. میزان کاهش آفلاتوکسین B1 و B2 پس از انجام هیدرولیز اسیدی، به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۲۰/۷۰ درصد نسبت به نمونه‌ی شاهد بوده‌است.

۶. بیشترین درصد اتانول نمونه‌های تخمیر مربوط به زمان ۶۰ ساعت با مقدار ۳۷/۳۵ گرم بر لیتر می‌باشد؛ اما با توجه به افزایش کم میزان اتانول بعد از ۳۶ ساعت زمان مناسب برای تخمیر حدود ۳۶ ساعت است.

۷. با توجه به کاهش قابل ملاحظه آفلاتوکسین موجود در ضایعات نان در هیدرولیز اسیدی و هزینه کم این روش، استفاده از هیدرولیز اسیدی برای تخمیر ضایعات نان توصیه می‌گردد.

REFERENCES

Anonymous, 2017. Glucose assay kit. Ziestchem Diagnostics, Tehran, Iran. (In Farsi)

Acanski, M. Pastor, K. Razmovski, R. Vucurovic, V. Psodorov, D. (2014). Bioethanol production from waste bread samples made from mixtures of wheat and buckwheat flours. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 18(1), 40-43.

Abedi, M. (2012). *Bioethanol production from potato waste*. Master of Science Thesis. University of Tehran. Tehran, Iran. (In Farsi).

Caputi, A. Ueda, M. Brown, Th. (1968). Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 19, 160-165.

Chambers, PJ. Pretorius, IS. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*. 11(12), 914-920.

Chiaramonti, D. (2007). Bioethanol: role and production technologies. In P. Ranalli (Ed). *Improvement of crop plants for industrial end uses.* Springer. (pp. 209-251).

Duku, M. H., GU, S., Hagan, E.B. (2011). A comprehensive review of biomass resources and biofuels potential in Ghana, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1), 515– 514.

Ebrahimi, B. Rahmani, M. (2012). The study of technology development issues obtained by the production and use of biofuels compared to the fossil ones. *Journal of development of industrial technology*, 10 (19), 27:37. (In Farsi)

Ghorbani, F. Amini, M. Daneshi, A. (2009). Production of ethanol from waste molasses of sugar factories in a discontinuous fermentation system. *Journal of Science and technology Environmental*, 11 (4). (In Farsi)

Hashem, M. Asseri, T.Y.A. Alamri, S.A. Alrumman, S.A. (2018). Feasibility and Sustainability of Bioethanol Production from Starchy restaurants' Bio-wastes by New Yeast Strains, *Waste and Biomass Valorization* . **10(4)**, 1617–1626

Hassan-Beygi, S. R. Istan, V, Ghobadian, B. Aboonajmi, M. (2013). An experimental investigation of Perkins A63544 diesel engine performance using D-Series fuel. *Energy Conversion and Management*, 76, 356–361.

ISIRI, 6872, 2011. Food and feed stuffs - determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Tehran, Iran (In Farsi)

Kapdan, I. Kargi, F. Oztekin, R. Argun, H. (2009). Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different Rhodobacter sp. *International journal of hydroenergy*, 34 (5), 2201- 2207.

Khoshpey, B. Farhud, D.D. and Zaini, F. (2011). Aflatoxins in Iran: Nature, hazards and

carcinogeicity. *Iranian Journal of Public Health*, 40 (4), 1-30.

Kim, Y. Jang, J. Park, S. Um, B. (2018). Dilute sulfuric acid fractionation of Korean food waste for ethanol
and lactic acid production by yeast. *Waste Management journal*, 74 .231–240.

Lee, J. Her, J.Y. Lee, K.G. (2015). Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chemistry Journal*, 189 (15), 45–51.

Licths, F. (2001). Ethanol knowledge: Ethanol Applition. Available at: http:// www.iecbp.com.

Mahmoodi, P. Karimi, K. Taherzade, M. (2018). Efficient conversion of municipal solid waste to biofuel by simultaneous dilute-acid hydrolysis of starch and pretreatment of lignocelluloses. *Energy Conversion and Management*, 166 (15), 569-578.

Masumiyan, Z. Yavarmanesh, M. Shahidi Noghabi, M. Sadeghi, M. Sohrabi Balsini, M. (2015). The efficiency of zeolite and citric acid in the control of mold growth and production of Aflaoxin in dry breads wastage across the Mashhad and it's modeling with artificial neural networks method. *Science and Food industry of Iran.* 12 (48), 99-114. (In Farsi)

Melikoglu, M. Webb, C. (2013). Use of waste bread to produce fermentation products. In: M.R. Kosseva and C. Webb (Eds). *Food industry wastes: assessment and recuperation of commodities*. Amsterdam: *Elsevier Science Publishers*, 63–76.

Mena, C. Adenso-Diaz, B. Yurt, O. (2011). The causes of food waste in the supplier–retailer interface. evidences from the UK and Spain. *Resources, Conservation and Recycling*, 55 (6), 648-658.

Najafi, G. Ghobadian, B. Tavakoli, T. Yusaf, T. (2009). Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy reviews*, 13, 1418–1427.

Obeidavi, Z. (2014). Investigation the bioethanol production process and microorganisms' the role in this process. *International Conference on Environmental Science, Engineering and Technologies*, Tehran, Iran. (In Farsi) From https://www.civilica.com/Paper-CESET01-CESET01_358.html

Pietrzak, W. Kawa-Riejilska, J. (2014*).* Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: effect of raw material pretreatment. *Fuel*, 134 (15), 250-256.

Pietrzak, W. Kawa-Riejilska, J. (2015). Simultaneous scarification and ethanol fermentation of waste wheat–rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. *Fuel*, 147 (1), 236-242.

Rastegar, H. Shoeibi, Sh. Yazdan-panah, H. AmirAhmadi, M. Mousavi Khaneghah, A. Bovo Campagnollo, F. S. Sant'Ana, A. (2017). Removal of aflatoxin B1 by roasting with lemon juice and/or citric acid in contaminated pistachio nuts. *Food Control*, 71 ,279-284.

Sattari, B & Karimi, K. (2018). Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102: 1097–1117.

Shahnoushi, N. Firoozzare, A. Jalerajabi, M. Daneshvar, M. Dehghanian, S. (2011). The use of the order logit model in an investigation of the effective factors on bread waste. *Journal of Economic Research*. 46 (3), 111-132. 0039-8969. (In Farsi) From https://jte.ut.ac.ir/article_23966.html

Tyner, WE. (2013). Biofuels and food prices: separating wheat from chaff. G*lobal food security*, 2 (2), 126-130.

Valentine, J. Clifton-Brown, J. Hastings, A. Robson, P. Allison, G. Smith, P. (2012). Food vs. fuel: the use of land for lignocellulosic 'next generation' energy crops that minimize competition with primary food production. *GCB Bioenergy*,4 (1),1–19.