تولید گلوکز از لینتر به روش آنزیمی

صراحی عابدینی فر[*1]، کیخسرو کریمی[1]، محمد جعفر طاهرزاده[1]
گیتی امتیازی[2]
۱. دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
s8201204@ce.iut.ac.ir

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

تولید گلوکز از ترکیبات لیگنوسلولزی موارد استفاده فراوانی به عنوان ماده اولیه تخمیر برای تولید اتانل و بسیاری از محصولات دیگر دارد. لینتر که از ضایعات کارخانجات پنبه می باشد حاوی درصد بالائی سلولز می باشد. سلولز میتواند توسط آنزیم سلولاز به مونومر اولیه خود که گلوکز می باشد تبدیل شود. در طی این تحقیق از میان سه نوع آنزیم صنعتی سلولاز از محصولات شرکت ASA آلمان، آنزیم B-TXL که فعالیت بالاتری نسبت به بقیه داشت برای فرآیند هیدرولیز انتخاب گردید. برای انجام عملیات هیدرولیز برای افزایش دسترسی آنزیم به سطح سلولز لینتر، ابتدا بر روی لینتر پخت قلیائی انجام گردید. سپس لینتر در شرایط مناسب هیدرولیز و گلوکز تهیه گردید. نتایج آزمایشات نشان داده که با استفاده از ۲۴ واحد آنزیم(برمبنای واحد فیلتر واتمن) به ازای هر گرم لینتر پس از مدت ۴۸ ساعت ۵۰٪ لینتر میتواند به گلوکز تبدیل گردد..

کلمات کلیدی: سلولاز، هیدرولیز آنزیمی، لینتر، گلوکز

مقدمه

ترکیبات لیگنوسلولزی مانند لینتر، باگاس ، ضایعات چوب از جمله مواد ارزان قیمتی هستند که می توانند برای تولید مواد اولیه تخمیر بکار روند. . این ترکیبات در حالت عادی قابل مصرف برای میکروارگانیسم های معمولی نمی باشند. بنابراین ابتدا لازمست توسط عملیات هیدرولیز به مواد قابل تخمیر تبدیل شوند. در مرحله بعد با انجام عملیات تخمیر، گلوکز و دیگر قندهای حاصل از هیدرولیز توسط میکروارگانیسمهای مناسب به اتانول و یا محصولات دیگر تبدیل می گردند.[۱] یکی از روشهای تبدیل ترکیبات لیگنوسلولزی به مواد قابل تخمیر، هیدرولیز آنزیمی می‌باشد. در این روش سلولز موجود در این ترکیبات توسط آنزیم به گلوکز تبدیل می‌گردد.[۲]

آنزیم سلولاز به وسیله میکروارگانیسم های مختلف از قبیل باکتریهای هوازی و غیرهوازی [۳و۴] و قارچهای غیرهوازی [۵]وwhitr rot fungi[۶] وSoft rot fungi [۷] تولید میشود.سلولاز تولید شده از باکتری هنوزمرکز مطالعات می باشد.

اخیراً لوگدال[۱] و همکارش[۸] سلولازهای تولید شده از باکتریها را بازبینی کرده و ۴۶ واحد باکتری تولید کننده سلولاز را معرفی نمودند.بهترین باکتریهای غیرهوازی شامل: اکتیویبرو[۲]، کلوستریدیوم[۳]، باکتریودس[۴] ، میکرومونوسپور[۵] وروومینوکوکوس[۶] میباشد و همچنین بهترین نمونه باکتریهای هوازی شامل: اسیدوترموس[۷]، باسیلوس[۸]، سلولوموناس[۹]،سلویبری[۱۰]، سودوموناس[۱۱] وترمومونوسپور[۱۲] می باشد. قارچها در این زمینه بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند.یکی از مهمترین قارچها تریکودرماریزی[۱۳]می باشد.

آنزیم سلولاز معمولاً مخلوطی از چندین نوع آنزیم می‌باشد حداقل سه گروه از آنزیمهای سلولاز درهیدرولیز درگیر هستند:

- اندوگلوکاناز(مانند اندو ۱و۴-دی-گلوکانوهیدرولاز[۱۴]) که به نواحی باکریستالینی کمترزنجیره سلولزحمله کرده، ایجاد یک سر آزاد در زنجیر می‌کند.
- اگروگلوکاناز یا سلوبیوهیدرولاز (مانند ۱و۴-بی-دی-گلوکان سلوبیوهیدرولاک[۱۵]) که به تخریب بیشتر سلولز از طریق جدا کردن واحدهای سلوبیوز می‌کند.
- بتا-گلوکوسیداز که سلوبیوز را به گلوکز تبدیل می‌کند.

---

[1] -Ljungdahl
[2] -Acetivibrio
[3] -Clostridium
[4] -Bacteroides
[5] -Micromonospora
[6] -Ruminococcus
[7] -Acidothermus
[8] -Bacillus
[9] -Cellulomonus
[10] -Cellvibri
[11] -Pseudomonas
[12] -Thermomonospora
[13] -Trichoderma reesei
[14] -endo 1,4-D-glucanohydrolase
[15] -1,4-B-D-glucan cellobiohydrolak

در کنار آنزیمهای فوق تعدادی آنزیم وجود دارد که می‌تواند همی‌سلولز را تخریب نماید مانند گلوگورونیداز، استیل استراز، زایلاناز، زایلوزیداز، گالاکتوماناز، و گلوکوماناز.[۹]

فرآیندهائی برای افزایش راندمان آنزیم سلولاز قبل از انجام هیدرولیز صورت می‌گیرد که تحت عنوان فرآیندهای مقدماتی مطرح هستند. انجام فرایندهای مقدماتی برای داشتن راندمان بالا و سرعت هیدرولیز بالا الزامی می باشد.[۱۰] یکی از روشهای معروف روش قلیائی می باشد. راندمان این روش شدیداً وابسته به مقدار لیگنین موجود در ترکیبات لیگنوسلولزی می‌باشد.[۱۱] هیدروکسید سدیم رقیق می‌تواند موجب تورم (افزایش سطح تماس با آنزیم)، کاهش درجه پلیمریزاسیون، کاهش کریستالینتی و جداسازی لیگنین شود. راندمان هیدرولیز در این روش بوسیلهٔ کاهش ۵۵٪ الی ۲۰٪ از لیگنین، از ۱۴٪ تا ۵۵٪ می‌تواند افزایش یابد[۲]در این تحقیق از روش قلیائی به عنوان فرایند مقدماتی استفاده شده است.

محصولات هیدرولیز آنزیمی معمولاً قندهای مختلف و غالباً گلوکز می‌باشد. هزینهٔ یوتیلیتی روش آنزیمی بسیار پائین‌تر از روش هیدرولیز اسیدی و قلیایی می‌باشد زیرا شرایط عملیاتی آن معمولاً در pH حدود ۵ و دمائی درحدود ۴۵ الی ۵۰ بوده و مسئلهٔ خوردگی را نیز به دنبال ندارد.[۹]

در این تحقیق در ابتدا سه آنزیم سلولاز صنعتی به نامهای B-TXL,TXL,TS از شرکت ASA آلمان خریداری و فعالیت آنها بررسی و سپس نمونه با فعالیت بالاتر برای هیدرولیز انتخاب شد. سپس با کمک این آنزیم میزان قند موجود در سوبسترا آنالیز شد.

مواد و روش انجام آزمایشات

۱- آنزیمها: آنزیم های خریداری شده از شرکت ASA آلمان از قارچ تریکودرما ریشیوبدست آمده ودر محدوده دمایی ۴۰°c الی۷۰°cوpH بین۲/۵ الی ۷ فعال می باشند. دمای اپتیمم آنها °c ۴۵ الی°c ۵۵ و pH اپتیمم آنها ۴/۵عنوان شده است.

۲- بافر سیترات: به منظور ثابت نگه داشتن pH در طی فرایند هیدرولیز از بافر سیترات سدیم استفاده می کنیم.

برای این عمل ابتدا محلول ۱M از اسید سیتریک (تهیه شده از شرکت مرک آلمان با خلوص ۹۸٪)با ۴/۵ =pHتهیه نموده و۵۰ml از محلول را رقیق نموده و pH آن را در ۴/۸ تنظیم می کنیم.

۳- کاغذ واتمن[16] شماره۱: به عنوان سوبسترا برای تعیین فعالیت آنزیم استفاده می شود.

۴- DNS: ترکیبی ازgr ۱۰هیدروکسید سدیم وgr ۳/۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید و۲mlفنل مایع و gr ۰/۵متا بی سولفیدسدیم که همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شده است،در یک لیتر می باشد.

۵- نمک راشل: شاملgr۴۰۰ سدیم پتاسیم تارتارات (تهیه شده از شرکت مرک آلمان)در یک لیترمی باشد.

۶- لینتر برش دو: از ضایعات کارخانجات پنبه می باشد وحاوی ۸۷/۲٪ سلولز می باشد.

۷- تتراسایکلین: گرید دارویی می باشد.

[16] -Whatman paper

۸- فیلتر استریل: از فیلتر با قطرµm ۰/۲برای استریل آنزیم استفاده می شود. ماکزیمم فشار اعمالی به این فیلتر ۷ اتمسفر می باشد.

روش تعیین فعالیت آنزیمهای سلولاز

فعالیت آنزیم به روش IUPAC (International Union Of Pure and Applied Chemists) محاسبه می شود.آنزیم مناسب، آنزیمی است که ۲mg گلوکز به ازای هر mlخود آزاد نماید.

روش IUPAC نیز بر اساس تولیدmg ۲ گلوکز به ازای mg ۵۰ سوبسترا در ml ۰/۵آنزیم می باشد. در این روش فعالیت سلولز در واحد FPU/ML عنوان می شود.هر واحد FPUشامل µmol/(min.ml) ۰/۳۷گلوکز می باشد.

برای تعیین فعالیت آنزیم های مورد نظر ابتدا آنها توسط فیلتر استریل می نماییم.یک قطعه از کاغذ واتمن با اندازهcm ۶×۱غوطه ورشده در ml ۱بافردرحمام با دمای $50^{\circ}c$ قرار گرفته(در حدود ۱۰ دقیقه) وسپس به میزانml ۰/۵از آنزیم موردنظربه آن اضافه شده وبه مدت ۱ ساعت در حمام با دمای$50^{\circ}c$ قرار می گیرد.بعدازپایان ۱ساعت غلظت قند به روش DNS تعیین میگردد.[۱۲]

روش انجام فرآیند مقدماتی بر روی لینتر

برای عملیات مقدماتی از روش پخت قلیائی استفاده گردید. مقدار ۱ کیلوگرم لینتر خام را در ۱۶ لیتر محلول سود ۲٪ وزنی خیسانده و سپس به مدت ۳/۵ ساعت در دمای ۱۲۵ درجه(فشار بخار ۲/۵ اتمسفر) اتوکلاو گردید. سپس مخلوط فوق ۳ بار با آب شهر شستشو گردیده وخشک شد.

روش تعیین ترکیبات موجود در لینتر

ابتدا لازم است مقدار سلولز موجود در ماده اولیه مورد استفاده برای هیدرولیز تعیین گردد.در این تحقیق برای تعیین مقدار سلولز از روش تصحیح شده ASTM E1758-01 بر مبنای روش آزمایشگاهی ارائه شده توسط NREL انجام گرفت. در این روش با استفاده از دو مرحله هیدرولیز اسیدی یکی اسیدی غلیظ در دمای پایین(۳۰ درجه) و دیگری اسیدی رقیق در دمای بالا(۱۲۱ درجه) پلیمر کربوهیدراتها (glucan, xylan, ...) به قندهای مربوطه تبدیل گردیده و سپس قندهای تولید شده توسط روش HPLC با استفاده از ستون AMINEX HPX-87P اندازه گیری می شود. در این روش ۰/۱±۳ گرم از لینتر در یک لوله آزمایش با حجم ۲۰ سی سی قرار داده و بر روی آن ۳ سی سی اسید سولفوریک ۷۲٪ اضافه می شود. سپس برای مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه قرار می گیرد. سپس نمونه ها از لوله آزمایش به یک بالن ۱۰۰ سی سی انتقال و بر روی آن ۸۴ سی سی آب مقطر اضافه می گردد(بدین ترتیب محلول اسیدی ۴٪ بدست می آید). سپس مخلوط بمدت یک ساعت اتوکلاو گردید(دمای ۱۲۱ درجه). سپس مخلوط سانتریفوژ و نمونه ها آنالیز می گردد. برای گلوکز نیز شاهدی همانند لینتر قرار داده می شود تا مشخص شود چه مقدار از گلوکز نشکیل شده در این روش تخریب می شود تا در محاسبات در نظر گرفته شود. برای اندازه گیری قند تولید شده با استفاده از روشHPLC با استفاده از ستونHPX-87P در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد اندازه گیری انجام

گرفت. سیال شوینده[17] در این اندازه گیری اسید سولفوریک ۰/۰۵مولار و آب مقطر بدون یون با دبی ۶ میل لیتر در دقیقه بوده است. برای اندازه گیری گلوکز از دتکتورRI در دمای ۴۰ درجه استفاده شده است. گاز زدا، پمپ، آون مربوط به دمای ستون و دتکتورها ساخت شرکت Jasco ژاپن در سال۱۹۹۳ می باشد.(۱۳)

روش انجام هیدرولیز آنزیمی

لینتر را پس از انجام عملیات مقدماتی به وسیله آنزیم B-TXLکه مطلوبترین آنزیم موجود بوده تحت شرایط استریل هیدرولیز می کنیم.برطبق اطلاعات موجود برای آنزیم دمای بهینه $40^{\circ}c$ الی $50^{\circ}c$ و pH بهینه۴ الی ۵ می باشد. دما را $45^{\circ}c$ و pH را در مقدار ۴/۸ ثابت نگه می داریم. دو نمونه حاوی۵۰ gr و۳۰gr لینتر به ازای ۱ لیتر تهیه نموده و آنها را به مدت ۱۵دقیقه دردمای $121^{\circ}c$ در اتوکلاو استریل نموده و سپس آنزیم بترتیب با FPU=۱۲ و FPU= ۲۴ به ازای هر گرم سلولز و همچنین ۶۰ mg تترا سایکلین به ازای هر ۵ gr لینتر (برای جلوگیری از رشد باکتریها)به آن اضافه نموده و نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای $45^{\circ}c$ در یک همزن با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفته و در زمانهای مختلف نمونه گیری شده وآنالیز می شود.

روش آنالیز قند

برای آنالیز میزان قند بدست آمده از روش DNS استفاده می شود. در این روش نمونه ها را بعد از اینکه به مدت ۱ hr در دمای $50^{\circ}c$ قرار گرفتند به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و سپس ۱ ml نمک راشل و ۵ ml آب مقطر به آن اضافه نموده و میزان جذب آن را با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ nm بدست می آوریم. برای کالیبره نمودن دستگاه از نمونه ای حاوی ۱/۵ ml بافر سیترات بدون حضور سوبسترا استفاده می کنیم.

بازده عملیات هیدرولیز بر اساس رابطه زیر تعیین می گردد:

$$\text{بازده(٪)} = \frac{\text{قند تولید شده(gr)} \times ۰/۹}{\text{سوبسترا(gr)}} \times ۱۰۰$$

ضریب ۰/۹ مربوط به آب جذب شده در هنگام هیدرولیز توسط گلوکز می باشد. (در تبدیل سلولز به گلوکز ۱ مول آب جذب می شود.)

نتایج حاصل از آزمایشات و بحث پیرامون آنها

نتایج آنالیز لینتر

لینتر خام(قبل ازفرایند مقدماتی)دارای۸۷/۲٪ سلولز بوده وپس از فرایند مقدماتی مقدارسلولز آن ۹۸/۱٪میباشد.

نتایج تعیین فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم های موجود براساس روشIUPAC تعیین می شود.میزان فعالیت آنزیم ها طبق جدول زیر می باشد.مشاهده می شود که آنزیم B-TXL بیشترین فعالیت را در این بین دارا می باشد.

[17] -Eluent

جدول ۱- فعالیت آنزیم ها

نوع آنزیم	B-TXL	TXL	TS
میزان فعالیت(FPU/ML)	۳۷	۱۱/۱	**۱۸/۵**

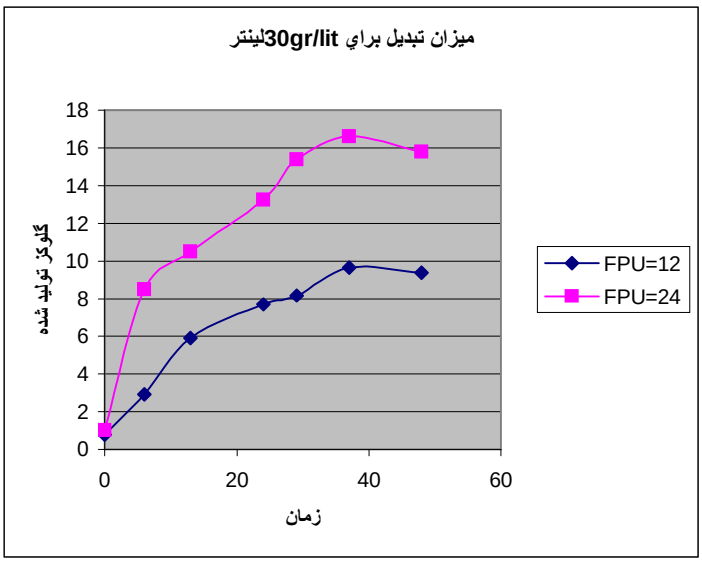
نتایج هیدرولیز آنزیمی و بحث پیرامون آن

همانطور که در نمودارهای ۱و۲ مشاهده می شود تولیدگلوکز در ۲۴ ساعت اول با سرعت بیشتری انجام می گیرد ماکزیمم سرعت تولید نیز در ۱۰ ساعت اولیه واکنش است ، بعد از آن میزان تولید قند بتدریج کم شده ودر زمانهای انتهایی عملیات به یک حد ثابتی می رسد.دلیل کاهش تولید قند در انتهای واکنش ناشی از کاهش فعالیت آنزیمو اثر بازدارندگی محصول می باشد.در اثر هیدرولیز آنزیمی ابتدا سلولز به سلوبیوز که دیمر گلوکز می باشد تبدیل می شود. سپس سلوبیز توسط قسمتی ازآنزیم سلولاز به نام سلوبیوز به گلوکز تبدیل می گردد.سلوبیوز قویترین بازدارنده آنزیم سلولاز (اندو و اگزو گلوکوناز) می باشد. به طوری که این ماده که خود واسطه ای در هیدرولیز آنزیمی می باشد برای سلولاز بازدارنده قوی می باشد. پس از سلوبیوز ،گلوکز قویترین بازدارنده سلولاز شناخته شده است.بنابراین با پیشرفت عملیات هیدرولیز و با تولید محصول (سلوبیز و گلوکز) سرعت تولید قند کاهش می یابد. این پدیده به نام پدیده بازدارندگی محصول[18] در بحث هیدرولیز آنزیمی با سلولاز مطرح می باشد.[۱۴] همانگونه که در شکلهای ۱و۲ و همچنین جدول ۲ مشاهده میگردد سرعت هیدرولیز آنزیمی در ۱۰ ساعت اولیه بیشتر از ۴ برابر سرعت تولید در ساعات نهایی هیدرولیز بوده است.از مقایسه نمودار ۱و۲ مشاهده میگردد که هنگامی که مقدار لینتر بیشتر باشد (gr/lit ۵۰) اثر میزان آنزیم بر روی تولید قند بیشتر از هنگامی است که مقدار سوبسترا (لینتر) کم باشد (gr/lit ۳۰) به طوری که با دو برابر کردن میزان آنزیم از FPU ۱۲ به FPU ۲۴ برای هنگامی که (gr/lit) ۵۰ لینتر وجود داشته باشد میزان قند ۱/۵ برابر می شود. در حالی که برای غلظت(gr/lit) ۳۰ لینتر میزان تولید قند کمتر از ۱ برابر افزایش می یابد. هنگامی که میزان FPU/gr ۱۲ آنزیم بکار رود به نظر میرسد محدود کننده هیدرولیز مقدار لینتر (سوبسترا) می باشد زیرا در غلظت gr/lit ۳۰ و gr/lit ۵۰ لینتر مقدار تقریباً یکسانی از قند (حدود gr/lit ۱۰) تولید شده است. در حالی که در هنگامی که مقدار آنزیم زیادتر باشد (یعنی FPU/gr ۲۴) مقدار لینتر تعیین کننده میزان قند نهایی می باشد به طوری که در این حالت غلظت gr/lit ۵۰ لینتر مقدار gr/lit ۲۵ قند تولید نموده در حالی که مقدار gr/lit ۳۰ لینتر مقدار gr/lit ۱۶ قند تولید نموده است.

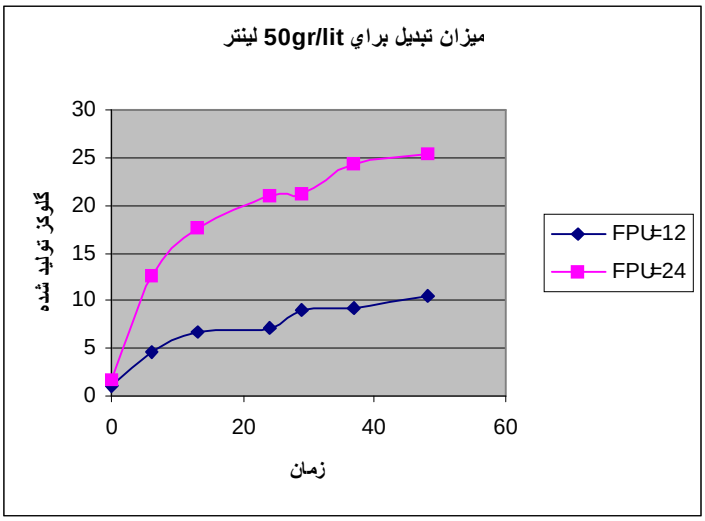
[18] - Product inhibition

جدول ۲- میزان گلوکز تولید شده

زمان (hr)	۳۰لیتر (gr/lit) FPU=۱۲	۳۰لیتر (gr/lit) FPU=۲۴	۵۰لیتر (gr/lit) FPU=۱۲	۵۰لیتر (gr/lit) FPU=۲۴
۰	۰/۷۸	۱/۰۳	۱	۱/۶۲
۶	۲/۹	۸/۵	۴/۶	۱۲/۶
۱۳	۵/۹	۱۰/۵	۶/۷	۱۷/۶
۲۴	۷/۷	۱۳/۲۶	۷/۱۱	۲۰/۹
۲۹	۸/۱۷	۱۵/۴	۸/۹۶	۲۱/۱
۳۷	۹/۶۷	۱۶/۶	۹/۲	۲۴/۴
۴۸	۹/۴	۱۵/۸	۱۰/۴	۲۵/۴



نمودار۱- میزان گلوکز تولید شده برای (gr/lit) ۳۰ لینتر



نمودار ۲- میزان گلوکز تولید شده برای (gr/lit) ۵۰ لینتر

نتیجه گیری

هیدرولیز آنزیمی یک روش مناسب برای هیدرولیز لینتر می باشد. با این روش راندمان نسبتاً بالائی از قندهای قابل تخمیر بدست می آید. در این روش افزایش میزان تولید گلوکز در ساعات اولیه با سرعت بیشتری انجام شده و سپس میزان آن بتدریج کاهش می یابد ودر نقاط انتهایی تقریباً ثابت می ماند. در غلظت های پایین آنزیم ، افزایش میزان سوبسترا (لینتر) اثری بر تولید قند ندارد در حالی که در غلظت های بالای آنزیم با افزایش سوبسترا غلظت قند تولیدی افزایش می یابد. بازده عملیات هیدرولیز آنزیمی نیز برای آنزیم مورد نظر ۵۰٪ می- باشد.

.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله برخود لازم می دانند که از زحمات شرکت فراتک و شرکت داج که در تهیه لینتر وآنزیم آنان را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را ابراز نمایند.

منابع و مراجع

1. Hutnan, M., Drtil, M., and Mrafkova, L. (2000) Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp. Biodegradation, 11(4), 203-11.

2. Sun, Y., and Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 83(1), 1-11.

3. Lamed,R.,E.A.Bayer (1988),Adv.Appl.Microbial,33:1-46.

4. Wilson,D.B.,Biochemisty and Genetics of Actinomycete Cellulases,(1992), Crit,Rev ,Biotechnol,12:46-63.

5. Barichievich,E.B.;R.E.Calza.(1990).Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus Neocallimastix frontalis EB188, Appl Environ Microbiol.56:43-58.

6. Uzcategui,E.;A.Ruiz;R.Montesino;G.Johnansson;L.G.Petterson.(1991) The 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolases from Phanerochaete chrysosporium. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to Trichoderma reesei, J. Biotechnol. 19:271-286.

7. Wood,T.M.;S.I.McCrae;C.A.Wilson;K.M.Ghat;L.A.Gow;J.P.Aubert;P.Beguin. (1988).

Biochem.and Gen.of Cellulose Deg.London:Academic Press,pp.31-52

8. Coughlan,M.P.,L.G.Ljungdahl, J.P.Aubert,P.Beguin,and J.Millet,eds. (1988) in Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation,New York,Academic Press,pp.11-30.

9. Duff, S. and W. Murray (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. Bioresource Technol. 55: 1-33.

10. McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. ACS Symposium Series. 566: 292-324.

11. Fan, L., Y. Lee, et al. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis.

12. Stephen R.Decker,William S.Adney,Edward Jennings,Todd B.Vinzant, and Michael E.Himmel

(2003)National Bioenergy Center, National Renewable Laboratory, 1617 Cole Boulevard, Golden, Co 80401.

13. NREL LAP-002, Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.

14. Tengborg.C (2000) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Softwood , Sweden , Lund university.