

تولید اتانول از ملاس و آب پنیر پرمیت با استفاده از مخمر و نژادهای باکتریایی

چکیده

هدف این کار مطالعه کاربرد ملاس و آب پنیر پرمیت (آب پنیر پروتئین گیری شده) به عنوان منابع بالقوه کربن جهت تولید اتانول و همچنین مطالعه حذف پسماندهای کشاورزی و صنعتی و متعاقباً کاهش هزینه های تولید اتانول می باشد. از ملاس نیشکر و آب پنیر پرمیت به عنوان منابع کربن جهت تولید اتانول توسط مخمرها و نژادهای باکتریایی استفاده گردید. از غلظت های مختلف قند (10، 15، 20 و 25 درصد) برای مطالعه تخمیر توسط دو نژاد مخمر *Kluyveromyces marxianus* NRRL85.54 و *Saccharomyces cerevisiae* O-14 و یک نژاد باکتریایی (*Zymomonas mobilis* ATCC 10988) استفاده گردید. همچنین، تولید اتانول توسط مخلوطی از ملاس و آب پنیر پرمیت با استفاده از این نژادها و کشت مختلط آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت بهینه قند برای دستیابی به کارایی بالای تخمیر اتانول توسط *Zymomonas mobilis* و *Kluyveromyces marxianus* NRRL85.54، *Saccharomyces cerevisiae* O-14 و ATCC 10988، 10 درصد بود. نتایج بدست آمده همچنین نشان داد که بهترین پسماند کشاورزی و صنعتی برای تولید اتانول، آب پنیر پرمیت با *K.marixuanus* و به دنبال آن مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت (غلظت قند 10 درصد) با کشت مختلط سه نژاد و سپس ملاس ها با *K.marixuanus* بود.

واژگان کلیدی: ملاس، آب پنیر پرمیت، اتانول، تخمیر، *Kluyveromyces marxianus*، *Zymomonas mobilis*، *Saccharomyces cerevisiae*.

مقدمه

صنعت تولید اتانول در بسیاری از کشورها به عنوان یکی از مهمترین فعالیتهای تجاری شناخته شده است. در این راستا یک جستجوی جهانی در جهت یافتن روشهای انتخابی و جایگزین برای تولید انرژی از منابع تجدیدپذیر صورت گرفته است. از منابع انرژی طبیعی نظیر سوخت فسیل، نفت، و زغال سنگ به سرعت استفاده شده و برآورد شده است که این منابع طی چند سال به پایان می رسند. بنابراین، منابع انرژی انتخابی نظیر اتانول، متان و هیدروژن مد نظر قرار داده شده اند. در آینده از اتانول به عنوان یک سوخت جایگزین استفاده می شود.

اتانول از محصولات و پسماندهای کشاورزی گوناگونی نظیر غلات، ملاس، میوه، آب پنیر و لیکور پسماند سولفیت تولید می شود. به طور کلی، اکثر محصولات کشاورزی فوق الذکر امر می کنند قیمت های بالاتر مواد غذایی و مواد دیگر مثل سیب زمینی به خاطر محصول پائین اتانول و هزینه های حمل و نقل بالای آنها غیر اقتصادی می باشد. بحران انرژی اوایل دهه 70 مجدداً علاقه ای نسبت به تخمیر اتانول ایجاد نموده است، اما کاربردش به دسترس پذیری و هزینه های کربوهیدرات نسبت به دسترس پذیری و هزینه های اتیلن بستگی دارد. قیمت قند و غلات، مثل قیمت نفت از سال 1973 به طور چشمگیری افزایش یافته است.

بسیاری از مواد خام بکاررفته در تولید اتانول از طریق تخمیر به سه نوع ماده خام کشاورزی تقسیم می شوند: قند، نشاسته و سلولز. قندها (نیشکر، چغندر قند، ملاس ها و میوه ها) مستقیماً به اتانول تبدیل می شوند. نشاسته ها (غلات، سیب زمینی، محصولات ریشه) ابتدا بایستی با عمل آنزیم ها از مالت یا کپک ها، به قندهای قابل تخمیر هیدرولیز شوند. سلولز (چوب، باقیمانده های کشاورزی، لیکور سولفیت پسماند ماشین کاغذسازی و مغز کاغذ) بایستی با عمل اسیدهای معدنی، به قندها تبدیل شود. به محض تشکیل قندهای ساده، آنزیم های مخمر می توانند به راحتی آنها را به اتانول تخمیر کنند.

ملاس، محصول پسماند صنعت قند و ماده خام امیدوارکننده ای برای تولید اتانول می باشد. برزیل از طریق تخمیر ملاس های نیشکر توسط مخمر همچنان در تولید اتانول سوخت موتوری در مقیاس بزرگ پیشگام می باشد. همچنین، در هند، ملاس ها کاربرد وسیعی در صنایع الکل دارند.

آب پنیر پرمیت از صنعت لبنیات پسماند مانع مهمی برای تولید اتانول بوده و در عین حال مشکلات زیست محیطی مرتبط با تیمار و امحاء را به حداقل می رساند.

میکروارگانیزم های مختلفی به عنوان میکروب های اتانولوژنیک در نظر گرفته شده اند.

Saccharomyces cerevisiae و *Kluyveromyces marxianus* و باکتری اختیاری

Zymomonas mobilis، کاندیدهای بهتری برای تولید الکل صنعتی به شمار می روند. هدف اصلی

مطالعه حاضر، بازیافت پسماندهای کشاورزی و صنعتی جهت کاهش هزینه های مالی فرایند و پتانسیل ملاس ها و آب پنیر پرمیت به عنوان سوسترهایی برای تولید اتانول توسط مخمر و نژادهای باکتریایی می باشد.

مواد و روشها

پسماندهای کشاورزی و صنعتی

از ملاس های نیشکر مصری با 50 درصد قندهای قابل تخمیر و 80 درصد اسیدهای کل بدست آمده از کارخانه **El Hawamdia** برای صنعت قند ادغام شده، برای تولید اتانول استفاده گردید. آب پنیر پرمیت (2. 4 درصد لاکتوز و pH 5. 4) از واحد فراوری لبنیات، موسسه تحقیقات تولید جانوری، ARC، وزارت کشاورزی، Cairo, Dokki، مصر بدست آمد.

میکروارگانیسیم ها

در سراسر پژوهش فعلی، پتانسیل تولید اتانول دو نژاد مخمر و یک نژاد باکتری، تست گردید.

14 *Kluyveromyces marxianus* NRRL8554

Saccharomyces cerevisiae O. و *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 از کلکسیون

کشت بخش میکروبیولوژی کشاورزی، مهندسی کشاورزی، دانشگاه Cairo بدست آمدند.

محیط کشت

از محیط کشت اکسترکت مالت آگار مخمر (محیط YM) برای کشت و حفظ نژاد مخمر *cerevisiae* *Saccharomyces* استفاده گردید.

از بروت YM نیز برای تهیه محیط کشت سلولهای مخمر *Kluyveromyces marxianus* استفاده

گردید. از محیط *Zymomonas mobilis* برای کشت و حفظ نژاد *Zymomonas mobilis* در دمای 4درجه سانتی گراد استفاده گردید.

از دو محیط متفاوت برای تولید اتانول با استفاده از منابع کربن مختلف استفاده گردید، به عبارتی، گلوکز، ملاس،

آب پنیر پرمیت. محیط اول (محیط شماره 1) از $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5% ؛ 0.3% اکسترکت یا عصاره

مخمر؛ KH_2PO_4 0.5% ؛ MgSO_4 0.1% ؛ CaCl_2 0.01% ، 2. 15 درصد

گلوکز تشکیل می شود. از آن در آزمایشات مختلف تخمیر ناپیوسته استفاده گردید. گلوکز در محیط تخمیر جای

خود را با منابع کربن بررسی شده مثل ملاس و آب پنیر پرمیت عوض نمود. محیط دوم (محیط شماره 2) از

0.5 درصد پیتون، 0.3 درصد اکسترکت یا عصاره گوشت تشکیل می شود. از غلظت های مختلف قند به عنوان منابع کربن مثل گلوکز، ملاس، آب پنیر پرمیت یا مخلوطی از ملاس و آب پنیر پرمیت استفاده می گردد.

تعیین ترکیب شیمیایی ملاس و آب پنیر پرمیت

طبق اظهارات APHA, 1992، تست NPK و تست مواد آلی روی ملاس های تصفیه شده و نمونه های آب پنیر پرمیت اتوکلاو شده اجرا گردید (جدول 1). مواد آلی با روش Walkely و Black تعیین گردید.

تصفیه ملاس ها

تصفیه ملاس ها به روش شیمیایی با اضافه کردن 3 میلی لیتر H_2SO_4 غلیظ شده به 1 کیلوگرم ملاس مخلوط شده با 1000 میلی لیتر آب مقطر تا زمان رسیدن به pH 5.3 انجام شد. سپس مخلوط در حمام آب تا نقطه جوش به مدت 30 دقیقه گرم شد و بعد از سرد شدن، به 2000 میلی لیتر رسید، سپس به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد، سانتریفیوژ گردید و در دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه، استریل گردید. غلظت قند 25 درصد بود.

جدول 1. ترکیب شیمیایی ملاس و آب پنیر پرمیت

Sample	%N	%P	%K	%O.M
Whey permeates	0.06	0.38	0.12	4.5
Molasses	0.20	0.27	0.11	15.2

تصفیه آب پنیر پرمیت

تصفیه آب پنیر پرمیت از طریق گرم شدن با اضافه کردن 3 میلی لیتر H_2SO_4 غلیظ به 1 کیلوگرم آب پنیر پرمیت انجام شد. سپس مخلوط تا رسیدن به نقطه جوش به مدت 30 دقیقه در حمام آب گرم شد و پس از سرد شدن، به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد، سانتریفیوژ گردید و در دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه استریل شد. تصفیه آب پنیر پرمیت با اتوکلاو در دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه نیز انجام می شود، بدین طریق پروتئین های باقیمانده و فسفات کلسیم رسوب می کند. از آب پنیر تصفیه شده به روش اتوکلاو و محتوی 5.4 درصد قند برای تولید اتانول استفاده گردید. مقادیر متفاوتی از ملاس های تصفیه

شده به آب پنیر پرمیت محتوی 10، 15، 20 یا 25 درصد قند اضافه گردید تا بدین طریق مقدار قند کل در محیط تخمیر بکاررفته برای تولید اتانول افزایش یابد.

روشهای میکروبیولوژیکی

از یک اسلانت از محیط کشت مخمر یا *S.cerevisiae* یا *K.marixuanus* برای تلقیح و مایه کوبی در فلاسک های مخروطی (با ظرفیت 250 میلی لیتر) محتوی 50 میلی لیتر محیط بروت YM استفاده گردید. سپس روی شیکر چرخشی (120rpm) در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت، انکوبه گردید. نژاد باکتریایی اینوکولوم *Zymomonas mobilis* به همین طریق اما بدون همزدن تهیه گردید. از این محیط های کشت فعال به عنوان اینوکولوم برای تولید اتانول استفاده گردید. تولید اتانول با محیط های تخمیر محتوی گلوکز، ملاس، آب پنیر پرمیت و مخلوطی از ملاس و آب پنیر پرمیت به عنوان منابع کربن در فلاسک های ناپیوسته و تخمیر بیوراكتور ناپیوسته مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق روش تشریح شده توسط Norris و Ribbons (1970)، رشد میکروبی برحسب وزن خشک تعیین گردید.

روشهای تحلیلی

قندهای محلول کل (TSS) با استفاده از روش اسید سولفوریک تعیین شدند که توسط (Smith et al., 1956) شرح داده شد. اتانول طبق روشهای Martin پس از تغییر و اصلاح توسط Plevako و Bakoshinskaya (1964) برآورد گردید.

تحلیل آماری

داده های ارائه شده در سه نسخه برای پارامترهای آزمایشات مختلف مورد تست ANOVA قرار گرفتند (تحلیل واریانس).

نتایج و بحث

تولید اتانول از گلوکز خالص

مقایسه تولیداتانول با استفاده از محیط شماره (1) و محیط شماره (2)

در هر دو مورد، با افزایش زمان انکوباسیون، تولید اتانول افزایش یافت (جدول 2). هرچند با افزایش غلظت گلوکز، قند مصرفی نیز کاهش یافت، اما این مسئله تاثیر منفی بر محصول و کارایی داشت. یعنی این مسئله با اظهارات Sengupta و Sadhukan (1992) مخالفت داشت، آنها این گونه استنباط کردند که افزایش غلظت قند منجر به افزایش کارایی تولید اتانول گردید. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد که محیط شماره (2) بهتر از محیط شماره (1) است؟، زیرا تولید سینتیک اتانول با غلظت های قند 10، 15، 20 و 25 درصد، به ثبت رسید. در محیط شماره (2)، تولید اتانول به ترتیب 2.15، 3.34، 2.34 و 2.92 g/100ml و کارایی به ترتیب 19.88، 24.50، 31.56 و 29.92 درصد بود. بنابراین از این محیط در همه آزمایشات انجام شده استفاده گردید، زیرا منجر به تولید بالای سینتیک اتانول گردید.

تولید اتانول با نژادهای تست شده با استفاده از غلظت های مختلف گلوکز

در این آزمایش، غلظت های مختلفی (10، 15، 20 و 25 درصد) به محیط شماره 2 اضافه گردید، دو نژاد مخمر (*K.marixuanus & S.cerevisiae*) و یک نژاد باکتریایی (*Z.mobilis*) برای تولید اتانول مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه اینوکولوم 5 درصد (v/v) و دما به مدت 48 ساعت در 30 درجه سانتی گراد نگه داشته شد. نتایج جدول (3) تولید اتانول توسط میکروارگانیسم های مختلف را نشان می دهد که در محیط شماره (2) رشد کرده اند. در همه موارد، تولید اتانول ظرف مدت 48 ساعت افزایش یافت. شایان توجه است که حداکثر سطح اتانول با *Z.mobilis*، سپس با *S.cerevisiae* و *K.marixuanus* به ثبت رسید.

حداکثر سطح کارایی با *S.cerevisiae* (88.19%)، سپس *Z.mobilis* (81.59%) و در ادامه با *K.marixuanus* (70.34%) به ثبت رسید. علت این امر آن است که بخش عمده ای از قند مصرفی با *Z.mobilis* بدست آمد و اینکه این امر تاثیر منفی بر کارایی داشت. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد که براساس جنبه های اقتصادی و تولید سینتیک اتانول، غلظت گلوکز 10 درصد بهترین غلظت محسوب می شود. این مسئله با اظهارات Srivastava et al. (1997) موافقت دارد، آنها به این مسئله اشاره کردند که غلظت بالاتر قند 15، 20 و 25 درصد، مانع تولید سینتیک اتانول می گردد.

تولید اتانول از ملاس نیشکر

به دلایل اقتصادی از ملاس نیشکر به عنوان ماده خام برای تولید الکل استفاده می شود.

جدول 2. تولید اتانول با استفاده از محیط های شماره (1) و شماره (2)

Conc of sugar (%)	Incubation Time (hr)	Media									
		Medium No.1					Medium No.2				
		D.W. (g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W. (g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
				g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
10%	0	0.13	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0
	24	0.79	1.63	0.6	36.84	72.09	0.46	4.03	1.506	37.31	73.01
	48	1.1	2.37	1.03	43.71	85.55	0.53	5.43	2.15	45.06	88.19
15%	0	0.13	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0
	24	0.74	2.86	0.63	22.14	43.32	0.6	8.16	1.92	23.58	46.14
	48	1.17	3.9	0.92	23.59	46.16	0.93	9.81	2.344	25.67	50.24
20%	0	0.13	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0
	24	0.73	5.07	0.7	13.77	26.96	1	13.69	1.998	14.59	28.56
	48	1.3	7.65	1.2	15.69	30.7	1.27	14.75	2.344	16.13	31.56
25%	0	0.13	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0
	24	0.71	7.49	0.93	12.46	24.38	1.27	18.22	2.53	13.9	27.2
	48	1.5	10.08	1.4	13.89	27.17	1.53	19.33	2.92	15.29	29.92

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.1874 at P = (05)

جدول 3. تولید اتانول با نژادهای تست شده با استفاده از غلظت های مختلف گلوکز

Conc of sugar (%)	Incubation Time (hr)	Strains														
		S.cerevisiae O-14					Z.mobilis ATCC 10988					K.marxianus NRRL 85.54				
		D.W. (g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W. (g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W. (g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
				g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
10%	0	0.4	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	0.46	4.03	1.506	37.31	73.01	0.67	4.66	1.89	40.72	79.69	0.47	3.42	1.13	33.16	64.89
	48	0.53	5.43	2.15	45.06	88.19	0.83	6.24	2.6	41.7	81.59	0.51	4.59	1.65	35.94	70.34
15%	0	0.4	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	0.6	8.16	1.92	23.58	46.14	0.6	8.6	2.256	26.25	51.27	0.3	8.03	1.57	19.63	38.25
	48	0.93	9.81	2.344	25.67	50.24	0.8	9.24	2.76	29.9	58.52	0.71	8.9	2	22.47	43.98
20%	0	0.4	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	1	13.69	1.998	14.59	28.56	0.7	13.9	3.01	21.68	42.37	0.6	12.43	2.1	16.88	33.03
	48	1.27	14.75	2.344	16.13	31.56	0.93	14.7	3.4	23.15	45.29	0.83	13.3	2.43	17.98	35.83
25%	0	0.4	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	1.27	18.22	2.53	13.9	27.2	1.07	18.66	2.74	14.68	28.74	0.8	18.33	2.33	12.72	24.89
	48	1.53	19.33	2.92	15.29	29.92	1.53	19.3	3.05	15.8	30.94	1.13	19.33	2.73	14.3	28.28

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.2676 at P = (05)

طبق اظهارات Kazuhiko و Kozo(1992)، آن مهمترین سوبسترای بکاررفته به عنوان منبع کربن برای مخمرها و باکتریها می باشد. در این آزمایش، محیط شماره 2 تخمیرمحتوی غلظت های متفاوت قند (10، 15، 20، و 25 درصد قند از ملاس های نیشکر بدست آمد) در فرایندهای تخمیر ناپیوسته برای تولید الکل توسط مخمرها یا باکتریها، مورد بررسی قرار گرفت.

در این آزمایش، غلظت های مختلف قند ملاس های نیشکر (10، 15، 20 و 25 درصد) به محیط شماره 2 اضافه گردید و برای تولید اتانول، دو نژاد مخمر (*K.marixuanus & S.cerevisiae*) و یک نژاد باکتریایی (*Z.mobilis*) مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه اینوکولوم (v/v) 5% و دما به مدت 48 ساعت در 30 درجه سانتی گراد نگه داشته شد.

جدول (4) تولید اتانول توسط میکروارگانیسم های مختلف را نشان می دهد که در محیط شماره (2) رشد کردند. روشن بود که نژادمخمر *K.marixuanus* برای تولید الکل از ملاس پس از 48 ساعت تخمیر، کارآمدترین نژاد بود، و *Z.mobilis* و *S.cerevisiae* به ترتیب نزولی در رتبه های بعدی جای داشتند. این نژادها به ترتیب 2.65، 3.14 و 2.03 گرم اتانول در 100 میلی لیتر با کارایی 6.74، 12.60 و 47.04 درصد از محصول فرضی با نرخ مصرف قند 25، 63، 8، و 8.47 g/100ml تولید کردند.

این محصول اتانول با استفاده از *Z.mobilis* با مقدار بدست آمده توسط Diez و Yokoya (1996) مغایرت دارد، آنها به این مسئله توجه کردند که در صورت استفاده از *Z.mobilis* CP4، محصول اتانول 5.94 درصد از محصول فرضی بود. همچنین نتایج بدست آمده نشان می دهد که در همه جنبه ها مثلاً جنبه های اقتصادی و تولید سینتیک اتانول، غلظت گلوکز 10 درصد بهترین غلظت به شمار می رفت. این امر با Srivastava et al.(1997) موافق می باشد، آنها به این مسئله توجه کردند که غلظت بالاتر قند یعنی، 15، 20 و 25 درصد مانع تولید سینتیک اتانول می شود.

تولید اتانول از آب پنیرهای پرمیت

صنایع فرآوری لبنیات آب پنیر را در مقادیر عظیم تولید نموده و این اغلب ماده به عنوان یک تهدید زیست محیطی در نظر گرفته می شود. پروسه های مختلفی برای مصرف آب پنیر عمدتاً مبتنی بر تخمیر توسط

میکروارگانیسیم هـ ا پیش نهاد شـ ده اسـ ت
 (sp.) *Lactobacillus sp., sp. Candida, Kluyveromyces* که از لاکتوز استفاده

می کنند. آب پنیر پرمیت به عنوان یک ماده خام برای تولید اتانول مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه بین تولید اتانول با استفاده از آب پنیر پرمیت تصفیه و اتوکلاو شده

تصفیه آب پنیر پرمیت با استفاده از اسید صورت گرفته ، سپس گرما به محیط شماره (2) اضافه شده و با نژاد *S.cerevisiae* تلقیح می شود تا بدین طریق روش تصفیه بهتر برای تولید اتانول مورد بررسی قرار گیرد، اندازه اینوکولوم 5%(v/v) و دما به مدت 48 ساعت در 30 درجه سانتی گراد نگه داشته شد. نتایج جدول (5) تولید اتانول با دو روش تصفیه متفاوت را نشان می دهد. می توان نشان داد که آب پنیر پرمیت تصفیه شده با استفاده از گرما، بهتر از آب پنیر پرمیت تصفیه شده با استفاده از اسید می باشد زیرا تولید سینتیک اتانول در آب پنیر اتوکلاو شده بالاتر است. آب پنیر تصفیه شده با استفاده از گرما 1.61 g/100ml با کارایی 87.75% و قند مصرف شده 3.61g/100ml تولید نمود، در حالیکه آب پنیر تصفیه شده با استفاده از اسید 0.885 g/100ml با کارایی 69.21% و قند مصرف شده 2.5g/100ml تولید نمود. اختلاف بزرگ بین آنها ناشی از قرار گرفتن آنها در معرض دمای بالا در آب پنیر تصفیه شده با استفاده از گرما یا اسیدیته (قدرت اسیدی) در آب پنیر پرمیت تصفیه شده با استفاده از اسید می باشد.

Conc of sugar (%)	Incubation Time (hr)	Strains														
		<i>S.cerevisiae</i> O-14					<i>Z.mobilis</i> ATCC 10988					<i>K.marxianus</i> NRRL 85.54				
		D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
				g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
10%	0	0.2	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	0.43	7.61	1.25	16.37	32.04	0.87	7.57	1.53	20.24	39.61	0.43	7.74	2.63	33.98	66.5
	48	0.6	8.47	2.03	24.03	47.04	1.1	8.63	2.651	30.75	60.12	0.46	8.25	3.14	38.12	74.6
15%	0	0.2	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	0.97	10.76	1.597	14.95	29.25	0.97	10.43	1.87	17.97	35.17	0.48	11.93	3.29	27.62	54.04
	48	1.27	12.13	2.048	16.98	33.23	1.33	11.13	2.67	24.03	47.03	0.55	13.43	4.3	22.89	63.06
20%	0	0.2	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	1	1.07	1.293	13.38	26.19	0.85	16.5	2.3	13.96	27.32	0.39	10.34	2.33	22.57	44.17
	48	1.47	11.86	1.714	14.44	28.25	1.47	17.73	3.24	18.28	35.78	0.51	11.93	4.06	32.89	66.55
25%	0	0.2	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
	24	1.57	13.7	1.472	10.74	21.02	1.13	20.9	2.53	12.11	23.7	0.44	5.57	0.77	13.81	27.02
	48	1.83	14.77	1.712	11.59	22.69	1.67	21.6	3.83	17.72	34.67	0.61	7.78	1.82	23.41	45.81

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.2725 at P = (05)

جدول 4. تولید اتانول با نژادهای تست شده با استفاده از غلظت های مختلف قند ملاس های نیشکر

Incubation Time (hr)	Clarification methods									
	D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Using heat			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Using acid		
			Ethanol Kinetics Production					Ethanol Kinetics Production		
			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
0	0.5	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0
24	0.72	1.74	0.718	41.28	80.78	1.35	1.66	0.334	20.17	39.48
48	0.88	3.61	1.61	44.84	87.75	1.72	2.5	0.885	35.36	69.21

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.8136 at P = (05)

جدول 5. تولید اتانول با استفاده از آب پنیر پرمیت تصفیه شده با استفاده از اسید و گرما

Incubation Time (hr)	Strains														
	<i>S.cerevisiae</i> O-14					<i>Z.mobilis</i> ATCC 10988					<i>K.marxianus</i> NRRL 85.54				
	D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
0	0.5	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0
24	0.72	1.77	0.73	41.02	80.28	0.88	2.41	1.07	44.27	86.63	0.53	45.32	0.98	45.32	88.68
48	0.88	3.61	1.61	44.84	87.75	1.17	3.46	1.62	46.79	91.57	0.8	48.81	1.74	48.81	95.53

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.1896 at P = (05)

جدول 6. تولید اتانول با سه نژاد تست شده با استفاده از آب پنیر پرمیت

تولید اتانول با نژادهای تست شده با استفاده از آب پنیر پرمیت

آب پنیر پرمیت اتوکلاو شده به محیط شماره (2) اضافه شده و دو نژاد مخمر (*K.marixuanus* & *S.cerevisiae*) و یک نژاد باکتریایی (*Z.mobilis*) برای تولید اتانول مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه اینوکولوم (v/v) 5% و دما به مدت 48 ساعت در 30 درجه سانتی گراد نگه داشته شد. نتایج جدول 6 تولید اتانول با میکروارگانیسم های مختلف را نشان می دهد که در محیط شماره (2) رشد کردند. می توان توضیح داد که *K.marixuanus* نژادی کارآمد می باشد، *Z.mobilis* و سپس *S.cerevisiae* در رتبه های بعدی جای داشتند. *K.marixuanus* 1.74 g/100 ml با کارایی 95.53% و *Z.mobilis* 1.62 g/100ml با کارایی 91.57% تولید نمود. *S.cerevisiae* 1.61 g/100ml با کارایی 75.87 درصد تولید نمود. در این رابطه، Brady et al.(1994) اظهار داشتند که *K.marixuanus*، لاکتوز را سریعتر از دیگران تخمیر نمود.

اثر اندازه اینوکولوم بر تولید اتانول

آب پنیر پرمیت اتوکلاو شده به عنوان منبع کربن به محیط شماره (2) اضافه گردید سپس فرایند با انکوباسیون *S.cerevisiae* و *Z.mobilis* ادامه یافت. تولید اتانول مورد بررسی قرار گرفت. اندازه اینوکولوم (v/v) 5% و دما به مدت 48 ساعت در 30 درجه سانتی گراد نگه داشته شد. نتایج جدول (7) اثر اندازه اینوکولوم بر تولید اتانول را نشان می دهد. می توان به این مسئله توجه نمود که 5 درصد اندازه اینوکولوم با دو نژاد مختلف بهتر از 2.5 درصد است. همان گونه که قبلاً عنوان گردید، آب پنیر پرمیت تصفیه شده با استفاده از گرما بهتر از اسید می باشد. *Z.mobilis* کارآمدتر می باشد زیرا 1.89 g ethanol/100ml با کارایی 94.48% با اندازه اینوکولوم 5 درصد تولید نمود. *S.cerevisiae* 1.67 g ethanol/100ml با کارایی 90.42 درصد با اندازه اینوکولوم 5 درصد تولید نمود. Chahal (1991) اظهار داشت که *Z.mobilis* دارای بالاترین نرخ ویژه تولید اتانول می باشد، یعنی، *Z.mobilis* اتانول را بسیار سریعتر از مخمر قابل قیاس تولید می کند.

نتایج بدست آمده با نتایج Davison و Scott.(1988) و Webb et al.(1995) موافق می باشد، آنها این گونه استنباط کردند که *Z.mobilis* قابلیت تولید 50-200g ethanol/L/hr با محصول حدود 97 درصد از محصول فرضی را داشت. در مقابل، (Ghasem-Najafpour et al.(2004) این گونه استنباط کردند که در تخمیر ناپیوسته 5 درصد قند با *S.cerevisiae*، بهره وری اتانول 0.29 g/L/hr محاسبه گردید. همچنین، نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت قند 10 درصد آب پنیر پرمیت اتوکلاو شده بهترین غلظت به شمار می رفت.

تولید اتانول از مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت با نژادهای تست شده

هدف از اجرای این آزمایش ارزیابی تولید اتانول با دو نژاد مخمر (*K.marixuanus & S.cerevisiae*) و یک نژاد باکتریایی (*Z.mobilis*) رشد کرده روی محیط شماره (2) بود که برای رسیدن به غلظت قند 10 درصد، با ملاس های نیشکر کامل شده بود. (El-Nemr(1999) این گونه استنباط نمود که حداکثر بهره وری اتانول از آب پنیر شیرین یا شور در غلظت قند 10 درصد بدست آمد (لاکتورآب پنیر 4 درصد و ملاس 6 درصد بود). فرایند تخمیر به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد اجرا گردید. نتایج جدول (8) تولید اتانول از مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت با نژادهای تست شده را نشان می دهد. می توان اظهار داشت که *Z.mobilis* بهترین نژاد بود که زمانی کارایی بالای تولید اتانول را حفظ می کند که روی مخلوطی از ملاس و آب پنیر رشد کرده باشد. کارایی بدست آمده در این مورد 93.74 درصد، با *S.cerevisiae*، 51.91 درصد و با *K.marixuanus* 86.98 درصد بود.

Inoculum size & clarification method	Incubation Time (hr)	Strains									
		<i>S.cerevisiae</i> O-14					<i>Z.mobilis</i> ATCC 10988				
		D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
				g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
<i>H.W</i> 2.5ml	0	0.29	0	0	0	0	0.15	0	0	0	0
	24	0.41	2.96	1	35	66.74	0.21	3.5	1.4	39.78	77.89
	48	0.52	3.43	1.32	38.36	75.06	0.4	4.08	1.68	41.29	80.8
<i>H.W</i> 5ml	0	0.29	0	0	0	0	0.15	0	0	0	0
	24	0.38	3.34	1.45	43.46	85.05	0.29	3.73	1.78	47.74	93.43
	48	0.53	3.63	1.67	46.21	90.42	0.38	3.905	1.89	48.28	94.48
<i>A.W</i> 2.5ml	0	0.29	0	0	0	0	0.15	0	0	0	0
	24	0.4	4.6	0.8	17.43	34.1	0.26	3.79	1.2	31.58	61.8
	48	0.48	5.04	1.13	22.5	44.02	0.4	5.54	1.83	33.07	65.59
<i>A.W</i> 5ml	0	0.29	0	0	0	0	0.15	0	0	0	0
	24	0.42	2.85	1.1	38.65	75.65	0.3	3.47	1.45	41.84	81.88
	48	0.6	3.7	1.57	42.5	83.18	0.47	4.15	1.78	42.98	84.1

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.2986 at $P = (05)$
A.W refers to clarified whey using acid., *H.W* refers to clarified whey using heat.

جدول 7. اثر اندازه اینوکولوم بر تولید اتانول از آب پنیر پرمیت

Incubation Time (hr)	Strains														
	<i>S.cerevisiae</i> O-14					<i>Z.mobilis</i> ATCC 10988					<i>K.marxianus</i> NRRL 85.54				
	D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
0	0.13	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.11	0	0	0	0
24	0.8	2.12	0.95	44.78	87.63	0.5	2.53	1.16	45.9	89.81	0.22	4.28	1.62	37.85	74.07
48	1.43	3.35	1.57	46.71	91.51	1.03	3.3	1.58	47.9	93.74	0.29	4.5	2	44.44	86.98

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.3589 at $P = (05)$

جدول 8. تولید اتانول از مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت با نژادهای تست شده

Tested strains	Incubation Time (hr)	D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
				g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
S+Z	0	0.5	0	0	0	0
	24	0.95	1.81	0.77	42.68	83.52
	48	1.23	3.26	1.48	45.61	89.25
K+S	0	0.6	0	0	0	0
	24	0.94	2.17	0.87	39.98	78.24
	48	1.33	3.98	1.7	42.87	83.88
K+Z	0	0.7	0	0	0	0
	24	0.88	2.11	0.93	43.52	85.17
	48	1.13	5.1	1.66	42.34	82.85
K+S+Z	0	0.5	0	0	0	0
	24	0.87	2.58	1.12	43.02	84.19
	48	1.63	4.33	2.06	47.72	92.71

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.2142 at P = (05)

جدول 9. تولید اتانول از مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت با محیط کشت مختلط

Incubation Time (hr)	Whey permeate			Mixture of molasses & whey permeate					Molasses with 10% sugar conc.						
	<i>K.marxianus</i> NRRL 85.54			mixed culture					<i>K.marxianus</i> NRRL 85.54						
	D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production			D.W.(g/100ml)	(g/100ml)	g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)	D.W.(g/100ml)	Consumed sugar (g/100ml)	Ethanol Kinetics Production		
			g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)								g/100ml	Yield (%)	Efficiency (%)
0	0.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0	
24	0.53	45.32	0.98	45.32	88.68	0.87	2.58	1.12	43.02	84.19	0.43	7.74	2.63	33.98	66.5
48	0.8	48.81	1.74	48.81	95.53	1.63	4.33	2.06	47.72	92.71	0.46	8.25	3.14	38.12	74.6

Values are means of 3 replicates, LSD value = 0.3096 at P = (05)

جدول 10. مقایسه پسماندهای کشاورزی و صنعتی مختلف در تولید اتانول

تولید اتانول از مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت با محیط کشت مختلط

هدف از اجرای این آزمایش ارزیابی تولید اتانول با محیط کشت مختلط (*S.cerevisiae* & *Z.mobilis*)،

(*K.marixuanus*, *S.cerevisiae* & *Z.mobilis*) یا (*K.marixuanus* & *Z.mobilis*)، (*K.marixuanus* & *S.cerevisiae*)

بود که روی محیط شماره (2) رشد کرده و محتوی 10 درصد قند از ملاس نیشکر و آب پنیر پرمیت بودند.

نتایج جدول (9) تولید اتانول از مخلوط ملاس و آب پنیر پرمیت با محیط کشت های مختلط متفاوت را نشان می

دهد. نتایج بدست آمده نشان می دهد که تولید اتانول از محیط کشت مختلط سه نژاد بهترین نوع می باشد؛

بهره وری اتانول 2.06 g /100 ml و کارایی % 92.71 از 4.33 g/100 ml قند مصرفی با

Z.mobilis) و (*K.marixuanus* & *S.cerevisiae*) بوده، (*S.cerevisiae* & *Z.mobilis*) & *K.marixuanus* در رتبه های بعدی جای دارند.

می توان اظهار داشت که بهترین نژاد *K.marixuanus* است. همان گونه که در جدول (10) نشان داده شده است، هنگام مقایسه داده های قبلی، (Brady et al.(1994) اظهار داشتند که *K.marixuanus*، لاکتوز را سریعتر از قندهای دیگر تخمیر نمود. (Singh et al.(1998) این گونه استنباط کردند که *K.marixuanus* زمانی قابلیت تولید اتانول را داشت که روی محیط ملاس رشد کرده باشد. همچنین می توان عنوان نمود که بهترین پسماند کشاورزی و صنعتی برای تولید اتانول آب پنیر پریمیت می باشد، *K.marixuanus* و مخلوطی از ملاس و آب پنیر پریمیت با محیط کشت مختلط سه نژاد و سپس ملاس هایی با *K.marixuanus* در رتبه های بعدی جای دارند.

K.marixuanus کارآمدترین میکروارگانیسم تولید کننده اتانول از آب پنیر پریمیت و ملاس می باشد. شرایط بهینه تولید اتانول از پسماندهای کشاورزی و صنعتی (آب پنیر پریمیت و ملاس) غلظت قند 10 درصد بود که با استفاده از محیط کشت مختلط از سه نژاد (*K.marixuanus*, *S.cerevisiae* & *Z.mobilis*) با نسبت (1:1:1) بدست آمده بود. این مسئله در آزمایشات مقیاس بزرگ و کوچک تصدیق گردید.