

Effect of Acetic Acid on Growth and Ethanol Fermentation of Filamentous Fungi *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Neurospora intermedia* and *Aspergillus oryzae*

Mohammadtaghi Asadollahzadeh¹,
Ali Ghasemian^{2*}, Ahmadreza Saracian³,
Hossein Resalati⁴, Mohammad Taherzadeh⁵

1. Ph.D. Candidate of Pulp and Paper Technology, Department of Pulp and Paper Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 2. Associate Professor, Department of Pulp and Paper Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 3. Associate Professor, Department of Pulp and Paper Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 4. Professor, Department of Wood and Paper Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
 5. Professor, Department of Biotechnology, Swedish Centre for Resource Recovery, University of Borås, Borås, Sweden
- (Received: Vov. 2, 2017 - Accepted: Dec. 29, 2018)

Abstract

Toxic compounds and inhibitors in lignocellulosic hydrolysates such as acetic acid and phenolic compounds are the major challenge for biochemical conversion of lignocellulosic materials into biofuels like bioethanol. In this study, the performance of four filamentous fungi *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Neurospora intermedia* and *Aspergillus oryzae* on the fungal biomass production, sugar and acetic acid consumption as well as ethanol production was investigated in synthetic mediums containing 0, 3, 5 and 7 g/L acetic acid. The fungal biomass obtained after 48 and 72 hours cultivation showed that the rate of the fungi growth and lag phase decreased and increased by acetic acid addition into the medium, respectively. The inhibitory effect of acetic acid on *M. indicus* growth was higher than those of other fungi, i.e., its biomass production decreased significantly at higher concentration of acetic acid (5 g/L), while *A. oryzae* showed pretty good tolerance to acetic acid. The results indicated that the effect of acetic acid on the fungal biomass and ethanol production was dependent on acetic acid concentration and the fungus type which can affect positively and/or negatively on the fermentation. The ethanol concentration from *A. oryzae* and *R. oryzae* cultivation in the medium containing acetic acid was decreased and increased, respectively. According to the fermentation results, the medium containing 7 g/L acetic acid was enough to stop the fungi growth and ethanol production.

Keywords: Acetic acid, ethanol, filamentous fungi, fungal biomass

تأثیر اسید استیک بر رشد و تخمیر اتانول قارچ‌های فیلامنتوس *Rhizopus oryzae* و *Neurospora intermedia* *Mucor indicus* *Aspergillus oryzae*

محمدتقی اسداله‌زاده^۱، علی قاسمیان^{۲*}، احمدرضا سرائیان^۳، حسین رسالتی^۴، محمد طاهرزاده^۵

۱. دانشجوی دکتری، صنایع خمیر و کاغذ، گروه صنایع خمیر و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
 ۲. دانشیار، گروه صنایع خمیر و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
 ۳. دانشیار، گروه صنایع خمیر و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
 ۴. استاد، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
 ۵. استاد، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سوئدی بازیابی منابع، دانشگاه بوراس (Borås) سوئد
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۸)

چکیده

ترکیبات سمی و بازدارنده موجود در فرآورده‌های هیدرولیزی مواد لیگنوسلولوزی از قبیل اسید استیک و ترکیبات فنلی، مشکل اصلی فرآیند تبدیل بیوشیمیایی مواد لیگنوسلولوزی به سوخت‌های زیستی مانند بیواتانول می‌باشند. در این تحقیق، عملکرد چهار قارچ فیلامنتوس *Neurospora intermedia*، *Mucor indicus* و *Aspergillus oryzae* در محیط کشت‌های سنتزی حاوی صفر، سه، پنج و هفت گرم بر لیتر اسید استیک بر روی تولید بیومس قارچی، مصرف قند و اسید استیک و همچنین تولید اتانول بررسی شدند. مقدار بیومس قارچی به دست آمده بعد از زمان کشت ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که افزودن اسید استیک به محیط کشت، سبب کاهش سرعت رشد قارچ‌ها و افزایش فاز تأخیر شد. تأثیر بازدارندگی اسید استیک بر رشد قارچ *M. indicus* نسبت به سایر قارچ‌ها بیشتر بوده و تولید بیومس حاصل از کشت این قارچ در غلظت بیشتر اسید استیک (پنج گرم بر لیتر) به شدت کاهش یافت، درحالی‌که قارچ *A. oryzae* تحمل (بردباری) خوبی نسبت به اسید استیک نشان داد. نتایج نشان داد که تأثیر اسید استیک بر مقدار بیومس قارچی و تولید اتانول وابسته به غلظت اسید استیک و نوع قارچ مصرفی بوده و می‌تواند اثر مثبت و یا منفی داشته باشد. غلظت اتانول حاصل از تخمیر قارچ‌های *A. oryzae* و *R. oryzae* در محیط کشت حاوی اسید استیک به ترتیب کاهش و افزایش پیدا کرد. با توجه به نتایج تخمیر، قارچ‌های فیلامنتوس آزمایش شده قادر به رشد و تولید اتانول در محیط کشت حاوی هفت گرم بر لیتر اسید استیک نبودند.

واژه‌های کلیدی: اتانول، اسید استیک، بیومس قارچی، قارچ‌های فیلامنتوس.

مقدمه

در سال‌های اخیر، تولید تخمیری اتانول از مواد لیگنوسلولزی به ویژه پسماندهای کشاورزی به عنوان سوخت تجدیدپذیر و پاک در بخش حمل و نقل رشد چشمگیری داشته است (Sarkar *et al.*, 2012). با این وجود، استفاده از پسماندهای کشاورزی و یا سایر مواد لیگنوسلولزی به عنوان مواد خام اولیه برای تولید اتانول از طریق روش‌های بیوشیمیایی و تخمیر، با دو چالش مهم فنی روبرو است. یک چالش قابل ملاحظه و مهم، توسعه روش‌های پیش تیمار مؤثر و اقتصادی و مراحل هیدرولیز آنزیمی برای رهاسازی قندهای قابل تخمیر از زیست توده سلولزی می‌باشد و چالش دیگر، انتخاب میکروارگانیسم مناسب و پربازده است (Bellissimi *et al.*, 2009; Casey *et al.*, 2010; Harner *et al.*, 2014).

طی پیش تیمار، در اثر تخریب اجزای مختلف تشکیل‌دهنده مواد لیگنوسلولزی، یک‌سری از ترکیبات شامل ترکیبات آروماتیک و اسیدی از قبیل اسید استیک، اسید فرمیک، فورفورال، هیدروکسی متیل فورفورال، اسید لوولینیک و وانیلین تولید می‌شوند که می‌توانند به عنوان عوامل بازدارنده تخمیر عمل کرده و سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها، بازده اتانول و تولید بیومس قارچی را کاهش دهند (Limtong *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2006; Greetham, 2014; Silva *et al.*, 2016). تلاش‌های زیادی برای از بین بردن اثر منفی این عوامل بازدارنده بر تخمیر شامل خروج آن‌ها از فرآورده هیدرولیزی ماده لیگنوسلولزی، غربال کردن مخمرهای مقاوم به عامل بازدارنده و بهینه کردن پارامترهای عملیاتی برای تخمیر ماده لیگنوسلولزی انجام شده است (Zheng-yun *et al.*, 2010; Harner *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016).

اسید استیک که یک اسید ضعیف تولید شده از استیل‌زدایی همی‌سلولزها طی پیش تیمار است، مانع رشد میکروارگانیسم‌ها می‌گردد و به عنوان یک عامل ضد میکروبی در صنایع غذایی و آشامیدنی استفاده

می‌شود (Casey *et al.*, 2010; Greetham, 2014). در فرآیندهای کشت میکروارگانیسم‌ها و یا تخمیر، شکل جدا یا تجزیه نشده اسید استیک (HAc) که محلول در چربی است می‌تواند از میان غشای پلاسما عبور کرده و پراکنده گردد و به آنیون (Ac^-) و یک پروتون (H^+) در سیتوزول نزدیک خشی تجزیه شود. این امر منجر به کاهش pH داخل سلولی (pH_i) می‌شود. به منظور حفظ pH_i در مقدار نزدیک خشی، پروتون‌های اضافی بایستی به وسیله ATP از غشای پلاسما خارج شوند. در غلظت‌های زیاد اسید استیک، ظرفیت پمپ کردن پروتون سلول محدود و تهی شده و منجر به تخلیه و کاهش مقدار ATP و اسیدی شدن سیتوپلاسم می‌گردد. علاوه بر اختلال هموستاز pH_i ، انباشتگی مقادیر زیاد آنیون استات داخل سلولی ممکن است سمیت اسید آلی را افزایش دهد (Bellissimi *et al.*, 2009; Greetham, 2014; Liu *et al.*, 2015). اما اسیدهای ضعیف مانند اسید استیک در غلظت‌های کم می‌توانند به عنوان یک منبع کربن استفاده شده و با تنظیم pH موجب بهبود تخمیرپذیری و افزایش بازده اتانول شوند (Zheng-yun *et al.*, 2010; Greetham, 2014).

در حالی که مخمر *Saccharomyces cerevisiae* پرمصرف‌ترین میکروارگانیسم برای تبدیل تخمیری قندهای شش کربنی به اتانول می‌باشد، ممکن است به طور منفی تحت تأثیر عوامل بازدارنده قرار گیرد که منجر به بهره‌وری ضعیف و تخمیر ناقص خواهد شد (Millati *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2016; Nilsson *et al.*, 2011). از این رو، انتخاب یک میکروارگانیسم تولید کننده اتانول مناسب که مقاوم به عوامل بازدارنده موجود در فرآورده‌های هیدرولیزی مواد لیگنوسلولزی و همچنین قادر به تخمیر قندهای پنج کربنه و شش کربنه به اتانول باشد، راه حل کلیدی برای رفع این مشکل خواهد بود. قارچ‌های فیلامنتوس به واسطه تطبیق‌پذیری متابولیکی، نقش حیاتی در تولید صنعتی محصولات

گلوکز (۲۰ گرم بر لیتر)، آگار (۱۵ گرم بر لیتر) و عصاره سیب زمینی (۴ گرم بر لیتر) بودند، نگهداری شدند. پس از تهیه محیط کشت و استریل کردن آن به وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، مخلوط حاصل تا دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد خنک شده و به میزان تقریبی ۲۰ میلی‌لیتر برای ساخت پلیت در ظرف‌های پتری‌دیش استریل ریخته شدند. پس از تلقیح اسپور قارچ‌ها به پلیت‌های تهیه شده و انتقال آن‌ها به داخل انکوباتور، قارچ‌ها بر روی محیط کشت جامد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت چهار روز رشد کرده و سپس در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مواد شیمیایی

قندهای مونومری و ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها عبارت بودند از: گلوکز، گالاکتوز، زایلوز، مانوز، سولفات آمونیوم، مونونیتروژن فسفات، کلرید کلسیم دو آب، سولفات منیزیم هفت آب، هیدروکسید سدیم، اسید استیک، اتانول، عصاره مخمر، آگار و عصاره سیب زمینی که از شرکت‌های Sigma-ACROS, Aldrich و Scharlau خریداری شدند.

تهیه محیط کشت مایع و تلقیح اسپور قارچ در داخل آن برای تخمیر

برای کلیه آزمایش‌های تخمیر، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری که درپوشی از کلاف پنبه بر روی آن‌ها قرار گرفت، تهیه شدند. منابع کربنی (قندی)، مغذی و مواد معدنی موجود در محیط کشت برای کلیه تیمارها ثابت بوده و مقادیر آن‌ها براساس گرم بر لیتر محیط کشت عبارت بودند از: گلوکز ۳، گالاکتوز ۱/۵، مانوز ۴، زایلوز ۱/۵، عصاره مخمر ۴، سولفات آمونیوم ۷/۵، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۳/۵، کلرید کلسیم ۱ و سولفات منیزیم ۰/۷۵ گرم بر لیتر. اسید استیک در چهار سطح صفر، سه، پنج و هفت گرم بر لیتر، به عنوان متغیر

زیست فناوری مانند بیواتانول ایفا کرده‌اند. قارچ‌های فیلامنتوس قادر به رشد تحت هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی هستند و توانایی هضم و تخمیر منابع کربنی مختلف شامل قندهای پنج کربنه و شش کربنه را دارند. به علاوه، بیومس قارچی حاصل از فرآیند کشت این نوع قارچ‌ها حاوی مقادیر مفیدی از پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه و کیتین می‌باشد که می‌توانند به محصولات با ارزش افزوده بیشتر فرآوری شوند (El-Enshasy, 2007; Ferreira et al., 2012).

با توجه به اینکه خروج اسید استیک و عوامل بازدارنده دیگر برای کل فرآیند هزینه‌بر خواهد بود بنابراین، مطالعه مفصل و دقیق اثر این عامل بازدارنده بر رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید اتانول و همچنین ارائه یک راهکار مناسب برای رفع آن، مهم و ضروری می‌باشد. از طرف دیگر، بیشتر تحقیقات انجام شده به بررسی تأثیر اسید استیک بر رشد مخمرها مانند *Saccharomyces cerevisiae* و تخمیر اتانول حاصل از آن‌ها پرداختند. لذا در این تحقیق، تأثیر مقادیر مختلف اسید استیک در محیط کشت حاوی قندهای (مونومری) مخلوط بر رشد و تخمیر اتانول قارچ‌های فیلامنتوس *Mucor*, *Rhizopus oryzae* و *Neurospora intermedia*, *indicus* و *Aspergillus oryzae* مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

قارچ‌ها

قارچ‌های استفاده شده در این تحقیق از خانواده‌های زیگومیست‌ها شامل *Rhizopus oryzae* با مشخصه CCUG ۲۸۹۵۸ و *Mucor indicus* با مشخصه CCUG ۲۲۴۲۴ (تهیه شده از کلکسیون دانشگاه گوتنبرگ سوئد) و آسکومیست‌ها شامل *Aspergillus oryzae* با مشخصه CBS ۸۱۹/۷۲ و *Neurospora intermedia* با مشخصه CBS ۱۳۱/۹۲ (تهیه شده از موسسه تنوع زیستی قارچی Westerdijk هلند) بودند. این قارچ‌ها بر روی محیط کشتی که حاوی

یون هیدروژن (Aminex HPX-87H, Bio-Rad) و آشکارساز ضریب شکست استفاده گردید. دمای ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد و اسید سولفوریک ۵ میلی‌مولار به‌عنوان شوینده با سرعت جریان ۰/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شدند. محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و براساس تجزیه واریانس دو طرفه انجام شد. از آزمون دانکن به‌منظور مقایسه چندگانه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج

جدول ۱، غلظت بیومس قارچی تولید شده در محیط کشت مایع تحت شرایط مختلف تخمیر را نشان می‌دهد.

برای محیط کشت‌های بدون اسید استیک (نمونه شاهد)، قارچ‌های *N. intermedia* و *R. oryzae* به ترتیب بیشترین (۴/۶۲۲ گرم بر لیتر) و کمترین (۳/۸۰۶ گرم بر لیتر) میزان بیومس قارچی را طی ۴۸ ساعت نخست تخمیر تولید کردند. با افزایش زمان برداشت از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت، میزان بیومس به‌دست‌آمده توسط تمام نژادهای قارچی در محیط کشت‌های بدون اسید استیک (نمونه شاهد) کاهش یافت که علت آن می‌تواند اتمام منابع کربنی (قندی) موجود در محیط کشت بعد از ۴۸ ساعت تخمیر باشد که به موجب آن قارچ‌ها ناگزیر به استفاده از منابع مغذی موجود در بیومس برای ادامه حیات و زنده ماندن بودند.

مادامی که برداشت بیومس قارچی بعد از ۴۸ ساعت تخمیر انجام گرفت، میزان بیومس به‌دست‌آمده توسط تمام قارچ‌ها در محیط کشت‌های حاوی سه و پنج گرم بر لیتر اسید استیک، کمتر از میزان بیومس تولید شده در محیط کشت‌های بدون اسید استیک بود. برخلاف نمونه شاهد، با افزایش زمان برداشت از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت، تولید بیومس قارچی در محیط کشت‌های حاوی سه و پنج گرم بر لیتر اسید

محیط کشت در نظر گرفته شد. افزودن اسید استیک اتوکلاو شده در شرایط کاملاً استریل انجام گردید و سپس pH محیط کشت‌های تهیه شده با استفاده از اسید سولفوریک رقیق و هیدروکسید سدیم ۱۰ مولار در حد ۵/۵ تنظیم شد. به منظور تلقیح اسپور قارچ در داخل محیط کشت‌های مایع، ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به داخل پلیت‌های حاوی قارچ‌های مورد نظر ریخته شده و به‌وسیله لوپ پلاستیکی استریل، اسپورهای قارچ‌ها جدا و در درون آب پراکنده شدند. سوسپانسیون‌های اسپور قارچ به داخل شیکر تیوپ‌های استریل انتقال داده شدند تا به صورت محلول کاملاً همگن در آیند. سپس به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع، دو میلی‌لیتر از محلول اسپور قارچ برای تلقیح به ارلن مایرهای حاوی محیط کشت اضافه شدند. در نهایت، آزمایش‌های تخمیر به وسیله حمام آب شیکردار در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۵ دور بر دقیقه و به مدت ۷۲ ساعت انجام شدند. نمونه‌گیری‌ها برای آنالیز قند، اتانول و اسید استیک طی تخمیر در زمان‌های مختلف صفر، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شدند و نمونه‌ها تا زمان آنالیز توسط HPLC درون فریزر نگهداری شدند.

روش‌های آنالیز

بیومس‌های قارچی تولید شده در محیط کشت مایع بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت، توسط یک صافی فلزی با مش ریز (با مساحت منفذ ۱ میلی‌متر مربع) از محلول جدا شده و به‌وسیله ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو شدند و سپس در درون آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. خشک شدن تا زمان ثابت شدن وزن بیومس قارچی ادامه یافت. در نهایت، مقدار بیومس براساس گرم بر لیتر محیط کشت محاسبه شد. برای تعیین غلظت کل قندهای مونومری، اتانول و اسید استیک از دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) مجهز به ستون تبادل یونی مبتنی بر

همچنین، قارچ *A. oryzae* تحمل (بردباری) خوبی به اسید استیک نشان داد. مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر مستقل قارچ و اسید استیک و همچنین اثر متقابل قارچ و اسید استیک بر بیومس قارچی تولید شده معنی‌دار گردید ($P \leq 0.01$).

استیک افزایش یافت. نتایج نشان داد که تأثیر بازدارندگی اسید استیک بر رشد قارچ *M. indicus* نسبت به سایر قارچ‌ها بیشتر بوده و تولید بیومس حاصل از آن در غلظت بیشتر اسید استیک (پنج گرم بر لیتر) به شدت کاهش یافت.

جدول ۱. غلظت بیومس قارچی تولید شده در محیط کشت مایع تحت شرایط مختلف تخمیر

قارچ	زمان برداشت (ساعت)	غلظت اسید استیک (گرم بر لیتر)	غلظت بیومس قارچی (گرم بر لیتر)
<i>Aspergillus oryzae</i>	۰	۰	$4/339 \pm 0/167$
	۴۸	۳	$3/631 \pm 0/178$
		۵	$3/435 \pm 0/088$
		۰	$2/532 \pm 0/189$
	۷۲	۳	$4/753 \pm 0/224$
		۵	$4/872 \pm 0/066$
<i>Neurospora intermedia</i>	۰	۰	$4/622 \pm 0/177$
	۴۸	۳	$3/848 \pm 0/105$
		۵	$3/913 \pm 0/087$
		۰	$2/947 \pm 0/061$
	۷۲	۳	$4/107 \pm 0/033$
		۵	$4/398 \pm 0/096$
<i>Rhizopus oryzae</i>	۰	۰	$3/806 \pm 0/111$
	۴۸	۳	$3/112 \pm 0/092$
		۵	$2/11 \pm 0/078$
		۰	$1/546 \pm 0/083$
	۷۲	۳	$3/767 \pm 0/139$
		۵	$2/474 \pm 0/09$
<i>Mucor indicus</i>	۰	۰	$4/098 \pm 0/056$
	۴۸	۳	$1/228 \pm 0/098$
		۵	$0/785 \pm 0/027$
		۰	$1/825 \pm 0/094$
	۷۲	۳	$3/152 \pm 0/032$
		۵	$0/892 \pm 0/02$

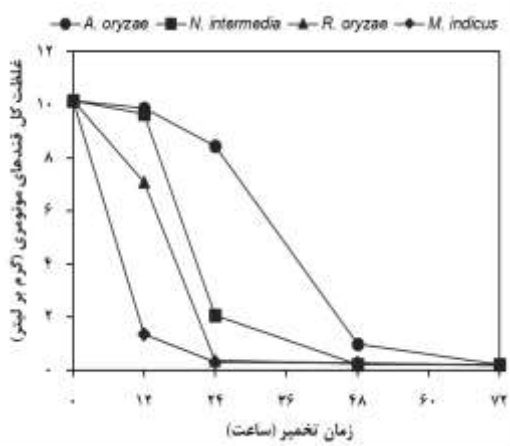
جدول ۲. تجزیه واریانس بیومس قارچی تولید شده در محیط کشت مایع تحت شرایط مختلف تخمیر

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F محاسبه شده
نوع قارچ	۳	۴۹/۱۱۵	۱۶/۳۷۲	۱۰۲۳/۰۳۱**
غلظت اسید استیک	۲	۴/۳۳۱	۲/۱۱۵	۱۳۲/۱۸۲**
نوع قارچ × غلظت اسید استیک	۶	۱۶/۳۰۸	۲/۷۱۸	۱۶۹/۸۴۶**
خطا	۲۴	۰/۳۸۴	۰/۰۱۶	
کل	۳۵	۷۰/۰۳۸		

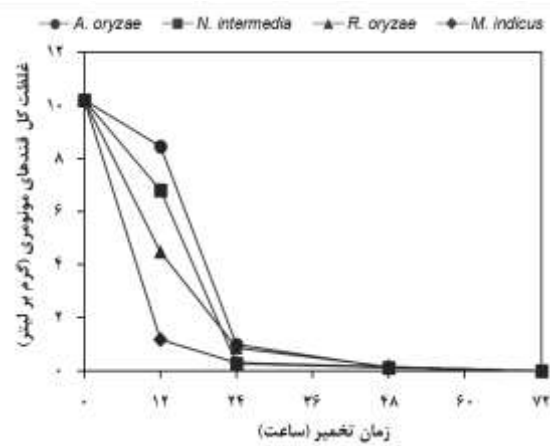
** اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.

مصرف نماید. با افزودن اسید استیک تا سطح پنج گرم بر لیتر، سرعت مصرف قندها توسط قارچ‌های آزمایش شده نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت و غلظت قندها بعد از گذشت ۷۲ ساعت تقریباً به صفر رسید. قارچ *M. indicus* در محیط کشت حاوی اسید استیک هم دارای سرعت مصرف بیشتری نسبت به سایر قارچ‌ها بود. نتایج نشان داد که قارچ‌های فیلامنتوس در دو محیط کشت حاوی سه و پنج گرم بر لیتر اسید استیک، با سرعت تقریباً مشابهی قندها را مصرف نمودند و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو محیط کشت در مصرف کل قندها مشاهده نشد ($P > 0/05$).

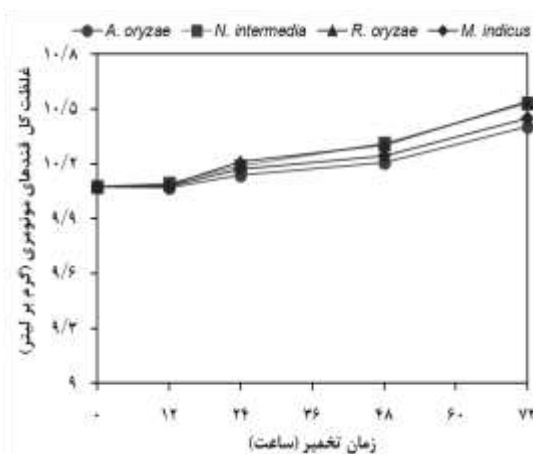
شکل ۱، غلظت کل قندهای مونومری در جریان تخمیر قارچ‌های فیلامنتوس در محیط کشت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در محیط کشت‌های بدون اسید استیک (نمونه شاهد)، غلظت کل قندهای مونومری در ۴۸ ساعت اولیه تخمیر تقریباً به صفر رسید و کل قندهای مونومری در طول ۷۲ ساعت تخمیر به طور کامل مصرف شده بودند اما سرعت مصرف قندها برای قارچ‌های آزمایش شده متفاوت بود. سرعت مصرف قندها طی تخمیر *M. indicus* بسیار بیشتر از سایر قارچ‌ها بوده و این قارچ توانست طی ۱۲ ساعت اولیه تخمیر، بخش اعظم قندها را



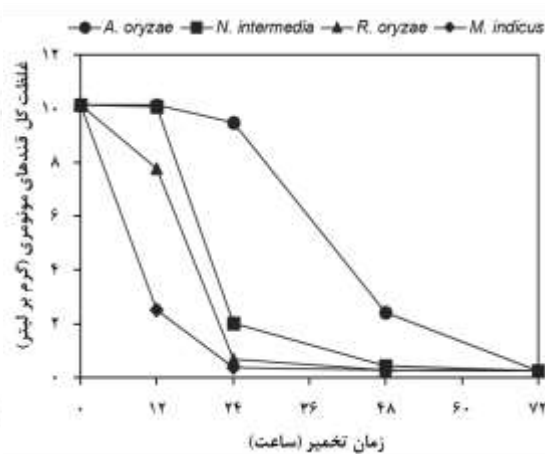
(b)



(a)



(d)



(c)

شکل ۱. غلظت کل قندهای مونومری طی تخمیر قارچ‌های آزمایش شده در محیط کشت‌های حاوی (a) صفر گرم بر لیتر اسید استیک (نمونه شاهد)، (b) سه گرم بر لیتر اسید استیک، (c) پنج گرم بر لیتر اسید استیک و (d) هفت گرم بر لیتر اسید استیک.

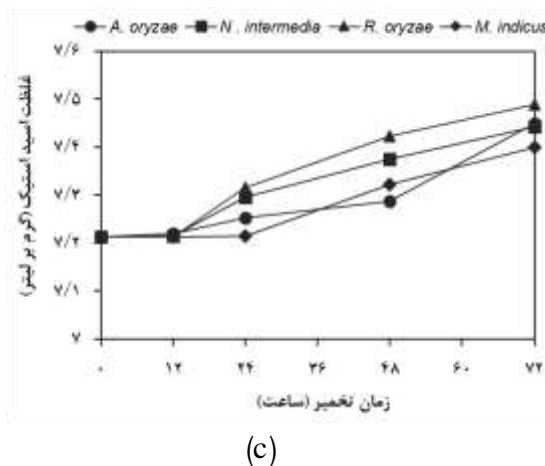
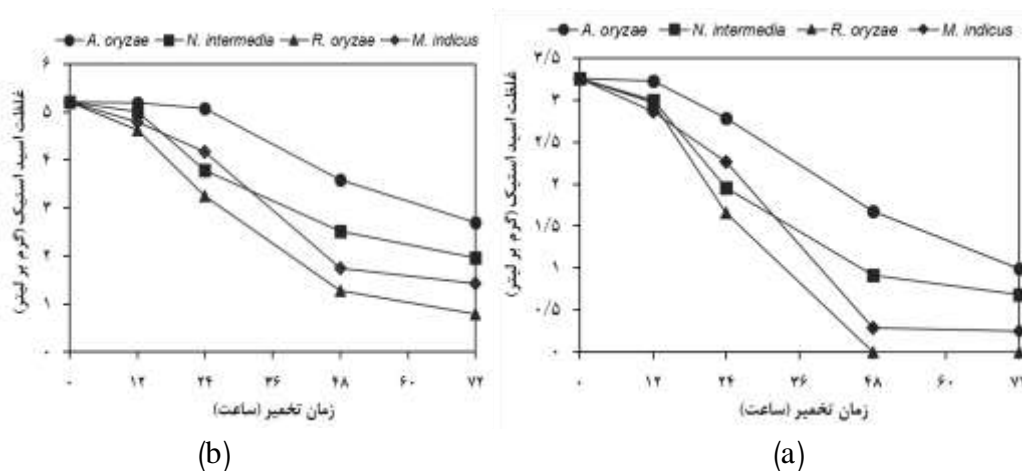
می‌تواند تبخیر محیط کشت مایع و کاهش اندک غلظت آن طی تخمیر باشد.

جدول ۳، تجزیه واریانس مصرف کل قندهای مونومری و اسید استیک توسط قارچ‌های فیلامنتوس تحت شرایط مختلف تخمیر بعد از ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. براساس این جدول، اثر مستقل اسید استیک بر مصرف کل قندهای مونومری و مصرف کل اسید استیک معنی‌دار شد ($P \leq 0.01$). اثر مستقل قارچ و اثر متقابل قارچ و اسید استیک بر مصرف کل اسید استیک معنی‌دار ($P \leq 0.01$) و اما بر مصرف کل قندهای مونومری معنی‌دار نشدند ($P > 0.05$).

غلظت اتانول حاصل از تخمیر قارچ‌های فیلامنتوس در محیط کشت‌های حاوی صفر، سه و پنج گرم بر لیتر اسید استیک در شکل ۳ نشان داده شده است.

غلظت اسید استیک طی تخمیر قارچ‌های فیلامنتوس در محیط کشت‌های حاوی سه، پنج و هفت گرم بر لیتر اسید استیک در شکل ۲ نشان داده شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، همه قارچ‌های فیلامنتوس آزمایش شده توانایی تحمل (بردباری) اسید استیک تا حد پنج گرم بر لیتر را داشتند و توانستند اسید استیک را طی تخمیر مصرف نمایند. قارچ‌های *A. oryzae* و *R. oryzae* به ترتیب با سرعت بیشتر و کمتری اسید استیک را مصرف کردند. در محیط کشت‌های حاوی هفت گرم بر لیتر اسید استیک، قارچ‌های فیلامنتوس رشد و فعالیتی نداشتند و مقدار اسید استیک دست نخورده باقی ماند. علت افزایش ناچیز غلظت اسید استیک در این حالت

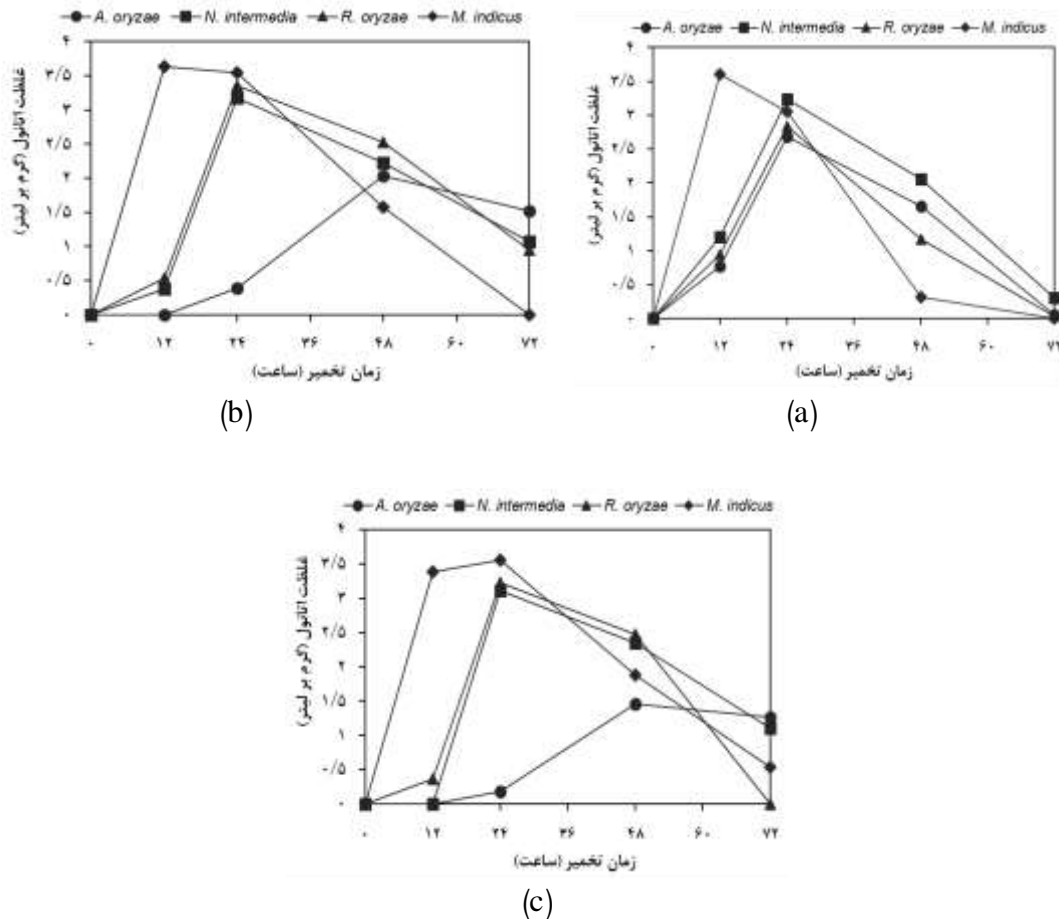


شکل ۲. غلظت اسید استیک طی تخمیر قارچ‌های آزمایش شده در محیط کشت‌های حاوی (a) سه گرم بر لیتر اسید استیک، (b) پنج گرم بر لیتر اسید استیک و (c) هفت گرم بر لیتر اسید استیک.

جدول ۳. تجزیه واریانس مصرف کل قندهای مونومری و اسید استیک توسط قارچ‌های فیلامنتوس تحت شرایط مختلف تخمیر بعد از ۷۲ ساعت

منبع تغییرات	متغیر وابسته	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F محاسبه شده
نوع قارچ	مصرف کل قندهای مونومری	۳	۰/۰۰۱	۰	۰/۰۷۰ ^{ns}
	مصرف کل اسید استیک	۳	۴/۶۷۴	۱/۵۵۸	۴۴۹/۴۹۵ ^{**}
غلظت اسید استیک	مصرف کل قندهای مونومری	۳	۹۰۳/۱۲۵	۳۰۱/۰۴۲	۱۲۱۳۳۴/۷۱۲ ^{**}
	مصرف کل اسید استیک	۲	۸۱/۴۹۸	۴۰/۷۴۹	۱۱۷۵۵/۵۷ ^{**}
نوع قارچ × غلظت اسید استیک	مصرف کل قندهای مونومری	۹	۰/۰۰۳	۰	۰/۱۴۱ ^{ns}
	مصرف کل اسید استیک	۶	۲/۹۷۱	۰/۴۹۵	۱۴۲/۸۳۲ ^{**}
خطا	مصرف کل قندهای مونومری	۳۲	۰/۰۷۹	۰/۰۰۲	
	مصرف کل اسید استیک	۲۴	۰/۰۸۳	۰/۰۰۳	
کل	مصرف کل قندهای مونومری	۴۷	۹۰۳/۲۰۸		
	مصرف کل اسید استیک	۳۵	۸۹/۲۲۶		

ns، **: اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و نبود اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد.



شکل ۳. غلظت اتانول حاصل از تخمیر قارچ‌های آزمایش شده در محیط کشت‌های حاوی (a) صفر گرم بر لیتر اسید استیک (نمونه شاهد)، (b) سه گرم بر لیتر اسید استیک و (c) پنج گرم بر لیتر اسید استیک.

یافت. سپس غلظت اتانول در جریان تخمیر کاهش پیدا کرد و بعد از ۷۲ ساعت تقریباً به صفر رسید. افزودن اسید استیک به محیط کشت منجر به کاهش

در محیط کشت بدون اسید استیک (نمونه شاهد)، قارچ *A. oryzae* طی ۲۴ ساعت نخست تخمیر به بیشترین غلظت اتانول (۲/۶۸ گرم بر لیتر) دست

سه گرم بر لیتر اسید استیک طی ۱۲ ساعت نخست تخمیر به‌ترتیب به ۳/۶۱ و ۳/۶۴ گرم بر لیتر رسید. نتایج تخمیر *M. indicus* نشان داد که افزودن اسید استیک به محیط کشت تا حد سه گرم بر لیتر، نه تنها تأثیر منفی بر تولید اتانول نداشت بلکه نرخ کاهش غلظت اتانول بعد از ۱۲ ساعت نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. اضافه کردن اسید استیک به محیط کشت *M. indicus* تا حد پنج گرم بر لیتر موجب افزایش فاز تأخیر تولید اتانول شد و غلظت اتانول حداکثر (۳/۵۶ گرم بر لیتر) طی ۲۴ ساعت نخست تخمیر به‌دست آمد. هیچ‌یک از قارچ‌های فیلامنتوس قادر به تولید اتانول در محیط کشت حاوی هفت گرم بر لیتر اسید استیک نبودند.

مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، اثر مستقل قارچ و اسید استیک و همچنین اثر متقابل قارچ و اسید استیک بر مقدار اتانول حداکثر معنی‌دار شد ($P \leq 0.01$).

بحث و نتیجه‌گیری

حضور ترکیبات بازدارنده در فرآورده‌های هیدرولیزی مواد لیگنوسلولزی، یکی از موانع اصلی پیش روی صنعت تولید اتانول سلولزی است به علت این که این ترکیبات عملکرد تخمیری میکروارگانیسم‌ها را به طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهند. تأثیر اسید استیک، به عنوان یکی از این ترکیبات بازدارنده، بر فرآیند تخمیر قارچ‌های فیلامنتوس *Mucor*، *Rhizopus oryzae* و *Neurospora intermedia indicus* و *Aspergillus oryzae* مورد بررسی قرار گرفتند.

غلظت اتانول حاصل از *A. oryzae* و افزایش فاز تأخیر شد. حداکثر غلظت اتانول طی تخمیر *A. oryzae* در محیط کشت‌های حاوی اسید استیک در ۴۸ ساعت اولیه تخمیر به دست آمد و بعد از آن کاهش پیدا کرد. به علاوه، افزایش غلظت اسید استیک از سه به پنج گرم بر لیتر سبب کاهش غلظت اتانول شد. نتایج تخمیر *N. intermedia* نشان داد که افزودن اسید استیک تأثیر واضح و قابل توجهی بر غلظت اتانول حداکثر نداشت درحالی‌که فاز تأخیر اندکی افزایش پیدا کرد. غلظت اتانول حداکثر طی تخمیر *N. intermedia* در محیط کشت‌های با و بدون اسید استیک در ۲۴ ساعت نخست تخمیر به دست آمد. در بررسی تخمیر *R. oryzae* در محیط کشت‌های حاوی صفر، سه و پنج گرم بر لیتر اسید استیک، غلظت اتانول حداکثر طی ۲۴ ساعت نخست تخمیر به‌ترتیب ۲/۸۴، ۳/۳۶ و ۳/۲۳ گرم بر لیتر به‌دست آمد. در تمام موارد، غلظت اتانول بعد از ۲۴ ساعت و در جریان تخمیر کاهش یافت. نتایج نشان داد که افزودن اسید استیک به محیط کشت، تأثیر مثبت بر غلظت اتانول حاصل از *R. oryzae* داشته و منجر به افزایش غلظت اتانول شد اما بین محیط کشت‌های حاوی سه و پنج گرم بر لیتر اسید استیک به لحاظ غلظت اتانول، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$). برخلاف قارچ‌های دیگر، سرعت و مقدار تولید اتانول در تخمیر *M. indicus* بیشتر بود، به‌طوری‌که غلظت اتانول حداکثر در محیط کشت بدون اسید استیک و همچنین محیط کشت حاوی

جدول ۴. تجزیه واریانس مقدار اتانول حداکثر تولید شده توسط قارچ‌های فیلامنتوس تحت شرایط مختلف تخمیر

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F محاسبه شده
نوع قارچ	۳	۸/۸۹۷	۲/۹۶۶	۵۸۷/۹۲۴**
غلظت اسید استیک	۳	۸۱/۵۷۲	۲۷/۱۹۱	۵۳۹۰/۰۹۶**
نوع قارچ × غلظت اسید استیک	۹	۵/۳۳۵	۰/۵۹۳	۱۱۷/۵۰۲**
خطا	۳۲	۰/۱۶۱	۰/۰۰۵	
کل	۴۷	۹۵/۹۶۵		

** اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.

کاهش pH داخل سلولی (pH_i) را جبران نماید که به موجب آن انرژی آزاد بیشتری به دور از رشد سلولی آزاد می‌گردد. در نهایت، سرعت تولید ATP و یا ظرفیت ATP محدود شده و منجر به توقف رشد و حتی مرگ سلول می‌شود (Bellissimi *et al.*, 2009). Taherzadeh *et al.* (1997) نیز دریافتند که غلظت شکل تفکیک (جدا) نشده اسید استیک در محیط کشت نیابستی از ۵ گرم بر لیتر بیشتر باشد تا عمل رشد مخمر *S. cerevisiae* اتفاق بیافتد.

کاهش سرعت مصرف قندها توسط قارچ‌های آزمایش شده در محیط کشت حاوی سه و پنج گرم بر لیتر اسید استیک، با نتایج تحقیق Casey *et al.* (2010) مطابقت دارد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، قارچ‌ها به علت اثر بازدارندگی اسید استیک در غلظت زیاد هفت گرم بر لیتر، قادر به مصرف قندها در این محیط نبودند. افزایش ناچیز غلظت قندهای مونومری طی فواصل زمانی تخمیر در محیط کشت حاوی هفت گرم بر لیتر اسید استیک می‌تواند به علت تبخیر شدن آب و کاهش اندک حجم محیط کشت مایع در طول دوره کشت یا تخمیر باشد. اسید استیک در غلظت‌های کم می‌تواند به عنوان یک منبع کربنی استفاده شود و در جریان تخمیر به وسیله میکروارگانیسم‌ها مصرف گردد و همچنین منجر به تغییر مقدار pH طی تخمیر می‌شود (Zheng-yun *et al.*, 2010). مطابق شکل ۲، در این تحقیق نیز همه قارچ‌های فیلامنتوس آزمایش شده توانستند تا حدی اسید استیک موجود در محیط کشت را مصرف نمایند اما سرعت مصرف اسید استیک به وسیله این قارچ‌ها متفاوت بود.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، افزودن اسید استیک در غلظت‌های کم (به ویژه سه گرم بر لیتر) تأثیر مثبتی بر تولید اتانول حاصل از قارچ‌های *R. oryzae* و *M. indicus* داشت، بدین صورت که به ترتیب موجب افزایش غلظت اتانول و کوتاه شدن فاز تأخیر گردید. Wikandari *et al.*

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، سرعت رشد این قارچ‌ها با افزودن اسید استیک به محیط کشت کاهش می‌یابد و موجب طولانی‌تر شدن فاز تأخیر^۱ (دوره خواب) می‌گردد. به طوری که مقدار بیومس قارچی به دست آمده بعد از ۴۸ ساعت تخمیر در محیط کشت‌های حاوی اسید استیک کمتر از مقدار بیومس تولید شده در محیط کشت‌های بدون اسید استیک بود. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که کاهش pH داخل سلولی (pH_i) در اثر افزودن اسید استیک به محیط کشت، از طریق فعالیت ATP آزادی می‌گردد و با آزادسازی پروتون‌ها از میان غشای سلول موجب حفظ pH داخل سلولی در حد خنثی می‌گردد اما این فعالیت منجر به افزایش مصرف ATP و اضافه شدن استات به محیط کشت می‌گردد که کاهش بیومس قارچی تولید شده را به همراه دارد (Wang *et al.*, 2013; Greetham, 2014). در تحقیق انجام شده توسط Limtong *et al.* (2000) مشخص شد که رشد برخی مخمرهای تخمیرکننده زایلوز از قبیل *Candida shehatae*، *Pichia fusant* و *stipitis* CBS5773 و *stipitis* F101 در محیط کشت زایلوز حاوی ۰/۵ درصد اسید استیک (حجمی/حجمی) به طور کامل مهار شده بود. در حالی که در محیط کشت گلوکز حاوی ۰/۵ درصد اسید استیک (حجمی/حجمی) در مقایسه با محیط کشت بدون افزودن اسید استیک، نژادهای مختلف *S. cerevisiae* مانند M30، Sc90، N1، G/3، G/5، G/2، TJ3 و SH1089 با نرخ رشد ویژه و حداکثر غلظت سلول کمتر رشد کردند.

با توجه به نتایج تخمیر، قارچ‌ها قادر به رشد و فعالیت در محیط کشت حاوی هفت گرم بر لیتر اسید استیک نبودند زیرا با افزایش مقدار اسید استیک، ATP بیشتری بایستی هیدرولیز شود تا اثر منفی

1. Lag phase

بر لیتر به محیط کشت، قارچ‌های فیلامنتوس آزمایش شده قادر به رشد و فعالیت متابولیکی از قبیل مصرف قندهای مونومری، مصرف اسید استیک و تولید اتانول بودند اما هیچ گونه رشد و فعالیت قارچی در محیط کشت‌های حاوی هفت گرم بر لیتر اسید استیک مشاهده نشد. از طرف دیگر، سرعت مصرف قندهای مونومری، اسید استیک و تولید اتانول متأثر از غلظت اسید استیک اضافه شده و نوع قارچ مصرفی بود.

سپاسگزاری

از مساعدت‌های مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه Borås سوئد و همچنین از خدمات و همکاری بسیار خوب آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه Borås سوئد، تشکر و قدردانی می‌گردد.

(2010)، تأیید کردند که برخلاف اثرات بازدارندگی فورفورال و هیدروکسی متیل فورفورال، افزایش غلظت اسید استیک تا یک مقدار مشخص سبب افزایش بازده و بهره‌وری اتانول می‌گردد. به علاوه، Taherzadeh *et al.* (1997) دریافتند که در غلظت ۳/۳ گرم بر لیتر اسید استیک تفکیک (جدا) نشده، بازده اتانول حاصل از مخمر *S. cerevisiae* در مقایسه با حالت بدون اسید استیک اضافه شده، ۲۰ درصد بیشتر بود. براساس تحقیق انجام شده توسط Casey *et al.* (2010)، سرعت تولید اتانول مخمر *S. cerevisiae* در زمان حضور اسید استیک کاهش یافت اما بازده متابولیک اتانول تحت شرایط یکسان افزایش پیدا کرد. به‌طور کلی، با افزودن اسید استیک تا حد پنج گرم

REFERENCES

- Bellissimi, E.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T.; van Maris, A.J.A.; (2009). Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase based *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Research*; 9(3): 358-364.
- Casey, E.; Sedlak, M.; Ho, N.W.Y.; Mosier, N.S.; (2010). Effect of acetic acid and pH on the co-fermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*; 10(4): 385-393.
- El-Enshasy, H.A.; (2007). Filamentous fungal cultures-process characteristics, products, and applications, In: Yang, S.; (Editor), *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Elsevier, ISBN: 978-0-444-52114-9, p. 225.
- Ferreira, J.A.; Lennartsson, P.R.; Niklasson, C.; Lundin, M.; Edebo, L.; Taherzadeh, M.J.; (2012). Spent sulphite liquor for cultivation of an edible *Rhizopus* SP. *BioResources*; 7(1): 173-188.
- Greetham, D.; (2014). Presence of low concentrations of acetic acid improves fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*; 5: 192.
- Harner, N.K.; Bajwa, P.K.; Habash, M.B.; Trevors, J.T.; Austin, G.D.; Lee, H.; (2014). Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* tolerant to hardwood spent sulfite liquor and acetic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 105(1): 29-43.
- Johansson, E.; Brandberg, T.; Larsson, C.; (2011). Influence of cultivation procedure for *Saccharomyces cerevisiae* used as pitching agent in industrial spent sulphite liquor fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 38(11): 1787-1792.
- Limtong, S.; Sumpradit, T.; Kitpreechavanich, V.; Tuntirungkij, M.; Seki, T.; Yoshida, T.; (2000). Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces*

- cerevisiae*. Kasetsart Journal, Natural Sciences; 34(1): 64-73.
- Liu, Z.; Liu, L.; Wen, P.; Li, N.; Zong, M.; Wu, H.; (2015). Effects of acetic acid and pH on the growth and lipid accumulation of the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. BioResources; 10(3): 4152-4166.
- Millati, R.; Edebo, L.; Taherzadeh, M.J.; (2005). Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. Enzyme and Microbial Technology; 36(2-3): 294-300.
- Nilsson, R.L.K.; Holmgren, M.; Madavi, B.; Nilsson, R.T.; Sellstedt, A.; (2016). Adaptability of *Trametes versicolor* to the lignocellulosic inhibitors furfural, HMF, phenol and levulinic acid during ethanol fermentation. Biomass and Bioenergy 90: 95-100.
- Oliva, J.M.; Negro, M.J.; Sáez, F.; Ballesteros, I.; Manzanares, P.; González, A.; Ballesteros, M.; (2006). Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry; 41(5): 1223-1228.
- Sarkar, N.; Ghosh, S.K.; Bannerjee, S.; Aikat, K.; (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. Journal of Renewable Energy; 37(1): 19-27.
- Silva, S.A.; Oliveira Junior, A.M.; de Farias Silva, C.E.; Abud, S.A.K.; (2016). Inhibitors influence on ethanol fermentation by *pichia stipitis*. Chemical Engineering Transactions; DOI: 10.3303/CET1649062; 49: 367-372.
- Taherzadeh, M.J.; Niklasson, C.; Liden, G.; (1997). Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? Chemical Engineering Science; 52(15): 2653-2659.
- Wang, J.; Huang, F.; Zhao, X.; Zhao, J.; Wang, Y.; Zhou, S.; (2013). Effect of acetic acid on ethanol fermentation by engineered *Escherichia coli* SZ470. Advanced Materials Research; DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.724-725.369; 724-725: 369-372.
- Wikandari, R.; Millati, R.; Syamsiyah, S.; Muriana, R.; Ayuningsih, Y.; (2010). Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on Indigeneous microbial isolate for bioethanol production. Agricultural Journal; 5(2): 105-109.
- Zheng-yun, W.; Yu, D.; Li, T.; Yue-hong, L.; Yi-jie, Z.; Wen-xue, Zh.; (2010). Investigating the effects of two lignocelluloses degradation by-products (furfural and acetic acid) on ethanol fermentations by six ethanologenic yeast strains. African Journal of Biotechnology; 9(50): 8661-8666.