

تولید اتانول زیستی از ضایعات نان با هیدرولیز آنزیمی و تخمیر با مخمر

ساکارومایسس سرویزیه

سمانه ترابی^۱، سیدرضا حسن بیگی^{۲*}، بهزاد ستاری^۳ و برات قبادیان^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲ و ۳- به ترتیب: استاد گروه مهندسی فنی کشاورزی؛ و استادیار گروه مهندسی فناوری صنایع غذایی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- استاد گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳

چکیده

ضایعات نان از ضایعات مواد غذایی رایج در جهان است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر متغیرهای زمان قندسازی و نسبت ضایعات نان به آب (غلظت سوبسترا) بر میزان گلوکز ضایعات نان و تولید اتانول زیستی از گلوکز حاصل از هیدرولیز شدن آن است. ضایعات نان ابتدا به قطعات کوچک تقسیم و پس از آن با نسبت ۱۵-۱۰ (w/v%) با آب مخلوط شدند. از آنزیم‌های آلفا آمیلاز برای مایع‌سازی و گلوکوامیلاز برای قندسازی استفاده شد. برای بررسی اثر متغیرهای زمان قندسازی و غلظت سوبسترا بر مقدار گلوکز، از روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی) با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت استفاده گردید. قند حاصل از هیدرولیز به روش کیت گلوکز اندازه‌گیری شد. میزان آفلاتوکسین ضایعات نان (به عنوان شاهد) و نمونه بهینه حاصل از فرآیند هیدرولیز (نمونه با بیشترین میزان گلوکز) اندازه‌گیری شد. از مخمر ساکارومایسس سرویزیه برای فرآیند تخمیر استفاده شد. نتایج تحقیق نشان داد که بیشترین غلظت گلوکز در هیدرولیز، مربوط به غلظت سوبسترای ۱۵۰ گرم بر لیتر و زمان قندسازی ۴۸ ساعت به میزان ۱۰۰/۲۱ گرم بر لیتر است. هیدرولیز در غلظت‌های بیشتر و زمان‌های طولانی‌تر، به علت ایجاد ویسکوزیته و چسبندگی بالا، میزان غلظت گلوکز را کاهش می‌دهد در نتیجه اثر مطلوبی روی هیدرولیز ندارد. معلوم شد فرآیند هیدرولیز شدن آفلاتوکسین B₁ و B₂ را به ترتیب به میزان ۷/۸۸ درصد در زمان ۳۶ ساعت به دست بیشترین مقدار اتانول زیستی در فاز تخمیر، ۴۵/۳۵ گرم بر لیتر با بازده ۸۸/۷ درصد در زمان ۳۶ ساعت به دست آمد که می‌تواند به دلیل مصرف گلوکز تولید شده در مرحله هیدرولیز شدن به واسطه رشد مناسب توده سلولی در تخمیر در این مدت زمان باشد؛ زمان مناسب برای فرآیند تخمیر ۳۶ ساعت است.

واژه‌های کلیدی

آفلاتوکسین، زیست توده، گلوکز

مقدمه

است از "اجزای قابل تجزیه شدن زیستی از محصولات، پسماندها و مواد زائد کشاورزی (شامل مواد گیاهی و دامی)، جنگل‌ها و صنایع وابسته، و مواد زائد صنعتی و شهری قابل تجزیه " (Duku *et al.*, 2011) از مواد زیست توده نشاسته‌ای و

زیست توده، قابلیت بسیار مناسبی برای تولید فرآورده‌های زیستی در جهان دارد. تعریف‌های متعدد و گوناگونی برای زیست توده در منابع وجود دارد. تعریف اتحادیه اروپا از زیست توده عبارت

نوع و ترکیباتی بسیار سمی هستند که در انواع مختلفی از مواد غذایی ایجاد می‌شوند. رایج‌ترین آفاتوکسین‌ها B₁، B₂، G₁ و G₂ هستند که معمولاً در مواد غذایی، غلات و فرآورده‌های آن از جمله نان وجود دارند (Ismail *et al.*, 2017; Udomkun *et al.*, 2017).

کاوا ریگالسکا و همکاران (Kawa-Rygielska *et al.*, 2012) در مطالعه‌ای نشان دادند که ضایعات نان بازده بالایی برای تولید اتانول زیستی دارد. بازده اتانول زیستی از ضایعات نان بر اساس شرایط فرآیند می‌تواند از ۰/۳۵ تا ۰/۳۷ کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک سوبسترا باشد. اکانسکی و همکاران (Acanski *et al.*, 2014) در تحقیقی در مورد تولید اتانول زیستی از ضایعات نان گندم معمولی و نان گندم سیاه یا دیلار (باکویت)، گزارش کردند که نان دارای ۱۰۰ درصد آرد گندم و بدون آرد گندم سیاه (باکویت) به علت داشتن pH نزدیک به pH مخمر، بیشترین تولید اتانول زیستی را دارد و حدود ۰/۴۰ گرم اتانول زیستی به ازای هر گرم آرد تولید می‌کند. کمترین مقدار تولید (۰/۳۰ گرم اتانول زیستی به ازای هر گرم آرد مربوط به نسبتی است که آرد گندم سیاه (باکویت) ۱۰۰ درصد (یعنی بدون آرد گندم معمولی) باشد. پیترزاک و کاوا-ریگالسکا (Pietrzak & Kawa-Rygielska., 2014) در بررسی تولید اتانول زیستی از ضایعات نان گندم-چاودار اعلام داشتند با پیش‌فرآوری کردن، به خصوص پیش‌فرآوری‌هایی مانند پیش‌هیدرولیز و استفاده از پرتوهای مایکروویو، عملکرد تولید اتانول زیستی افزایش می‌یابد. این محققان بازده تولید اتانول زیستی بدون پیش‌فرآوری را ۸۰ درصد گزارش کردند. هان و همکاران (Han *et al.*, 2017) در مطالعه‌ای تولید اتانول زیستی از ضایعات نان را در

سلولزی، با فرآیندهای هیدرولیز و تخمیر می‌توان اتانول زیستی تولید کرد. فرآیند تبدیل زیست توده نشاسته‌ای و سلولزی به اتانول زیستی شامل مراحل پیش‌فرآوری، هیدرولیز و تخمیر است. پس از آنکه قند از واکنش هیدرولیز به دست آمد، در فرآیند تخمیر می‌توان الکل تولید کرد. این قسمت از فرآیند به صورت بی‌هوازی پیش می‌رود و کنترل عواملی مانند دما و pH در این فرایند اهمیت بسیار بالایی دارد (Limayem & Ricke, 2012).

اتانول زیستی قابلیت استفاده در موتورهای درون‌سوز به عنوان سوخت زیستی تجدیدپذیر را دارد. به علاوه، اتانول زیستی کاربردهای فراوانی در صنعت، صنایع شیمیایی مانند رنگ‌سازی، لاستیک‌سازی، صنایع دارویی و به عنوان ضد عفونی کننده دارد (Abedi, 2012). ضایعات مواد غذایی منبعی ارزان و مناسب برای تولید اتانول زیستی و ضایعات نان هم از رایج‌ترین ضایعات مواد غذایی در جهان هستند. بخش اعظم این ضایعات عملاً در مرحله مصرف ایجاد می‌شود (Svanes *et al.*, 2019). بررسی‌ها نشان می‌دهد که سالانه حدود ۹/۳ میلیون تن نان در ایران مصرف می‌شود و به‌رغم اقدامات صورت گرفته در زمینه افزایش کیفیت نان تولیدی، در شرایط فعلی از این مقدار نان حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد به دورریز و ضایعات تبدیل می‌شود (Izad-Panah *et al.*, 2018). هدر رفت سرمایه‌های ملی از ضایعات نان رقمی در حدود ۶۰۰ میلیون دلار در سال برآورد می‌شود (Shahnoushi *et al.*, 2011).

ضایعات نان قابلیت محدودی برای پردازش مجدد در صنایع غذایی دارند. از ضایعات نان زمانی می‌توان به عنوان خوراک دام استفاده کرد که در آنها هیچ فساد میکروبی (کپک نان) رخ نداده باشد (Sugiura *et al.*, 2009). آفاتوکسین‌ها بیش از ۲۰

کار گرفت که باعث کاهش آلودگی هوا نیز خواهد شد.

این تحقیق با هدف تبدیل ضایعات نان به اتانول زیستی از طریق هیدرولیز آنزیمی و فرآیند تخمیر با مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) اجرا می‌شود. به منظور دستیابی به بهترین شرایط تولید اتانول زیستی در این تحقیق، اثر زمان قندسازی و بارگذاری‌های (غلظت سوبسترا) مختلف بر هیدرولیز آنزیمی بررسی و نمونه هیدرولیز شده با شرایط بهینه تخمیر خواهد شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد اولیه

ضایعات نان لواش (تهیه شده از نانوائی محلی در شهرستان پاکدشت) با آسیاب کوچک مدل فلر^۲ EG151 با توان ۱۶۰ وات خرد شد. اندازه ذرات آن با عبور از الک با اندازه سوراخ‌های ۲ میلی‌متر (معادل مش ۱۰) در محدوده کمتر از ۲ میلی‌متر غربال گردید. برای تعیین مقدار رطوبت ضایعات نان، سه نمونه ۵۰ گرمی آن درون آون در دمای 3 ± 105 درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت خشک شد (Acanski *et al.*, 2014). با استفاده از رابطه ۱، مقدار رطوبت (بر پایه تر) ضایعات نان تعیین شد:

$$(1) \quad \text{درصد رطوبت} = \frac{M1-M2}{M2} \times 100$$

که در آن،

$M1$ = جرم اولیه ضایعات نان (گرم)؛ و $M2$ = جرم ثانویه ضایعات نان (گرم).

هیدرولیز آنزیمی

برای هیدرولیز آنزیمی، ضایعات نان خرد شده پس از وزن و مخلوط شدن با آب با نسبت ۱۵-۱۰ (w/v%)، تا دمای جوش به مدت یک ساعت حرارت

یک راکتور با میزان بارگذاری ۳۲ g/(L.d)، به مقدار ۵۴/۷mmol/g اتانول زیستی گزارش کردند.

هاشم و همکاران (Hashem *et al.*, 2018) طی تحقیقی در مورد امکان تولید اتانول زیستی از ضایعات زیستی نشاسته‌ای رستوران‌ها به کمک سویه‌های مخمر، مقدار ۱۱/۵ گرم بر لیتر اتانول زیستی از ۲۷ گرم بر لیتر گلوکز را گزارش کردند. کیم و همکاران (Kim *et al.*, 2018) در مطالعه تجزیه ضایعات مواد غذایی برای تولید اتانول زیستی و اسید لاکتیک توسط مخمر اعلام کردند که با بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز می‌توان ۱۱ گرم بر لیتر اتانول زیستی از ۲۴ گرم بر لیتر قند به دست آورد. مورایس و همکاران (Moraise *et al.*, 2019) با بررسی تولید اتانول زیستی از نشاسته سیب‌گرگ^۱ (میوه بومی برزیل) بازده اتانول زیستی را ۹۲ درصد گزارش و اعلام کردند افزایش سوسپانسیون نشاسته بازده تولید گلوکز را می‌کاهد.

از حدود ۹/۳ میلیون تن نان که هر سال در ایران مصرف می‌شود، چنانچه به‌طور میانگین ۲۰ درصد آن به ضایعات تبدیل شود، سالانه ۱/۸۶ میلیون تن ضایعات نان در کشور وجود دارد که به علت نگهداری نادرست به آفلاتوکسین آلوده است. در حال حاضر به علت نبود بازار ضایعات نان در کشور، به غیر از خوراک دام، متاسفانه این ضایعات آلوده در تغذیه دام استفاده می‌شود که به تولید فرآورده‌های لبنی ناسالم در کشور می‌انجامد. تولید اتانول زیستی از ضایعات نان، بازاری برای ضایعات نان موجود در کشور ایجاد خواهد کرد. با تبدیل ضایعات نان می‌توان بخشی از نیاز کشور را به اتانول، سالانه در حدود ۹۵۰ میلیون لیتر اتانول زیستی، تأمین کرد. الکل حاصل را می‌توان در موارد مختلفی از جمله به عنوان مکمل افزایش‌دهنده عدد اکتان بنزین به

و پنج صدم (۰/۴۵) میلی گرم آنزیم گلوکوآمیلاز به ازای هر گرم نان به محلول واکنش اضافه شد. واکنش به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و هم‌زدن با سرعت ۶۰۰ rpm ادامه یافت. نمونه‌ای از هیدرولیز آنزیمی در شکل ۱ نشان داده شده است. محصول این واکنش محلولی حاوی قندهای مونومر (به طور عمده گلوکز) است.

با استفاده از نتایج آزمایش‌ها در خصوص واکنش آنزیمی، زمان قندسازی و نسبت ماده اولیه به دست آمد. دامنه و مقادیر هر یک از پارامترها به نرم‌افزار دیزاین اکسپرت^۱ داده شد و نرم‌افزار آنها را به روش سطح پاسخ^۲ و طرح مرکب مرکزی^۳ کدبندی کرد (جدول ۱). آزمایش‌ها با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت تحلیل شد و شرایط با بیشترین بازده به دست آمد.

داده شد، با سرعت ۵۰۰ rpm هم زده شد تا ژلاتینه شود و محلول آماده هیدرولیز شدن به دست آید. فرآیند هیدرولیز در دو مرحله مایع‌سازی و قندسازی به ترتیب با آنزیم آلفاآمیلاز (۳۰۰ AGU/g) و گلوکوآمیلاز (۳۴۰ AGU/g) دنبال شد. در مرحله مایع‌سازی، با توجه به شرایط فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز، pH محلول روی ۵/۸ تنظیم شد (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2014). نیم (۰/۵) میلی گرم آنزیم آلفاآمیلاز به ازای هر گرم نان به محلول واکنش اضافه شد. واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و سرعت ۶۰۰ rpm هم‌زنی شد، آنزیم آلفاآمیلاز با جوشاندن محلول به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد. در مرحله قندسازی، برای فراهم کردن شرایط فعالیت آنزیم گلوکوآمیلاز، pH محلول روی ۴/۳ تنظیم شد. چهل

جدول ۱- متغیرها و محدوده آنها در آزمایش هیدرولیز آنزیمی

Table 1- Variables and their range in enzymatic hydrolysis test

Range محدود		Variable متغیر
-1	1	
10	48	Sacchrification time (hour) زمان قندسازی (ساعت)
10	15	Bread to water ratio (w / v%) نسبت نان به آب (w/v%)



شکل ۱- نمونه هیدرولیز آنزیمی

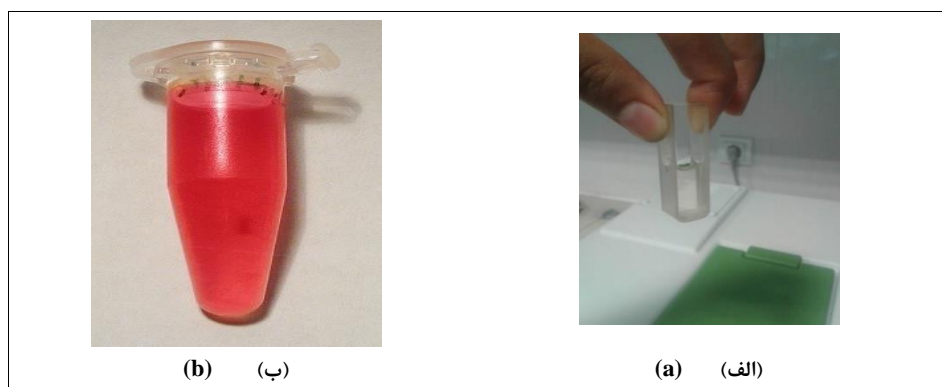
Fig. 1- Enzymatic hydrolysis sample

1- Design expert

2- Response Surface Methodology (RSM)

3- Central Composite Design (CCD)

از هر نمونه، ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف (شکل ۲-الف) 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 اندازه‌گیری شد (Anon, 2017). در شکل ۲-ب، نمونه حاوی گلوکز نشان داده شده که پس از اضافه‌سازی معرف به رنگ صورتی درآمده است.



شکل ۲-الف) کووت حاوی معرف کیت گلوکز و ب) نمونه حاوی گلوکز که پس از اضافه‌سازی کیت به رنگ صورتی درآمده است
Fig. 2- a) Cuvette containing glucose kit reagent, b) A sample containing glucose that turns pink after adding the kit

مجهز به آشکارساز (Waters, Fluorescence 2475) استفاده گردید. ابعاد ستون نصب شده کروماتوگرافی برابر $4/6 \times 100 \times 100$ میلی‌متر بود. دمای ستون روی ۵۰ درجه سلسیوس و دبی جریان در ۲-۳ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. برای فاز جاری متانول، آب و استونیتریل (C_2H_5N , H_2O , CH_3OH) به کار برده شدند. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار دنبال و میانگین‌های میزان آفلاتوکسین‌های موجود در نمونه هیدرولیز شده و نمونه بدون هیدرولیز شدن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

تخمیر

مرحله نهایی در تولید اتانول زیستی، استفاده از مخمر و تخمیر نمونه‌های حاصل از هیدرولیز شدن است. به این منظور از مخمر ساکارومایسیس سرویزیه برای فرآیند تخمیر استفاده شد. تخمیر در

اندازه‌گیری قند به روش کیت گلوکز

گلوکز تحت تاثیر آنزیم گلوکز اکسیداز آب اکسیژنه آزاد 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 است که در طول موج ۴۹۰-۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. روش اندازه‌گیری در این تحقیق بدین صورت بود که به ۱۰ میکرولیتر

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین

میزان آفلاتوکسین ضایعات نان (به عنوان شاهد) و نمونه بهینه حاصل از فرآیند هیدرولیز آنزیمی اندازه‌گیری شد. یک نمونه که در آن میزان گلوکز تولید شده با هیدرولیز آنزیمی بیشتر از سایر نمونه‌ها بود به عنوان نمونه با شرایط بهینه انتخاب شد. برای آماده‌سازی نمونه شاهد، ۱۶۰ گرم ضایعات نان کپک زده به یک لیتر آب مقطر استریل شده در اتوکلاو اضافه شد. دو نمونه برای اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین به آزمایشگاه سنجش میکوتوکسین انتقال داده شد. برای این آزمون از استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ استفاده شده است (Anon, 2011).

برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters e2695)

۶۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار اتانول زیستی تولیدی با استفاده از معادله استاندارد تهیه شده محاسبه گردید. محلول‌های استاندارد اتانول زیستی با استفاده از محلول اتانول زیستی-آب در محدوده صفر تا ۲۰ درصد اتانول زیستی (v/v) تهیه شد. برای تهیه محلول دی کرومات پتاسیم، ابتدا ۳۲۵ میلی لیتر H_2SO_4 غلیظ به ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. پس از آن ۳۳/۷۷ گرم $K_2Cr_2O_7$ به محلول اضافه و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از سردسازی به حجم ۱ لیتر رسانده شد (Caputi et al., 1968).

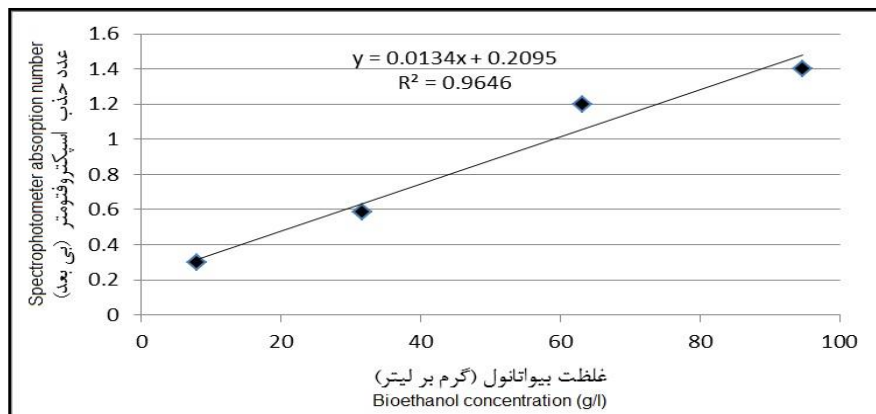
آماده‌سازی منحنی استاندارد

منحنی استاندارد با اضافه‌سازی ۱ میلی لیتر از هر غلظت محلول استاندارد (صفر تا ۲۰ درصد (v/v)) در یک فلاسک حجمی ۱۰۰ میلی لیتر حاوی ۲۵ میلی لیتر محلول دی کرومات پتاسیم، تهیه شد. نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در حمام آب ۲۰ دقیقه حرارت داده شدند و حجم آنها با افزودن آب مقطر به ۵۰ میلی متر رسانده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت و منحنی استاندارد مطابق شکل ۳ رسم شد.

محیط کشت متعارف^۱ YEPD صورت گرفت تا روند آن بررسی شود. برای تخمیر نمونه‌های حاصل از هیدرولیز، مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از هر یک از محلول‌های هیدرولیز شده داخل ارلن با حجم ۲۵۰ میلی لیتر ریخته شد. مقدار ۰/۲ درصد پیتون و ۰/۱ درصد عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن و فسفر مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها به محیط‌ها اضافه گردید. بعد از استریل کردن محیط‌ها با اتوکلاو، pH محیط‌های کشت در ۵/۶ تنظیم گردید. مخمر به محیط هیدرولیز شده تلقیح شد. فلاسک‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۹۶ ساعت گرماگذاری شدند (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2014). در پایان مرحله تخمیر مقدار اتانول زیستی تولید شده به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV/VIS)، مدل لامبدا ۲۵۲ شرکت پرکین المرا^۲ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری الکل نمونه‌های حاصل از تخمیر

برای تعیین درصد اتانول زیستی تولیدی در نمونه‌ها، از روش دی کرومات پتاسیم استفاده شد. برای این کار، ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های حاصل از تخمیر با معرف اسیدی دی کرومات پتاسیم مخلوط شد (وجود الکل باعث ایجاد رنگ سبز می‌گردد). بعد از سردسازی در دمای محیط، جذب در طول موج



شکل ۳- منحنی استاندارد اتانول زیستی

Fig. 3- Bioethanol standard curve

1- Yeast Extract Peptone Dextrose

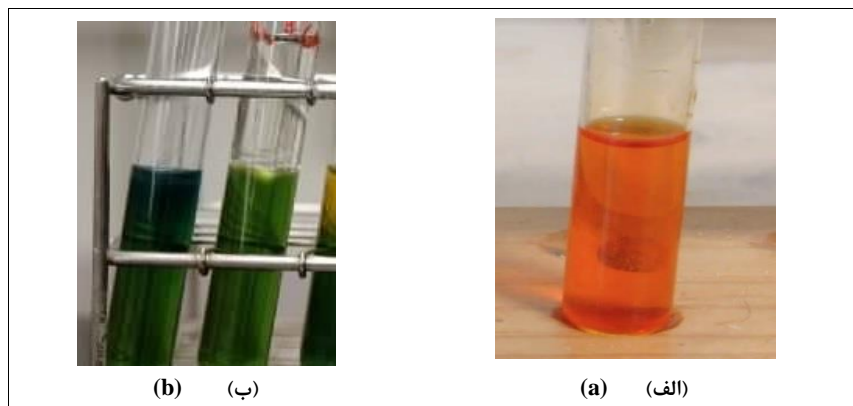
2- Lambda25

3- Perkin Elmer

برآورد الکل در نمونه‌ها

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 مخلوط کردن و خنک کردن محتویات فلاسک، جذب در ۶۰۰ نانومتر ثبت شد (شکل ۴-ب). مقدار اتانول زیستی در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد اتانول زیستی تعیین شد.

یک میلی‌لیتر از نمونه‌های تخمیر شده با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. ۲۰ میلی‌لیتر نمونه رقیق شده در مرحله قبل به یک فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محلول دی‌کرومات پتاسیم (شکل ۴-الف) اضافه گردید. محتویات فلاسک در



شکل ۴-الف) معرف دی‌کرومات پتاسیم و ب) نمونه‌های حاوی الکل اضافه شده به معرف دی‌کرومات پتاسیم که به رنگ سبز لجنی در آمده‌است

Fig. 4- a) Potassium dichromate reagent, b) Samples containing alcohol added to the potassium dichromate reagent, which have become sludge green

نتایج و بحث

مقدار رطوبت برای ضایعات نان، در این تحقیق ۹/۸ درصد (بر مبنای تر) به دست آمد. در ادامه، نتایج هیدرولیز آنزیمی، مقایسه میزان آفلاتوکسین نمونه هیدرولیز شده با نمونه شاهد و تغییرات بازده الکل در فرآیند تخمیر بررسی می‌شوند.

هیدرولیز آنزیمی

دامنه و مقادیر هر یک از پارامترهای زمان قندسازی و غلظت سوبسترا (نسبت ضایعات نان به آب) به روش سنترال کامپوزیت^۱ با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت به دو فاکتور و یک سطح کدبندی شدند. آزمایش‌های طراحی شده به همراه پاسخ‌های به

دست آمده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

نتایج تجزیه واریانس با روش سطح پاسخ اثر پارامترهای غلظت سوبسترا و زمان قندسازی بر میزان گلوکز تولید شده در جدول ۳ ارائه شده است. در این جدول پیداست که اثر ساده زمان قندسازی و غلظت سوبسترا و اثر متقابل غلظت سوبسترا در زمان قندسازی و زمان قندسازی در زمان قندسازی بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز آنزیمی ضایعات نان همگی در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار هستند.

اثر متقابل غلظت سوبسترا در غلظت سوبسترا بر میزان گلوکز تولید شده در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار است.

1- Central composite

جدول ۲- سطوح متغیرهای مستقل زمان قندسازی و نسبت نان به آب و متغیر وابسته غلظت گلوکز برای هیدرولیز آنزیمی
 Table 2- Levels of independent variables of saccharification time and substrate concentration and dependent variable of glucose concentration for enzymatic hydrolysis

Glucose concentration (g/l) غلظت گلوکز (گرم بر لیتر)	Sacchrifice time (hour) زمان قندسازی (ساعت)	Substrate concentration (%) غلظت سوبسترا (درصد)	Test number شماره آزمایش
52.87	29.00	8.96	1
92.80	29.00	16.04	2
80.00	29.00	12.50	3
82.50	29.00	12.50	4
34.00	10.00	10.00	5
80.30	29.00	12.50	6
16.25	2.13	12.50	7
85.00	55.87	12.50	8
75.00	29.00	12.50	9
83.75	29.00	12.50	10
45.00	10.00	15.00	11
58.00	48.00	10.00	12
100.21	48.00	15.00	13

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت سوبسترا و زمان قندسازی بر میزان گلوکز تولید شده
 Table 3- The analysis of variance results (mean squares) of the effect of substrate concentration and saccharification time on the amount of produced glucose

Mean Squares میانگین مربعات	Dof درجه آزادی	Source of variations منبع تغییرات
1503.70**	1	Substrate concentration (A) غلظت سوبسترا (A)
3891.26**	1	Saccharification time (B) زمان قندسازی (B)
243.52**	1	AB
131.29*		A ²
1660.40**	1	B ²
11.23	4	Error خطا

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌داری سطح احتمال ۵ درصد

** Stands for significant at 1% probability level, * Stands for significance at 5% probability level

رابطه ۲ میزان گلوکز حاصل از قندسازی، زمان در زمان، غلظت سوبسترا در زمان و هیدرولیز آنزیمی ضایعات نان بر حسب غلظت سوبسترا در غلظت سوبسترا را پیش‌بینی متغیرهای معنی‌دار غلظت سوبسترا، زمان می‌کند.

تولید اتانول زیستی از ضایعات نان با هیدرولیز آنزیمی ...

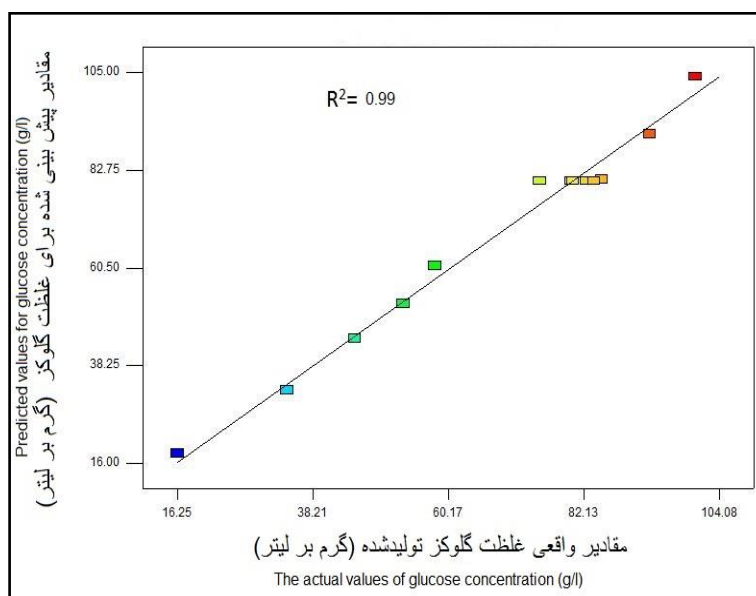
شکل ۵ مقایسه شده است. نقاط بالا یا پایین خط، اختلاف بین مقادیر اندازه‌گیری شده و پیش‌بینی شده را مشخص می‌کنند. هرچه پراکندگی نقاط در امتداد خط کمتر باشد، مقادیر پیش‌بینی شده با مدل به مقادیر اندازه‌گیری شده نزدیک‌ترند. از شکل ۵ مشاهده می‌شود که نقاط به طور تصادفی در امتداد خط ۴۵ درجه پراکنده شده‌اند که نشان دهنده دقت مطلوب مدل در پیش‌بینی مقدار گلوکز تولید شده است.

$$\begin{aligned} \text{Glucose (\%)} &= 80.31 + 13.71 A \\ &+ 22.05 B + 7.80 AB \\ &- 4.34 A^2 - 15.45 B^2 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Glucose (\%)} &= 80.31 + 13.71 A \\ &+ 22.05 B + 7.80 AB \\ &- 4.34 A^2 - 15.45 B^2 \end{aligned}$$

که در آن،

A = غلظت سوپسترا (W/V%) و B = زمان قندسازی (ساعت). مقادیر اندازه‌گیری غلظت گلوکز و مقادیر پیش‌بینی شده غلظت گلوکز با مدل ۲ در



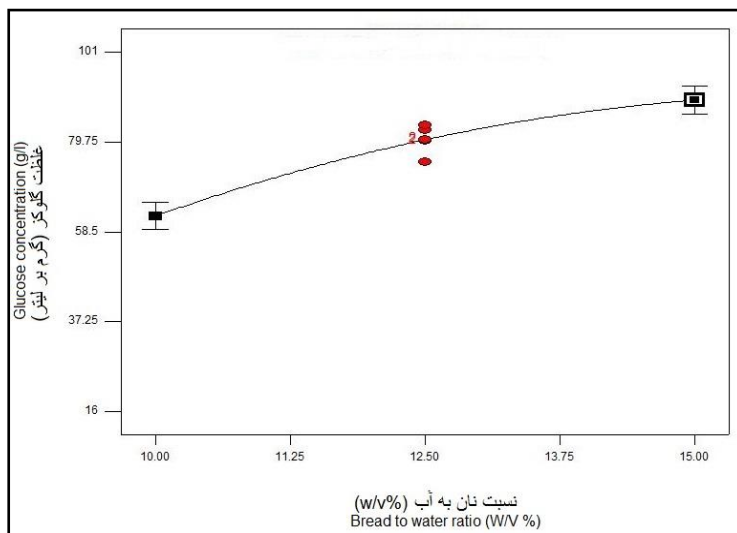
شکل ۵- مقایسه مقادیر پیش‌بینی شده با مدل با مقادیر واقعی (اندازه‌گیری شده) غلظت گلوکز تولید شده

Fig. 5- Comparison of the values predicted by the model with the actual values (measured) of the produced glucose concentration

یافته‌های ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi et al., 2008) مطابقت دارد. این محققان گزارش کرده‌اند که افزایش درصد جامدات بازده هیدرولیز را کاهش می‌دهد، در واقع افزایش شدید ویسکوزیته در اثر افزایش غلظت و اختلاط ناشی از آن باعث غیرفعال شدن آنزیم می‌شود و محصول مورد نظر در غلظت‌های زیاد، اثر بازدارندگی بر آنزیم دارد.

اثر غلظت سوپسترا (نسبت ضایعات نان به آب) بر میزان غلظت گلوکز

شکل ۶، اثر غلظت سوپسترا را بر غلظت گلوکز تولید شده در هیدرولیز آنزیمی نشان می‌دهد. با افزایش غلظت سوپسترا از ۱۰ تا ۱۵ (w/v%)، غلظت گلوکز از ۶۲/۲۵ تا ۸۹/۶۷ گرم بر لیتر افزایش می‌یابد و افزایش میزان سوپسترا بیشتر از این منجر به کاهش غلظت گلوکز می‌گردد. این روند با

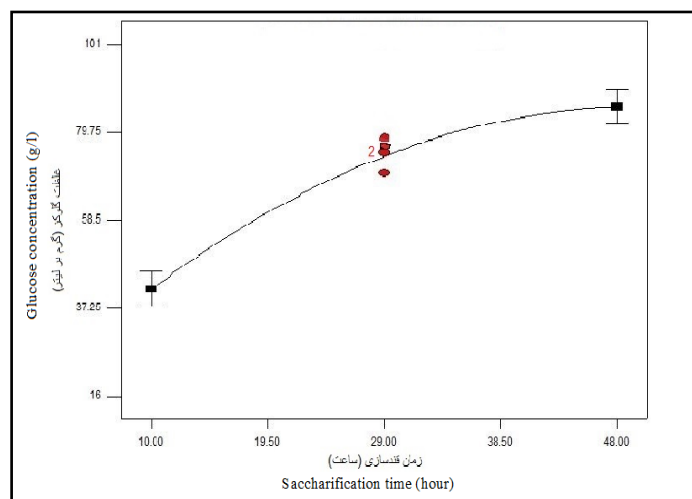


شکل ۶- اثر سوبسترا (نسبت نان به آب) بر غلظت گلوکز تولید شده

Fig. 6- The effect of substrate (bread to water ratio) on the produced glucose concentration

اثر زمان قندسازی بر غلظت گلوکز
در شکل ۷، اثر زمان قندسازی بر غلظت گلوکز تولید شده در هیدرولیز نشان داده شده است. در این شکل پیداست که افزایش زمان قندسازی از ۱۰ تا ۴۸ ساعت باعث افزایش غلظت گلوکز تولید شده از ۴۲/۸ تا ۸۶/۹۱ گرم بر لیتر شده است. پس از ۴۸ ساعت به دلیل اثر بازدارندگی محصول بر آنزیم و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم گلوکوآمیلاز بازده گلوکز با کاهش همراه خواهد بود.

اثر زمان قندسازی بر غلظت گلوکز
در شکل ۷، اثر زمان قندسازی بر غلظت گلوکز تولید شده در هیدرولیز نشان داده شده است. در این شکل پیداست که افزایش زمان قندسازی از ۱۰ تا ۴۸ ساعت باعث افزایش غلظت



شکل ۷- اثر زمان قندسازی بر غلظت گلوکز در هیدرولیز آنزیمی

Fig. 7- The effect of saccharification time on glucose concentration in enzymatic hydrolysis

اثر زمان قندسازی و غلظت سوبسترا بر غلظت گلوکز
اثر متقابل غلظت سوبسترا و زمان قندسازی بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز ضایعات نان در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌گونه که از این شکل پیداست برای زمان ۲۹ ساعت، افزایش غلظت سوبسترا باعث افزایش معنی‌داری در تولید گلوکز باعث شده است، به گونه‌ای که غلظت گلوکز تولیدی

اثر زمان قندسازی و غلظت سوبسترا بر غلظت گلوکز
اثر متقابل غلظت سوبسترا و زمان قندسازی بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز ضایعات نان در

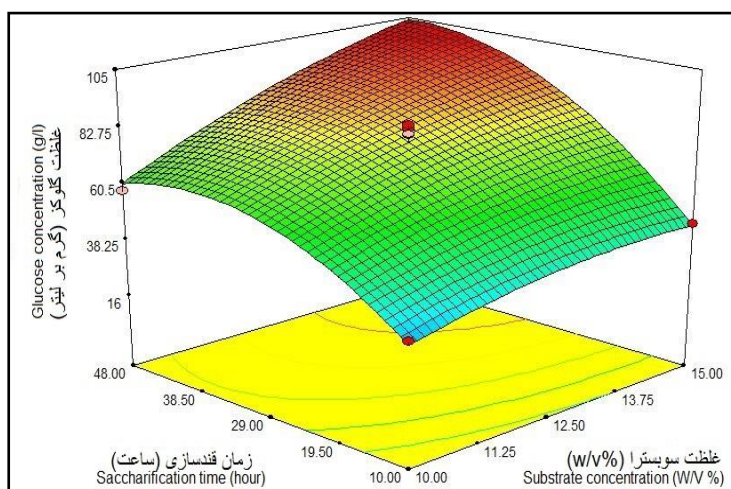
تولید اتانول زیستی از ضایعات نان با هیدرولیز آنزیمی ...

روی هیدرولیز ندارد. طبق بررسی‌های هودکوا و همکاران (Hudečková *et al.*, 2017) بیشترین تولید گلوکز در هیدرولیز آنزیمی ضایعات نان در شرایط مایع‌سازی در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و pH=۶، قندسازی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و pH=۴/۲، و بارگذاری ۱۵ (w/v%) به میزان ۷۰/۲۸ گرم بر لیتر گلوکز به دست آمده است.

بررسی‌های پیترزاک و کاوا-ریگالسکا (Pietrzak & Kawa-Rygielska., 2015) در مورد تولید اتانول زیستی از ضایعات نان گندم-چاودار نشان می‌دهد هنگامی که مایع‌سازی آنزیمی در دمای نهایی ژلاتین شدن (۵۹ درجه سلسیوس) صورت گیرد مؤثرتر است.

از ۵۲/۸۷ به ۹۲/۸ گرم بر لیتر افزایش پیدا کرده است. افزایش غلظت سوبسترا از ۱۰ تا ۱۵ (w/v%) در زمان ۴۸ ساعت باعث افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز تولیدی از ۵۸ به ۱۰۰/۲۱ گرم بر لیتر شده است.

بیشترین غلظت گلوکز تولید شده مربوط به غلظت سوبسترای ۱۵ (w/v%) با مقدار ۱۰۰/۲۱ گرم بر لیتر و نزدیک به مقدار پیش‌بینی شده با نرم‌افزار (۱۰۳/۵۱ گرم بر لیتر) است. هیدرولیز شدن در غلظت‌های بالاتر، به علت ایجاد ویسکوزیته و چسبندگی بالا با کاهش بازده همراه است. در واقع ایجاد ویسکوزیته و چسبندگی در اثر غلظت بالا از تجزیه شدن گلوکز جلوگیری می‌کند و اثر مطلوبی



شکل ۸- تاثیر زمان قندسازی و غلظت سوبسترا (w/v%) بر تولید گلوکز در فرایند هیدرولیز آنزیمی

Fig. 8 - The effect of saccharification time and substrate concentration (w / v%) on glucose production in the enzymatic hydrolysis process

آماري ۱ درصد معنی‌دار هستند. همچنین اثر عامل هیدرولیز آنزیمی بر میزان آفلاتوکسین B₂ در سطح آماري ۵ درصد معنی‌دار است (برای رعایت اختصار جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). نتایج مقایسه میانگین‌های میزان آفلاتوکسین‌های B₂، B₁ و آفلاتوکسین کل موجود در نمونه هیدرولیز شده و نمونه شاهد در جدول ۴ داده شده است. از این

مقایسه میزان سم آفلاتوکسین در نمونه هیدرولیز شده آنزیمی با نمونه شاهد

نتایج تجزیه واریانس میزان آفلاتوکسین‌های موجود در نمونه‌های هیدرولیز شده و شاهد (هیدرولیز نشده) نشان می‌دهد که اثر عامل هیدرولیز آنزیمی بر میزان آفلاتوکسین B₁ و آفلاتوکسین کل موجود در نمونه‌ها هر دو در سطح

داده شود. کاهش آفلاتوکسین B₁ در فرآیند هیدرولیز شدن آنزیمی ممکن است به علت تخریب پیوندهای گلیکوزیدیک موجود در این آفلاتوکسین باشد. استفاده از آنزیم‌ها برای سم‌زدایی مایکوتوکسین‌ها، یک استراتژی امیدوارکننده در محصولات غذایی به شمار می‌رود (Vanhoutte *et al.*, 2016). بررسی‌ها نشان می‌دهد لاکازها و پراکسیدازها در تخریب AFB₁ بسیار کارآمد هستند، اما استفاده از آنها در محصولات غذایی چالش برانگیز است. با این حال، استفاده از آنزیم‌های آمیلولیتیک در محصولات غذایی بی‌خطر است (Rushing & Selim, 2019).

جدول پیداست هیدرولیز آنزیمی سبب کاهش معنی‌دار آفلاتوکسین B₁ از ۹۲/۶۱ به ۲۲/۵۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر (به میزان ۷۶ درصد) شده است. همچنین در اثر فرآیند هیدرولیز شدن، میزان آفلاتوکسین B₂ به طور معنی‌دار از ۲/۸۲ به ۲/۳۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر، یعنی ۱۶ درصد، کاهش یافته است. میزان آفلاتوکسین کل در اثر فرآیند هیدرولیز شدن به طور معنی‌داری از ۹۵/۴۳ به ۲۵/۲۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافته است. آفلاتوکسین B₁ در فرآیند هیدرولیز راحت‌تر از آفلاتوکسین B₂ سم‌زدایی شده است که می‌تواند به علت تبدیل B₁ به B₂ در فرآیند هیدرولیز نسبت

جدول ۴- مقایسه میزان آفلاتوکسین موجود در نمونه‌های شاهد و هیدرولیز شده

Table 4 - Comparison of aflatoxin levels in the control and hydrolyzed samples

Total aflatoxin آفلاتوکسین کل	Aflatoxin B ₂ آفلاتوکسین B ₂	Aflatoxin B ₁ آفلاتوکسین B ₁	Sample status وضعیت نمونه
95.43 ^a	2.82 ^a	92.61 ^a	Control sample نمونه شاهد
25.21 ^b	2.36 ^b	22.51 ^b	Hydrolyzed sample نمونه هیدرولیز شده

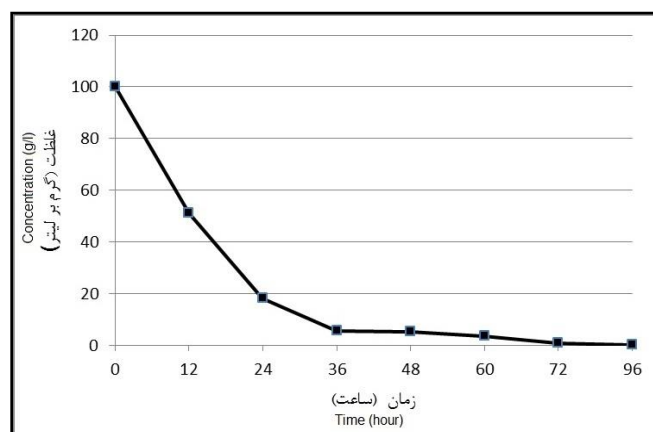
در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Non-similar letters indicate a significant difference in the probability level of 5% per column

افزایش مقدار توده زیستی و تغییرات فیزیکی محیط کشت، مقدار اکسیژن محلول در محیط کشت کاهش می‌یابد. به این ترتیب، مخمر در ابتدا با مصرف منابع کربنی چرخه رشد خود را طی می‌کند و باعث تولید اتانول زیستی می‌شود. پیتززاک و کاوا-ریگالسکا (Pietrzak & Kawa-Rygielska., 2015) می‌گویند فرآیند تخمیر ضایعات نان در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه و مدت زمان ۹۶ ساعت، کاهش در گلوکز مصرف شده را از حدود ۹۰ گرم بر لیتر به کمتر از ۱۶ گرم بر لیتر می‌رساند.

تغییرات میزان گلوکز و بازده الکل در فرآیند تخمیر

تغییرات غلظت گلوکز در فرآیند تخمیر با گذشت زمان در شکل ۹ نشان داده شده است. در این شکل مشاهده می‌شود که در ۲۴ ساعت اول مقدار گلوکز از ۱۰۰/۲۱ گرم بر لیتر به ۱۸/۲۳ گرم بر لیتر و پس از ۴۸ ساعت از آغاز آزمایش به ۵/۳۲ گرم بر لیتر کاهش یافته است. با ادامه آزمایش مقدار گلوکز باقیمانده باز هم کاهش می‌یابد و پس از ۹۶ ساعت به مقدار بسیار ناچیز ۰/۱۲ گرم بر لیتر می‌رسد. در حین فرآیند تخمیر، با رشد مخمر و



شکل ۹- تغییرات مصرف گلوکز در تخمیر نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی

Fig. 9- Variations of glucose consumption in the fermentation of enzymatic hydrolyzed samples

فعالیت مخمر و به تبع آن سرعت تولید الکل کاهش می‌یابد.

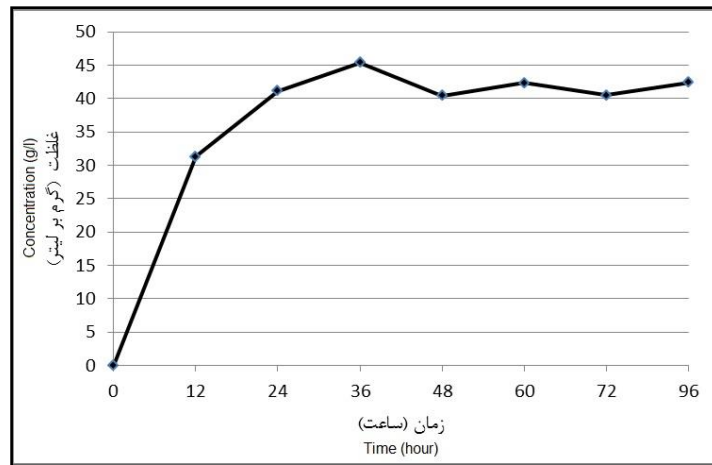
شکل ۱۱ بیانگر بازده تولید اتانول زیستی در زمان‌های مختلف است. طبق نتایج ارائه شده در شکل ۱۱، بازده تولید الکل بعد از ۱۲ ساعت ۶۱/۳ درصد است که با افزایش زمان به ۳۶ ساعت به میزان حداکثر ۸۸/۷۰ درصد می‌رسد. با توجه به جزئی بودن تغییرات بازده بعد از زمان ۳۶ ساعت، دیگر نیازی به ادامه فرایند نیست (شکل ۱۱). رسیدن به بازده ۸۸/۷ درصد در فرآیند تخمیر در زمان ۳۶ ساعت می‌تواند به دلیل مصرف گلوکز تولید شده در مرحله هیدرولیز شدن به واسطه رشد مناسب توده سلولی در تخمیر باشد. کیتاگاکي و همکاران (Kitagaki *et al.*, 2007) گزارش داده‌اند که سلول‌های مخمر ظرفیت تحمل اتانول زیستی تا غلظت خاصی را دارند که بعد از آن مقدار، از رشد و در نتیجه آسیب به سلول‌های مخمر جلوگیری می‌شود. افزایش میزان اتانول زیستی به سلول‌های مخمر تنش وارد می‌کند و سبب تغییر در ساختار پروتئین، سیالی بودن غشا و... می‌شود که در نهایت به مرگ سلول‌های مخمر می‌انجامد (Van Maris *et al.*, 2006) پیترزاک و کاوا-ریگالسکا (Pietrzak & Kawa-Rygielska., 2015) در تولید اتانول زیستی

شکل ۱۰، تغییرات غلظت اتانول زیستی تولیدی را از ضایعات نان در فرآیند تخمیر نشان می‌دهد. مقدار تولید الکل در ابتدای فرایند صفر است، اما در ۱۲ ساعت اولیه با مصرف گلوکز موجود در محیط، الکل تولید شده ۳۱/۳۲ گرم بر لیتر و در ۳۶ ساعت پس از شروع آزمایش به ۴۵/۳۵ گرم بر لیتر و در ساعات بعدی تقریباً به حالت سکون می‌رسد. در واقع سرعت تولید الکل در روزهای اول تا چهارم یکسان نیست، در روزهای اولیه سرعت تولید بیشتر است تا در روزهای بعد.

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 است و در نتیجه مخمر بسیار فعال است؛ بنابراین، سرعت تولید الکل زیاد است. تجمع اتانول در محیط تنشی شیمیایی برای سلول مخمر محسوب می‌شود؛ به عبارت دیگر، افزایش غلظت اتانول عاملی است تخریبی. با افزایش غلظت اتانول در مرحله اول، رشد مخمر مهار می‌شود و مرگ سلول مخمر را در پی دارد. به عبارت دیگر، سلول‌های مخمر ظرفیت تحمل اتانول را تا غلظت خاصی دارند (Kitagaki *et al.*, 2007)؛ بنابراین، هرچه تخمیر پیشتر رود میزان قند کمتر و میزان الکل بیشتر می‌شود. در نتیجه

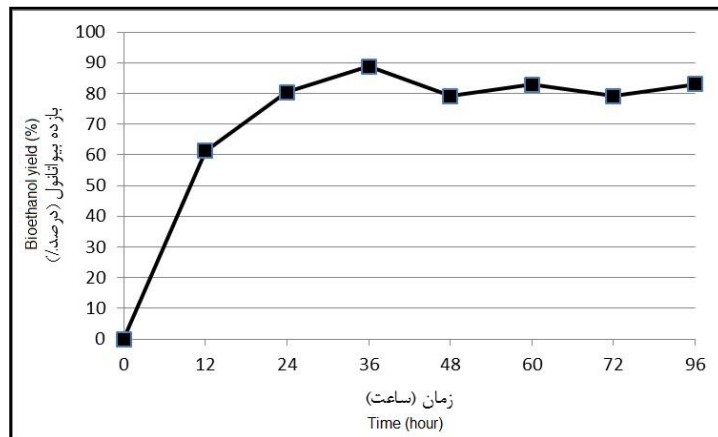
پیش‌هیدرولیز و استفاده از پرتوهای مایکروویو عملکرد تولید اتانول زیستی در حدود ۰/۰۱۲ تا ۰/۰۳۵ کیلوگرم بر کیلوگرم افزایش می‌یابد. این محققان بازده تولید اتانول زیستی را برای حالت بدون پیش‌فرآوری ۸۰ درصد و برای حالت با پیش‌فرآوری ۳ تا ۸ درصد بیشتر گزارش کردند.

از ضایعات نان گندم-چاودار توانستند از ۳۰۰ گرم ضایعات نان به غلظت اتانول زیستی ۱۲۸/۰۱ گرم بر لیتر (۰/۴۲ کیلوگرم بر کیلوگرم ماده خشک) دست یابند. پیترزاک و کوا-ریگالسکا (Pietrzak & Kawa-Rygielska, 2014) نیز گزارش کردند با پیش‌فرآوری به‌خصوص پیش‌فرآوری‌هایی مانند



شکل ۱۰- تولید اتانول زیستی در فرایند تخمیر نمونه هیدرولیز شده ضایعات نان

Fig. 10 – Bioethanol production during the fermentation process of hydrolyzed samples of bread waste



شکل ۱۱- تغییرات بازده تولید اتانول زیستی با زمان در فرایند تخمیر

Fig. 11 – Variations in bioethanol production yield with time during the fermentation process

افزوده می‌شود. در این تحقیق، استفاده از ضایعات نان به عنوان منبعی برای تولید اتانول زیستی بررسی گردید. نتیجه‌گیری این تحقیق به شرح زیر است:

نتیجه‌گیری

توسعه استفاده از ضایعات برای تولید فرآورده‌های دیگر، علاوه بر کاهش حجم ضایعات و مدیریت آنها، سبب ایجاد ارزش

هیدرولیز آنزیمی در شرایط زمان قند سازی ۴۸ ساعت و غلظت سوبسترای ۱۵ (w/v%)، برابر با ۱۰۰/۲۱ گرم بر لیتر است.

هیدرولیز آنزیمی نمونه‌ها سبب کاهش معنی‌دار میزان آفلاتوکسین B₁ به میزان ۷۶ درصد، آفلاتوکسین B₂ به میزان ۱۶ درصد و آفلاتوکسین کل موجود در نمونه‌ها به میزان ۷۳ درصد می‌شود.

بیشترین بازده تولید اتانول زیستی در فرآیند تخمیر در ۳۶ ساعت اول به میزان ۸۹ درصد به دست آمد که می‌تواند به علت مصرف گلوکز تولید شده در مرحله هیدرولیز شد توسط مخمر و رشد مناسب توده سلولی آن در مدت زمان ۳۶ ساعت باشد؛ توصیه می‌شود زمان فرآیند تخمیر ۳۶ ساعت در نظر گرفته شود.

اثر غلظت سوبسترا، زمان قندسازی و اثر متقابل زمان قندسازی در غلظت سوبسترا بر میزان گلوکز تولید شده در هیدرولیز آنزیمی ضایعات نان در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار است.

افزایش سوبسترا از ۱۰ (w/v%) تا ۱۵ (w/v%) باعث افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز از ۶۲/۲۵ به ۸۹/۶۸ گرم بر لیتر در هیدرولیز آنزیمی می‌شود و افزایش بیشتر میزان سوبسترا به علت ایجاد ویسکوزیته و چسبندگی زیاد به کاهش غلظت گلوکز منجر می‌شود.

افزایش زمان قند سازی از ۱۰ تا ۴۸ ساعت در هیدرولیز آنزیمی میزان غلظت گلوکز را به طور معنی‌دار از ۴۲/۸۰ به ۸۶/۹۰ گرم بر لیتر افزایش می‌دهد. بیشترین میزان غلظت گلوکز آزاد شده به واسطه

قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران به دلیل فراهم کردن امکانات لازم برای اجرای این تحقیق قدردانی می‌کنند.

مراجع

- Abedi, M. (2012). Bioethanol production from potato waste (M. Sc. Thesis), University of Tehran. Tehran. Iran. (in Persian)
- 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.
- Anon. (2011). Food and feed stuffs - determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI, 6872. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Tehran, Iran (in Persian)
- Anon. (2017). *Glucose Assay Kit*. Ziestchem Diagnostics, Tehran, Iran. (in Persian)
- Caputi, A., Ueda, M., & Brown, Th. (1968). Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 19(3), 160-165.
- 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*, 15(1), 404-415.
- Ebrahimi, F., Khanahmadi, M., Roodpeyma, Sh., & Taherzadeh, M. (2008). Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 333-337.

- Han, W., Hu, Y., Li, Sh., Huang, J., Nie, Q., Zhao, H., & Tang, J. (2017). Simultaneous dark fermentative hydrogen and ethanol production from waste bread in a mixed packed tank reactor. *Journal of Cleaner Production*, 141, 608-611.
- 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(6), 1617-1626.
- Hudečková, H., Šupinová, P., & Babák, L. (2017). Optimization of enzymatic hydrolysis of waste bread before fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(1), 35-40.
- Ismail, A., Riaz, M., Akhtar, S., Yoo, S. H., Park, S., Abid, M., & Ahmad, Z. (2017). Seasonal variation of aflatoxin B1 content in dairy feed. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26(1), 33-37 .
- Izad-Panah, N., Mohammadi, V., & Aghayar-Makui, N. (2018). A review of bread wastes (The need to reduce bread wastes to increase productivity). *Applied Studies in Management and Development Sciences*, 11(2), 47-58. (in Persian)
- Kawa-Rygielska, J., Pietrzak, W., & Czubaszek. A. (2012). Characterization of fermentation of waste wheat-rye bread mashes with the addition of complex enzymatic preparations. *Biomass and Bioenergy*, 44, 17-22.
- Kim, Y. S., Jang, J. Y., Park, S. J., & Um. B. H. (2018). Dilute sulfuric acid fractionation of Korean food waste for ethanol and lactic acid production by yeast. *Waste Management*, 74, 231-240.
- Kitagaki, H., Araki, Y., Funato, K., & Shimoi, H. (2007). Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Letters*. 581(16), 2935-2942.
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449-467.
- Moraise, R. R., Pascoal, A. M., Pereira-Júnior, M. A., Batista, K. A., Rodriguez, A. G., & Fernandes, K. F. (2019). Bioethanol production from *Solanum lycocarpum* starch: A sustainable non-food energy source for biofuels. *Renewable Energy*, 140, 361-366.
- 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.
- 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. (in Persian)
- Sugiura, K., Yamatani, S., Watahara, M., & Onodera, T. (2009). Ecofeed, animal feed produced from recycled food waste. *Veterinaria Italiana*, 45(3), 397-404.

- Svanes, E., Oestergaard, S., & Hanssen, O. J. (2019). Effects of packaging and food waste prevention by consumers on the environmental impact of production and consumption of bread in Norway. *Sustainability*, *11*(1), 43. doi:10.3390/su11010043.
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 81-100.
- Udomkun, P., Wiredu, A. N., Nagle, M., Müller, J., Vanlauwe, B., & Bandyopadhyay, R. (2017). Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application -A review. *Food Control*, *76*, 127-138.
- Vanhoutte, L., Audenaert, K., & De Gelder, L. (2016). Biodegradation of mycotoxins: Tales from known and unexplored worlds. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 561. doi: 10.3389/fmicb.2016.00561.
- Van Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, *90*(4), 391-418.



Research Paper

Bioethanol Production from Bread Waste with Enzymatic Hydrolysis and Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*

S. Torabi, S. R. Hassan-Beygi*, B. Sattari and B. Ghobadian

* Corresponding Author: Professor, Department of Agrotechnology, Abouraihan College, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: rhbeigi@ut.ac.ir

Received: 19 May 2019, Accepted: 22 April 2020

Abstract

Bread waste is the common part of food biomass in the world. The aim of this study was to investigate the effects of saccharification time and also substrate concentration on the amount of glucose as well as bioethanol obtained from bread wastes following hydrolysis processing. The bread wastes were crushed to small parts and then mixed with water at ratio of 10-15 (w/v%). Alpha-amylase and glucoamylase enzymes were used for liquefaction and saccharification, respectively. The effects of saccharification time and substrate loading parameters on the amount of glucose were investigated by using response surface methodology (central composite design) with Design Expert software. The glucose-derived from hydrolysis processing was measured by glucose kit. Aflatoxin contents of the bread wastes (as control sample) and optimum sample obtained from the hydrolysis processing (sample with the maximum glucose) were measured. Fermentation processing was carried out by using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The results showed that the highest amount of glucose (100.21 g/l) in enzymatic hydrolysis was obtained at the saccharification time of 48 h and substrate loading of 150 g/l. The hydrolysis processing at the higher concentrations and longer duration, due to high viscosity and adhesion, reduced the concentration of glucose, so high concentration did not have any favorable effect on the hydrolysis processing. The hydrolysis processing reduced Aflatoxin B₁ and B₂ at a ratio of 76% and 16%, respectively. The greatest amount of bioethanol in the fermentation phase (45.35 g/l) was obtained at 36 hours with efficiency of 88.7%. It could be related to the consumption of glucose produced in the hydrolysis phase due to proper growth of the cell mass during fermentation phase in this duration. The recommended time for the fermentation processing is 36 hours.

Keywords: Aflatoxin, Biomass, Fermentation, Glucose