

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم، گروه زیست شناسی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

تولید میکروبی اتانول آشنایی با هیدرومتر

دکتر سهیلا عباسی

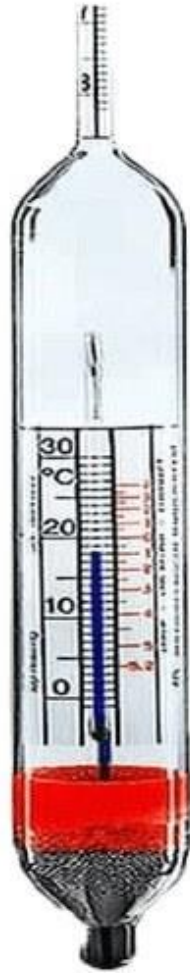
هیدرومتر چیست ؟

هیدرومتر وسیله ای است که معمولاً از جنس **شیشه** ساخته شده و برای تعیین **وزن مخصوص مایعات** (چگالی مایعات) استفاده میشود هیدرومتر دارای یک ساقه استوانه ای شکل و یک بالون است که با جیوه یا گلوله های سربی سنگین شده تا به صورت مستقیم و رو به بالا شناور بماند برای تعیین چگالی مایع مورد نظر ابتدا مایع را درون ظرف بلندی ریخته و هیدرومتر را طوری در داخل آن قرار می دهیم که به صورت آزادانه شناور باشد. محلی که سطح مایع هیدرومتر را **قطع** میکند یادداشت برداری میشود.

معمولاً داخل ساقه هیدرومترها یک **درجه کاغذی** قرار دارد که با کمک آن وزن مخصوص را میتوان به صورت مستقیم خواند.

هیدرومتر در **مایعات سبک** مثل کروزن بنزین و الکل نسبت به **مایعات سنگین** مثل شیر، آب نمک و اسیدها تا عمق بیشتری فرو می رود. بنابراین باید دو وسیله جداگانه داشته باشیم یکی برای مایعات سنگین و یکی برای مایعات سبک.

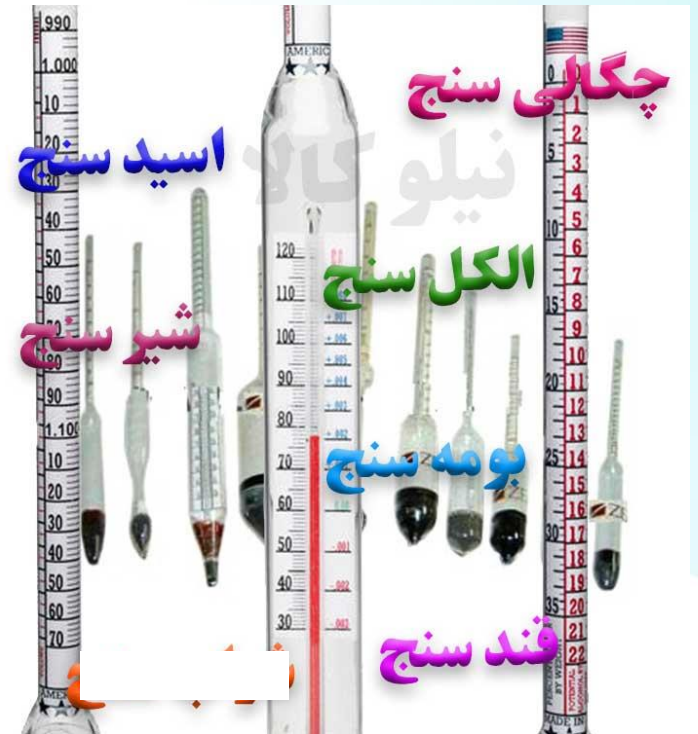
در بسیاری از صنایع از هیدرومترهای متعددی استفاده میشود که علت آن افزایش دقت در تعیین چگالی است. مثلاً یک هیدرومتر برای محدوده ۱،۰/۹۵ و یک هیدرومتر برای محدوده ۰/۹۵،۰/۹۰ و



دکتر سهیلا عباسی



دکتر سهیلا عباسی



مقدمه

به واسطه ی موارد استعمال صنعتی فراوان **الکل اتیلیک** یکی از مهمترین محصولات **تخمیری** در زندگی جدید به شمار می آید و سالانه مقادیر هنگفتی از آن در موارد مختلف مصرف میشود الکل اتیلیک **حلال** تعداد زیادی از مواد شیمیایی و دارویی است و همچنین ماده ی **ضد عفونی کننده** نیز میباشد و در کارخانجات در تهیه ی بسیاری از ترکیبات مختلف به عنوان معرف مورد نیاز است.

در عصر حاضر به دلیل کمبود منابع انرژی تولید تخمیری اتانول از دهه ی ۱۹۸۰ به بعد مجدداً اهمیت پیدا کرده است. در کشورهایی که مناطق کشاورزی وسیعی دارند، نظیر برزیل، آفریقای جنوبی و ایالات متحده مطالعات گسترده ای در زمینه ی تولید اتانول از **کربوهیدرات** هایی مانند ساکارز و نشاسته انجام شده است. هدف چنین تحقیقاتی استفاده از اتانول به عنوان **سوخت اتومبیل** است اما در بعضی از کشورها تولید اتیلن و سایر ترکیبات پتروشیمیایی از اتانول نیز مد نظر میباشد.

مواد اولیه برای تخمیر اتانول

- با این که استفاده از پدیده‌ی تخمیر و تحول قند به الکل جهت به دست آوردن مشروبات الکلی از اعصار قدیم وجود داشته است، ولی تا اواسط قرن ۱۹ از علت و عوامل این تحول کسی باخبر نبود.
- الکل اتیلیک از تخمیر مواد هیدروکربنی مختلف توسط قارچ‌های ذره بینی موسوم به مخمرها به دست می‌آید.
- مواد اولیه قنددار معمولاً به طور مستقیم توسط میکروارگانیسم‌ها به اتانول تبدیل می‌شود. در حالی که نشاسته و سلولز ابتدا باید هیدرولیز شده و به قند تبدیل گردند و سپس در فرایند تخمیر به اتانول تبدیل شوند.

ترکیبات قند دار	ترکیبات نشاسته دار	ترکیبات سلولز دار
ملاس نیشکر	غلات (گندم-ذرت)	ضایعات کشاورزی
ملاس چغندر	سیب زمینی	ضایعات جنگلی
میوه و سر درختی‌ها	برنج	چوب
خرما	دیگر محصولات ریشه‌ای	زباله‌های جامد شهری
هندوانه	دیگر محصولات ریشه‌ای	کاغذ بازیافتی

ملاس چغندر قند (Beet Molasses)

ملاس چغندر قند ماده ای است که در صنعت مخمر سازی به عنوان **محیط کشت** و رشد تکثیر **مخمر** به کار می رود در کارخانجات قند سازی خلال چغندر را در دیگهای شربت گیری (دیفوزیون) وارد می کنند و تقریباً تمام قند آن را طبق اسموز استخراج کرده و ماده حاصله که حاوی مقدار کمی قند (حدود ۳۱٪) است تفاله نامیده می شود. شربت حاصله بریا تصفیه با مواد آهکی و دیگر مواد شیمیایی مخلوط و صاف می شود و سپس آن را تغلیظ نموده و به دانه های شکر تبدیل می کنند. (کریستالیزاسیون) و دانه های تبلور شده در دستگاه مخصوصی (سانتریفوژ) از پس آب جدا می نمایند. این عمل را چندین بار (معمولاً سه بار) تکرار می کنند آخرین پس آب که دیگر با شرایط و وسایل موجود در کارخانه قندگیری از آن مقرون به صرفه نیست از کارخانه خارج و بنام ملاس چغندر قند نامیده می شود.

- ماده اولیه مورد استفاده در تخمیر الکلی می تواند **ملاس** باشد. در چنین محیط قندی ملاس به وسیله ی مخمر تغییر یافته و محصول نهایی عمده، الکل اتیلیک و گاز کربنیک خواهد بود.

- از آن جایی که مقدار انرژی موجود در محصولات به دست آمده در اثر تخمیر کمتر از انرژی ماده ی قندی است، در ضمن عمل تخمیر مقداری انرژی نیز آزاد می شود.



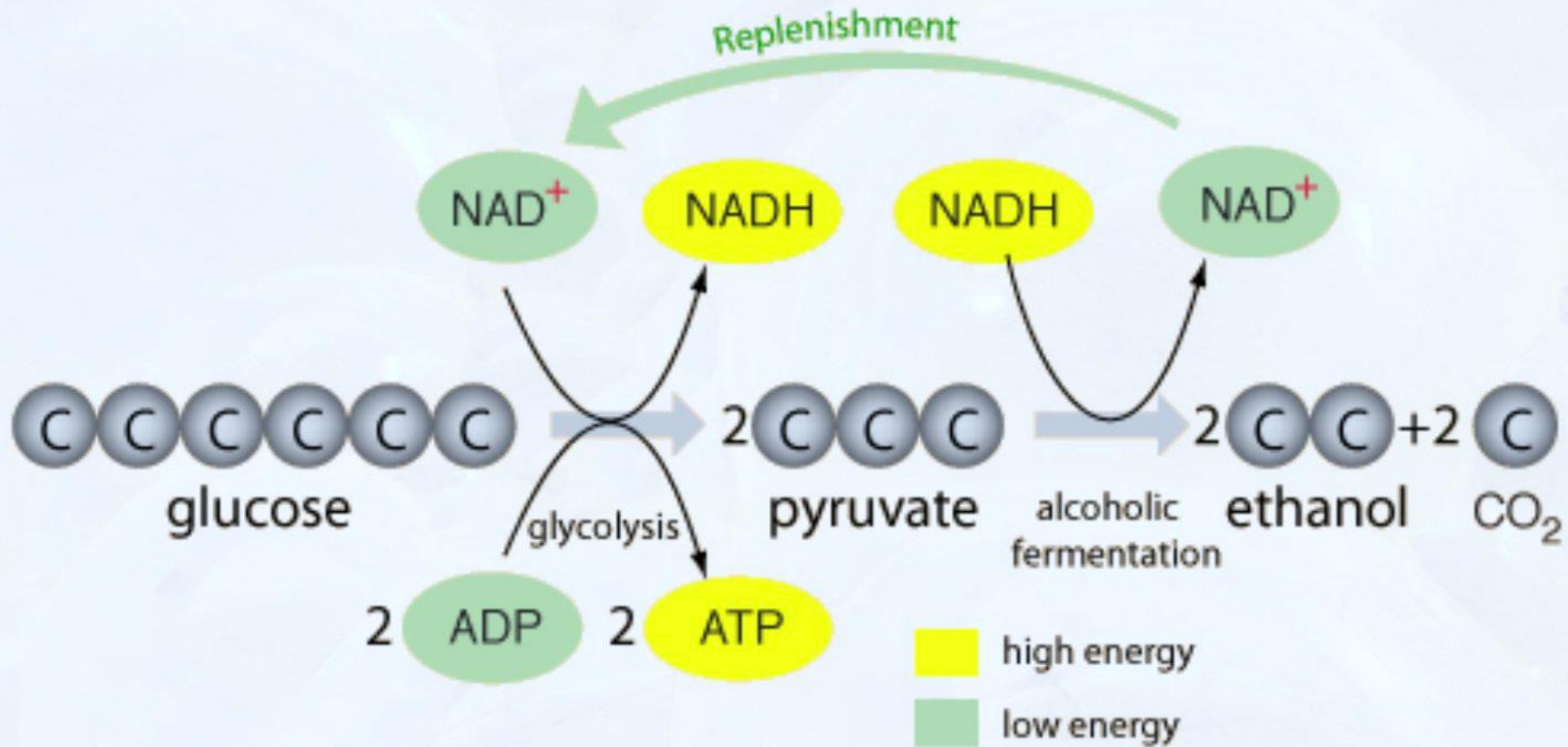
دکتر سهیلا عباسی

گرچه تخمیر الکلی باید در شرایط بی‌هوازی صورت گیرد ولی چون برای تکثیر سریع سلول‌های مخمر هوا لازم است. پس از وارد کردن مایه‌ی تخمیر باید شرایط هوازی را تا مدتی در محیط نگه داشت. در این مدت سلول‌های مخمر به سرعت رشد و تکثیر می‌کنند و الکل تولید نمی‌شود.

در مرحله‌ی بعد بایستی با بستن راه هوا، شرایط بی‌هوازی را در محیط برقرار می‌کنند. به این ترتیب تبدیل قند به الکل به زودی شروع می‌شود.

تحت شرایط بی‌هوازی رشد به آهستگی صورت گرفته و پیرووات حاصل از مسیر کاتابولیک، به واسطه‌ی پیرووات دکربوکسیلاز به استالدئید و دی‌اکسید کربن شکسته می‌شود. سپس با احیای استالدئید توسط الکل دهیدروژناز، اتانول تولید می‌گردد. پس از تولید الکل، با استفاده از عمل تقطیر، الکل را از مایع فرمانتاسیون جدا می‌نمایند.

تا به حال برای تولید اتانول هم از مخمر و هم از باکتری استفاده شده است. ساکارومایسس سرویزیه معمول ترین مخمري است که در این رابطه کاربرد دارد.



مواد و وسایل لازم آزمایش

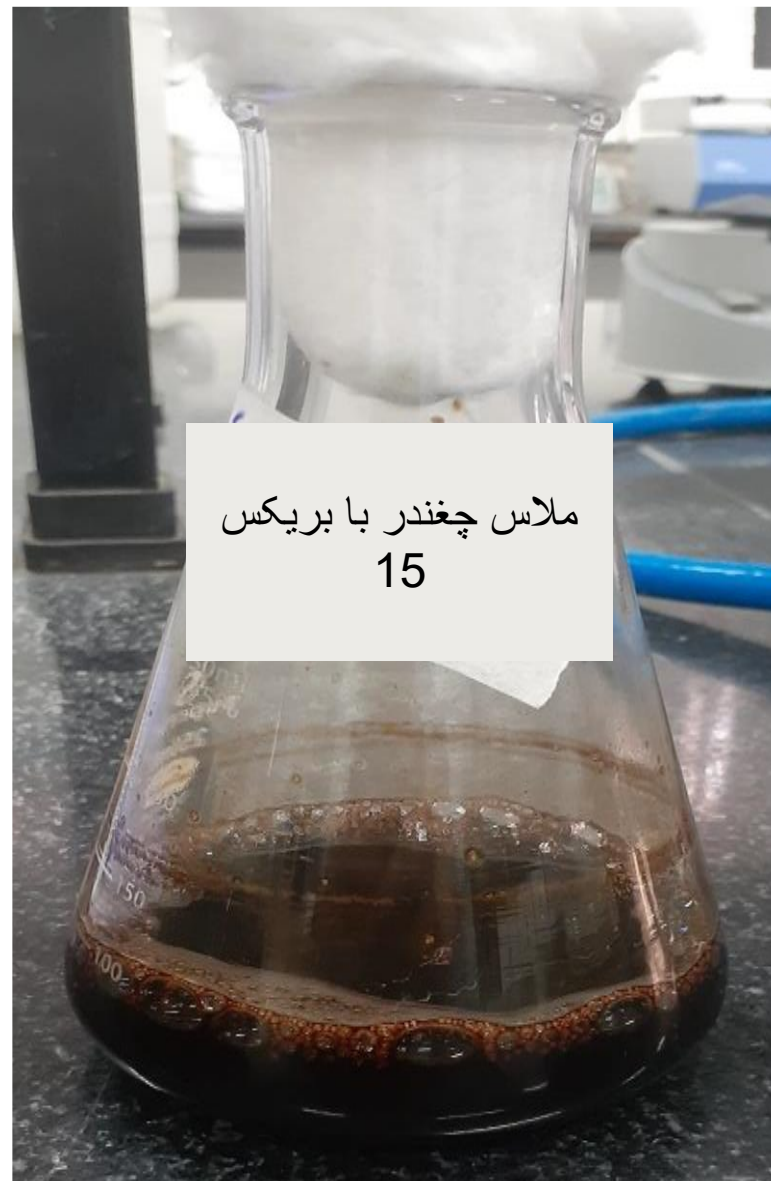
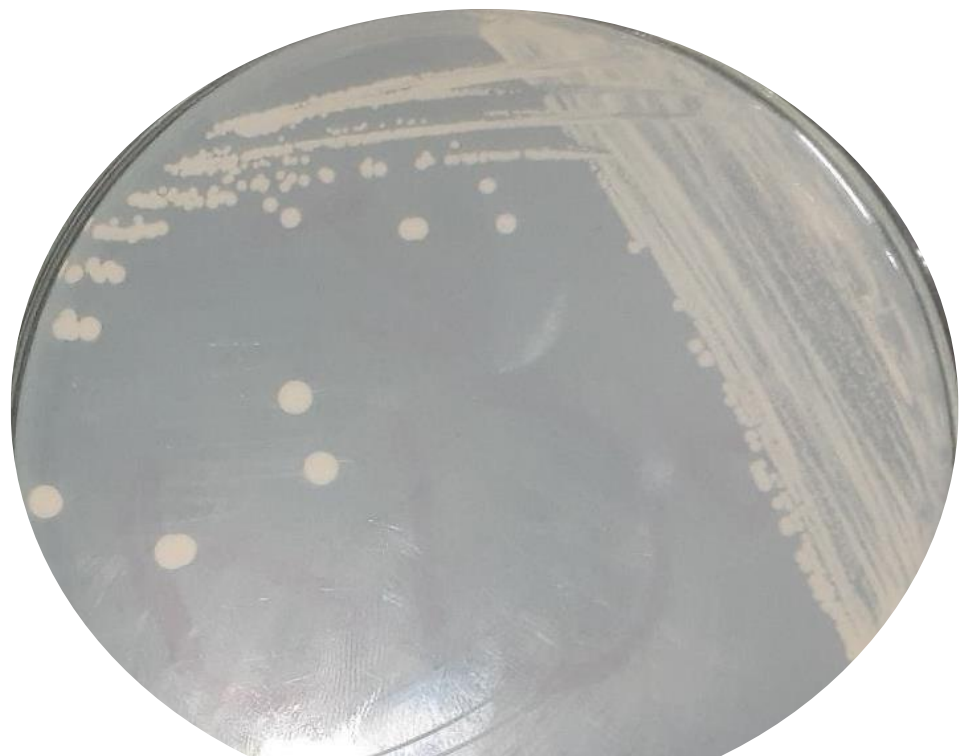
- کشت ۲۴ یا ۴۸ ساعته ساکاروماپسس سرویزیه
- محیط کشت ملاس چغندر با بریکس ۱۵ و ۱۸
- انکوباتور شیکردار
- بیکرومات کلسیم
- اسید سولفوریک
- لوپ
- لوله‌های درپیچ دار
- پی‌پت استریل

روش کار آزمایش

۱. تولید میکروبی الکل - مرحله‌ی هوازی:

با استفاده از لوپ استریل در کنار شعله مقداری از کلنی‌های ساکارومایسس را به داخل ارلن‌های حاوی ۵۰ سی سی ملاس با بریکس ۱۵ تلقیح می‌کنیم و ارلن‌های تلقیح شده را در داخل انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز (۷۲ ساعت) قرار می‌دهیم. در این مرحله مخمر به شدت رشد می‌کند و تعداد آن به شدت افزایش می‌یابد و یا به عبارت دیگر مایه تلقیح آماده می‌شود.

بعد از این مدت ارلن‌های کشت اولیه مرحله هوازی را به محیط کشت دوم (محیط کشت تولید اتانول) در داخل ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر ملاس با بریکس ۱۸ (به عنوان کشت ثانویه) خالی می‌کنیم و سپس ارلن را روی شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز قرار می‌دهیم. مرحله‌ی هوازی در واقع مرحله‌ی رشد مخمر و تولید بیوماس است، تا مخمر بتواند در مرحله‌ی بی هوازی الکل تولید کند.



ملاس چغندر با بریکس
15

روش کار آزمایش



۲. تولید الکل - مرحله‌ی دوم - مرحله‌ی بی‌هوازی:

بعد از گذشت زمان مورد نظر، محتویات کشت ثانویه را به یک لوله درپیچ‌دار استریل بزرگ تخلیه می‌کنیم.

البته قبل از این کار ارلن‌ها را به خوبی به هم می‌زنیم. ۲ تا ۳ سانتیمتر از بالای لوله باید خالی باشد، سپس پارافین مذاب روی محتویات می‌ریزیم تا شرایط بی‌هوازی در لوله ایجاد شود و لوله‌ها را به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده و بعد از این مدت تست تولید الکل را انجام می‌دهیم.

بررسی تولید الکل

روش‌های مختلفی برای بررسی تولید الکل وجود دارد که یکی از آنها مجاورت الکل تبخیر شده موجود در نمونه با محلول **جاذب الکل** می‌باشد.

محلول جاذب الکل عبارت است از **دی کرومات پتاسیم** به میزان ۵ سی سی و **اسید سولفوریک غلیظ** به میزان ۲ سی سی. واکنش فوق **گرمازا** است. پس ابتدا دی کرومات پتاسیم را به داخل استوانه مدرج ۳۵ سی سی وارد کرده و به آرامی ۲ سی سی اسید سولفوریک غلیظ را به آن اضافه می‌کنیم. نمونه حاصل **نارنجی** رنگ خواهد بود و در صورتی که با الکل تماس پیدا کند، تغییر رنگ داده و **سبز تیره** یا **آبی** خواهد شد.

روش بررسی تولید الکل

ابتدا پارافین اضافه شده به لوله‌ی آزمایش را خارج کرده و نمونه‌ی مورد آزمایش را به نسبت ۵ سی سی از ملاس چغندر و ۲۵ سی سی آب مقطر رقیق می‌کنیم. نمونه‌ی رقیق شده را به بالن‌های ته گرد با لوله رابط جانبی اضافه می‌کنیم و درب آن‌ها را با چوب پنبه می‌بندیم و آن را روی پایه ثابت کرده و زیر آن شعله‌ی چراغ گاز گذاشته و نمونه را حرارت می‌دهیم.

ادامه روش بررسی تولید الکل

همزمان با این کار استوانه‌ی مدرج حاوی محلول جاذب الکل به کمک یک گیره، به آرامی در کنار و لوله‌ی رابط جانبی بالن قرار داده طوری که لوله‌ی رابط به داخل محلول جاذب الکل موجود در استوانه وارد شود. سپس شعله را روشن کرده و در اثر حرارت دادن نمونه، محتویات داخل بالن که شامل آب، ملاس چغندر و الکل تولید شده توسط میکروارگانیزم می‌باشد. شروع به گرم شدن می‌کند و شروع به تبخیر شدن می‌نماید و بدین ترتیب از لوله‌ی رابط جانبی بالن خارج می‌شوند. زودتر از همه الکل خارج می‌شود چون نقطه‌ی جوش آن ۷۶ درجه است. البته الکل به همراه آب خارج می‌شود. قبل از بیرون آمدن و رفتن به فضا، ابتدا به محلول جاذب الکل وارد می‌شود.

در ابتدا محلول جاذب خنک است و بخارات خروجی تبدیل به مایع می‌شوند ولی بعد از مدتی چون محلول نیز به دلیل مجاورت با بخار گرم می‌شود، بخار از یک طرف وارد و از طرف دیگر خارج می‌شود. تماس آن با محلول جاذب الکل باعث می‌شود که رنگ محلول تغییر یافته و به سبز تیره تبدیل می‌شود. شدت رنگ حاصله نیز به میزان الکل موجود در نمونه بستگی دارد.

سپس ابتدا به آرامی استوانه مدرج را از درون لوله خارج می‌کنیم و سپس حرارت را قطع می‌کنیم چون به علت اختلاف فشار اگر اول حرارت را قطع کنیم همه‌ی محلول استوانه را به داخل می‌کشیم.



تغییر رنگ نشاندهنده
تولید اتانول

با تشکر از توجه شما
با آرزوی سلامتی و موفقیت