فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۸۳- ۹۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۳۱

استفاده از لجن فعال به‌عنوان مکمل در محیط کشت تولید اتانول

حمزه ایمانی *: دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، i.hamze@yahoo.com
اعظم جیحانی‌پور: استادیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، a.jeihanipour@gmail.com
محمد علی اسداللهی: استادیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، ma.asadollahi@ast.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: لجن مازاد حاصل از تصفیه فاضلاب شهری حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات حاوی فسفر، نیتروژن و سولفور است، بنابراین می‌توان لجن را به‌عنوان جایگزین منبع مواد مغذی برای تولید محصولات تخمیری توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده کرد. در این پژوهش، رشد مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* برای تولید بیواتانول روی لجن حاصل از تصفیه فاضلاب شهری، به‌عنوان جایگزین مواد مغذی، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* CEN.PK 113-7D برای تولید بیواتانول استفاده شد. لجن حاصل از تصفیه هوازی فاضلاب شهری به چهار روش اسیدی، بازی، حرارتی و اولتراسونیک پیش فرآوری شد. ابتدا امکان رشد سلول‌های مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در شرایط هوازی روی لجن خام و لجن پیش فرآوری شده آزمایش و میزان رشد مخمر به روش CFU اندازه گیری شد. همچنین، توانایی تولید اتانول از لجن پیش‌فرآوری شده و لجن خام توسط مخمر و در شرایط بی هوازی بررسی شد. تحلیل کمی مقدار اتانول تولید شده توسط دستگاه گاز- کروماتوگرافی انجام شد.

نتایج: بیش‌ترین میزان رشد مخمر بر روی لجن تر، با پیش‌فرآوری به روش قلیایی حاصل شد. با استفاده از این پیش‌فرآوری غلظت سلول‌های مخمر در شرایط رشد هوازی بعد از ۳۶ ساعت از $۱/۲×۱۰^{۵}$ (سلول/ میلی‌لیتر) به $۱/۵×۱۰^{۶}$ (سلول/ میلی‌لیتر) رسید و بازدهی اتانول تولید شده در شرایط بی‌هوازی برابر با ۰/۱۱ گرم اتانول به ازای هر گرم گلوکز اولیه اندازه‌گیری شد. همچنین، با خشک کردن و سپس، پیش‌فرآوری قلیایی لجن، میزان تولید اتانول به ۰/۴۱ گرم اتانول به ازای هر گرم گلوکز اولیه افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که لجن باقی‌مانده از تصفیه فاضلاب شهری اگر خشک و به روش قلیایی پیش‌فرآوری شود می‌تواند به‌عنوان جایگزین مواد مغذی در محیط کشت تولید اتانول زیستی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بیواتانول، *ساکارومایسس سرویسیه*، لجن تصفیه خانه فاضلاب شهری، پیش‌فرآوری

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

در حدود ۹۰ درصد از انرژی جهان از سه منبع اصلی نفت، زغال سنگ و گازهای طبیعی تأمین می‌شود و در چند دهه اخیر سرعت مصرف این منابع به شدت افزایش یافته است (۱ و ۲). از نقطه‌نظر زیست‌محیطی استفاده از سوخت‌های فسیلی موجب انتشار گاز دی‌اکسید کربن و اکسیدهای نیتروژن در اتمسفر می‌شود. بسیاری از پژوهشگران معتقدند که گاز دی‌اکسید کربن در بلندمدت موجب گرم‌شدن کره زمین می‌شود (۳). با توجه به این‌که سوخت‌های فسیلی منابع محدود و به سرعت رو به اتمام هستند و همچنین آلودگی زیست محیطی به همراه دارند، یکی از چالش‌های مهم در قرن بیست و یکم جایگزین کردن سوخت‌های فسیلی با سوخت‌های تجدیدپذیر است. آمارها نشان می‌دهد که ایران نیز استثنا نبوده و در سال‌های نه چندان دور نیاز به جایگزین کردن سوخت‌های فسیلی با منابع انرژی دیگر خواهد داشت (۴). از جمله این سوخت‌های جایگزین که امروزه بخش مهمی از پژوهش‌های علمی در کشورهای مختلف را به خود اختصاص داده است، سوخت زیستی بیواتانول است. در حال حاضر بیواتانول چه از نظر ارزش اقتصادی و چه از نظر حجم تولید مهم‌ترین محصول زیست فناوری در دنیاست (۵). اتانول کاربردهای متعددی دارد، که از آن جمله می‌توان به ضدعفونی کننده در بخش بهداشت و درمان، ماده اولیه برای تولید بعضی از محصولات غذایی، دارویی و شیمیایی، حلال در صنایع مختلف و به عنوان سوخت و یا مکمل سوخت در بخش حمل و نقل اشاره کرد. بیش از ۸۰ درصد بیواتانول تولیدی در جهان، بیواتانول سوختی است (۶). بیش‌ترین اتانول تولیدی در جهان (حدود ۹۳ درصد) از روش تخمیر و فقط حدود ۷ درصد از روش سنتز شیمیایی تولید می‌شود (۷ و ۸).

در این پژوهش، برای کاهش هزینه تولید و همچنین ارایه راهکاری اقتصادی برای استفاده مجدد از لجن مازاد تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری، از لجن به‌عنوان جایگزین مواد مغذی مورد نیاز برای رشد مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*[1] استفاده شد. لجن مازاد ماده جامدی است که در فرآیند لجن فعال در تصفیه فاضلاب شهری به روش هوازی تولید می‌شود و در حقیقت نوعی محصول فرعی مهم در فرآیند تصفیه فاضلاب است (۹). با وجود همه پژوهش‌های انجام شده در زمینه استفاده از لجن تصفیه‌خانه‌ها، برای تولید محصولات مختلف از جمله سوخت‌های زیستی (بیودیزل)، آنزیم‌ها، حشره‌کش‌ها[2]، بیوپلاستیک‌ها، و لخته سازها[3] (۱۰- ۱۴)، تاکنون گزارشی در زمینه استفاده از لجن به عنوان ماده مغذی میکروارگانیسم‌های تولید کننده بیواتانول ارایه نشده است. میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تولید اتانول هستند (۱۵ و ۱۶). مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* به علت وجود مزایای زیاد، متداول‌ترین سویه مورد استفاده برای این منظور است (۵). در این پژوهش، برای نخستین بار امکان رشد مخمر *ساکارومایسس* سرویسیه روی لجن هم در حالت پیش‌فرآوری شده و هم به شکل خام بررسی شد. همچنین، از آنجاکه هدف اصلی تولید اتانول بود، میزان اتانول تولیدی حاصل از رشد مخمر در شرایط بی هوازی و با استفاده از لجن پیش‌فرآوری شده به چهار روش مختلف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

لجن فاضلاب: لجن فاضلاب شهری (بدون عبور از هاضم بی‌هوازی)، از تصفیه خانه فاضلاب شهری شمال اصفهان دریافت شد. در انجام این پروژه از دو نوع لجن تر و خشک به عنوان ماده مغذی برای تولید بیواتانول استفاده شد. منظور از لجن تر، لجنی است که به طور مستقیم از تصفیه‌خانه فاضلاب تهیه شد. برای تهیه لجن خشک، لجن تر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته داخل آون خشک شد.

خواص فیزیکی لجن مازاد تصفیه‌خانه فاضلاب شمال اصفهان شامل: جامدات کل، جامدات فرار، جامدات محلول کل، جامدات ثابت و جامدات نامحلول کل با استفاده از روش‌های استاندارد آب و فاضلاب اندازه‌گیری شد (۱۷). همچنین، برای تعیین درصد عناصر کربن، نیتروژن و گوگرد از دستگاه تحلیل عنصری[۴] استفاده شد. نتایج حاصل در جدول ۱ ارایه شده است.

میکروارگانیسم: سویه مخمر استاندارد *ساکارومایسس سرویسیه* به نام CEN. PK 113-7D تهیه شده از کلکسیون میکروبی مرکز زیست‌فناوری میکروبی دانشگاه فنی دانمارک (DTU)، به عنوان سویه تولید کننده اتانول استفاده شد.

محیط کشت تکثیر: مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* بر روی محیط کشت جامد حاوی گلوکز (۲۰ گرم بر لیتر) ، پپتون (۲۰ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۱۰ گرم بر لیتر) و آگار (۲۰ گرم بر لیتر) کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. مخمر رشد داده شده پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

جدول ۱- خواص فیزیکی و شیمیایی لجن مازاد حاصل از فرآیند لجن فعال تصفیه‌خانه فاضلاب شهری شمال اصفهان

شاخص	مقدار
خواص فیزیکی	
جامدات کل (گرم بر لیتر)	۴۵/۵ ±۰/۵
جامدات فرار (گرم بر لیتر)	۲۷/۷ ±۰/۳
جامدات محلول کل (گرم بر لیتر)	۴/۲۵ ±۰/۸
جامدات ثابت (گرم بر لیتر)	۲۱/۵ ±۰/۵
جامدات نامحلول کل (گرم بر لیتر)	۴۱/۲۵ ±۰/۳
اسیدیته	۶/۱۲ ±۰/۰۵
خواص شیمیایی	
کربن کل (درصد جامدات کل)	۳۹/۵۱
نیتروژن کل (درصد جامدات کل)	۳/۷۵
سولفور کل (درصد جامدات کل)	۱/۱۴

مایه تلقیح: برای تهیه مایه تلقیح، رشد مخمر در محیط کشت مایع حاوی (گرم بر لیتر): آمونیوم کلراید (۷/۵)، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (۳/۵)، سولفات منیزیم (۰/۷۵)، کلرید کلسیم (۱)، گلوکز (۴۰) و عصاره مخمر (۵) انجام گرفت.

برای این منظور پس از آماده‌سازی محیط کشت درون ارلن مناسب، به مدت ۱۵ دقیقه درون اتوکلاو و با دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سپس، در شرایط کاملا استریل، مخمر به میزان یک لوپ تلقیح شد و در دور ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری شد. در همه آزمایش‌ها از مایه تلقیح تهیه شده، به میزان ۴ درصد (حجمی/حجمی) استفاده شد.

روش‌های پیش‌فرآوری: برای آزادسازی مواد آلی موجود در لجن و افزایش بازدهی تولید اتانول، چهار روش پیش‌فرآوری اسیدی، بازی، حرارتی و اولتراسونیک بر روی لجن انجام شد که روش انجام هر یک در ادامه آمده است.

پیش‌فرآوری اسیدی: در روش اسیدی، اسیدیته نمونه با استفاده از سولفوریک اسید ۱ نرمال بر روی ۲ تنظیم شد. سپس، نمونه به مدت ۲ ساعت در دور ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ نرمال اسیدیته بر روی ۶ تا ۷ تنظیم شد (۱۰).

پیش‌فرآوری حرارتی: در روش حرارتی نمونه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد (۱۸).

پیش‌فرآوری قلیایی: در روش قلیایی ابتدا اسیدیته نمونه با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ نرمال بر روی ۱۱ تنظیم شد، بعد در دور ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری شد، و سپس، با استفاده از سولفوریک اسید ۱ نرمال اسیدیته بر روی ۶ تا ۷ تنظیم شد (۱۰).

پیش‌فرآوری اولتراسونیک: پیش‌فرآوری اولتراسونیک، با استفاده از دستگاه اولتراسوند به مدت ۶۰ دقیقه، تحت فرکانس ۲۴ کیلوهرتز، با انرژی ورودی ۳۰۰ وات و قطر پراب ۱۴ میلی‌متر انجام شد (۱۹).

اندازه‌گیری رشد بیومس سلولی روی لجن با روش CFU[۵]: در این پژوهش، برای بررسی رشد *ساکارومایسس سرویسیه* بر روی لجن از روش شمارش میکروارگانیسم‌ها برحسب تعداد کلونی‌های تشکیل شده که در اصطلاح روش CFU نام دارد، استفاده شد. ابتدا مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در محیط کشت حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن (۴۰ گرم بر لیتر) و لجن خام یا پیش‌فرآوری شده به عنوان ماده مغذی (۱۰ گرم جامد کل[۶] بر لیتر) در شرایط هوازی، دور ۱۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. غلظت سلول‌های زنده مخمر در زمان صفر و زمان ۳۶ ساعت پس از گرماگذاری به روش CFU اندازه گیری شد. در این روش در ۵ لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول ۰/۹ درصد نمک سدیم کلراید به ترتیب رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ از محیط کشت حاوی مخمر تهیه شد. مقدار ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به دو پلیت حاوی محیط کشت جامد منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از سپری شدن زمان رشد (۳۶ ساعت)، تعداد کلونی‌ها مشخص شد (۲۰).

فرآیند تخمیر: برای رشد مخمر به شکل بی‌هوازی و تولید اتانول در محیط کشت تخمیر از گلوکز به‌عنوان منبع کربن و لجن هوازی پیش‌فرآوری شده به‌عنوان ماده مغذی استفاده شد. از آن‌جا که لجن فاضلاب شامل مخلوط پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌های مختلف است، پیش از استفاده باید این میکروارگانیسم‌ها کاملاً غیر فعال شوند. برای این کار نمونه‌های لجن قبل از هر بار استفاده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. سپس، برای آزادسازی مواد مغذی موجود در لجن و افزایش بازدهی تولید اتانول، روش‌های پیش‌فرآوری یاد شده (اسیدی، بازی، حرارتی و اولتراسونیک) بر روی لجن انجام شد. ابتدا مقدار مشخصی از لجن پیش‌فرآوری شده یا لجن خام داخل ویال‌های ۱۰۰ سی‌سی ریخته شد و درب آن که متشکل از درپوش آلومینیومی و رابری بود، پرس شد. سپس داخل ویال توسط جریان گاز نیتروژن از طریق یک سر سرنگ شرایط بی‌هوازی برقرار شد. ویال حاوی لجن و محلول گلوکز مورد نیاز آن جداگانه استریل شده و سپس در شرایط کاملاً استریل محلول گلوکز به وسیله سرنگ به لجن افزوده شد. در نهایت، مایه تلقیح به مقدار ۴ درصد حجمی/حجمی به آن اضافه شد. ویال‌ها

درون دستگاه شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ درور بر دقیقه قرار گرفتند و در زمان‌های مشخص نمونه‌گیری انجام شد (۲۱).

روش تحلیل: به منظور اندازه‌گیری غلظت اتانول، نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. برای اندازه‌گیری اتانول از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای (FID[۷]) استفاده شد. ستون استفاده شده HP-INNOWAX با ۱۵ متر طول و ۰/۲۵ میلی‌متر قطر بود. برنامه دمایی برای تحلیل نمونه‌ها در دستگاه کروماتوگرافی گازی طراحی شد. طی تحلیل، دمای اولیه آون ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انتخاب شد. این دما با شیب دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا رسیدن به دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و بعد از ۱ دقیقه زمان اقامت با سرعت ۶۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای تزریق کننده، ستون و شناساگر به ترتیب بر روی ۱۹۰، ۱۸۰ و ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. از گاز نیتروژن با جریان ۳/۳ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. حجم نمونه تزریق شده به دستگاه کروماتوگرافی ۱ میکرولیتر بود. برای اندازه‌گیری گلوکز، از کیت گلوکز استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند و بعد ۴۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده که حاوی گلوکز بود، به همراه ۴ میلی‌لیتر محلول شناساگر کیت گلوکز دورن یک لوله آزمایش ریخته شدند. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (بن‌ماری) نگه‌داری شد. در نهایت، میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار استاندارد، غلظت گلوکز محاسبه شد. هر آزمایش با ۲ بار تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش شد.

نتایج

مقایسه انواع روش‌های پیش‌فرآوری لجن در افزایش میزان رشد بیومس سلولی و تولید اتانول: در بررسی میزان رشد بیومس سلولی مخمر، غلظت سلول پس از سپری شدن زمان رشد روی نمونه بدون پیش‌فرآوری با نمونه‌های پیش‌فرآوری شده مقایسه شد. نتایج آزمایش‌ها انجام شده در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از میزان رشد بیومس سلولی بر روی لجن پیش‌فرآوری شده به روش‌های اسیدی، قلیایی، حرارتی و اولتراسونیک، مناسب‌ترین روش پیش‌فرآوری برای افزایش بازدهی تولید اتانول انتخاب شد.

جدول ۲- میزان رشد بیومس سلولی مخمر روی لجن تر خام و پیش‌فرآوری شده پس از ۳۶ ساعت (غلظت سلولی در زمان صفر $۱/۲\times۱۰^{۵}$ سلول/ میلی‌لیتر)

روش پیش‌فرآوری	غلظت سلول (سلول/ میلی‌لیتر)
قلیایی	$۱/۵\times۱۰^{۶}$
اسیدی	$۷/۴\times۱۰^{۵}$
حرارتی	$۶/۰\times۱۰^{۵}$
اولتراسونیک	$۲/۵\times۱۰^{۵}$
بدون پیش‌فرآوری	$۱/۴\times۱۰^{۵}$

افزایش میزان رشد بیومس سلولی در لجن پیش‌فرآوری شده با سود ۱ نرمال نسبت به لجن خام قابل توجه است. بنابراین، برای رسیدن به بیش‌ترین میزان آزادسازی مواد مغذی موجود در لجن و تولید اتانول از روش قلیایی استفاده شد. فرآیند تخمیر در شرایط بی‌هوازی انجام گرفت و پس از ۴۸ ساعت غلظت اتانول به ۱۶/۳ گرم بر لیتر رسید که با توجه به غلظت گلوکز اولیه، میزان اتانول تولیدی ۰/۱۱ گرم اتانول به گرم قند اولیه بود.

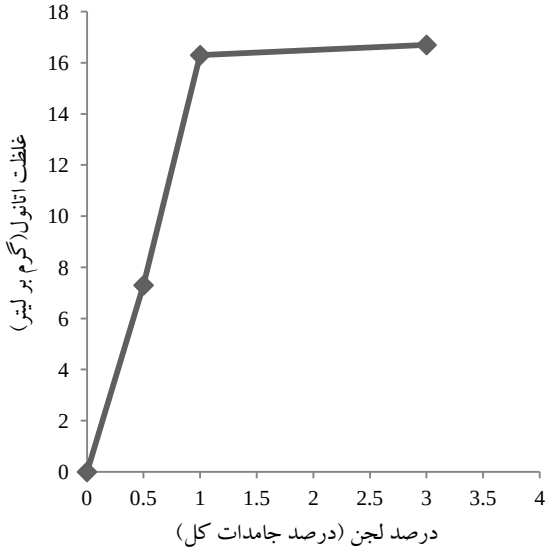
تأثیر خشک کردن لجن روی بازدهی تولید اتانول: میزان اتانول تولید شده از لجن تر بازدهی کمابیش پایینی داشت. بنابراین، از لجن خشک برای تولید اتانول و مقایسه آن با لجن تر استفاده شد. میزان اتانول تولید شده با استفاده از لجن خشک برای هر چهار روش پیش‌فرآوری اندازه‌گیری شد تا تأثیر نوع لجن بر بازدهی تولید مشخص شود. نتایج به دست آمده در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج نشان می‌دهد که برای لجن خشک نیز پیش‌فرآوری تأثیر مثبتی بر آزادسازی مواد مغذی لجن و در نتیجه افزایش بازدهی تولید اتانول داشته است. به طوری که با استفاده از پیش‌فرآوری قلیایی، ۸۰ درصد بازدهی تئوری (۰/۵۱ گرم اتانول به ازای هر گرم گلوکز) یعنی ۰/۴۱ گرم اتانول بر گرم گلوکز اولیه به دست آمد. شایان ذکر است که میزان تولید اتانول برای نمونه شاهد، یعنی تخمیر گلوکز در محیط کشت حاوی مواد مغذی استفاده شده در تهیه مایع تلقیح و در غیاب لجن نیز اندازه‌گیری شد، که این مقدار برابر با ۰/۴۵ گرم اتانول بر گرم گلوکز اولیه بود.

بهینه‌سازی درصد لجن: برای بهینه‌سازی لجن مصرفی و تعیین حد غلظتی از لجن که در آن می‌تواند به‌عنوان یک عامل محدودکننده در نظر گرفته شود، فرآیند تخمیر و تولید اتانول با درصدهای مختلف لجن انجام شد. به این منظور مقادیر ۰/۵، ۱ و ۳ درصد از لجن خشک پیش‌فرآوری شده به روش قلیایی به‌عنوان منبع مواد مغذی برای تولید اتانول استفاده شد. شکل ۱ تغییرات میزان تولید اتانول با درصدهای مختلف لجن را نشان می‌دهد.

با توجه به شکل ۱، بهترین غلظت لجن در محیط کشت را می‌توان ۱۰ گرم بر لیتر یا همان ۱ درصد در نظر گرفت. در محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد لجن غلظت اتانول تولید شده کمابیش پایین است و نشان‌دهنده کمبود ماده‌ی مغذی مورد نیاز برای رشد بیومس و تولید محصول است. با افزایش مقدار لجن به ۱ درصد (درصد جامدات کل)، تولید اتانول به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت ولی با افزایش مقدار لجن به ۳ درصد، تغییر چندانی در میزان تولید مشاهده نشد. بنابراین، می‌توان محیط کشت حاوی ۱۰ گرم بر لیتر (۱ درصد جامدات کل) لجن را در محیط کشت حاوی ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز برای تولید محصول مناسب دانست.

جدول ۳- میزان تولید اتانول با استفاده از لجن خشک خام و پیش‌فرآوری شده

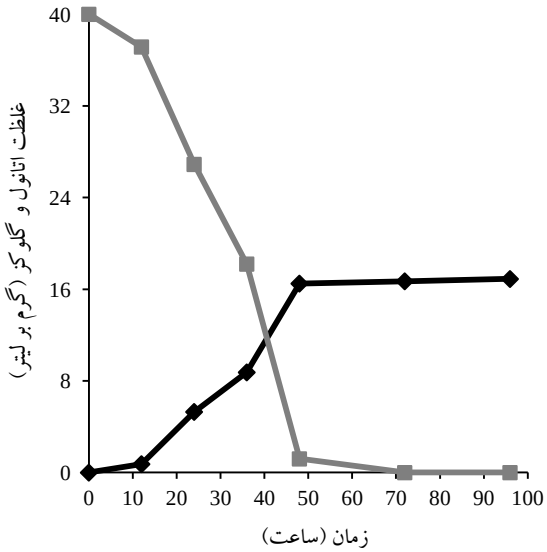
روش پیش‌فرآوری	گرم اتانول به گرم گلوکز اولیه
قلیایی	۰/۴۱ ±۰/۰۱
اسیدی	۰/۳۶ ±۰/۰۲
حرارتی	۰/۳۳ ±۰/۰۲
اولتراسونیک	۰/۳۱ ±۰/۰۲
بدون پیش‌فرآوری	۰/۲۴ ±۰/۰۱



شکل ۱- میزان تولید اتانول برای درصدهای مختلف از لجن خشک پیش‌فرآوری شده به روش قلیایی (پس از ۴۸ ساعت تخمیر)

روند تولید اتانول و مصرف گلوکز توسط *ساکارومایسس سرویسیه* در حضور لجن خشک پیش فرآوری شده: مقدار اتانول تولید شده و گلوکز باقیمانده در حین تخمیر (در بازه زمانی صفر تا ۹۶ ساعت) در محیط کشت حاوی ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز و ۱ درصد لجن خشک پیش‌فرآوری شده با سود ۱ نرمال اندازه گیری شد. نتایج در شکل ۲ ارایه شده است.

شکل ۲ نشان می‌دهد که، تولید اتانول و مصرف گلوکز پس از پایان فاز تأخیر شروع می‌شود. ماکزیمم مقدار اتانول در ۴۸ ساعت تولید شده است. به‌طوری که بعد از ۴۸ ساعت و در بازه زمانی ۴۸ تا ۹۶ ساعت، میزان تولید اتانول تغییر معناداری نداشته است، که ناشی از تمام شدن گلوکز است. بنابراین، زمان ۴۸ ساعت می‌تواند به‌عنوان، زمان بهینه فرآیند تخمیر در نظر گرفته شود. در این حالت ماکزیمم غلظت اتانول و مقدار بهره‌دهی به ترتیب ۱۶/۴ گرم بر لیتر و ۰/۳۴ گرم بر لیتر بر ساعت به دست آمد.



شکل ۲- میزان تولید اتانول (♦) و مصرف گلوکز (■) در زمان‌های مختلف توسط *ساکارومایسس سرویسیه* با استفاده از لجن پیش‌فرآوری شده به روش قلیایی

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه امکان تولید بیواتانول توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* با استفاده از لجن فاضلاب شهری به عنوان جایگزین موادی مغذی بررسی شد. بازدهی ۹۰ درصدی تولید اتانول با استفاده از محیط کشت حاوی لجن فاضلاب (۱۰ گرم بر لیتر) و گلوکز (۴۰ گرم بر لیتر)، نسبت به محیط کشت استاندارد (حاوی اجزای مورد استفاده در تهیه مایه تلقیح) حاصل شد، که این میزان در مقایسه با بازدهی تولید محصولات دیگر مانند حشره‌کش زیستی، مقدار قابل قبولی است (۱۲).

با استفاده از نمودار تولید اتانول و مصرف گلوکز، زمان ۴۸ ساعت بهترین زمان برای محصول‌گیری تعیین شد. با توجه به شکل ۲، حداکثر غلظت اتانول که ۱۶/۴ گرم بر لیتر است در زمان ۴۸ ساعت بوده که در این زمان غلظت گلوکز هم به صفر رسیده است، بنابراین برای محصول‌گیری زمان مناسبی انتخاب شده است.

از چهار روش پیش فرآوری اسیدی، قلیایی، حرارتی و اولتراسونیک برای آزادسازی مواد آلی و افزایش تولید اتانول استفاده شد. در روش‌های شیمیایی، معمولاً از اسید (فسفریک اسید) و قلیا (سدیم هیدروکسید) برای هیدرولیز لجن استفاده می‌شود (۹ و ۸). بیش‌ترین بازدهی مربوط به روش قلیایی بود که در آن از سود ۱ نرمال و رساندن اسیدیته نمونه تا ۱۱ استفاده شد، که میزان تولید محصول را نسبت به نمونه پیش‌فرآوری نشده، در حدود ۴۰ درصد افزایش داد. نتیجه به دست آمده در این پژوهش، نتایج مطالعات قبلی و مؤثر بودن پیش‌فرآوری بر افزایش آزاد سازی مواد مغذی موجود در لجن را تأیید می‌کند (۲۲).

برای بهینه‌سازی غلظت لجن، مقادیر ۰/۵، ۱ و ۳ درصد از لجن به‌عنوان منبع مواد مغذی برای تولید اتانول استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده غلظت بهینه لجن، ۱۰ گرم بر لیتر در محیط کشت نهایی تعیین شد. در واقع می‌توان گفت، غلظت مواد مغذی تا ۱۰ گرم بر لیتر به عنوان یک عامل محدود کننده رشد می‌تواند محسوب شود. این مقدار در مطالعاتی که از لجن فاضلاب برای تولید *باسیلوس تورنژنسیس* استفاده شده بود، ۲ تا ۲/۵ درصد گزارش شده است (۱۲ و ۲۳). این تفاوت می‌تواند ناشی از غلظت مواد مغذی موجود در لجن باشد که بسته به منبع فاضلاب و نوع فرآیندهای تصفیه آن می‌تواند متغیر باشد.

References

(1) Sivakumar G., Vail DR., Xu J., Burner DM., Ge X., Weathers PJ. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *Engineering in Life Sciences* 2010; 10 (1): 8- 18.

(2) Siqueira PF., Karp SG., Carvalho JC., Sturm W., Rodriguez-Leon JA., Tholozan JL., et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae at laboratory., pilot and industrial scales. *Bioresource Technology* 2008; 99 (17): 8156- 63.

(3) Chandel AK., Chan ES., Rudravaram R., Narasu ML., Rao LV., Ravindra P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2007; 2 (1): 014- 32.

(4) Najafi G., Ghobadian B., Tavakoli T., Yusaf T. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2009; 13 (6):1418- 27.

(5) Shojaosadati A., Asadollahi MA. *Industrial Biotechnology*. 3rd ed. Tehran: Tarbiat Modares University; 2010.

(6) Gnansounou E., Dauriat A. Ethanol fuel from biomass: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2005; 64 (11): 809- 21.

(7) Sarkar N., Ghosh SK., Bannerjee S., Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* 2012; 37 (1): 19- 27.

(8) Pandey A. *Handbook of Plant-Based Biofuels.* Washington: Taylor & Francis Group; 2008.

(9) Metcalf L., Eddy HP., Tchobanoglous G. *Wastewater Engineering: Treatment , Disposal, Reuse*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2003.

(10) Angerbauer C., Siebenhofer M., Mittelbach M., Guebitz G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology* 2008; 99 (8): 350-56.

(11) Chau ASM., Takabatake H., Satoh H., Mino T. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research* 2003; 37 (15): 3602- 11.

(12) Sachdeva V., Tyagi RD., Valero JR. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology* 2000; 42 (9): 211- 16.

(13) Ting C. H., Lee DJ. Production of hydrogen and methane from wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 2007; 32 (6): 677- 82.

(14) Tyagi RD., surampalli RY., Yan S., Tian C., Zhang CM., Kao BN. *Sustainable Sludge Management: Production of Value Added Products*. Reston, Va: American Society of Civil Engineers; 2009.

(15) Park YK., Sato HH. Fungal invertase as an aid for fermentation of cane molasses into ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 44 (4): 988- 9.

(16) Skotnicki ML. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 1981; 41 (4): 889- 93.

(17) APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed., American Public Health Association, Washington D.C.; 1989.

(18) Kim J., Park C., Kim TH., Lee M. ., Kim S., Kim SW., et al. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Bioscience and Bioengineering* 2003; 95 (3): 271- 5.

(19) Bougrier C., Albasi C., Delgenes JP., Carrere H. Effect of ultrasonic. thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering Process* 2006; 45 (8): 711- 8.

(20) Tirado-Montiel ML., Tyagi RD., Valero JR. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research* 2001; 35 (16): 3807- 16.

(21) Chunkeng HU., Qing Q., Peipei G. Medium optimization for improved ethanol production in very high gravity fermentation. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2011; 19 (6): 1017- 22.

(22) Beenyi X., Junxin L. pH dependency of hydrogen fermentation from alkali pretreated sludge. *Chinese Science Bulletin* 2006; 51 (4): 399- 404.

(23) Vidyarthi AS., Tyagi R. D., Valero J. R., Surampalli RY. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* 2002; 36 (19): 4850- 60.

---

[1]- *Saccharomyces cerevisiae*
[2]- Biopesticide
[3]- Flocculants
[4]- LECO CHNS 923 analyzer
[5]- Colony forming unit
[6]- Total solid
[7]- Flame Ionization Detector

Application of activated sludge as a complementary in bioethanol production

Hamzeh Imani*
M.Sc. Student of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, i.hamze@yahoo.com
Azam Jeihanipour
Assistant Professor of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, a.jeihanipour@gmail.com
Mohammad Ali Asadollahi
Assistant Professor of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, ma.asadollahi@ast.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: Excess activated sludge contains large amounts of components such as phosphorus, nitrogen, and sulfur which can theoretically be used as a nutrient source in fermentation processes to produce value added materials. In the present study, the possibility to grow *Saccharomyces cerevisiae* and produce ethanol on pretreated and untreated activated sludge as a nutrient source was investigated.

Materials and methods: In this article, *Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK 113-7D, was used as an ethanol producer microorganism. In order to release the organic matter of the sludge and increase the efficiency of ethanol production, four pretreatments, i.e. acidic, alkaline, thermal and ultrasonic were performed on the sludge. The effectiveness of each pretreatment on biomass growth at aerobic conditions was measured by CFU method. Moreover, the yield of ethanol at anaerobic conditions was measured using gas-chromatography.

Results: The highest biomass yield of yeast on the wet sludge at aerobic conditions was obtained after alkaline pretreatment, in which the biomass concentration increased from 1.2×10^5 (CFU/ml) to 1.5×10^6 (cell/ml) after 36 hour of cultivation. At anaerobic conditions, the yield of ethanol on alkaline pretreated sludge was 0.11 g ethanol/g initial glucose. Additionally, by drying the sludge and performing the alkaline pretreatment, the ethanol production was increased up to 0.41 g ethanol/g initial glucose.

Discussion and conclusion: The results showed that the excess activated sludge from wastewater treatment plants can be used as nutrient source for ethanol production. However, it needs to be treated and alkaline pretreatment of dried sludge is suggested to produce a high yield of ethanol.

Key words: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Activated sludge, Pretreatment

* Corresponding author
Received: November 16, 2013 / **Accepted:** April 20, 2014