

## Magdalena LECH, Anna TRUSEK – HOŁOWNIA

e-mail: magdalena.lech@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprocusowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wroclaw

## Biodegradacja serwatki w bioreaktorze membranowym

## Wstęp

Reaktor membranowy jest rodzajem reaktora działającego w trybie ciągłym, który ma na celu immobilizację objętościową katalizatora. W bioreaktorze membranowym, za sprawą filtra membranowego ułożonego na strumieniu wylotowym, ma miejsce zatrzymanie (zatrzymanie) komórek z możliwością ich częściowej recyrkulacji. Prowadzi to do powstania wysokiej koncentracji komórek w strefie bioreakcji, a tym samym zwiększenia wydajności procesu względem klasycznego reaktora przepływowego działającego w analogicznych warunkach. Stosowanie tego typu rozwiązań w technologiach procesów fermentacyjnych niesie wiele korzyści: niskie koszty inwestycyjne i eksploatacyjne, neutralność względem pożywki i mikroorganizmów, i co bardzo ważne, wysoką selektywność separacyjną.

Biodegradacja poprocesowej serwatki powstałej po separacji cennych białek w niej zawartych [Sanmartin i in., 2012] może z powodzeniem odbywać się we wspomnianym bioreaktorze membranowym. Bakterie rodzaju *Lactobacillus* oraz *Lactococcus* z grupy GRAS [2016] są szczepami, które efektywnie obniżają zawartość laktozy. Laktoza jest właśnie głównie odpowiedzialna za wysokie wskaźniki ChZT i BZT serwatki. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska [2014] wskaźnik ChZT w takim rodzaju ścieków powinien zostać obniżony do 125 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, natomiast w serwatce poprodukcyjnej wartość ta sięga 90 gO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

W pracy przedstawiono opis procesu, mającego na celu obniżenie zawartości cukru mlecznego w ściekach pochodzących z przemysłu mleczarskiego, z wykorzystaniem reaktora membranowego oraz szczepu *Lactobacillus rhamnosus*.

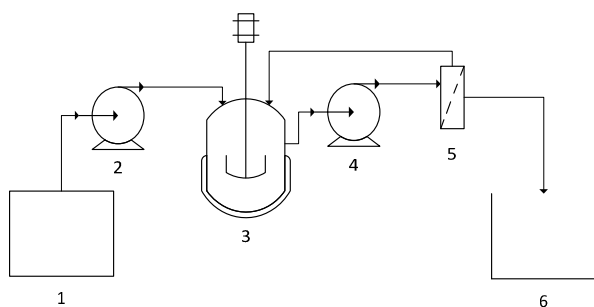
## Badania doświadczalne

## Materiały.

Biodegradacji poddawano medium serwatkowe rozcieńczone pożywką mineralną o składzie: 5 g L<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONa, 1 g L<sup>-1</sup> Tween, 2 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g L<sup>-1</sup> cytrynian trzyamonowy, 0,2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O [De Man i in., 1960].

## Aparatura.

Hodowla była prowadzona w bioreaktorze mieszalnikowym o objętości roboczej 0,4 L (szybkość mieszania 70 rpm przy średnicy mieszadła łopatkowego 4 cm) termostatowanym przy 38°C. Na strumieniu wylotowym umieszczono kanałową membranę ceramiczną – 5 o średnicy porów 0,45 μm (*Tami Industries*, Francja) i powierzchni filtracyjnej 0,013 m<sup>2</sup>. Schemat instalacji przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Schemat reaktora membranowego. 1 – sterylny zbiornik poprocesowej serwatki, 2 – pompa dozująca, 3 – termostatowany reaktor mieszalnikowy, 4 – perystaltyczna pompa odbierająca płyn pochodowlany, 5 – membrana mikrofiltracyjna, 6 – zbiornik permeatu (ścieku o obniżonej zawartości laktozy)

Przed rozpoczęciem procesu o charakterze ciągłym przez 24 h prowadzono hodowlę startową w systemie okresowym. Medium początkowe stanowiła serwatka o stężeniu laktozy 4 g L<sup>-1</sup>. Wykorzystywany szczep – *Lactobacillus rhamnosus* pochodził z kolekcji Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (PCM 492, *Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnych*).

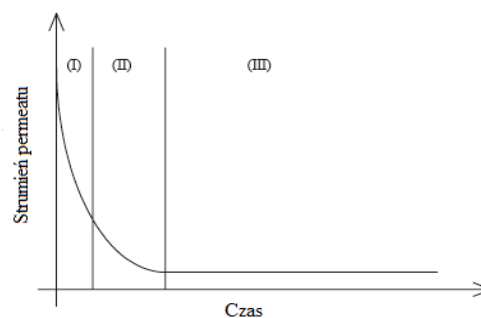
## Metodyka.

Stężenie laktozy oznaczano za pomocą metody kolorymetrycznej z wykorzystaniem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) [Miller, 1956], bazując na krzywej standardowej o równaniu C<sub>LC</sub> [g L<sup>-1</sup>] = 2,18·Abs(550). Stężenie komórek (X) szczepu *Lactobacillus rhamnosus* oznaczono za pomocą analizy spektrofotometrycznej przy długości fali λ = 550 nm wykorzystując krzywą standardową wykonaną metodą oznaczania suchej masy o równaniu

$$X \text{ [g L}^{-1}\text{]} = 4,13 \text{ Abs}(550) \quad (1)$$

## Wyniki i dyskusja

W celu redukcji spadku (zmienności) strumienia permeatu w trakcie procesu ciągłego doprowadzono go do stanu quasi-stacynnego spadku. W tym celu co kilka godziny mierzono objętościowe natężenie przepływu strumienia wylotowego, gdy zmiana była mniejsza niż 1% rozpoczynano właściwy proces (w dalszym ciągu stan procesu był nieustalony). Za stan ustalony uznawano ten w którym zmiana stężenia laktozy w strumieniu wylotowym była mniejsza niż 1% dla trzech pomiarów z rzędu.



Rys. 2. Spadek strumienia permeatu w separacji mikro- i ultrafiltracyjnej. I – wstępny, szybki spadek, II – długoterminowy, wolny spadek, III – quasi-stacynny, ustalony strumień permeatu [Nigram i in., 2008]

W tym stanie (uzyskanym po ok. 72 h) strumień permeatu wynosił średnio 7,30·10<sup>-2</sup> L h<sup>-1</sup>. Objętość reaktora wynosiła 0,4 L, a czas przebywania τ wynosił 5,5 h i był zdefiniowany jako

$$\tau = \frac{V_{R-a}}{Q_{Per}} \quad (2)$$

gdzie:

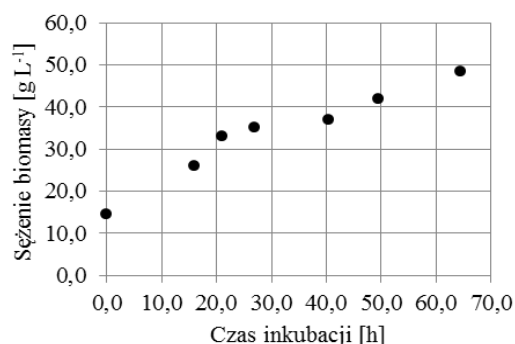
 $Q_{Per}$  – strumień permeatu, [L h<sup>-1</sup>] $V_{R-a}$  – objętość reaktora, [L]

Równoległe do procesu biodegradacji w reaktorze membranowym prowadzono proces w klasycznym reaktorze mieszalnikowym (o identycznej budowie i warunkach procesowych, pozbawionym jedynie membrany separującej mikroorganizmy). Przewidywano, że stosowanie membrany mikrofiltracyjnej spowoduje zwiększenie wydajności procesu. Wyniki uzyskane dla obu typów reaktora podano w tab. 1.

Tab. 1. Porównanie wyników uzyskanych przy  $\tau = 5,5$  h dla reaktorów działających w trybie ciągłym: membranowego oraz klasycznego mieszalnikowego.

Rodzaj reaktora	Stężenie laktozy na wlocie [g L <sup>-1</sup> ]	Stężenie laktozy na wylocie [g L <sup>-1</sup> ]	Ubytek laktozy [g L <sup>-1</sup> ]	Stężenie biomasy w reaktorze [g L <sup>-1</sup> ]
klasyczny	6,82	3,11	3,71	6,37
membranowy	7,86	1,45	6,41	48,49

Ponieważ pracę ciągłą reaktora rozpoczynano po 24-godzinnej inkubacji w reaktorze działającym w trybie okresowym, stężenie początkowe biomasy wynosiło 14,5 g L<sup>-1</sup>. Przez 64 godziny stężenie bakterii w bioreaktorze membranowym, za sprawą membrany, wzrosło ponad 3-krotnie, podczas gdy w klasycznym, mieszalnikowym ponad 2-krotnie zmalało (stężenie w tym reaktorze po 24-godzinnej inkubacji wynosiło 13,9 g L<sup>-1</sup>), gdzie szybkość namnażania była znacznie mniejsza niż wymywania. W stanie ustalonym koncentracja biomasy w takim przypadku jest za niska i proces staje się nieefektywny. Na rys. 3 przedstawiono wykres wzrostu stężenia biomasy w trakcie hodowli.



Rys. 3. Stężenie bakterii w trakcie trwania hodowli w reaktorze membranowym (stan nieustalony)

Ponieważ prowadzone badania traktowano jako wstępne, w procesie nie stosowano częściowego odbioru biomasy (*bleeding*). Jest oczywiste, że w przypadku prowadzenia biodegradacji w większej skali, należałoby podzielić strumień wylotowy na dwa i poza permeatem należałoby odbierać część zawracanego (w postaci retentatu) strumienia zateżonej biomasy. Zastosowanie tego zabiegu jest konieczne w celu usunięcia części bakterii na rzecz bardziej aktywnych i wydajniejszych w procesach metabolicznych komórek powstających w fazie logarytmicznego wzrostu. Zabieg ten pozwala także na pracę w stanie ustalonym.

Należy w związku z tym wprowadzić współczynnik podziału strumieni, który w przypadku porównywania reaktorów pracujących z takim samym czasem przebywania wynosi [Trusek-Hołownia, 2011]

$$\frac{C_{Wy,S,BM}}{C_{Wy,S,Klas}} = \frac{\mu_{max} \tau - 1}{\mu_{max} \tau \Psi - 1} \quad (3)$$

gdzie:

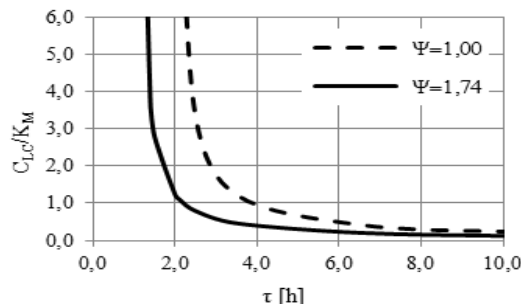
$C_{Wy,S,BM}$  – stężenie wylotowe z reaktora membranowego, [g L<sup>-1</sup>]

$C_{Wy,S,Klas}$  – stężenie wylotowe z reaktora klasycznego [g L<sup>-1</sup>].

$\Psi$  – współczynnik podziału strumieni [-];

$\mu_{max}$  – maksymalna szybkość wzrostu biomasy [h<sup>-1</sup>],

Obliczony współczynnik podziału strumieni (intensyfikacji) jednoznacznie wskazuje, że zastosowanie membrany wraz z częściowym odbiorem biomasy skutkuje wzrostem szybkości przemian, co powoduje skrócenie czasu przebywania. Rys. 4 przedstawia zależność  $C_{LC}/K_M$  od czasu przebywania  $\tau$  dla reaktora membranowego ( $\Psi = 1,74$ ) i klasycznego ciągłego, dla którego  $\Psi = 1$ .

Rys. 4. Wpływ współczynnika intensyfikacji  $\Psi$  na czas przebywania serwatki w procesie ciągłej biodegradacji w bioreaktorze membranowym

## Wnioski

Immobilizacja szczepu *Lactobacillus rhamnosus* w bioreaktorze membranowym zdecydowanie zwiększa efektywność procesu. Redukcja laktozy, przy tym samym czasie przebywania, jest prawie dwukrotnie większa (42%) w przypadku reaktora membranowego.

Gęstość optyczna ( $OD_{550}$ ) w strumieniu permeatu wynosi zero, a stężenie laktozy niewiele powyżej 1 g L<sup>-1</sup>. Zastosowanie niewiele dłuższego czasu przebywania może skutkować powstaniem strumienia wolnego od laktozy, który bez konsekwencji (spełnia normy) mógłby zostać wydalony do środowiska wodnego.

Warto podkreślić, że szczep ten jest w stanie produkować kwas mlekowy z obecnej w serwatce laktozy [Rattanachakunsoon i Phumkhachorn, 2010]. Pojawia się więc możliwość dalszego rozwijania opisanego procesu w kierunku produkcji tego cennego składnika przy jednoczesnej utylizacji szkodliwej laktozy.

## OZNACZENIA:

BZT – biologiczne zapotrzebowanie na tlen, [g L<sup>-1</sup>]

ChZT – chemiczne zapotrzebowanie na tlen, [g L<sup>-1</sup>]

$C_{LC}$  – stężenie równowagowe laktozy, [g L<sup>-1</sup>]

$K_M$  – stała Monoda [g L<sup>-1</sup>]

$\mu_{max}$  – logarytmiczna szybkość wzrostu, [h<sup>-1</sup>]

$\lambda$  – długość fali świetlnej, [nm]

## LITERATURA

- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe, E.M., (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 30-35. 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
- GRAS – *Generally Recognized as Safe*, (2016). U.S. Food and Drug Administration (06.2017) <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS>
- Miller C.N., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 81, 426-428
- Nigam M. O., Bansal B., Chen X. D., (2008). Fouling and cleaning of whey protein concentrate fouled ultrafiltration membranes. *Desalination*, 218, 313-322. DOI: 10.1016/j.desal.2007.02.027
- Rattanachakunsoon P., Phumkhachorn P., 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals Biol. Res.*, 1(4), 218-228
- Rozporządzenie MŚ (2014). w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego. Dz.U. z dnia 16 grudnia 2014, poz. 1800
- Sanmartin B., Diaz O., Rodriguez-Turienzo L., Cobos A., (2012). Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Res.*, 105, 186-192. DOI:10.1016/j.smallrumres.2011.11.020
- Siso M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.*, 57, 1-11. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00036-3
- Trusek-Hołownia A., (2011). *Membrane bioreactors. Models for bioprocess design*. Desalination Pub., USA

**Badania prowadzone w ramach projektu 0401/0251/16 ze środków statutowych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.**