

Magdalena LECH, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

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

Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Biodegradacja serwatki koziej w bioreaktorze działającym w trybie ciągłym

Wstęp

Serwatka będąca produktem ubocznym generowanym przez przemysł mleczarski jest medium zawierającym duże ilości laktozy i białka. Wartości te mierzone metodami Lowry'ego [Lowry i in., 1951] dla białka oraz cukrów redukujących DNS [Miller, 1959] dla laktozy, wynoszą odpowiednio od 9 do 14 kg m⁻³ oraz od 39 do 45 kg m⁻³. Z tak wysokiej zawartości składników organicznych wynika wysoki wskaźnik ChZT, który wynosi 80 kg m⁻³ [Gonzales Siso, 1996]. Serwatka jest zakwalifikowana zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska [2014] jako substancja szczególnie szkodliwa dla środowiska wodnego i musi zostać poddana utylizacji przed wprowadzeniem do zbiorników wodnych. Wartość wskaźnika ChZT w takim medium powinna wynosić 125 mgO₂ dm⁻³.

Mając na uwadze względy środowiskowe, jak i zalety białek serwatkowych celowe jest ich maksymalne odzyskanie i zagospodarowanie, podobnie jak i laktozy. Efektywnymi do tego technikami są procesy membranowe [Sanmartin i in., 2012; Konrad i in. 2012]. Niemniej należy się liczyć, że strumienie odpadowe powstające w wyniku separacji nadal będą posiadały na tyle wysoki ładunek, że będzie on musiał zostać poddany utylizacji.

Do biodegradacji serwatki wykorzystywany jest m.in. szczep *Bacillus licheniformis*, którego efektywność przekształcania związków organicznych zawartych w serwatce w hodowlach okresowych została zbadana i opisana w literaturze [Lech i Trusek-Hołownia 2013].

W niniejszej pracy zaprezentowano opracowany proces biodegradacji serwatki koziej, pochodzącej z produkcji serwów podpuszczkowych, w bioreaktorze mieszalnikowym działającym w sposób ciągły.

Materiały i metody

Pożywka, będąca jednocześnie biodegradowanym medium, to serwatka o różnym stopniu rozcieńczenia pochodząca z mleczarni *Sery Łomnickie – Kozia Łąka*, Polska. Rozcieńczenie zostało dobrane na podstawie wyników uzyskanych z hodowli okresowych, gdzie największą właściwą szybkość wzrostu *B.licheniformis* (PCM-1849, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN, Wrocław), odnotowują się na podłożu zawierającym 2 kg dm⁻³ laktozy. Aby pozbyć się naturalnej mętności, która uniemożliwiałaby monitoring stężenia komórek, poddawano ją klarowaniu wapniowo - termicznemu [Rinn i in. 1990]. Wstępnie wirowano przez 30 minut w 4°C (przy 9508 G), dodawano 1,2 kg m⁻³ CaCl₂ w temperaturze 2÷5°C, następnie 2M NaOH do uzyskania pH 7,3. Serwatkę inkubowano przez 8 minut w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu ponownie wirowano. Uzyskano klarowną serwatkę o niezmiennym składzie białkowym i cukrowym.

Analizy zawartości białka w roztworach dokonywano przy pomocy metody Lowry'ego, bazując na krzywej standardowej na albuminie wołową o równaniu:

$$C_B [\text{kg m}^{-3}] = 0,396 \text{ Abs (750)} \quad (1)$$

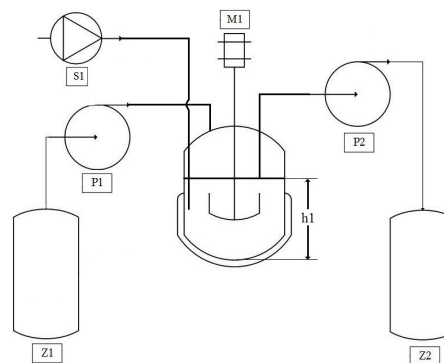
Laktozę oznaczano przy pomocy metody kolorymetrycznej z wykorzystaniem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) i bazującej na redukujących właściwościach laktozy, z wykorzystaniem krzywej standardowej o równaniu:

$$C_L [\text{kg m}^{-3}] = 2,360 \text{ Abs (550)} \quad (2)$$

Stężenie komórek (X) szczepu biodegradującego oznaczono przy pomocy analizy spektrofotometrycznej przy długości fali $\lambda=550$ [nm] (która została wybrana na podstawie zbadania widma spektrofotometrycznego próbki pohodowlanej, zawierającej biomase) wykorzystując krzywą standardową wykonaną metodą suchej masy o równaniu:

$$X [\text{kg m}^{-3}] = 0,389 \text{ Abs (550)} \quad (3)$$

Stężenie laktozy w zbiorniku dozującym (Z1) uzyskiwano poprzez odpowiednie rozcieńczenie serwatki wodą destylowaną po sterylizacji. Schemat układu przedstawiono na rys. 1. Zamkniętą sterylną, mieszaninę serwatkową dozowano przy pomocy pompy zębatej P1 do termostowanego (przy pomocy płaszcza grzejnego, w temperaturze 37°C), zamkniętego reaktora zaopatrzonego w mieszadło mechaniczne M1, które zapewniało jednorodność stężeniową hodowli. Mieszadło pracowało z intensywnością 2,3·10⁻³ G. Odbiór mieszaniny pohodowlanej następował w momencie osiągnięcia wysokości h1, czyli króćca wlotowego do przewodu zasysającego pompy odbierającej P2. Hodowla była stale napowietrzana przy udziale sprężarki S1, a strumień powietrza wynosił 2,5·10⁻⁵ m³ s⁻¹.

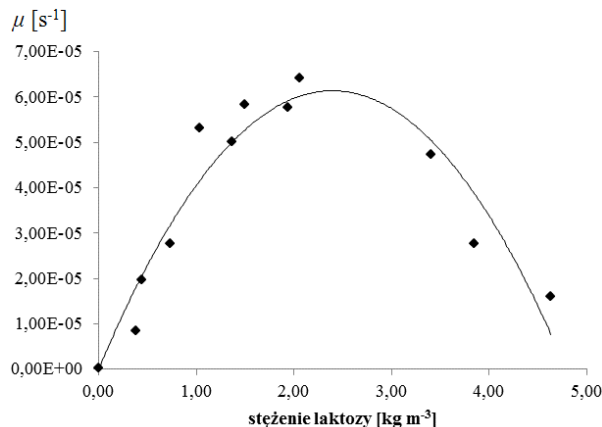


Rys. 1. Schemat układu do prowadzenia procesu ciągłego w bioreaktorze mikrobiologicznym.

Czystość hodowli monitorowano poprzez codzienne posiewy na płytce agarowej. Eksperymentalnie zbadano, iż stan ustalony następował po wymianie czterech objętości reaktora, która wynosiła 2,6·10⁻³ m³.

Wyniki i ich omówienie

Ustalając parametry procesowe biodegradacji ciągłej bazowano na wynikach uzyskanych z hodowli okresowej na podłożu serwatkowym [Lech i Trusek-Hołownia, 2013], które wskazywały, iż po przekroczeniu stężenia laktozy 2 kg m⁻³ i/lub białek ok. 0,6 kg m⁻³ obserwuje się spadek wartości właściwej szybkości wzrostu bakterii (Rys. 2).



Rys. 2. Właściwa szybkość wzrostu biomasy w hodowli okresowej [Lech i Trusek – Hołownia, 2013]

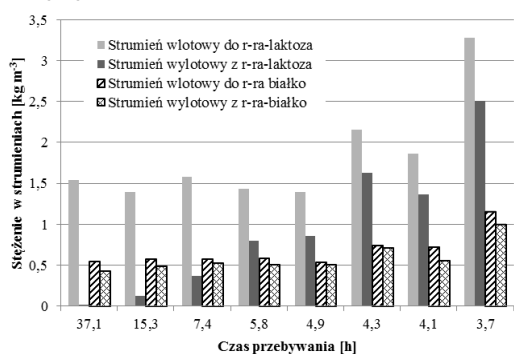
Zależność tę z dobrą dokładnością opisano równaniem *Luonga* [1986]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_L}{K_m + C_L} \left[1 - \frac{C_L}{K_i} \right]^n = \frac{2,29 \cdot 10^{-4} C_L}{4,79 + C_L} \left[1 - \frac{C_L}{6} \right]^{1,1} \quad (4)$$

uzyskując następujące wartości stałych:

$$K_i = 6 \quad K_m = 4,79 \text{ kg m}^{-3} \quad n = 1,1 \quad \mu_{\max} = 2,29 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Maksymalna wartość właściwej szybkości wzrostu oscylowała około $6,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Wartości te wzięto pod uwagę przy planowaniu procesu ciągłego.



Rys. 3. Stężenie laktozy i białka w strumieniu dozującym oraz wylotowym z reaktora.

Badania w procesie ciągłym prowadzono w zakresie czasów przebywania od 3,7 do 37,1 h. Dozowano serwatkę zawierającą od 1,4 do 3,3 kg m^{-3} laktozy i od 0,5 do 1,2 kg m^{-3} białek serwatkowych. Na Rys. 3 przedstawiono uzyskany rozkład stężeń dla laktozy i białek serwatkowych. Szacując na podstawie tych stężeń wartość ChZT, norma pozwalająca na wypuszczenie strumienia do środowiska zostało uzyskana już po czasie przebywania w reaktorze trwającym 37 h, gdzie ChZT wynosiło $7,6 \text{ mgO}_2 \text{ dm}^{-3}$

Ponieważ wzrost komórek odbywa się głównie na bazie źródła węglowego jakim jest laktoza, właściwą szybkość wzrostu biomasy zaprezentowano w odniesieniu do stężenia laktozy – rys. 4. Uzyskana zależność w swym przebiegu jest bardzo zbliżona do krzywej otrzymanej z wyników z hodowli okresowych. Zgodnie z teorią [Ledakowicz, 2011] uzyskano punkty jedynie na ramieniu wznoszącym, stąd do opisu kinetycznego procesu zastosowano równanie *Monoda*:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_L}{K_m + C_L} = \frac{8,52 \cdot 10^{-5} C_L}{0,45 + C_L} \quad (5)$$

uzyskując następujące wartości stałych:

$$K_m = 0,45 \text{ kg m}^{-3} \quad \mu_{\max} = 8,52 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

a zakres stosowności równania wynosił od 0 do 2,2 kg m^{-3} laktozy.

Szybkość biodegradacji obliczona dla laktozy oraz białka potwierdza słuszność założenia, iż wzrost szczepu ma miejsce głównie za sprawą metabolizmu laktozy. Niewielki wzrost szybkości przekształcania białka wraz ze wzrostem jego stężenia, może potwierdzać doniesienia literaturowe, iż szczep *B. licheniformis* jest zdolny do oddychania azotanowego [Singleton, 1999], jednak metabolizm laktozy jest dominujący.

Współczynnik wydajności biomasy względem laktozy wyniósł:

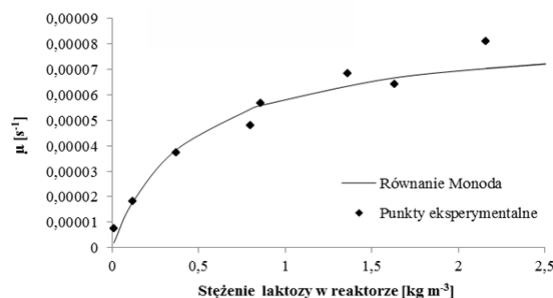
$$Y_{XL} = \frac{X_t - X_0}{c_{L,0} - c_{L,t}} = 0,3195 \quad (6)$$

Ostatecznie zależność szybkości przekształcania laktozy od stężenia komórek zdolnych do biodegradacji i substratu wyrażono za pomocą równania:

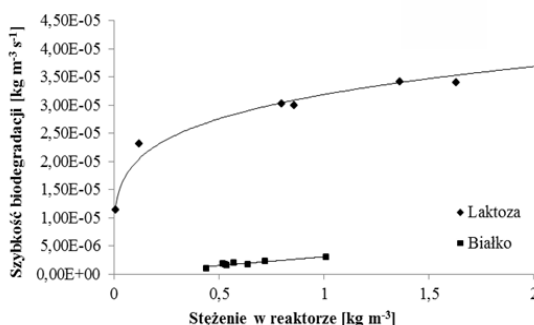
$$r_L = \frac{\mu(L)[X]}{Y_{XL}} = \frac{8,52 \cdot 10^{-5} c_L [X]}{0,3195 (c_L + 0,45)} \quad (7)$$

Wnioski

Serwatka, z punktu widzenia przemysłu mleczarskiego jest bardzo uciążliwym medium – powstaje w dużych ilościach oraz wymaga



Rys. 4. Właściwa szybkość wzrostu biomasy w reaktorze działającym w trybie ciągłym (punkty – wartości pomiarowe, linia – zależność opisana równaniem kinetycznym)



Rys. 5. Szybkość przekształcania składników organicznych obecnych w serwatce, metabolizowanych

kosztownej utylizacji. Jednocześnie jest źródłem cennych białek o działaniu prozdrowotnym. Ich odzysk jednak nie obniża znacząco ładunku łatwo przyswajalnego węgla organicznego jaki za sobą niesie. Wskazane jest, aby obecna w serwatce laktozę odzyskiwać np. za pomocą nanofiltracji [Le i in, 2014], a utylizować wyłącznie strumienie uboczne. Do tego celu można wykorzystać intensywnie przebiegający proces w bioreaktorze ciągłym z wykorzystaniem szczepu *Bacillus licheniformis*.

Dobry szczep skutecznie biodegraduje obecna w serwatce laktozę i w sytuacji zastosowania długich czasów przebywania (ponad 30 h) obserwuje się niemal 100% spadek zawartości laktozy w strumieniu wylotowym w stosunku do zasilającego (Rys. 3).

OZNACZENIA:

- ChZT – chemiczne zapotrzebowanie na tlen, mg dm^{-3}
- C_L – stężenie w reaktorze laktozy, kg m^{-3}
- C_B – stężenie w reaktorze białka, kg m^{-3}
- c – stężenie, kg m^{-3}
- k – stała szybkości reakcji, $\text{s}^{-1} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$
- K_m – stała *Monoda*, kg m^{-3}
- K_i – stała w równaniu inhibicji *Luonga* [-]
- n – stała w równaniu inhibicji *Luonga* [-]
- r – szybkość reakcji, $\text{kg m}^{-3} \text{ s}^{-1}$
- X – stężenie biomasy, kg m^{-3}
- Y_{XL} – współczynnik wydajności biomasy (względem laktozy) [-]
- $\mu(L)$ – właściwa szybkość wzrostu zależna od laktozy, s^{-1}
- μ – właściwa szybkość wzrostu, s^{-1}
- μ_{\max} – logarytmiczna szybkość wzrostu, s^{-1}
- λ – długość fali świetlnej, nm

LITERATURA:

Bugg T., Foght J.M., Pickard M.A., Gray M.R., 2000. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. *Appl. Env. Microbiol.*, **66**, 5387-5392. DOI: 10.1128/AEM.66.12.5387-5392.2000

Candow D.G., Burke N.C., Smith-Palmer T., and Burke D.G., 2006. Effect of whey and soy protein supplementation combined with resistance training in young adults. *Int. J. Sport Nutr. Exercise Metabol.*, **16**, 233-244

Konrad G., Kleindchmidt T., Faber W., 2012. Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. *Int. Dairy J.*, **22**, 73-77

Le T.T., Caballita A.D., Bui V.M., 2014. Membrane separations in dairy processing. *J. Food Res. Technol.*, **2** (1), 1-14

- Lech M., Trusek – Hołownia A., 2013. Biodegradacja serwatki z użyciem szczepu *B.licheniformis*. *Inż. Ap. Chem.*, **52**, nr 5, 443-444
- Ledakowicz S., 2011. *Inżynieria biochemiczna*. WNT, Warszawa
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-270
- Luong J. H. T., 1986, Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition, *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 2, 242-248
- Mawson. A. J, Bioconversion for whey utilization and waste abatement, 1994, *Biores. Tech.*, **47**, 195-203. DOI: 10.1016/0960-8524(94)90180-5
- Miller C.N., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-428
- Morr C.V, Ha E. Y.W., 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 431-476. DOI: 10.1080/10408399309527643
- Rinn J-C., Morr C.V., Seo A. Surak J.G., 1990. Evaluation of nine semi-pilot scale whey pretreatment modifications for producing whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, **55**, 510-515. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb06798.x
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 r. 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. 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
- Singleton P., 1999. *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. John Wiley & Sons, England
- Siso M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Tech.*, **57**, 1-11. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00036-3

Projekt współfinansowany ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii

Rui C. MARTINS¹, Ana C. OLIVEIRA², Rosa M. QUINTA-FERREIRA¹

e-mail: martins@eq.uc.pt

¹ CIEPQPF – Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

² Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, Coimbra, Portugal

Integrating coagulation and Fenton's oxidation for pharmaceutical effluents treatment

Introduction

The search for new drugs able to fulfil the health requirements of modern society is pushing pharmaceutical industries to design and produce even more complex molecules. Unavoidably, during these processes a large amount of wastewater with a complex composition is produced [Martínez *et al.*, 2003]. Effluents from pharmaceutical industry are originated from different operating steps such as fermentation, chemical synthesis, extraction and formulation. This leads to a highly organically charged stream whose characteristics dramatically change depending on the type of pharmaceutical which is being produced. One of the consequences is that the traditional biological systems usually applied for wastewater treatment are inefficient for this kind of effluent [Tekin *et al.*, 2006]. In this context, chemical systems such as the advanced oxidation processes (AOP) are called as alternatives to handle with these biorefractory wastewaters. Among the AOPs, Fenton's peroxidation is industrially preferable since it operates at room conditions of pressure and temperature, does not need sophisticated equipment and requires safe and easy to handle reactants.

Although several works are reported in literature regarding the degradation of synthetic solutions of pharmaceuticals through AOPs [Andreozzi *et al.*, 2003; Dantas *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2013], data are still scarce regarding the abatement of actual wastewaters [Monteagudo *et al.*, 2013]. Fenton's process was able to remove up to 56.4% of COD from a pharmaceutical wastewater [Martínez *et al.*, 2003]. Moreover, Tekin *et al.* [2006] verified that Fenton's is able to improve biodegradability leading to an effluent capable to be further refined in an aerobic systems.

The application of microwave to assist Fenton's peroxidation proved to improve iron sludge settling and the effluents' biodegradability [Yang *et al.*, 2009].

Monteagudo *et al.* [2013] reached up to 84% of TOC removal

when applying a ferrioxalate-assisted solar/photo-Fenton system. One of the main disadvantages of this technology is related with the amount of dissolved iron required to catalyse the oxidation reaction that will lead to a large amount of sludge whose management is an environmental issue.

In this context, the aim of the present research is to analyse the activity of several solid catalysts in Fenton peroxidation of a real pharmaceutical wastewater and compare them with the traditional iron sulphate salt. Moreover, the integration of this oxidation system with a pre-coagulation step was evaluated. Besides, the impact of light on the treatment efficiency was still assessed. The final goal was to provide reliable data so that the industrial stakeholders could decide for a solution for their environmental problem.

Materials and Methods

Catalysts preparation and characterization

Four solid catalysts were selected: a commercial (N-150 composed by Fe₂O₃ – MnO_x, provided by Clariant Produkte GmbH); a laboratory prepared (Fe-Ce-O 70/30) and two low cost materials (red volcanic rock and iron shavings constituted by zero valent iron). Fe-Ce-O 70/30 was obtained by the co-precipitation of a mixed solution of cerium and iron nitrates precursors (with a molar proportion between Fe/Ce of 70/30). The precipitate was washed, dried and calcinated during 2h at 300°C. The detailed procedure is described elsewhere [Martins *et al.*, 2010].

Atomic absorption (Perkin-Elmer 3300) was used to determine the chemical composition of the low cost materials (after acid digestion). Elemental analysis was carried out to determine the catalysts content in C, H, N and O (Fisons Instruments EA 1108 CHNS-O). Surface area was obtained through the BET method (ASAP 2000, Micromeritics). X-ray diffraction (Philips PW 3040/00 X'Pert) was used to infer about the materials structural characteristics.