

# BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DAS INDÚSTRIAS DE DERIVADOS LÁCTEOS PRÉ-TRATADAS COM ENZIMAS HIDROLÍTICAS

<sup>1</sup>Adriano Aguiar Mendes, <sup>1</sup>Grazielle dos Santos Silva, <sup>1</sup>Heizir Ferreira de Castro

Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Engenharia Química/DEQUI, Rod. Itajubá-Lorena Km. 74,5, Campinho, 12600-970, Lorena-SP, heizir@dequi.fuenquil.br

**Palavras-chave:** Biodegradabilidade, Lipase, Hidrólise, Lipídeos, Metano

**Área do Conhecimento:** Engenharias

**Resumo-** O presente trabalho tem por objetivo a hidrólise enzimática de efluentes das indústrias de laticínios, empregando enzima hidrolítica de fonte animal disponível no mercado nacional sobre a formação de gás metano por biodegradabilidade anaeróbia em diferentes concentrações de ácidos graxos. As amostras de efluentes hidrolisadas entre 8 e 24 h reduziram a formação de metano e a remoção de matéria orgânica em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e cor. As amostras com maior formação de metano e remoção de matéria orgânica e cor foram obtidas nas amostras suplementada com enzima simultaneamente (controle C<sub>2</sub>) e hidrolisada no tempo 4 h.

## Introdução

A adoção de um maior rigor dos padrões de descarte de águas residuárias tem motivado a realização de pesquisas, cujo objetivo é reduzir o impacto ambiental, especialmente em efluentes contendo elevados teores de lipídeos, como os provenientes de laticínios, matadouros e avícolas, enlatados, extração de óleos, entre outros. Esses compostos causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleo nas superfícies aquáticas, impedindo a difusão de oxigênio do ar para esse meio promovendo a mortandade da vida aquática [1].

Nos reatores aeróbios, os lipídeos formam mousses estáveis na superfície do tanque de aeração que dificultam a floculação e a sedimentação do lodo e bloqueiam as trocas gasosas indispensáveis nesse sistema. Na digestão anaeróbia, a acumulação de lipídeos, em concentrações milimolares, pode causar problemas como toxicidade a microrganismos acetogênicos e metanogênicos, formação de espumas devido ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados, má formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) e o decréscimo da concentração de trifosfato de adenosina (ATP), molécula utilizada como fonte de energia pelas células microbianas [2,3].

Desta forma, a degradação de lipídeos é um processo lento, tendo como etapa limitante a liberação de ácidos graxos pelos microrganismos específicos com atividade lipolítica [2]. Essa

biodegradação consiste em utilizar lipases para promover a reação de hidrólise seqüencial dos grupos acila do glicerídeo. Lipases são enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana classificadas como glicerol éster hidrolases (E. C. 3.1.1.3) que atuam na interface orgânica/aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis com a liberação de ácidos graxos e glicerol [3].

O presente trabalho tem por objetivo o pré-tratamento de efluentes das indústrias de laticínios na hidrólise de lipídeos, empregando lipase de fonte animal de baixo custo (pâncreas de porco) disponível no mercado nacional sobre a formação de gás metano por biodegradabilidade anaeróbia em diferentes concentrações de ácidos graxos. O desenvolvimento e a utilização de lipases auxilia no pré-tratamento do efluente, pois essas enzimas hidrolíticas aceleram a hidrólise de lipídeos e, conseqüentemente, auxiliam o tratamento biológico resultando na redução da matéria orgânica em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), cor e sólidos em suspensão como lipídeos [3].

## Materiais e Métodos

*Enzima:* Preparação de lipase pancreatina (LNU) adquirida da empresa Nuclear/SP.

*Efluente:* Coletado na indústria de derivados lácteos Cooperativa Maringá (Guaratinguetá-SP), coletado em um único ponto antes de ser conduzido a Estação de Tratamento (flotador).

**Lodo Anaeróbio:** Coletado na indústria de derivados lácteos DANONE (Guaratinguetá-SP), proveniente da estação de tratamento anaeróbio.

**Hidrólise Enzimática:** As reações de hidrólise do efluente foram realizadas em reatores de bancada providos de cubos em aço inox de 350 mL com agitador mecânico (200 rpm). O meio reacional foi preparado contendo 250 g de efluente, 0,5 g/L de lipase, ajuste de pH (8,0) com NaOH 1 M e íons cálcio (10 mM). Em tempos pré-determinados de 4, 8, 12 e 24 h, foram retiradas amostras, para acompanhamento da evolução da reação (ácidos graxos formados). Foram utilizados como controles o efluente bruto (C<sub>1</sub>) e suplementado com enzima, solução alcalinizante e íons cálcio (C<sub>2</sub>). A atividade hidrolítica da lipase foi paralisada ao final dos ensaios com aquecimento do meio reacional até 60 °C por um período de 10 min. A temperatura do sistema foi mantida a 37 °C por aquecimento em banho termostatizado com água. Foram determinados os valores de pH, proteína, ácidos graxos formados (mM), glicerol e a porcentagem de hidrólise (%).

**Biodegradabilidade Anaeróbia:** Estes testes foram conduzidos em frascos tipo soro vedados, acoplados a gasômetros (frascos de Duran) preenchidos com 300 mL de solução NaOH 5% (m/v) para coleta do metano produzido. O volume de solução alcalina deslocado do gasômetro foi recolhido em erlenmeyers de 125 mL situados à jusante. Nos frascos tipo soro foram adicionados 50 mL de lodo anaeróbio e 250 mL de efluente bruto ou pré-tratado enzimaticamente, em diferentes tempos de hidrólise (4 a 24 h) e o controle C<sub>2</sub> a 35 °C. Para o controle C<sub>2</sub>, as etapas de hidrólise e biodegradação foram simultâneas. Por um período de 360 h foi medido, em intervalos de 24 h, o volume de metano formado na digestão anaeróbia. O final dos testes, as amostras foram centrifugadas (25 min e 4000 rpm) e submetidas às análises de redução de proteína, açúcares redutores simples, DQO, cor, pH, volume de metano formado e ácidos livres. A avaliação do perfil cinético de remoção da matéria orgânica (quantificada como DQO) permitiu avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático do efluente.

**Análises:** O teor de sólidos totais foi determinado por evaporação do efluente com o auxílio de um rotoevaporador. Cor foi determinada pelo método descrito por [3]. Os índices de acidez e

saponificação e porcentagem de ácidos graxos livres foram determinados segundo metodologia descrita por [4]. O pH foi determinado com o auxílio do pHmetro. Massa específica foi determinada com o auxílio de um picnômetro. As concentrações de lipídeos e DQO foram determinadas por métodos descritos por [5]. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry [6]. A concentração de carboidratos foi determinada pelo método DNS [7]. A concentração de glicerol foi determinada segundo metodologia descrita por [8].

## Resultados

A caracterização do efluente foi realizada de acordo com técnicas descritas anteriormente, cujos resultados são sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização do efluente.

Características	Resultados
Sólidos totais (mg/L)	9164
Lipídeos (mg/L)	4680
Ácidos graxos livres (%)	0,6
Índice de acidez	1,1
Índice de saponificação (mg KOH/ g)	184,6
Proteínas (mg/L)	5711
Açúcares redutores simples (mg/L)	377
DQO (mg/L)	52500
pH	5,25
Glicerol (%)	0,376
Unidades de cor (UC)	13777
Massa específica (g/ cm <sup>3</sup> )	1,0

Para verificar o efeito da concentração de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente na biodigestão anaeróbia, esses testes foram efetuados com efluentes tratados em diferentes tempos de hidrólise (4 a 24 h) e os controles C<sub>1</sub> (efluente bruto) e C<sub>2</sub> (efluente suplementado com enzima no tempo inicial de biodigestão). Essa metodologia permitiu verificar a influência da concentração de ácidos graxos livres nas amostras submetidas a biodigestão anaeróbia.

Os valores de pH e as concentrações de ácidos graxos livres, glicerol e proteínas encontrados nas amostras após a etapa de hidrólise por diferentes tempos é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Influência de tempo de hidrólise nas características do efluente antes da etapa de biodigestão.

Tempo de Hidrólise (h)	Ácidos Graxos Livres (mM)	Glicerol (%)	Porcentagem de Hidrólise (%)	Redução de Proteína (%)	pH
C <sub>1</sub>	2,70	0,376	0	0	5,25
C <sub>2</sub>	2,70	0,376	0	0	8,03
4	3,91	0,391	3,9	7,2	5,91
8	4,51	0,411	8,5	7,9	5,71
12	7,58	0,433	13,1	8,6	5,32
24	9,45	0,451	16,6	9,1	5,09

C<sub>1</sub>: Efluente bruto; C<sub>2</sub>: Efluente incubado com enzima, ajuste de pH e íons cálcio.

Os resultados obtidos com relação às concentrações de proteínas, açúcares redutores simples, matéria orgânica (DQO), ácidos graxos livres, valor de pH, turbidez (cor) e volume de

metano formado após a etapa de biodigestão, são mostrados na Tabela 3. A curva de formação de metano é apresentada na Figura 1.

Tabela 3. Biodegradabilidade anaeróbia de efluentes pré-tratados enzimaticamente nos tempos 4, 8, 12 e 24 h e o efluente bruto (C<sub>1</sub>) e suplementado com enzimas (C<sub>2</sub>).

Tempo de Hidrólise (h)	Redução				Ácidos Graxos (mM)	pH	Volume de CH <sub>4</sub> (mL)
	Açúcares Redutores Simples (%)	DQO (%)	Proteínas (%)	Cor (%)			
C <sub>1</sub>	92,2	31,5	82,3	17,5	17,0	5,12	232
C <sub>2</sub>	100	62,8	88,2	82,7	0	8,71	346
4	97,6	58,1	86,4	71,1	5,83	5,53	359
8	95,8	54,3	85,5	60,1	3,52	5,91	260
12	99,1	48,6	84,6	70,3	1,69	6,91	264
24	97,4	50,5	84,9	71,6	1,32	6,98	238

C<sub>1</sub>: Efluente bruto; C<sub>2</sub>: Efluente suplementado com enzima LNU, ajuste de pH e íons cálcio.

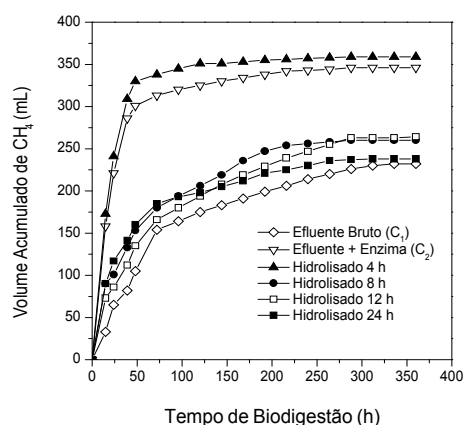


Figura 1. Cinética de biodegradação do efluente.

## Discussão

A caracterização do efluente, em estudo foi importante para estimar os parâmetros analisados como DQO, cor, proteínas, açúcares redutores simples e lipídeos. Após essa etapa, foi realizada a hidrólise enzimática dos lipídeos na avaliação da concentração de ácidos graxos liberados sobre a formação de metano na biodigestão

anaeróbia. A porcentagem de hidrólise de lipídeos obtidos variou entre 3,9% (4 h) e 16,6% (24 h) e a porcentagem de hidrólise das proteínas variou entre 7,2% (4 h) e 9,1% (24 h). A etapa de hidrólise mostrou ser eficiente na redução da massa molar de compostos orgânicos contidos no efluente, o que pode auxiliar a biodigestão anaeróbia.

O volume final de metano formado na biodigestão do efluente bruto (232 mL) foi inferior aos obtidos para todas as amostras de efluentes hidrolisados. As amostras de efluente C<sub>2</sub> e hidrolisada no tempo 4 h resultou em um volume final de metano de 346 e 359 mL, respectivamente, superior às outras amostras hidrolisadas. Nota-se pela Figura 1 que a velocidade de formação de metano para as amostras C<sub>2</sub> e hidrolisada no tempo 4 h foi elevada nas primeiras 50 h de reação e após esse período, a velocidade foi reduzida em função da elevada conversão da matéria orgânica em compostos de baixa massa molar como metano e gás carbônico, comportamento não observado para as demais amostras.

A concentração de ácidos graxos formados pela etapa de hidrólise enzimática promoveu inibição na biodegradação pelos microrganismos anaeróbios com tempo de hidrólise superior a 4 h.

Estudos descritos na literatura sugerem que ácidos graxos em concentrações milimolares inibem a ação de microrganismos acetogênicos [1,2]. Para a amostra hidrolisada no tempo 4 h, a concentração de ácidos livres foi menor, o que não promoveu essa inibição e a amostra C<sub>2</sub>, provavelmente, os ácidos graxos liberados pela ação enzimática foram consumidos simultaneamente. A concentração de lipídeos contidos no meio não foi estimada, mas foi verificada uma redução considerável na concentração de ácidos livres, obtidos na etapa de hidrólise, o que provavelmente auxiliou na formação de metano.

Apesar da concentração de açúcares redutores simples não ter sido alterada na hidrólise, esta etapa auxiliou na remoção desses compostos durante a biodigestão, proporcionando elevada remoção desses compostos (valores entre 92,2-100%). No controle 1 (efluente bruto) a redução desses compostos foi de 92,2%. A biodegradabilidade de açúcares como lactose é geralmente mais acelerada e com elevada eficiência de remoção em condições anaeróbias, se comparada com outros compostos orgânicos como lipídeos e proteínas [9].

A redução da concentração de proteínas foi similar em todas as amostras analisadas, com porcentagem de redução superior a 82%. Comparando os resultados obtidos na biodigestão anaeróbia das proteínas, nota-se que o lodo anaeróbio utilizado não sofreu inibição pelo substrato por ser uma cultura aclimatada, coletada em estação de tratamento de efluentes de laticínios. A preparação enzimática LNU contém enzimas contaminantes como proteases, o que torna atrativo à sua aplicação na hidrólise da caseína, principal proteína presente no leite e em efluentes de indústrias de derivados lácteos [9].

A aplicação da lipase LNU no pré-tratamento reduziu sensivelmente a concentração de matéria orgânica em termos de DQO e cor, sendo constatado para o controle C<sub>1</sub> uma redução de 31,5 e 17,5%, respectivamente, enquanto que para as amostras hidrolisadas foram obtidas reduções superiores a 50%, em termos de DQO e 60% em termos de cor, atingindo níveis máximos de remoção de DQO de 62,9% e cor de 82,7%, com o efluente hidrolisado simultaneamente (Controle C<sub>2</sub>). Por meio desses resultados verifica-se que não é necessária uma

etapa preliminar de hidrólise do efluente, mas a suplementação de enzima simultaneamente a biodigestão, reduzindo o tempo global do processo e facilitando, desta forma sua aplicação em escala industrial.

## Referências

- [1] MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **Intern. Biodet. Biodegr.** V. 50, p. 101-105, 2002.
- [2] PERLE, M.; KIMCHIE, S.; SHELEF, G. Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. **Water Res.** V. 29, n. 6, p.1549-1554, 1995.
- [3] MENDES, A. A. Avaliação da biodegradabilidade de efluentes com alto teor de lipídeos previamente tratados com enzimas hidrolíticas. 2004. 149f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2004.
- [4] MORETTO, E.; FETT, R. (1998). Óleos e Gorduras Vegetais (Processamento e Análises). 2ºed, Florianópolis, Editora UFSC, v. 1.
- [5] APHA; AWWA; WPCF. (1995). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19<sup>th</sup> edition, New York.
- [6] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** V.193, n.1, p.265-275, 1951.
- [7] MARTELLI, H. L.; PANEK, A. D. (1968). Bioquímica Experimental. Rio de Janeiro, Ao livro Técnico S. A.
- [8] COKS, L. V.; VAN REDE, C. (1966). Laboratory handbook for oils and fats analysis, 1<sup>st</sup> ed., Academy Press, London.
- [9] PAVLOSTHATIS, S. G.; GIRALDO-GOMEZ, E. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. **Crit. Rev. Environ. Control.** V. 21, p. 411-490, 1991.