



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ingeniería Química

**Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en
reactores enzimáticos operados en continuo**

Memoria presentada por

Carmen López Díaz

Para optar al grado de Doctor por la
Universidade de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Noviembre de 2005





UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ingeniería Química

Juan Manuel Lema Rodicio, Catedrático de Ingeniería Química y María Teresa Moreira Vilar, Profesora Asociada de Ingeniería Química de la Universidade de Santiago de Compostela,

Informan:

Que la memoria titulada “Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo”, que para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado en Ingeniería Química y Ambiental, presenta Doña Carmen López Díaz, ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidade de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela, el 19 de Julio de 2005.

Juan M. Lema Rodicio

M. Teresa Moreira Vilar

Esta memoria fue presentada el 25 de Noviembre de 2005 en la Escola Técnica Superior de Enxeñería de la Universidade de Santiago de Compostela ante el tribunal compuesto por:

Dr. Spyros N. Agathos. Université Catholique de Louvain, Louvain-la Neuve, Bélgica

Dr. Gumersindo Feijoo Costa. Universidad de Santiago de Compostela.

Dr. José Manuel Guisán Seijas. Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

Dr. Inmaculada Ortiz Uribe. Universidad de Cantabria.

Dra. Herminia Domínguez González. Universidad de Vigo.

Calificación: *Sobresaliente Cum Laude.*

Reconocimiento de “Doctorado Europeo” dentro del programa de Doctorado “Ingeniería Química y Ambiental”.

AGRADECIMIENTOS

Cualquiera que haya tenido una tesis en sus manos sabe que esta primera página va a ser, sin duda, la más leída, y quizás la única. Así que trataré de esmerarme y plasmar en palabras mi agradecimiento a todos los que contribuisteis a la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero dar las gracias más sinceras a mi director Juan Lema, por tu confianza en mi trabajo, tu asesoramiento científico y tu estímulo para encaminar la investigación hacia los logros alcanzados. A mi directora M^a Teresa Moreira, por tu supervisión científica y literaria y tu dedicación. Gracias al profesor Gumersindo Feijoo, por haberte comportado como un director más.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, mediante una beca de Formación de Profesorado Universitario (AP2000-1712) y por la Comisión Española de Ciencia y Tecnología (CICYT) mediante el proyecto PPQ2001-3063.

La realización de la tesis doctoral me permitió crecer intelectual y personalmente. Y a ello contribuyeron, en buena parte, las estancias realizadas. De todas ellas guardo muy buenos recuerdos, pues he podido aprovecharlas, científica y personalmente. Gracias al grupo de Ingeniería de Biocatalizadores y Biotransformaciones del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del C.S.I.C. de Madrid, dirigido por José Manuel Guisán. Gracias a Roberto, por dirigir mi trabajo, y a Lorena W., Lorena B., Palomo, Manuel, Rosa, Rodrigo, Beni... por hacer de mi primera estancia un bonito recuerdo. Gracias al Laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, de la Université Blaise-Pascal de Clermont-Ferrand (Francia) dirigido por la profesora Anne-Marie Delort. Gracias, en particular, a Bruno por tu interés y empeño en obtener resultados y sacar el artículo adelante. Gracias al Fungal Biotechnology Group de la University of Westminster, de Londres (Reino Unido), dirigido por el profesor Tajalli Keshavarz. Gracias a Romeo, Rakesh, Orr, Tati y, muy especialmente, a la loquita de Tata, por vuestras enseñanzas y vuestra amistad.

Además, quisiera agradecer al profesor Juan Carlos García Monteagudo, del departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia, sus enseñanzas sobre la voltimetría cíclica y su colaboración en nuestra investigación, poniendo a nuestra entera disposición su equipo y su laboratorio.

Gemma, eres la mejor compañera de trabajo del mundo! Mis dudas, mis quejas, mis problemas, mis tomas de muestra nocturnas, mis medidas, mis fracasos y mis éxitos han sido también tuyos. Gracias por compartir trabajo, diversión, congresos, cenas, confidencias... ¡Te quiero siempre a mi lado! Iñaki, Juani, Thelmo, Ángeles, gracias por vuestras lecciones. Juanca, Pablo, Lara, Alejandra, Ana, Lorena, compañeros de “hongos”, gracias por compartir poyata, risas, penas y alegrías, logrando el mejor ambiente de trabajo. Ana, gracias por ser mi mejor (y única, pero eso no importa) discípula, y por la parte de este trabajo que te corresponde.

Mar, un “gracias” por cada muestra analizada en el HPLC, y Magda, un “gracias” por cada medida de toxicidad. Luis, un “gracias” por cada duda resuelta acerca de los bichitos esos que se escapan de mi ámbito más cercano. Rosa, un “gracias” por cada duda resuelta, cada dibujo escaneado, cada viaje organizado, cada café, cada broma y cada sonrisa. Javi, un “gracias” por cada dibujo, cada modificación, cada duda sobre informática y mil “gracias” por cada dibujo en Flash. ¡Siempre dan que hablar! Deberías hacer un Copy Right.

Y ahora necesitaría 300 páginas más para seguir dando mis particulares gracias, porque no creo que sea posible separar la vida laboral de la afectiva, y en el éxito de esta última hay mucha gente involucrada. Belén, eres única y creas adición. Sé siempre así. Almu, sé que siempre puedo recurrir a ti, para todo. Marta, gracias por nuestras largas conversaciones. Mantengámoslas. Gonzalo, sigue sugiriendo churrascos, haces que estemos unidos. Sonia y Elena, gracias porque ya sois más amigas que compañeras de trabajo. Christian, ¡no dejes de visitarnos! Jose, gracias porque eres mucho más que mi ex-compañero de despacho. Alex, gracias por haberme hecho un huequito, por lo que hemos vivido y viviremos juntos. Como tú dices, sobran las palabras...

A los que no aparecéis aquí, a las de la playa, las de la resi y las de Sarria.

Gracias a mi familia. A Merce, porque eres todo lo que puede ser una hermana. Yo intento seguirte... A mis padres, por estar en cada momento, dedicarse a mí y por tantas cosas que no van a caber aquí.

Ante todos me quito el sombrero. No dejéis de estar ahí!

Gracias

Índice

Objetivos y resumen	1
Objetivos e resumen	5
Objectives and abstract	9
Capítulo 1. Introducción	13
Resumen	13
1. Tintes industriales	15
1.1. Aplicaciones	15
1.2. Clasificación	17
2. Impacto ambiental de los efluentes coloreados	19
2.1. Efectos ecológicos	21
2.2. Efectos toxicológicos	22
2.3. Minimización de los impactos	22
3. Tecnologías para el tratamiento de efluentes coloreados	23
3.1. Tratamientos químicos	23
3.2. Tratamientos físicos	25
3.3. Tratamientos biológicos	26
4. Tratamiento de efluentes coloreados mediante hongos ligninolíticos	30
4.1. Hongos ligninolíticos	30
4.2. Aplicaciones	31
4.3. Degradación de tintes	32
5. Tratamiento de efluentes coloreados mediante enzimas ligninolíticas	34
5.1. Enzimas ligninolíticas	34
5.2. Manganese peroxidasa	35
5.3. Peroxidasa versátil	38
5.4. Aplicaciones	39
6. Reactores enzimáticos	40
6.1. Reactores enzimáticos de membrana	42
6.2. Otros reactores enzimáticos	44
6.3. Aplicaciones	44
7. Referencias	46
Capítulo 2. Materiales y métodos	59
Resumen	59
1. Compuestos químicos	61

2. Producción de manganeso peroxidasa	61
2.1. Microorganismo	61
2.2. Producción	61
2.3. Ultrafiltración	63
2.4. Microfiltración y diálisis	63
3. Valoraciones enzimáticas	64
3.1. Medida de actividad manganeso peroxidasa	64
3.2. Valoración de la proteína total	64
4. Métodos analíticos	65
4.1. Determinación de la concentración de Orange II por espectrofotometría	65
4.2. Determinación de concentraciones por cromatografía (HPLC)	66
5. Referencias	68
Capítulo 3. Cinética de la degradación de Orange II en discontinuo	69
Resumen	69
1. Introducción	71
2. Materiales y métodos	73
2.1. Preparación del crudo enzimático	73
2.2. Medio de degradación	73
2.3. Ensayos de degradación	74
3. Resultados y discusión	74
3.1. Cinética en función de la concentración de Orange II	74
3.2. Cinética en función de la concentración de Orange II y H ₂ O ₂	79
4. Conclusiones	85
5. Referencias	89
Capítulo 4. Degradación en continuo de Orange II en un reactor enzimático de membrana	91
Resumen	91
1. Introducción	93
2. Materiales y métodos	97
2.1. Operación del reactor enzimático de membrana	97
2.2. Técnicas analíticas	101
3. Resultados y discusión	102
3.1. Eficacia de la membrana	102
3.2. Estrategias de adición de MnP	103
3.3. Optimización de la operación en continuo	107
3.4. Dinámica del proceso en continuo	115
3.5. Operación en estado no estacionario	120
3.6. Modelización	123
4. Conclusiones	127
5. Referencias	129

Capítulo 5. Inmovilización de MnP	133
Resumen	133
1. Introducción	135
2. Materiales y métodos	144
2.1. Compuestos químicos	144
2.2. Preparación del crudo enzimático	145
2.3. Activación de los soportes e inmovilización	145
2.4. Estudios de estabilidad	150
2.5. Determinación de conductividades	151
2.6. Estudios de adsorción de Orange II sobre los derivados	151
2.7. Técnicas analíticas	151
3. Resultados y discusión	152
3.1. Estudios de estabilidad	152
3.2. Inmovilización de MnP sobre distintos tipos de soportes	154
3.3. Estabilidad de los derivados frente a la temperatura	157
3.4. Comparación de conductividades	158
3.5. Adsorción de Orange II sobre el soporte	159
4. Conclusiones	160
5. Referencias	162
Capítulo 6. Degradación en continuo de Orange II en un reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada	165
Resumen	165
1. Introducción	167
2. Materiales y métodos	168
2.1. Inmovilización de MnP	168
2.2. Saturación de los derivados	169
2.3. Estabilidad de los derivados	169
2.4. Operación en continuo	170
2.5. Técnicas analíticas	171
3. Resultados y discusión	172
3.1. Saturación de los derivados	172
3.2. Estabilidad de los derivados	174
3.3. Operación en continuo	176
3.4. Operación en estado no estacionario	179
3.5. Modelización	181
4. Conclusiones	184
5. Referencias	186
Capítulo 7. Mecanismo de degradación enzimática de Orange II	189
Resumen	189

1. Introducción	191
2. Materiales y métodos	196
2.1. Compuestos químicos	196
2.2. Ensayos de degradación	196
2.3. Espectroscopía de RMN ¹ H	197
2.4. Análisis por HPLC	198
2.5. Test de toxicidad	199
2.6. Síntesis de sal de diazonio	199
2.7. Técnicas analíticas	199
3. Resultados y discusión	199
3.1. Estequiometría de la reacción enzimática	199
3.2. Identificación de los productos de degradación por RMN	201
3.3. Identificación de los productos de degradación por HPLC	205
3.4. Degradación enzimática de los productos intermedios	207
3.5. Propuesta de mecanismo	208
3.6. Toxicidad	211
4. Conclusiones	212
5. Referencias	213
Capítulo 8. Postratamiento bacteriano de Orange II	217
Resumen	217
1. Introducción	219
2. Materiales y métodos	222
2.1. Tratamiento anaerobio	222
2.2. Tratamiento aerobio	225
2.3. Técnicas analíticas	229
3. Resultados y discusión	234
3.1. Caracterización del efluente de degradación enzimática de Orange II	234
3.2. Tratamiento anaerobio	235
3.3. Tratamiento aerobio	244
4. Conclusiones	252
5. Referencias	254
Capítulo 9. Estudio por voltametría cíclica de la estabilización de Mn³⁺ por ácidos quelantes	257
Resumen	257
1. Introducción	259
2. Materiales y métodos	262
2.1. Compuestos químicos	262
2.2. Ensayos de decoloración	262
2.3. Voltametría cíclica	262
3. Resultados y discusión	263
3.1. Decoloración de Orange II en presencia de ácidos quelantes	263

3.2. Determinación de las energías relativas de quelación de ácidos carboxílicos	264
3.3. Capacidad quelante de Orange II	269
4. Conclusiones	272
5. Referencias	273
Anexo. Estudio económico del proceso de degradación enzimática	275
Resumen	275
1. Introducción	277
2. Materiales y métodos	277
2.1. Ensayos de degradación	277
2.2. Técnicas analíticas	278
3. Resultados	279
3.1. Ensayos de degradación en discontinuo con MnP libre	279
3.2. Ensayos de degradación en continuo con MnP libre	280
3.3. Ensayos de degradación en discontinuo con MnP inmovilizada	281
3.4. Ensayos de degradación en continuo con MnP inmovilizada	281
3.5. Estimación del coste de producción de MnP	282
3.6. Estimación de los costes de inmovilización	284
3.7. Estimación de los costes del proceso	285
3.8. Comparación económica del proceso enzimático con procesos de oxidación avanzada	285
4. Conclusiones	286
5. Referencias	287
Conclusiones	289
Conclusións	293
Conclusions	297

Objetivos y resumen

Los efluentes generados en las industrias textiles contienen una fracción significativa de tintes, que, por adjuntar una intensa coloración, no pueden ser vertidos a los cauces naturales. Estos tintes son de difícil tratamiento, pues los procesos biológicos aerobios convencionales apenas son capaces de degradarlos, mientras que mediante los procesos anaerobios se generan aminas aromáticas de potencial carácter cancerígeno. En este trabajo se plantea, como alternativa, la degradación de tintes mediante las enzimas oxidativas de hongos ligninolíticos y en particular la enzima manganeso peroxidasa (MnP).

El objetivo global de este trabajo es el desarrollo de tecnologías avanzadas para el tratamiento en continuo de compuestos xenobióticos, basadas en procesos de oxidación enzimática *in vitro*. Se ha considerado el tinte Orange II como compuesto modelo, ya que por su carácter azo puede ser representativo de un elevado número de colorantes empleados en la industria textil. Para la consecución de este objetivo se proponen una serie de objetivos específicos:

- i)* Desarrollo de un reactor enzimático de membrana para la degradación en continuo de Orange II mediante MnP. Maximización de la eficacia (definida como la cantidad de tinte degradada por unidad de enzima consumida) y estudio de la estabilidad del sistema (Capítulo 4).
- ii)* Estudio de la inmovilización de la enzima MnP. Obtención de un soporte de inmovilización que permita una buena capacidad de retención de la enzima, baja pérdida de actividad enzimática durante el proceso de inmovilización, alta estabilidad de la enzima inmovilizada, baja interacción entre el tinte y el soporte y bajo coste (Capítulo 5).
- iii)* Desarrollo de un reactor en continuo de tanque agitado para la degradación de Orange II mediante MnP inmovilizada. Maximización de la eficacia mediante la minimización del consumo de soporte y enzima (Capítulo 6).

- iv) Obtención, a partir del proceso en discontinuo, de un modelo cinético que permita el diseño de reactores, la simulación de procesos en continuo y la optimización de las condiciones de operación (Capítulos 3, 4 y 6).
- v) Identificación del mecanismo de degradación enzimática del tinte Orange II y cuantificación de los productos intermedios y finales, para evaluar la toxicidad del efluente generado (Capítulo 7).
- vi) Estudio del postratamiento de Orange II, mediante procesos anaerobios y aerobios, para determinar cuál de los procesos bacterianos es más adecuado para el tratamiento del efluente de la degradación enzimática (Capítulo 8).
- vii) Estudio de la energía relativa de quelación de Mn^{3+} por distintos ácidos y análisis de la posibilidad de que el propio tinte Orange II tenga capacidad quelante (Capítulo 9).
- viii) Estudio económico de los procesos de oxidación mediante MnP y comparación con otros procesos de oxidación avanzada (Anexo).

En el Capítulo 1 se realizó una revisión de los tintes industriales y sus aplicaciones, así como de los distintos procesos de tratamiento de efluentes, propuestos en la bibliografía. Más particularmente, se estudió la degradación de tintes con hongos ligninolíticos y sus enzimas oxidativas, haciendo especial hincapié en el ciclo catalítico de la enzima MnP. Por último, se realizó una revisión de las distintas configuraciones de reactor enzimático, con enzima libre o inmovilizada.

En el Capítulo 2 se describió el procedimiento de fermentación del hongo *Bjerkandera* sp. BOS55, así como la obtención y tratamiento del crudo enzimático. Además, se describieron los procedimientos empleados a lo largo de todo el trabajo experimental: análisis de la actividad MnP y determinación de las concentraciones de Orange II y los productos de degradación.

Como paso previo al tratamiento en continuo de Orange II, se llevaron a cabo ensayos de oxidación enzimática en discontinuo mediante MnP, a diferentes concentraciones iniciales de tinte y diferentes velocidades de adición de H_2O_2 , para obtener un modelo que describiese el comportamiento cinético del proceso de decoloración. Se obtuvo una ecuación cinética que es la combinación de una ecuación tipo Michaelis-Menten con respecto a Orange II y una función lineal con respecto a la velocidad de adición de H_2O_2 (Capítulo 3).

La primera configuración de reactor propuesta fue un reactor de tanque agitado asociado a una membrana de ultrafiltración para la separación y recirculación de la enzima (Capítulo 4). Se estudiaron diversas estrategias de adición de enzima y el efecto de parámetros tales como el nivel de actividad enzimática, la velocidad de adición de H_2O_2 , el tipo de ácido orgánico o el tiempo de residencia hidráulico. El objetivo fue maximizar la eficacia del sistema, que alcanzó un valor 16 veces superior al obtenido en los ensayos previos en discontinuo, con una decoloración superior al 90%. Se llevaron a cabo procesos de hasta 18 días de duración, en que el reactor permaneció estable y no hubo necesidad de cambio o limpieza de la membrana. Por último, se aplicó la ecuación cinética obtenida en el Capítulo 3 a los ensayos realizados, obteniendo un buen ajuste entre los datos experimentales y los datos simulados, tanto en estado estacionario como no estacionario.

Se analizó una segunda estrategia de degradación en continuo de Orange II mediante enzima inmovilizada. Para ello, se estudiaron diversas posibilidades para la inmovilización de MnP, mediante enlaces iónicos y covalentes entre la enzima y el soporte de inmovilización (Capítulo 5). Un soporte de agarosa activado con grupos glutaraldehído para la unión covalente con la enzima dio lugar a un derivado estable, con una retención enzimática del 100%, aunque el proceso de inmovilización se realiza a condiciones severas que disminuyen la actividad enzimática en un 50%. El problema de la interacción entre el tinte y el soporte se solventó en los ensayos en continuo. Se operó un reactor de tanque agitado en que la enzima se retuvo por medio de un pequeño filtro de punta de pipeta (Capítulo 6). El tinte se adsorbió en el soporte hasta que este se saturó; a partir de ese momento, la eliminación de tinte en el reactor fue debida a la degradación enzimática. La eficacia del sistema se optimizó en función de dos factores: el soporte y la enzima. Se maximizó la cantidad de enzima inmovilizada en el soporte y se minimizó el consumo de enzima mediante la modificación de las condiciones de operación (TRH y carga de Orange II en la alimentación). Se alcanzó una decoloración superior al 80% con una eficacia ligeramente mayor que la obtenida en el reactor de membrana en las mismas condiciones. Por último, se modificó la ecuación cinética propuesta en el Capítulo 3 y se aplicó a los ensayos con enzima inmovilizada, obteniéndose un ajuste correcto entre los datos experimentales y simulados.

En el Capítulo 7 se determinó, mediante RMN y HPLC, el mecanismo de degradación enzimática del tinte Orange II, con el objetivo de conocer los productos de degradación y estudiar la toxicidad de los mismos. Se identificaron 9 compuestos, de los cuales 2 no se habían identificado con anterioridad (4-diazonio bencenosulfonato y 2-naftol). Esto permitió considerar tres rutas distintas de degradación de Orange II, dos de ellas basadas en una ruptura asimétrica del enlace azo y la tercera basada en la ruptura simétrica. Los compuestos generados suponen un 30% de la concentración de tinte de partida, lo que indica la existencia de otras rutas o la degradación de los productos identificados. La degradación enzimática de Orange II permite la disminución de la toxicidad original.

El efluente de la degradación enzimática de Orange II se puede tratar en una planta depuradora convencional con el objetivo de eliminar el tinte residual y los compuestos procedentes de la oxidación enzimática, que aportan DQO y color. En el Capítulo 8 se estudió el postratamiento anaerobio y aerobio del efluente del proceso enzimático. En ambos procesos se eliminó un 30% de la DQO, aunque a diferencia del proceso anaerobio, en el aerobio no hubo eliminación de color. La toxicidad se incrementó en el proceso anaerobio, aunque en valores muy alejados de aquellos para los cuales un efluente se considera tóxico.

La capacidad de la enzima MnP para degradar Orange II en ausencia de compuestos quelantes que estabilicen el Mn^{3+} generado en el ciclo catalítico hizo pensar la posibilidad de que el propio tinte tenga efecto quelante. En el Capítulo 9 se estudió por voltametría cíclica la capacidad de varios ácidos carboxílicos para complejar el ion Mn^{3+} , se estableció un orden de energía relativa de quelación y se obtuvieron evidencias de que el tinte Orange II tiene cierta acción quelante sobre el Mn^{3+} . Así, no es necesaria la presencia de un compuesto quelante para realizar la degradación de Orange II mediante MnP.

Por último, se realizó un estudio para comparar económicamente los procesos de degradación enzimática de compuestos recalcitrantes con otros procesos de oxidación avanzada y analizar en conjunto la mejor alternativa para la degradación enzimática de compuestos (Anexo). Se tuvo en cuenta principalmente el coste de producción de la enzima, pues es el factor más relevante del proceso. Los resultados indicaron que los costes de operación del reactor enzimático de membrana se sitúan en el rango de los procesos de oxidación avanzada.

Obxectivos e resumo

Os efluentes xerados nas industrias téxtiles conteñen unha fracción significativa de tinguiduras, que, por adxuntar unha intensa cor, non poden ser vertidas ós cauces naturais. Estas tinguiduras son de difícil tratamento, pois os procesos biolóxicos aerobios convencionais practicamente non son capaces de degradalas, mentres que mediante os procesos anaerobios xéranse aminas aromáticas de potencial carácter canceríxeno. Neste traballo propónse, como alternativa, a degradación de tinguiduras mediante as encimas oxidativas de fungos ligninolíticos e, en particular, a encima manganeso peroxidasa (MnP).

O obxectivo global deste traballo é o desenvolvemento de tecnoloxías avanzadas para o tratamento en continuo de compostos xenobióticos, baseadas en procesos de oxidación enzimática *in vitro*. Considerouse a tinguidura azo Orange II como composto modelo, xa que polo seu carácter azo pode ser representativa dun elevado número de tinguiduras empregadas na industria téxtil. Para a consecución deste obxectivo propóñense unha serie de obxectivos específicos:

- i)* Desenvolvemento dun reactor encimático de membrana para a degradación en continuo de Orange II mediante MnP. Maximización da eficacia (definida como a cantidade de tinguidura degradada por unidade de encima consumida) e estudo da estabilidade do sistema (Capítulo 4).
- ii)* Estudo da inmovilización da encima MnP. Obtención dun soporte de inmovilización que permita unha boa capacidade de retención da encima, baixa perda de actividade enzimática durante o proceso de inmovilización, alta estabilidade da encima inmovilizada, baixa interacción entre a tinguidura e o soporte e baixo custo (Capítulo 5).
- iii)* Desenvolvemento dun reactor en continuo de tanque axitado para a degradación de Orange II mediante MnP inmovilizada. Maximización da eficacia mediante a minimización do consumo de soporte e encima (Capítulo 6).

- iv) Obtención, a partir do proceso en descontinuo, dun modelo cinético que permita o deseño de reactores, a simulación de procesos en continuo e a optimización das condicións de operación (Capítulos 3, 4 e 6).
- v) Identificación do mecanismo de degradación encimática da tinguidura Orange II e cuantificación dos produtos intermedios e finais, para avaliar a toxicidade do efluente xerado (Capítulo 7).
- vi) Estudio do postratamento de Orange II, mediante procesos anaerobios e aerobios, para determinar cal dos procesos bacterianos é máis axeitado para o tratamento do efluente da degradación encimática (Capítulo 8).
- vii) Estudio da enerxía relativa de quelación de Mn^{3+} por distintos ácidos e análise da posibilidade de que a propia tinguidura Orange II teña capacidade quelante (Capítulo 9).
- viii) Estudio económico dos procesos de oxidación mediante MnP e comparación con outros procesos de oxidación avanzada (Anexo).

No Capítulo 1 realizouse unha revisión das tinguiduras industriais e as súas aplicacións, así como dos distintos procesos de tratamento de efluentes propostos na bibliografía. Máis particularmente, estúdiouse a degradación de tinguiduras con fungos ligninolíticos e as súas encimas oxidativas, facendo especial fincapé no ciclo catalítico da encima MnP. Por último, realizouse unha revisión das distintas configuracións de reactor encimático, con encima libre ou inmovilizada.

No Capítulo 2 describiuse o procedemento de fermentación do fungo *Bjerkandera* sp. BOS55, así como a obtención e tratamento do crudo encimático. Ademais, describíronse todos os procedementos empregados ó longo de todo o traballo experimental: análise da actividade MnP e determinación das concentracións de Orange II e os produtos de degradación.

Como paso previo ó tratamento en continuo de Orange II, leváronse a cabo ensaios de oxidación enzimática en descontinuo mediante MnP, a diferentes concentracións iniciais de tinguidura e diferentes velocidades de adición de H_2O_2 , para obter un modelo que describise o comportamento cinético do proceso de degradación. Obtívose unha ecuación cinética que é a combinación dunha ecuación tipo Michaelis-Menten con respecto a Orange II e unha función lineal con respecto á velocidade de adición de H_2O_2 (Capítulo 3).

A primeira configuración de reactor proposta foi un reactor de tanque axitado asociado a unha membrana de ultrafiltración para a separación e recirculación da encima (Capítulo 4). Estudiáronse diversas estratexias de adición de encima e o efecto de parámetros como o nivel de actividade encimática, a velocidade de adición de H₂O₂, o tipo de ácido orgánico ou o tempo de residencia hidráulico. O obxectivo foi maximizar a eficacia do sistema, que acadou un valor 16 veces superior ó obtido nos ensaios previos en descontinuo, cunha eliminación de cor superior ó 90%. Leváronse a cabo procesos de ata 18 días de duración, en que o reactor permaneceu estable y non houbo necesidade de cambio ou limpeza da membrana. Por último, aplicouse a ecuación cinética obtida no Capítulo 3 ós ensaios realizados, obtendo un bo axuste entre os datos experimentais e os datos simulados, tanto en estado estacionario como non estacionario.

Analizouse unha segunda estratexia de degradación en continuo de Orange II mediante encima inmovilizada. Para iso, estudiáronse diversas posibilidades para a inmovilización de MnP, mediante enlaces iónicos e covalentes entre a encima e o soporte de inmovilización (Capítulo 5). Un soporte de agarosa activado con grupos glutaraldehido para a unión covalente coa encima deu lugar a un derivado estable, cunha retención encimática do 100%, aínda que o proceso de inmovilización realízase a condicións severas que diminúen a actividade encimática nun 50%. O problema da interacción entre a tinguidura e o soporte eliminouse nos ensaios en continuo. Operouse un reactor de tanque axitado no que a encima se retivo por medio dun pequeno filtro de punta de pipeta (Capítulo 6). A tinguidura adsorbeuse no soporte ata que este se saturou; a partires dese momento, a eliminación de tinguidura no reactor foi debida á degradación encimática. A eficacia do sistema optimizouse en función de dous factores: o soporte e a encima. Maximizouse a cantidade de encima inmovilizada no soporte e minimizouse o consumo de encima mediante a modificación das condicións de operación (TRH e carga de Orange II na alimentación). Acadouse unha eliminación de cor superior ó 80% cunha eficacia lixeiramente maior que a obtida no reactor de membrana nas mesmas condicións. Por último, modificouse a ecuación cinética proposta no Capítulo 3 e aplicouse ós ensaios con encima inmovilizada, obténdose un axuste correcto entre os datos experimentais e os simulados.

No Capítulo 7 determinouse, mediante RMN e HPLC, o mecanismo de degradación encimática da tinguidura Orange II, co obxectivo de coñecer os

productos de degradación e estudar a toxicidade dos mesmos. Identificáronse 9 compostos, dos cales 2 non se identificaran con anterioridade (4-diazonio bencenosulfonato e 2-naftol). Isto permitiu considerar tres rutas distintas de degradación de Orange II, dúas delas baseadas nunha ruptura asimétrica do enlace azo e a terceira baseada na ruptura simétrica. Os compostos xerados supoñen un 30% da concentración de tinguidura de partida, o que indica a existencia doutras rutas ou a degradación dos produtos identificados. A degradación encimática de Orange II permite a diminución da toxicidade orixinal.

O efluente da degradación encimática de Orange II pódese tratar nunha planta depuradora convencional co obxectivo de eliminar a tinguidura residual e os compostos procedentes da oxidación encimática, que aportan DQO e cor. No Capítulo 8 estúdiouse o postratamento anaerobio e aerobio do efluente do proceso encimático. En ambos procesos eliminouse un 30% da DQO, aínda que, a diferenza do proceso anaerobio, no aerobio non houbo eliminación de cor. A toxicidade incrementouse no proceso anaerobio, aínda que en valores moi lonxe daqueles para os cales un efluente considérase tóxico.

A capacidade da encima MnP para degradar Orange II en ausencia de compostos quelantes que estabilicen o Mn^{3+} xerado no ciclo catalítico fixo pensar a posibilidade de que a propia tinguidura teña efecto quelante. No Capítulo 9 estúdiouse por voltametría cíclica a capacidade de varios ácidos carboxílicos para complexar o ión Mn^{3+} , estableceuse unha orde de enerxía relativa de quelación e obtivéronse evidencias de que Orange II ten certa acción quelante sobre o Mn^{3+} . Así, non é necesaria a presenza dun composto quelante para realizar a degradación de Orange II mediante MnP.

Por último, realizouse un estudo para comparar economicamente os procesos de degradación encimática de compostos recalcitrantes con outros procesos de oxidación avanzada e analizar en conxunto a mellor alternativa para a degradación encimática de compostos (Anexo). Tívoise en conta principalmente o custe de produción da encima, pois é o factor máis relevante do proceso. Os resultados indicaron que os custes de operación do reactor encimático de membrana sitúanse no rango dos procesos de oxidación avanzada.

Objectives and abstract

The effluents generated in textile industries present a significant concentration of dyes, which cannot be disposed into the natural streams due to their high color. These dyes are very difficult to be treated, as the conventional aerobic biological processes can hardly degrade them, whereas potential carcinogenic aromatic amines are generated during the anaerobic processes. In this work, an alternative is presented, based on the degradation of dyes by the oxidative enzymes from white-rot fungi, and especially the enzyme manganese peroxidase (MnP).

The main objective of this work is the development of advanced technologies for the continuous treatment of xenobiotic compounds, based on *in vitro* enzymatic oxidation processes. The dye Orange II is considered as a model compound, since its azo bound can be representative of a high number of the dyes used in the textile industry. Some specific objectives are proposed for this aim:

- i)* Development of an enzymatic membrane reactor for the continuous degradation of Orange II by MnP. Maximization of the efficiency (defined as the amount of dye degraded per unit of enzymatic activity consumed) and study of the stability of the system (Chapter 4).
- ii)* Study of the MnP immobilization. Development of an immobilization support which allows a good enzyme retention capacity, a low activity loss during the immobilization process, a high stability of the immobilized enzyme, a low interaction between the dye and the support and a low cost (Chapter 5).
- iii)* Development of a continuous stirred tank reactor for the degradation of Orange II by immobilized MnP. Maximization of the efficiency by means of the minimization of both the support and the enzyme consumption (Chapter 6).
- iv)* Establishment of a kinetic model by means of the assays performed in a discontinuous operation. Application of the model to reactor design,

simulation of continuous operation and optimization of the operation conditions (Chapters 3, 4 and 6).

- v) Identification of the enzymatic degradation mechanism of Orange II, quantification of the intermediates and final products and evaluation of the generated effluent toxicity (Chapter 7).
- vi) Study of the Orange II posttreatment, by both anaerobic and aerobic processes, aiming to determine the most adequate biological process for the treatment of the enzymatic degradation effluent (Chapter 8).
- vii) Study of the relative Mn^{3+} chelating energy of different acids and analysis of the possible chelating capacity of Orange II (Chapter 9).
- viii) Economic study of the MnP oxidation processes and comparison with other advanced oxidation processes (Appendix).

In Chapter 1, a revision of the different industrial dyes, their applications and processes for the treatment of effluents proposed in the bibliography was carried out. Specifically, dye degradation by white-rot fungi and their oxidative enzymes was evaluated, with special emphasis on the catalytic cycle of MnP. Finally, a revision of the different configurations of enzymatic reactors with free and immobilized enzymes was considered.

In Chapter 2, both the fermentation process of the fungus *Bjerkandera* sp. BOS55 and the treatment of the enzymatic crude obtained were described. Moreover, a description of the experimental procedures applied was made: determinations of MnP activity and the concentrations of Orange II and related degradation products.

As a previous step for the continuous treatment of Orange II, discontinuous assays by MnP were performed, with different initial dye concentrations and different H_2O_2 addition rates, aiming to obtain a model that could describe the kinetic behaviour of the decolorization process. A kinetic equation was obtained as a combination of a Michaelis-Menten equation related to Orange II and a linear function related to the H_2O_2 addition rate (Chapter 3).

The first reactor configuration proposed is a stirred tank reactor coupled to an ultrafiltration membrane for the retention and recycling of the enzyme (Chapter 4). Some strategies for the enzyme addition and the effect of parameters such as enzymatic activity, H_2O_2 addition rate, organic acid and hydraulic retention time

were studied. The objective was to maximize the efficiency of the system, which reached a level that was 16-fold the one obtained in the previous discontinuous assays, with a decolorization higher than 90%. A 18-day process was carried out, and the reactor was stable and the membrane was not changed or cleaned. Finally, the kinetic equation that had been obtained in Chapter 3 was applied to the continuous assays performed, obtaining a good adjustment between the experimental and simulated data, in both stationary and non-stationary states.

A second strategy for the continuous degradation of Orange II was studied, using immobilized enzyme. With this purpose, some possibilities for MnP immobilization were analyzed, by means of ionic or covalent bonds between the enzyme and the support (Chapter 5). An agarose support activated with glutaraldehyde groups for the covalent attachment with the enzyme gave a stable derivative, with an enzymatic retention of 100%, although the immobilization process was performed under strong conditions that diminish the enzymatic activity about 50%. The problem of the interaction between the dye and the support was overcome in the continuous operation. A stirred tank reactor where a small filter retained the immobilized enzyme into the vessel was operated (Chapter 6). The dye was adsorbed into the support till saturation; thereafter, the removal of dye was due to the enzymatic degradation. The efficiency of the system was optimized by means of the modification of two factors: the support and the enzyme. The amount of enzyme immobilized onto the support was maximized and the enzyme consumption was minimized by the variation of the operational conditions (HRT and Orange II loading rate). The system reached a decolorization higher than 80% and an efficiency higher than that obtained in the enzymatic membrane reactor with the same conditions. Finally, the kinetic equation proposed in Chapter 3 was modified and applied to the assays with immobilized enzyme, obtaining a correct adjustment between the experimental and simulated data.

In Chapter 7, the mechanism for the enzymatic degradation of the dye Orange II was studied by NMR and HPLC, aiming to know the degradation products and study their toxicity. Nine compounds were identified: two of them had not been identified before (4-diazonium benzenesulfonate and 2-naphthol). Having these products in mind, three degradation pathways were considered: two of them were based on the asymmetric cleavage of the azo bond and the third one was based on the symmetric cleavage. The compounds generated accounted for

30% related to the initial dye concentration, therefore it can be supposed that there is another pathway for the degradation of the dye or the degradation of the identified products is being carried out. The enzymatic degradation of Orange II allows the decrease of the original toxicity.

The effluent of the enzymatic degradation of Orange II can be treated in a conventional wastewater treatment plant in order to remove the remaining dye and the compounds coming from the enzymatic oxidation, which provide COD and color. In Chapter 8, the anaerobic and aerobic posttreatment of the enzymatic process was studied. In both processes there was a removal of 30% COD, although the anaerobic process was the only one that removed color. The toxicity was increased in the anaerobic process, although the values reached were very far from those considered toxic.

The enzyme MnP was able to degrade Orange II in the absence of chelating compounds that stabilize the Mn^{3+} generated in the catalytic cycle. It can be thought that the dye itself can be a chelating compound for the cation Mn^{3+} . In Chapter 9, the capacity of some carboxylic acids to chelate the ion Mn^{3+} was studied, an order for the relative energy of chelation was established and evidences for the chelating capacity of Orange II were obtained.

Finally, an economical study was performed with the aim of comparing the enzymatic degradation processes with some advanced oxidation processes and analysing the best alternative for the enzymatic degradation of compounds (Appendix). The main factor considered was the cost of the enzyme production, as it is the most relevant factor of the process. The cost of the enzymatic membrane reactor is within the cost of the advanced oxidation processes.

Capítulo 1

Introducción

Resumen

La creciente industrialización de la sociedad hace que cada día cobren mayor importancia los residuos generados en los distintos procesos industriales. En concreto la utilización de tintes textiles cada vez más resistentes provoca la generación de elevados volúmenes de efluentes fuertemente coloreados, constituidos por moléculas complejas que deben ser degradadas antes de su vertido.

Los hongos de podredumbre blanca, por medio de la secreción de enzimas extracelulares, son capaces de degradar compuestos de estructura tan compleja como la lignina. Estos hongos han sido estudiados a su vez para la degradación de otros tipos de compuestos recalcitrantes que difícilmente pueden ser degradados mediante otros tratamientos.

En este capítulo se presenta una descripción de los tintes industriales y la problemática ambiental que conllevan. Además se hace una amplia revisión de los distintos métodos empleados en la eliminación de estos compuestos de las aguas residuales: métodos físicos, químicos y biológicos. Se considera el método biológico de degradación mediante hongos ligninolíticos y sus enzimas oxidativas, y se hace un amplio estudio de su mecanismo de degradación y aplicación en la eliminación de compuestos recalcitrantes, y de forma más específica, tintes industriales. Por último se presenta un informe de los diferentes tipos de reactores que se pueden emplear en los procesos en continuo basados en reacciones catalizadas por enzimas y se estudia su aplicación en procesos de tratamiento de emisiones.

Índice

1. Tintes industriales	15
1.1. Aplicaciones	15
1.2. Clasificación	17
2. Impacto ambiental de los efluentes coloreados	19
2.1. Efectos ecológicos	21
2.2. Efectos toxicológicos	22
2.3. Minimización de los impactos	22
3. Tecnologías para el tratamiento de efluentes coloreados	23
3.1. Tratamientos químicos	23
3.2. Tratamientos físicos	25
3.3. Tratamientos biológicos	26
4. Tratamiento de efluentes coloreados mediante hongos ligninolíticos	30
4.1. Hongos ligninolíticos	30
4.2. Aplicaciones	31
4.3. Degradación de tintes	32
5. Tratamiento de efluentes coloreados mediante enzimas ligninolíticas	34
5.1. Enzimas ligninolíticas	34
5.2. Manganeseo peroxidasa	35
5.3. Peroxidasa versátil	38
5.4. Aplicaciones	39
6. Reactores enzimáticos	40
6.1. Reactores enzimáticos de membrana	42
6.2. Otros reactores enzimáticos	44
6.3. Aplicaciones	44
7. Referencias	46

1. Tintes industriales

La contaminación ambiental debida a fuentes tanto naturales como antropológicas se está viendo incrementada día a día debido al aumento de población, industrialización y urbanización. Además los avances en la ciencia y tecnología desde la revolución industrial han permitido a los hombres explotar cada vez más los recursos naturales. Anualmente se eliminan al medio ambiente un gran número de contaminantes y materiales de desecho que contienen metales pesados. La cantidad de contaminantes que causan problemas al medio se ha convertido en un problema medioambiental de gran importancia, por lo que resulta necesario el desarrollo de tecnologías que puedan ser aplicables a la eliminación de compuestos xenobióticos procedentes de las industrias agroquímicas y petroquímicas, metales pesados, pesticidas, exceso de nutrientes, fenoles, hidrocarburos y aguas residuales procedentes de la industria de los tintes.

El color es el primer contaminante que se reconoce en las aguas residuales. Es proporcionado por los colorantes, que se definen como sustancias que son capaces de conferir color a otras sustancias. El término “colorante” engloba tanto a tintes como a pigmentos. Ambos se diferencian por sus características de solubilidad: los tintes son compuestos solubles, que se aplican principalmente a materiales textiles en disolución acuosa; los pigmentos son compuestos insolubles, que se incorporan a productos tales como pinturas, tintas de imprenta o plásticos (Christie, 2003).

Los tintes industriales son compuestos orgánicos sintéticos de historia reciente. Hasta mediados del siglo XIX sólo se utilizaban tintes naturales, con características poco adecuadas para la tinción, tales como poca estabilidad y poca resistencia al lavado y a la luz. El afán por mejorar esas características y adaptar los tintes a sus aplicaciones de tinción hizo que su industria ofreciese productos cada vez más baratos, más fáciles de aplicar y que proporcionasen más color y mejor comportamiento térmico. De esta manera, 50 años después del origen de la industria de los tintes, el 90% de los tintes utilizados eran sintéticos.

1.1. Aplicaciones

La mayor parte de los estudios sobre tintes refieren su aplicación a la industria textil (O'Neill *et al.*, 1999; Guaratini & Zanoni, 2000). En efecto, históricamente los tintes han sido aplicados principalmente a la tinción de pieles y

cueros. En la actualidad esta industria supone aproximadamente un 70% del empleo de tintes a nivel mundial. La tecnología moderna de tinción de fibras consiste en docenas de etapas que se eligen en función de la naturaleza de la fibra textil, la disponibilidad del tinte para su aplicación, sus propiedades de fijación, consideraciones económicas y muchas otras (Zollinger, 1987). Dichas etapas se pueden agrupar en cuatro pasos básicos:

- i) Tratamiento de materiales brutos: preparación de fibras, fabricación de hilos...
- ii) Producción de géneros de punto y tejidos
- iii) Actividades de acabado: tinción, impresión y acabados especiales
- iv) Transformación de los tejidos en productos: ropa de vestir, de hogar...

La consideración del tipo de fibra es un aspecto importante a la hora de elegir el tinte que debe ser aplicado. La naturaleza física y química de la fibra requiere que el tinte empleado presente un conjunto adecuado de características químicas que promuevan su afinidad por la fibra en cuestión. Las fibras textiles se pueden clasificar en tres grandes grupos: naturales, semisintéticas y sintéticas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de las fibras textiles

Fibras naturales	Fibras semisintéticas
<i>Origen animal (fibras proteicas)</i>	i) viscosa
i) lana	ii) acetato de celulosa
ii) seda	Fibras sintéticas
<i>Origen vegetal (fibras celulósicas)</i>	i) poliéster
i) algodón	ii) poliamida (nylon)
	iii) fibras acrílicas

Otras aplicaciones

El interés de los tintes no está reducido únicamente al campo textil, sino también a la industria fotográfica, papelera, farmacéutica, cosmética o alimentaria (Waring & Hallas, 1990). Además el empleo de tintes en las llamadas “nuevas tecnologías”, como la electrónica y la electrofotografía, está ganando una enorme importancia, por tratarse de industrias con facturaciones anuales muy

considerables. En este campo se está estudiando el uso de tintes en láser, displays y diodos de emisión de luz, ópticas no lineales...

1.2. Clasificación

El sistema de clasificación internacional es el *Colour Index*, que es una publicación de la *Society of Dyers and Colourists* realizada en 1924 (O'Neill *et al.*, 1999). En ella se clasifican los tintes asignando un nombre genérico determinado por sus características de aplicación, y a continuación un número CI basado en su estructura química. Además los tintes se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química o bien de acuerdo al método de aplicación a las fibras.

Según la estructura química

Según su estructura química, los tintes se agrupan en las siguientes familias químicas, en orden aproximadamente creciente de importancia: azo ($-N=N-$), carbonilo ($C=O$) (incluyendo antraquinonas), ftalocianina, ion arilcarbonio (incluyendo trifenilmetinos), sulfuro, polimetino y nitro (Christie, 2003). En la Figura 1.1 se representan los grupos cromóforos de estos tintes.

Los tintes azo constituyen la familia más importante entre los colorantes industriales. Se caracterizan por tener un grupo funcional azo, consistente en un enlace doble $-N=N-$, unido a átomos de carbono con hibridación sp^2 . Generalmente el grupo azo se une a dos anillos aromáticos. En cuanto a sus propiedades de color, los tintes azo aportan un rango de matices prácticamente completo y una alta intensidad de color. Además presentan buenas propiedades técnicas: solidez a la luz, al calor, al agua y a otros disolventes. A escala industrial estos tintes tienen un elevado rendimiento económico, debido a la naturaleza de los procesos utilizados en su fabricación. Por todas estas razones, los tintes azo suponen 2/3 de los colorantes orgánicos citados en el *Colour Index* (O'Neill *et al.*, 1999) y un porcentaje similar de los tintes empleados en aplicaciones textiles (Kunz *et al.*, 2002; Christie, 2003). Por esta razón frecuentemente se emplean tintes azo como modelo en el estudio del tratamiento de efluentes coloreados.

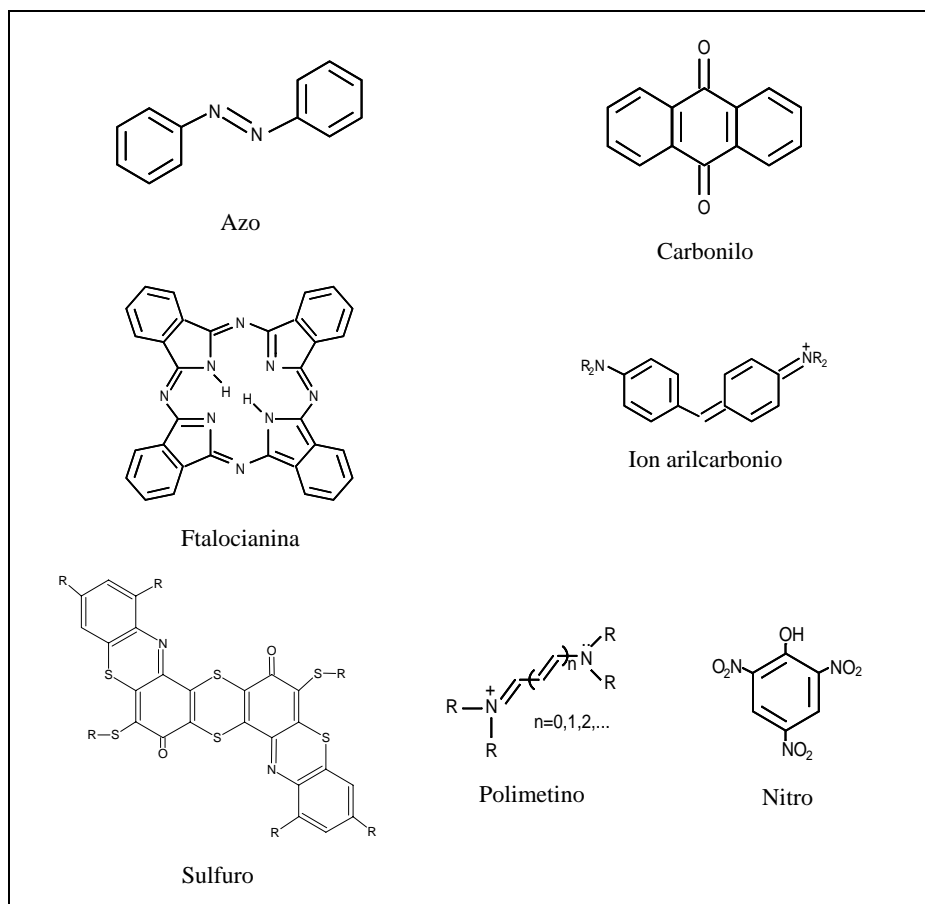


Figura 1.1. Estructura de las distintas clases de tintes empleados en la industria textil

Según el modo de aplicación

Dado que la aplicación más común de los tintes industriales es la tinción de fibras en la industria textil, se ha desarrollado una clasificación de los tintes en función de su método de aplicación. La forma de fijación de la molécula de colorante a la fibra se realiza generalmente en disolución acuosa mediante alguna de las siguientes interacciones: uniones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o enlaces covalentes. La Tabla 1.2 muestra la clasificación de los tintes en función del modo de aplicación a la fibra, así como las fibras a las cuales se aplican (Waring & Hallas, 1990; Guaratini & Zanoni, 2000).

Tabla 1.2. Clasificación de los tintes en función del método de aplicación a las fibras

<i>Clase de tinte</i>	<i>Descripción</i>	<i>Tipo de enlace</i>	<i>Aplicación</i>
Ácido	Aniónico con grupos sulfónicos	Interacción iónica	Lana, seda, poliamida
Mordiente	Requiere metales mordientes	Interacción iónica	Lana, seda
Premetalizado	Complejos con iones metálicos	Interacción iónica	Lana, seda, poliamida
Directo	Más de un grupo azo	Van der Waals	Algodón
Reactivo	Grupo electrofílico reactivo	Enlace covalente	Algodón, lana, seda, poliamida
De tina	Insoluble, se reduce y oxida sobre la fibra	Interacción iónica	Algodón, viscosa
Disperso	Insoluble, se hidroliza y precipita sobre la fibra	Interacción iónica	Celulosa, nylon, poliéster
Básico	Catiónico	Interacción iónica	Poliéster, acrílicos

Los tintes reactivos son los más utilizados en la industria textil, debido a la fortaleza del enlace covalente, que los hace persistentes y les confiere buenas propiedades de solidez al lavado. Estos tintes se introdujeron comercialmente para su aplicación a fibras de celulosa, aunque en la actualidad también se aplican a fibras de proteína, poliamida o poliéster.

2. Impacto ambiental de los efluentes coloreados

Aunque la industria de la fabricación de tintes representa una parte relativamente pequeña de la industria química, es importante el impacto ambiental que producen los efluentes que se generan. El tratamiento de estos efluentes viene determinado por una serie de características de la industria de los colorantes:

- i) *Producción:* En el mundo existen más de 100.000 tintes disponibles comercialmente (Kirby *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 2001) con una producción de más de $7 \cdot 10^5$ t/año (Meyer, 1981; Zollinger, 1987).
- ii) *Variabilidad de tintes:* Un 90% de los tintes se comercializan en cantidades inferiores a 100 t/año y sólo un 1% lo hacen en cantidades mayores de 1.000 t/año (Reife & Freeman, 1996; O'Neill *et al.*, 1999).
- iii) *Resistencia:* La exigencia actual de la industria textil radica en la búsqueda de tintes con estabilidad química y fotolítica cada vez más elevadas. Se diseñan tintes resistentes a la ruptura debida a la exposición a la luz, agua, jabones o lejías.
- iv) *Alto consumo de agua:* La tinción es un proceso húmedo, en el que se consumen 160 kg de agua/kg de producto acabado. El volumen de efluente representa un 90-95% del agua utilizada (Blánquez, 2005).
- v) *Elevadas pérdidas:* Sobre un 2% de la producción mundial de tintes se pierde en el efluente en procesos de fabricación (O'Neill *et al.*, 1999), mientras que un 10-15% se pierde en los procesos de tinción, como consecuencia de la incompleta fijación de los colorantes a las fibras. Este porcentaje representa la descarga de 200 t/d de estos compuestos al medio ambiente (Guaratini & Zanoni, 2000). Este porcentaje depende en gran medida del tipo de tinte y fibra que participan en la tinción, alcanzando valores desde 5% para tintes básicos hasta 50% para tintes reactivos (McMullan *et al.*, 2001).
- vi) *Altamente visible:* Valores del orden de mg/L de tinte en las aguas son visibles para el ojo humano. Para algunas clases de tintes ese valor disminuye a 0,005 mg/L en un cauce limpio (Gutiérrez & Crespi, 1999a).
- vii) *Variabilidad en la caracterización de las aguas:* En función del tipo de tinte aplicado, la fibra sobre la que se aplica y las distintas etapas en el proceso de tinción, las aguas generadas presentan características muy diferentes en cuanto a DQO, DBO, color, sólidos, C, N, P o sales (Vandevivere *et al.*, 1998; Bisschops & Spanjers, 2003).

Todas estas características hacen que el vertido de efluentes de la industria textil se haya convertido en un problema ecológico y toxicológico a nivel mundial.

2.1. Efectos ecológicos

La baja solubilidad de los pigmentos permite que estos sean mucho más fáciles de eliminar de las aguas por tratamientos físico-químicos. Sin embargo, los tintes presentan alta solubilidad, la cual se ve favorecida por la presencia de determinados grupos, tales como los sulfónicos. El primer efecto que causa el vertido de aguas residuales con tintes disueltos es el visual (Figura 1.2) y se presenta a concentraciones muy bajas de tinte. El hecho de transformar el entorno de cauces naturales es un aspecto negativo que debe ser solventado. El uso de esas aguas ya queda limitado, no siendo aptas para el consumo humano.



Figura 1.2. Efecto visual del vertido de efluentes coloreados sobre ríos

El principal problema ambiental derivado del aporte de color a las aguas de los ríos y lagos se debe a la reducción de la transparencia y la disminución del oxígeno disuelto, debido a que altas cargas de color dificultan la función fotosintética de las plantas.

Adicionalmente algunos problemas asociados a los efluentes textiles son debidos a la presencia de metales pesados o azufre, que producen problemas ambientales debido a su naturaleza tóxica.

2.2. Efectos toxicológicos

Los riesgos toxicológicos de los tintes sobre la salud humana están relacionados con el modo y tiempo de exposición. Estos compuestos presentan una baja toxicidad aguda, que es la resultante de los tiempos de exposición cortos. Esto es debido a que los tintes tienen una baja solubilidad en fluidos corporales (Christie, 2003) y una alta solubilidad en agua, de manera que estos compuestos suministrados oralmente son metabolizados en la microflora intestinal y excretados más rápidamente que los compuestos menos solubles (Guaratini & Zanoni, 2000). Estos compuestos únicamente producen efectos de poca gravedad, tales como dermatitis de contacto o sensibilización respiratoria.

La toxicidad crónica debida a exposición continuada a los tintes es baja. Se ha comprobado que algunos tintes de naturaleza azoica presentan un carácter cancerígeno potencial, y al menos 3.000 colorantes azo comerciales han sido catalogados como cancerígenos (Guaratini & Zanoni, 2000). Su toxicidad radica en que pueden dar lugar a las aminas aromáticas de las cuales derivan, debido a procesos de oxidación, hidrólisis o reducción del enlace azo. Algunas aminas aromáticas utilizadas en la fabricación de los tintes son carcinógenos reconocidos (Weisburger, 2002).

Aun así, el análisis del grado de toxicidad de los tintes, medido a partir de 50% de la dosis letal (LD_{50}) ha demostrado que apenas un número reducido de tintes presenta toxicidad aguda ($LD_{50} < 5$ g/kg) y son principalmente tintes bis-azo y básicos (Shore, 1996).

2.3. Minimización de los impactos

La legislación se está haciendo cada día más estricta en la mayor parte de los países desarrollados en cuanto a la eliminación de tintes de los efluentes textiles, lo que se está convirtiendo en un problema creciente para esta industria. La minimización de los impactos causados por este tipo de efluentes pasa por la prevención de la contaminación y la reutilización del agua y los compuestos de los efluentes generados.

Prevención de la contaminación

Existen una serie de técnicas de prevención de la contaminación, es decir, de reducción de la contaminación desde la fuente de origen, tales como:

- i) *Modificación del proceso*: Los cambios efectuados en el proceso y la implementación de tecnología nueva para llevarlo a cabo constituyen modificaciones a las operaciones básicas de una planta. Algunas reducen el uso del agua y eliminan o minimizan la descarga de compuestos químicos tóxicos o muy fuertes. Otras se basan en la recuperación de sustancias y el aprovechamiento de energía. El procedimiento con disolventes o las operaciones en continuo son algunos ejemplos.
- ii) *Ahorro del agua de proceso*: La minimización del consumo de agua en las plantas textiles da lugar a un ahorro en los costes y permite una mejor gestión de la contaminación a través de la reducción en origen.
- iii) *Substitución de compuestos químicos*: En muchos casos es posible reducir la cantidad de compuestos químicos utilizados en el procesamiento textil sin que ello produzca un efecto significativo en la calidad del producto. Otra solución es la substitución de los compuestos químicos más contaminantes por otros con menor toxicidad.

3. Tecnologías para el tratamiento de efluentes coloreados

El desarrollo de la tecnología adecuada para el tratamiento de efluentes textiles es objeto de gran interés en los últimos años debido a un aumento de la mentalización y la rigidez de la reglamentación ambiental. Las principales técnicas disponibles para la decoloración de este tipo de aguas se pueden agrupar en tres grandes grupos: tratamientos químicos, físicos y biológicos (Vandevivere *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2001; Forgacs *et al.*, 2004).

3.1. Tratamientos químicos

Reactivo de Fenton

El reactivo de Fenton es una combinación de H_2O_2 y sales de Fe(II). El ion ferroso se oxida a férrico mientras el H_2O_2 produce iones hidróxido y radicales hidroxilo. Estos últimos oxidan el tinte, y el compuesto formado precipita con el ion férrico y compuestos orgánicos (Lin & Peng, 1995). Con este método se consiguen altas velocidades de decoloración si las concentraciones de los reactivos implicados son elevadas (Kuo, 1992). Sin embargo, sus principales desventajas son la generación de lodos debida a la floculación de los reactivos con

el tinte, el coste de los lodos formados y el coste de los reactivos. Eventualmente deberá eliminarse también el hierro empleado (Gutiérrez & Crespi, 1999a).

Ozonización

Las técnicas de ozonización consisten en la destrucción de compuestos en base a la elevada capacidad oxidativa del ozono. La reacción de oxidación es rápida, se pueden tratar altos caudales, no se generan residuos ni lodos y se obtiene un efluente incoloro y con baja DQO, de manera que es apto para su vertido al medio ambiente (Ince & Gonenc, 1997). Sin embargo debe comprobarse la toxicidad de cada efluente concreto, pues en algunos casos los compuestos generados tienen mayor carácter tóxico que los colorantes de partida (Gutiérrez & Crespi, 1999a). Otra gran desventaja de la ozonización es su corto tiempo de vida media, aproximadamente de 20 min, lo cual repercute fuertemente en el coste del proceso (Robinson *et al.*, 2001).

Oxidación fotoquímica

Este método se basa en la combinación de la radiación UV con otros compuestos, tales como H₂O₂ o catalizadores como TiO₂, de manera que los rayos UV activan dichos compuestos y los hacen capaces de oxidar los tintes. Este método presenta una elevada eficacia y no genera lodos ni olores. Sin embargo las necesidades de una fuente de radiación, el coste, la lentitud del proceso y las dificultades de implementación a gran escala hacen que este método sea poco efectivo a nivel industrial (Kunz *et al.*, 2002).

Oxidación electroquímica

Los procesos electroquímicos se basan en la hidrólisis del colorante mediante un potencial o corriente controlada o a través de agentes secundarios generados electrolíticamente. Los procesos son limpios, operan a baja temperatura y en muchos casos no requieren la adición de productos químicos a las aguas residuales (Ochoa, 1995). El alto consumo de energía y la generación de compuestos secundarios por reacciones paralelas disminuyen la potencialidad del método (Guaratini & Zanoni, 2000).

Otros procesos químicos

Se han propuesto otros muchos métodos de eliminación de colorantes de las aguas, ya sean basados en procesos oxidativos con NaOCl (Chang *et al.*, 1996) o mediante la formación de complejos insolubles con ligandos (Buschmann, 1992).

3.2. Tratamientos físicos

Adsorción

La eficacia del proceso de adsorción está influenciada por una gran variedad de parámetros, entre ellos la interacción entre el tinte y el soporte, superficie específica, tamaño de la partícula, temperatura, pH o tiempo de contacto (Kumar *et al.*, 1998). La eficacia del método depende en gran medida del tipo de soporte elegido. Se emplean tanto soportes inorgánicos como orgánicos. Los primeros tienen una gran estabilidad mecánica y química, alta superficie específica y alta resistencia a la degradación microbiana. Los soportes orgánicos se generan a partir de fuentes renovables o son residuos industriales. Los procesos de adsorción generan efluentes de alta calidad, pero tienen una serie de desventajas que los hace ineficaces para el tratamiento de efluentes coloreados: son procesos lentos; no selectivos, de manera que hay una competición entre las moléculas de tinte y otros compuestos presentes en el efluente; no destructivos, generándose un residuo que debe ser eliminado; la desorción es un proceso muy difícil y costoso; los adsorbentes suelen ser caros y en ocasiones requieren un proceso de activación previo (Forgacs *et al.*, 2004).

Membranas de filtración

Los métodos de tratamiento basados en el empleo de membranas permiten una separación efectiva de las moléculas de colorante y otros compuestos de tamaño mayor al del poro de la membrana seleccionada. Principalmente se emplean las técnicas de ósmosis inversa y nanofiltración (Reife & Freeman, 1996). Se logra tratar grandes volúmenes de efluente en continuo de un modo rápido y satisfactorio. La generación de un residuo con una alta concentración de contaminante y la dificultad y coste de sustitución de las membranas son las principales desventajas de estas técnicas (Robinson *et al.*, 2001).

Intercambio iónico

El efluente pasa a través de las membranas de intercambio iónico hasta su saturación. La principal ventaja de esta técnica es que no hay pérdida de adsorbente durante su regeneración. Sin embargo, el coste es elevado, los disolventes necesarios para la limpieza son caros y es un método no apto para todo tipo de tintes (Slokar & Le Marechal, 1997).

Coagulación-floculación

Los métodos de coagulación-floculación se basan en la adición de polielectrolitos o floculantes inorgánicos (sales de hierro o aluminio), que forman flóculos con las moléculas de colorante facilitando su eliminación por sedimentación. Las eficacias de eliminación son altas, pero en el proceso se generan lodos que deben ser eliminados. Además los mejores rendimientos se logran al aplicar un exceso de coagulante, que aumenta la concentración de contaminante en el efluente (Gahr *et al.*, 1994).

La Tabla 1.3 muestra algunas aplicaciones de los distintos métodos químicos y físicos en la eliminación de colorantes de las aguas residuales, tanto sintéticas como reales, de la industria textil.

3.3. Tratamientos biológicos

La aplicación de microorganismos a la degradación de aguas que contienen tintes sintéticos es una opción atractiva, aunque la mayor parte de estos compuestos son químicamente muy estables y resistentes al ataque microbiano. El estudio de tratamientos biológicos para la biodegradación de estos compuestos adquiere gran importancia por las ventajas que el método presenta: los procesos son relativamente económicos, los costes de operación son bajos y se pueden generar efluentes limpios tras la degradación parcial o total de los productos iniciales.

Tratamiento bacteriano anaerobio

La eficacia de los tratamientos anaerobios en la degradación de tintes ha sido ampliamente estudiada y demostrada, tanto con cultivos mixtos como con cepas

Tabla 1.3. Aplicación de distintos métodos físico-químicos al tratamiento de aguas residuales conteniendo tintes

<i>Método</i>	<i>Tinte degradado</i>	<i>Referencia</i>
Reactivo de Fenton	Tintes azo	Solozhenko <i>et al.</i> , 1995
	Antraquinona-sulfonato	Kiwi <i>et al.</i> , 1993
	Orange II	Bandara <i>et al.</i> , 1997
	Tintes ácidos y reactivos	Hassan & Hawkyard, 2002
Ozonización	Moléculas con doble enlace	Slokar & Le Marechal, 1997
	Tintes azo	Shu & Huang, 1995
	Tintes reactivos	Peralta-Zamora <i>et al.</i> , 1999
	Aminoclorotrizinas	Arslan-Alaton <i>et al.</i> , 2004
Oxidación fotoquímica	Tintes reactivos	Peralta-Zamora <i>et al.</i> , 1999
	Orange II	Vinodgopal <i>et al.</i> , 1996
	Acid Blue 40	Tang & An, 1995
	Aguas residuales textiles	Kanmani & Thanasekaran, 2003 y 2004
Oxidación electroquímica	Tintes reactivos	Pelegriani <i>et al.</i> , 1999
	Tintes	Gutiérrez & Crespi, 1999b
	Tintes azo	McClung & Lemley, 1994
	Aguas residuales textiles	Lin & Peng, 1996
	Methyl Orange	Sanromán <i>et al.</i> , 2004
	Tintes azo	Bechtold <i>et al.</i> , 2002
Adsorción	Orange II	Jain <i>et al.</i> , 2003
	Tintes ácidos	Poots & McKay, 1976
	Tintes ácidos	Walker & Weatherley, 1997
	Congo red	Namasivayam & Arisi, 1997
	Brilliant Yellow	Yoshida & Takemori, 1997
	Porción Orange, Congo red	Namasivayam <i>et al.</i> , 1996
	Methylene Blue	Dobbs <i>et al.</i> , 1995
Remazol Brilliant Blue	El-Sharkawy, 2001	
Membranas filtración	Tintes aniónicos	Porter & Gomes, 2000
Intercambio iónico	Aguas residuales textiles	Slokar & Le Marechal, 1997
Coagulación-floculación	Acilan Blue	Ogutveren <i>et al.</i> , 1992

aisladas (Banat *et al.*, 1996; Delée *et al.*, 1998; McMullan *et al.*, 2001; Forgacs *et al.*, 2004; Méndez-Paz *et al.*, 2005a, 2005b). Los cultivos mixtos de microorganismos presentan la ventaja de que las distintas cepas presentes en el consorcio atacan a las moléculas de tinte en diferentes posiciones e incluso ayudan a la descomposición de los productos generados por las otras cepas. Sin embargo los consorcios generalmente varían en el transcurso del proceso de descomposición, de manera que sobreviven las cepas que mejor se adaptan al medio, dificultando los procesos de control (Banat *et al.*, 1996; Forgacs *et al.*, 2004).

La identificación química de los productos de degradación de los tintes muestra que la decoloración tiene lugar vía reductiva (Carliell *et al.*, 1994). En concreto en el caso de los tintes azo, el primer paso de la degradación es la ruptura del enlace azo. Este paso es llevado a cabo por una variedad de enzimas citoplasmáticas con baja especificidad por el sustrato llamadas “azorreductasas”. En condiciones anóxicas estas enzimas facilitan la transferencia de electrones por medio de flavinas solubles al tinte azo, el cual se reduce (McMullan *et al.*, 2001). Sin embargo es improbable que moléculas de tinte poliméricas o tintes azo sulfonados con carga sean capaces de atravesar la membrana bacteriana, lo que indica que es posible la existencia de otro mecanismo de reducción que no esté basado en las azorreductasas citoplasmáticas (Keck *et al.*, 1997). Keck *et al.* (1997) proponen un mecanismo en que ciertos compuestos con estructura basada en quinona, que han sido generados durante el metabolismo de sustratos específicos, actúan como mediadores en la transferencia de equivalentes redox entre la membrana bacteriana y las moléculas de tinte.

La adición de mediadores redox (van der Zee *et al.*, 2001) o la presencia de sales (Carliell *et al.*, 1998) puede acelerar la descomposición de tintes azo. A su vez, la aplicación de nuevas tecnologías, como sistemas de alta velocidad, en los cuales los tiempos de residencia hidráulicos se desacoplan de los tiempos de retención de sólidos, facilitan la eliminación de los tintes de las aguas residuales (van Lier *et al.*, 2001).

El mecanismo de reducción de los tintes azo da lugar a la generación de aminas aromáticas (Baughman & Weber, 1994; Méndez-Paz *et al.*, 2005a), que carecen de color, pero tienen un alto carácter tóxico, mutagénico y, en una alta proporción, cancerígeno (Chung *et al.*, 1992). Sólo en casos aislados se ha obtenido una mineralización parcial de tintes azo, en donde sólo uno de los

productos de la ruptura del enlace azo se mineraliza, mientras que el otro se acumula en el reactor (Donlon *et al.*, 1997).

Tratamiento bacteriano aerobio

Por lo general, los tratamientos aerobios basados en consorcios de bacterias en sistemas convencionales no son capaces de degradar tintes procedentes de efluentes textiles (Robinson *et al.*, 2001). En estos procesos la eliminación de tintes es debida frecuentemente a la adsorción sobre los lodos (Pagga & Brown, 1986). Sin embargo se ha conseguido aislar cepas de bacterias que sí son capaces de degradar algunas clases de tintes (McMullan *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual bacterias aerobias podrían degradar los tintes sintéticos sería mediante la secreción de azorreductasas aerobias (Russ *et al.*, 2000).

Tratamiento bacteriano combinado anaerobio-aerobio

Aunque la reducción anaerobia de tintes azo es más satisfactoria que la degradación aerobia, los productos generados presentan mayor toxicidad que los compuestos originales, y deben ser degradados. Estos compuestos son aminas aromáticas, que pueden ser oxidadas en un proceso aerobio convencional. El proceso combinado anaerobio-aerobio se ha puesto en práctica con éxito en numerosas ocasiones (Fitzgerald & Bishop, 1995; Panswad & Luangdilok, 2000), permitiendo incluso la mineralización total del tinte azo Mordant Yellow 3 (Kudlich *et al.*, 1997).

Otros tratamientos biológicos

Los microorganismos más estudiados en cuanto a su capacidad para degradar efluentes coloreados son los hongos de podredumbre blanca (Fu & Viraraghavan, 2001). Este grupo de microorganismos secreta enzimas extracelulares con alta capacidad oxidante, suficiente para mineralizar el principal constituyente de la pared celular de las plantas, la lignina, y por consiguiente para oxidar una gran cantidad de compuestos difícilmente degradables por otros métodos (Reddy, 1995). En el siguiente apartado se aborda un estudio más detallado del mecanismo de degradación y de las aplicaciones de los hongos ligninolíticos.

Algunas clases de algas también tienen capacidad para la biodegradación de tintes, mediante la secreción de enzimas azorreductasas que rompen los enlaces azo y dan lugar a la formación de aminas (Liu & Liu, 1992).

En muchos otros estudios se han presentado sistemas basados en organismos con capacidad para eliminar tintes por adsorción de los mismos en la biomasa microbiana, viva o muerta (Kumar *et al.*, 1998; Sumathi & Manju, 2000). Las interacciones entre los tintes y los microorganismos dependen de la química de ambos y las uniones se realizan normalmente por intercambio iónico. La biosorción es un proceso generalmente rápido, pero la principal desventaja es que el tinte no es degradado, de manera que se genera un residuo que contiene una alta concentración de los compuestos coloreados (Robinson *et al.*, 2001).

4. Tratamiento de efluentes coloreados mediante hongos ligninolíticos

4.1. Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos han sido los microorganismos más estudiados para la degradación de compuestos xenobióticos. Su capacidad de degradación de un compuesto tan complejo como la lignina ha hecho considerar estos hongos como una posible alternativa para la eliminación de otros muchos compuestos de baja biodegradabilidad.

La lignina, junto con la celulosa y hemicelulosa, es uno de los componentes principales de las plantas y la forma más abundante de carbonos aromáticos en la biosfera. Las macromoléculas de lignina se forman a partir de tres precursores alcohólicos (alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico) cuya polimerización al azar tras la formación de sus radicales correspondientes, produce una estructura totalmente heterogénea e irregular y finalmente una molécula tridimensional, amorfa e insoluble en agua (Adler, 1977). Debido a su complejidad, esta macromolécula confiere fuerza y rigidez a las paredes de las células y a los tejidos de todas las plantas vasculares actuando como un pegamento entre los polisacáridos. Además la lignina interviene en el transporte de agua en las plantas y forma una barrera contra la destrucción microbiana protegiendo a los polisacáridos fácilmente asimilables (Hofrichter, 2002).

En función del modo por el cual los hongos atacan a la madera y de la descomposición producida, se pueden clasificar en tres grupos:

- i) *Hongos de podredumbre parda o marrón*: Son capaces de degradar los carbohidratos de la pared celular de las plantas, pero no la lignina. Dado que el color pardo de la madera es conferido por la lignina, dicho color permanece intacto.
- ii) *Hongos de podredumbre blanda*: Atacan la madera en condiciones de alta humedad, provocando el reblandecimiento de los tejidos y en consecuencia una pérdida de peso significativa.
- iii) *Hongos de podredumbre blanca*: Estos hongos tienen capacidad para degradar simultáneamente la lignina y todos los carbohidratos de la pared celular. En muchas ocasiones estos hongos degradan preferentemente la lignina, de manera que permanecen la celulosa y hemicelulosa, confiriendo el color blanco a la madera. A este grupo de hongos pertenece la especie *Phanerochaete chrysosporium*, que es la más comúnmente empleada para la degradación de la lignina, además de otras como *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii*, etc.

Los hongos de podredumbre blanca son capaces de degradar la lignina por medio de la secreción de enzimas extracelulares mediante su metabolismo secundario. Principalmente estas enzimas son una fenoloxidasa (lacasa) y dos peroxidases (manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP)), esenciales para la degradación de la lignina. Sin embargo, para lograr su completa mineralización estas enzimas generalmente se combinan con otros procesos que requieren la presencia de otras enzimas, incapaces de la degradación de lignina por ellas mismas. Estas son glioxal oxidasa y superóxido dismutasa para la producción intracelular de H₂O₂, que es un cosustrato de LiP y MnP, y glucosa oxidasa, aril alcohol oxidasa y celobiosa deshidrogenasa, que participan en la ligninólisis asociada a la degradación de celulosa y hemicelulosa (Leonowicz *et al.*, 1999; Wesenberg *et al.*, 2003).

4.2. Aplicaciones

Dada la capacidad ligninolítica de los hongos de podredumbre blanca, una de sus primeras aplicaciones industriales fue la degradación de la lignina en los

procesos de elaboración de pasta de papel. Los hongos se aplican tanto en la etapa de pulpeo como en la de blanqueo, pues permiten un ahorro energético y de reactivos químicos (Moreira *et al.*, 1998, 2001b). Los efluentes generados en los procesos de tratamiento de la madera también fueron tratados con hongos de podredumbre blanca (Feijoo & Lema, 1995). Por otra parte, algunos de estos hongos, como *Trametes versicolor*, han sido aplicados a la producción de bioetanol (Jönsson *et al.*, 1998).

La mayor aplicación de los hongos de podredumbre blanca en el campo de la biotecnología está orientada a la degradación de compuestos xenobióticos. Esta capacidad de los hongos es de enorme importancia si se tiene en cuenta que estos compuestos no están presentes en el medio ambiente de forma natural, y por lo tanto no hay organismos en la naturaleza que estén adaptados a estos compuestos o a su degradación. El número de compuestos que pueden ser tratados por estos hongos está en proceso de crecimiento. Algunos de ellos son:

- i) *Compuestos clorados*: Algunos son di, tri, tetra y pentaclorofenoles, lindano o bifenilos policlorados (Manimekalai & Swaminathan, 2000; Duran *et al.*, 2002).
- ii) *Compuestos nitrosustituidos*: Di o trinitrotolueno (Kim & Song, 2000; van Aken *et al.*, 2000).
- iii) *Hidrocarburos policíclicos aromáticos*: Antraceno, fenantreno, pireno o benzopireno (Pickard *et al.*, 1999; Janikowski *et al.*, 2002).
- iv) *Tintes industriales*

4.3. Degradación de tintes

El hongo *Phanerochaete chrysosporium* ha sido el más frecuentemente empleado en la degradación de tintes, debido a su alta capacidad de producción de enzimas (Forgacs *et al.*, 2004). Se empleó por primera vez en 1980 para decolorar aguas con lignina procedentes de un proceso de pulpeo (Eaton *et al.*, 1980). Sin embargo no fue hasta 1983 cuando se aplicó por vez primera a la decoloración de tintes, cuando Glenn y Gold desarrollaron un método de medida de la actividad enzimática basado en la decoloración de una serie de tintes poliméricos sulfonados (Glenn & Gold, 1983). A partir de este momento, *Phanerochaete chrysosporium* se utilizó en numerosas ocasiones para la degradación de una

amplia variedad de tintes (Cripps *et al.*, 1990; Chagas & Durrant, 2001). Otros hongos de podredumbre blanca han sido estudiados en la oxidación de tintes industriales: *Trametes versicolor* (Wong & Yu, 1999; Blánquez *et al.*, 2004; Moldes, 2005), *Coriolus versicolor* (Yesilada *et al.*, 2003), *Funalia trogii* (Yesilada *et al.*, 1995), *Bjerkandera adusta* (Heinfling *et al.*, 1998a; Swamy & Ramsay, 1999; Moreira *et al.*, 2001c) y muchas otras cepas (Fu & Viraraghavan, 2001; Wesenberg *et al.*, 2003). El tratamiento de aguas mediante hongos de podredumbre blanca fue estudiado no sólo con aguas sintéticas sino también con efluentes reales procedentes de industrias textiles (Knapp & Newby, 1999).

El principal mecanismo por el cual los hongos de podredumbre blanca atacan las moléculas de tinte es la secreción de las enzimas ligninolíticas, principalmente MnP, LiP y lacasa (Wesenberg *et al.*, 2003). Sin embargo no se puede excluir la existencia de otros mecanismos. En algunos estudios se ha hablado de la contribución del sistema redox de la membrana plasmática de los hongos a la degradación de tintes (Pasti & Crawford, 1991). Otros trabajos proponen la producción de una enzima capaz de decolorar el tinte Remazol Brilliant Blue R (RBBR). Esta enzima presenta actividad diferente a la de MnP, LiP o lacasa y se le denominó RBBR oxigenasa (Vyas & Molitoris, 1995). Por último, un mecanismo que en ocasiones juega un papel muy importante en la decoloración de tintes es la adsorción, tanto en hongos vivos como muertos (Fu & Viraraghavan, 2001). Se ha calculado que el porcentaje de eliminación de color por biosorción puede llegar a ser del orden del 50% (Knapp *et al.*, 1995).

En la decoloración de tintes con hongos influyen diversos factores, relacionados, ya sea con las condiciones de crecimiento del hongo, o bien con la estructura química del tinte (Fu & Viraraghavan, 2001). La producción de enzimas ligninolíticas está inducida por limitación de nutrientes (principalmente C y N), elevadas concentraciones de oxígeno disuelto o baja agitación en cultivos sumergidos de hongos (Wesenberg *et al.*, 2003). Por otra parte la adición de activadores (Tween 80, veratril alcohol, óxido de manganeso (IV)) aumenta la velocidad de degradación de los tintes (Couto *et al.*, 2000). Por último, cuando los anillos aromáticos de los tintes están sustituidos con grupos hidroxil, amino o nitro, la decoloración es más rápida que en tintes no sustituidos (Spadaro *et al.*, 1992).

5. Tratamiento de efluentes coloreados mediante enzimas ligninolíticas

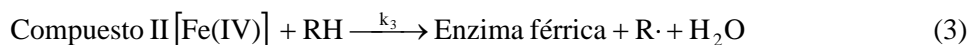
5.1. Enzimas ligninolíticas

Las principales enzimas ligninolíticas son oxidasas (lacasa) y peroxidasas (LiP y MnP). Son enzimas oxidativas que no requieren otros componentes celulares para poder desarrollar su función, tienen una gran especificidad por el sustrato y son capaces de transformar una gran variedad de compuestos tóxicos. Además estas enzimas están fácilmente disponibles en la naturaleza y han sido ampliamente estudiadas a lo largo de los últimos años como catalizadoras de reacciones de degradación de compuestos recalcitrantes (Torres *et al.*, 2003). Ambos tipos de enzimas ligninolíticas están glicosiladas, lo que aumenta su estabilidad (Nie *et al.*, 1999).

Las peroxidasas son enzimas con un grupo hemo, que requieren la presencia de peróxido de hidrógeno para oxidar la lignina. Tienen pesos moleculares entre 35 y 47 kDa, puntos isoeléctricos entre 2,8 y 5,4 y potenciales de oxidación de 1450-1510 mV (Mester & Tien, 2000; Wesenberg *et al.*, 2003). Las principales peroxidasas ligninolíticas son: LiP, que oxida compuestos fenólicos y no fenólicos, y MnP, que oxida compuestos fenólicos y emplea preferentemente Mn^{2+} como sustrato reductor. Lacasa es una fenoloxidasa que oxida fenoles y aminas aromáticas, utilizando oxígeno molecular como oxidante, que se reduce a agua por medio de la transferencia de cuatro electrones. La enzima lacasa tiene pesos moleculares entre 50 y 300 kDa, puntos isoeléctricos ácidos y potenciales de oxidación de 500-800 mV (Call & Mücke, 1997; Wesenberg *et al.*, 2003).

El ciclo catalítico de las peroxidasas ligninolíticas es similar al de otras peroxidasas. La forma férrica nativa de la enzima reacciona con una molécula de H_2O_2 , de manera que se genera el llamado compuesto I, que es una forma de la enzima con un estado de oxidación superior en dos equivalentes a la forma nativa (Reacción 1). Durante la oxidación de la forma férrica, se toma un electrón de la forma Fe^{3+} y el otro del anillo porfirínico, de manera que se generan Fe^{4+} y un radical porfirínico. A continuación este compuesto I se reduce en dos pasos sucesivos por medio de un sustrato, que opera como reductor. En un primer paso (Reacción 2) se forma el compuesto II, que es un intermediario con un grupo Fe^{4+} , y la forma radical del sustrato. En el segundo paso (Reacción 3) se produce la

reducción de la enzima a la forma férrica nativa, y se emplea una nueva molécula de sustrato, generándose por consiguiente una nueva forma oxidada de la misma (Nakayama & Amachi, 1999; Mester & Tien, 2000). Las dos primeras reacciones (enzima nativa y compuesto I) son rápidas, mientras que la reacción del compuesto II suele ser unas 10 veces más lenta (Kuan *et al.*, 1993). En exceso de H_2O_2 el compuesto II da lugar a una forma inactiva de la enzima (Reacción 4).



Debido a que *Phanerochaete chrysosporium*, el hongo de podredumbre blanca más comúnmente estudiado, produce una alta actividad LiP, esta enzima se consideró tradicionalmente la más importante en la degradación de la lignina. Sin embargo, las condiciones óptimas de producción de LiP no son adecuadas para muchos hongos de podredumbre blanca, y especialmente los hongos con mayor eficiencia en la degradación de lignina no fueron capaces de degradarla en dichas condiciones. Además, se encontró que diferentes hongos ligninolíticos no producen LiP, sino únicamente MnP o lacasa. El estudio de varias cepas diferentes de hongos evidenció la presencia de MnP en todas ellas, mientras que la producción de LiP fue más difícil de demostrar (Hatakka, 1994). Este hecho centró el interés en el empleo de MnP como enzima ligninolítica adecuada para la degradación de lignina y otros compuestos.

5.2. Manganeso peroxidasa

La enzima manganeso peroxidasa se descubrió por primera vez en el hongo de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara *et al.*, 1984; Glenn & Gold, 1985; Paszczynski *et al.*, 1985). Muchos grupos de hongos son capaces de producir MnP en múltiples formas, siendo los más comunes los de los géneros *Pleurotus* (Asada *et al.*, 1995), *Trametes* (Johansson & Nyman, 1993), *Phlebia* (Karhunen *et al.*, 1990) o *Bjerkandera* (de Jong *et al.*, 1992).

Generalmente la enzima MnP procedente de un mismo hongo se presenta en diferentes formas o isoenzimas, de manera que catalizan una misma reacción cinética pero se diferencian en el peso molecular, la carga o las constantes cinéticas, y están codificadas por diferentes genes. Así, se ha encontrado que el hongo *Ceriporiopsis subvermispora* produce hasta 11 isoenzimas (Hofrichter, 2002). *Bjerkandera adusta* produce dos isoenzimas, con pesos moleculares de 44 kDa. Tras la desglicosilación, la masa de la forma MnP1 se redujo a 42,7 kDa, lo que significa que la forma glicosilada contiene un 3% de carbohidratos. Los puntos isoeléctricos para ambas formas son 3,45 para MnP1 y 3,35 para MnP2 (Heinfling *et al.*, 1998a).

La estructura de MnP se puede dividir en tres regiones: zona distal, región próxima y sitio activo. La región distal contiene una serie de residuos (His, Arg, Asp y Leu) que intervienen en la reacción de la forma nativa de la enzima con H_2O_2 . La región próxima es responsable de la reactividad frente a estabilidad del grupo hemo. El residuo encargado de conferir estabilidad al estado Fe^{4+} del grupo hemo es His. El sitio activo de MnP con Mn^{2+} se considera que está formado por un propionato hemo y Glu35, Glu39 y Asp179 (Mester & Tien, 2000).

El ciclo tradicional de la enzima MnP comienza mediante una oxidación de la forma nativa por medio de una molécula de H_2O_2 , de manera que se genera una forma oxidada de la enzima (compuesto I), con un estado de oxidación dos niveles superior al de la forma nativa, y una molécula de agua. El compuesto I es posteriormente reducido por medio de la oxidación de Mn^{2+} , generándose Mn^{3+} y el compuesto II, en un estado de oxidación superior al de la enzima original. Por último se produce una nueva reducción de la enzima hasta recuperar la forma férrica. Esta nueva reducción implica la oxidación de otro Mn^{2+} a Mn^{3+} . El compuesto II, en exceso de H_2O_2 , da lugar a una forma inactiva (compuesto III). En la Figura 1.3 se muestra el ciclo catalítico de la enzima MnP.

MnP es una enzima dependiente del manganeso, pues a pesar de que tanto Mn^{2+} como varios compuestos fenólicos pueden reducir la forma MnP I a MnP II (Wariishi *et al.*, 1988), sólo Mn^{2+} es capaz de realizar la reducción de MnP II a la forma nativa MnP (Kuan *et al.*, 1993). Cuando Mn^{2+} es el substrato reductor, por cada ciclo catalítico de la enzima se generan dos formas de Mn^{3+} , que actúa como oxidante de otros compuestos, con un potencial redox de 1,5 V. El Mn^{3+} es un oxidante de pequeño tamaño, por tanto tiene acceso a un gran número de

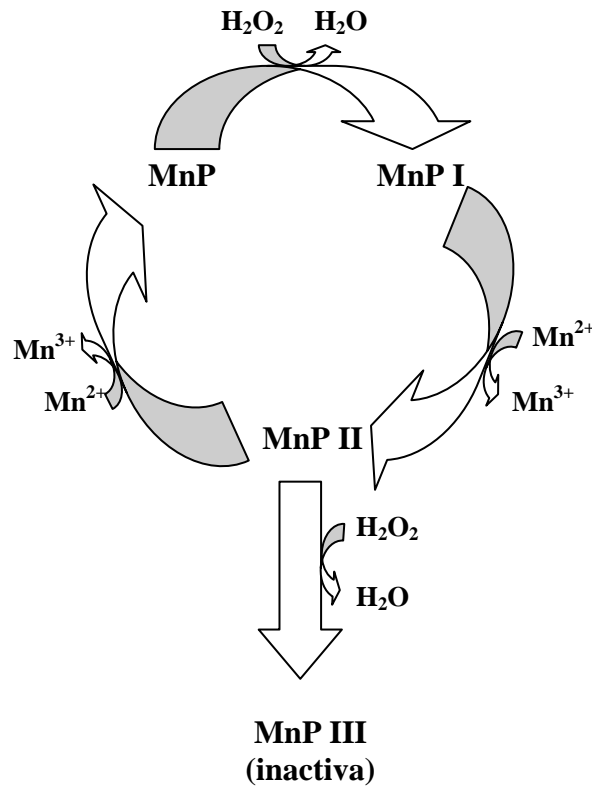


Figura 1.3. Ciclo catalítico de la enzima manganeso peroxidasa

compuestos que la enzima no podría alcanzar. Sin embargo, Mn³⁺ es un compuesto inestable en disolución acuosa, de manera que necesita formar un complejo estable con algún ácido orgánico. Los α -hidroxiácidos actúan quelando el Mn³⁺ y de esta forma facilitan la disociación de Mn²⁺-MnP I (Wariishi *et al.*, 1989).

La fuente de H₂O₂ para la iniciación del ciclo catalítico de la enzima puede provenir de dos orígenes: *i*) la reducción directa de O₂ por medio de otras enzimas del propio hongo, tales como aril alcohol oxidasas (AAO) para *Bjerkandera adusta* o *Pleurotus eryngii* o glioxal oxidasas en el caso de *Phanerochaete chrysosporium* (Gómez-Toribio *et al.*, 2001); *ii*) mediante la generación de radicales superóxido (O₂^{•-}) que proceden de la autooxidación de productos de reacción (Guillén *et al.*, 1997).

El ciclo catalítico de MnP también conlleva la generación de O₂ como resultado de la actividad peroxidasa sobre el Mn²⁺, y es debida a la oxidación parcial de H₂O₂ por parte del Mn³⁺ generado por la enzima. La producción de O₂ se hace más patente cuando hay ausencia de sustratos susceptibles de oxidación por parte de Mn³⁺ (Martínez *et al.*, 1996a).

La capacidad oxidativa de la enzima MnP se puede ver incrementada en presencia de compuestos que actúen como mediadores, tales como tioles (cisteína o glutatión) (Wesenberg *et al.*, 2003) o ácidos grasos insaturados (Tween 80) (Mester & Tien, 2000).

5.3. Peroxidasa versátil

La mayor parte de las MnP descritas parecen seguir el ciclo general mostrado en la Figura 1.3, pero hay algunas MnP que en ausencia de Mn²⁺ también oxidan compuestos aromáticos fenólicos (rojo fenol, 2,6-dimetoxifenol) y no fenólicos (alcohol veratrílico) y tienen actividad oxidasa con NADH, y por lo tanto se consideran formas híbridas entre LiP y MnP. Sin embargo la eficiencia catalítica es mucho más elevada en presencia de Mn²⁺ que con sustratos aromáticos (Heinfling *et al.*, 1998a). Estas enzimas, a las que se les llamó peroxidosas versátiles (VP), fueron descritas en los hongos *Pleurotus eryngii* (Martínez *et al.*, 1996a), *Bjerkandera* sp. BOS55 (Mester & Field, 1998) y *Bjerkandera adusta* (Heinfling *et al.*, 1998a).

La actividad dependiente o independiente de Mn²⁺ es función en gran medida de las condiciones de pH y de la concentración de sustratos. La actividad independiente de Mn²⁺ es máxima a pH 3, mientras que en presencia de Mn²⁺ el pH óptimo para la oxidación de sustratos es 4,5-5 (Martínez *et al.*, 1996b). En algunos casos Mn²⁺ actúa como inhibidor no competitivo en la degradación de compuestos, como ocurre en la decoloración de Reactive Blue 5 por MnP de *P. eryngii*. Esto sugiere que estas peroxidosas versátiles deben de disponer de al menos dos sitios activos de unión a sustratos (Heinfling *et al.*, 1998a). De esta manera las peroxidosas procedentes de *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus eryngii* pueden realizar una oxidación directa de sustratos o una oxidación vía la generación de complejos de Mn³⁺, que permite el acceso a sustratos en que no puede penetrar la enzima. Ambas oxidaciones pueden ser alternativas o secuenciales (Heinfling *et al.*, 1998a). A pesar de que la actividad de esta enzima puede ser independiente de la presencia de Mn²⁺, se mantendrá el nombre de

manganeso peroxidasa debido a que Mn^{2+} es su mejor sustrato, que será el empleado en el desarrollo de este trabajo.

Las ventajas de emplear MnP procedente del hongo *Bjerkandera adusta* frente a MnP de *Phanerochaete chrysosporium* son: *i)* MnP tiene actividad en presencia o en ausencia de Mn, aunque la afinidad a otros sustratos y la cinética es menor; *ii)* la resistencia frente a altas concentraciones de H_2O_2 es mayor (Mielgo *et al.*, 2003b), debido a que la enzima aril alcohol oxidasa del hongo *Bjerkandera adusta* produce concentraciones más altas de H_2O_2 que la enzima glioxal oxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Böckle *et al.*, 1999).

5.4. Aplicaciones

El empleo de enzimas *in vitro* a nivel industrial es una práctica que presenta una serie de ventajas con respecto al empleo de los hongos (López *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Forgacs *et al.*, 2004):

- i)* Las enzimas pueden operar bajo una variedad de condiciones de pH, fuerza iónica o temperatura
- ii)* Considerando la posible reutilización de la enzima, los requerimientos enzimáticos son bajos
- iii)* Las enzimas se pueden mantener activas en presencia de altas concentraciones de contaminantes y de concentraciones moderadas de disolventes orgánicos
- iv)* El proceso se puede modificar fácilmente en función del carácter de los sustratos a degradar
- v)* Los períodos de tratamiento son mucho más cortos que en presencia de hongo
- vi)* No existen retrasos causados por la fase de latencia de la biomasa
- vii)* Se reduce considerablemente el volumen de lodos, de manera que el impacto ambiental es mínimo
- viii)* La aplicación y el control del proceso son sencillos

Por otra parte algunos de los inconvenientes que conlleva el empleo de enzimas *in vitro* son la sensibilidad de algunas enzimas a cambios en las

condiciones ambientales, el coste del proceso de obtención de las mismas y, en el caso de las peroxidases, la inactivación por H₂O₂. El efecto de estas variables debe ser estudiado en cada caso concreto para minimizar el consumo de enzima y favorecer la eficacia del proceso.

Las enzimas ligninolíticas se han empleado tradicionalmente en procesos *in vitro*, principalmente en la degradación de compuestos recalcitrantes. Algunas de estas aplicaciones se esquematizan en la Tabla 1.4. Además de estas aplicaciones, las peroxidases se emplean como catalizadores en exámenes clínicos, en inmunoensayos enzimáticos y en análisis de quimioluminiscencia (Nakayama & Amachi, 1999).

6. Reactores enzimáticos

Si se pretende desarrollar un sistema económicamente viable, las reacciones catalizadas por enzimas deben considerar no sólo la separación de reactivos y productos sino también la recuperación y reutilización de la enzima (Prazeres & Cabral, 1994; Rios *et al.*, 2004). Por medio de sistemas que permitan retener la enzima es posible la operación de procesos enzimáticos en continuo, con todas las ventajas que conlleva (López *et al.*, 2002):

- i) Es posible trabajar con altas cargas de enzima
- ii) Se consigue mantener una actividad enzimática prolongada
- iii) Se reducen los costes, energía y productos de desecho
- iv) Se consigue reducir el riesgo de inhibición por sustrato o por producto
- v) Se consigue un producto más purificado, libre de enzima
- vi) La operación, control y escalado del proceso son sencillos

Las enzimas pueden estar presentes en diferentes formas: *i*) libres, solubles en la mezcla de reacción; *ii*) inmovilizadas en la superficie o la matriz de una membrana; *iii*) inmovilizadas mediante la formación de perlas o derivados sobre algún soporte (Figura 1.4). Si la enzima se mantiene libre, el sistema debe estar acoplado a una membrana y la retención de la enzima se realiza mediante su confinamiento en uno de los lados de la misma. Si la enzima está inmovilizada sobre la membrana o algún soporte, la inmovilización se realiza mediante

Tabla 1.4. Aplicación de enzimas ligninolíticas a la degradación *in vitro* de compuestos

Compuesto	Enzima	Fuente	Referencia
Lignina	MnP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Wariishi <i>et al.</i> , 1991
	MnP	<i>Nematoloma frowardii</i> y <i>Phlebia radiata</i>	Hofrichter <i>et al.</i> , 1999
	MnP y LiP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Thompson <i>et al.</i> , 1998
Fenoles	LiP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aitken <i>et al.</i> , 1989
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hammel & Tardone, 1988
	HRP	--	Wagner & Nicell, 2001
		--	Cooper & Nicell, 1996
	Lacasa	<i>Rhizoctonia praticola</i> <i>Coriolus versicolor</i>	Bollag <i>et al.</i> , 1988 Ullah <i>et al.</i> , 2000
	MnP	<i>Nematoloma frowardii</i>	Hofrichter <i>et al.</i> , 1998
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	LiP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hammel <i>et al.</i> , 1986
	Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	Majcherczyk <i>et al.</i> , 1998
	MnP	<i>Phanerochaete laevis</i> <i>Nematoloma frowardii</i>	Bogan & Lamar, 1996 Sack <i>et al.</i> , 1997
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Bogan <i>et al.</i> , 1996
Compuestos nitroaromáticos	MnP	<i>Nematoloma frowardii</i> y <i>Stropharia rugosoannulata</i>	Scheibner & Hofrichter, 1998
		<i>Nematoloma frowardii</i>	Hofrichter <i>et al.</i> , 1998
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	van Aken <i>et al.</i> , 2000
Tintes	LiP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Chivukula <i>et al.</i> , 1995
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ollikka <i>et al.</i> , 1993
	Lacasa	<i>Pyricularia oryzae</i>	Chivukula & Renganathan, 1995
		Preparado comercial	Soares <i>et al.</i> , 2001
		<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Schliephake <i>et al.</i> , 2000
		<i>Trametes versicolor</i>	Moldes, 2005
	HRP	Preparado comercial	Bhunja <i>et al.</i> , 2001
	MnP	<i>Bjerkandera adusta</i> y <i>Pleurotus eryngii</i>	Heinfling <i>et al.</i> , 1998b
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Glenn & Gold, 1985
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Bjerkandera sp.</i> <i>Bjerkandera sp.</i>	Moreira <i>et al.</i> , 2001a Mielgo <i>et al.</i> , 2003a

adsorción física, enlace covalente, fuerzas electrostáticas, inclusión o atrapamiento (Prazeres & Cabral, 2001). Cuando se trabaja con enzima inmovilizada, es necesario el transporte de los sustratos hasta el catalizador y de los productos desde el catalizador al medio de reacción. Por lo tanto la transferencia de materia juega a veces un papel muy importante (Giorno & Drioli, 2000).

6.1. Reactores enzimáticos de membrana

Los reactores enzimáticos de membrana se definen como aquellos en que la separación de la enzima y los productos o sustratos se realiza por medio de una membrana semipermeable que funciona como una barrera selectiva (Prazeres & Cabral, 1994). Los sustratos y productos permeables se separan de la mezcla de reacción mediante un gradiente a través de la membrana (potencial químico, presión, campo eléctrico) que causa el movimiento de los solutos, por difusión, convección o migración electroforética.

La combinación de la tecnología de membranas con los reactores enzimáticos permite hablar de tres configuraciones de reactor: *i*) reactor de membrana de contacto directo; *ii*) reactor con enzima inmovilizada en la membrana; *iii*) reactor de membrana extractiva.

Reactores enzimáticos de contacto directo

En estos reactores el sustrato se alimenta a la zona del sistema que contiene la enzima, de manera que se produce un contacto directo entre ambos, pudiendo así producirse una actuación enzimática inmediata sobre el sustrato. La enzima puede estar inmovilizada o libre. La separación del catalizador puede tener lugar en el mismo reactor o puede llevarse a cabo mediante el acoplamiento de una unidad de membrana externa.

La configuración más común dentro de los reactores de contacto directo consiste en un reactor de tanque agitado con enzima libre asociado a una membrana de ultrafiltración para la retención del catalizador (Figura 1.4.a). El efluente retenido se recircula al reactor, mientras que los productos de reacción son capaces de atravesar la membrana y abandonan el sistema como efluente (López *et al.*, 2002).

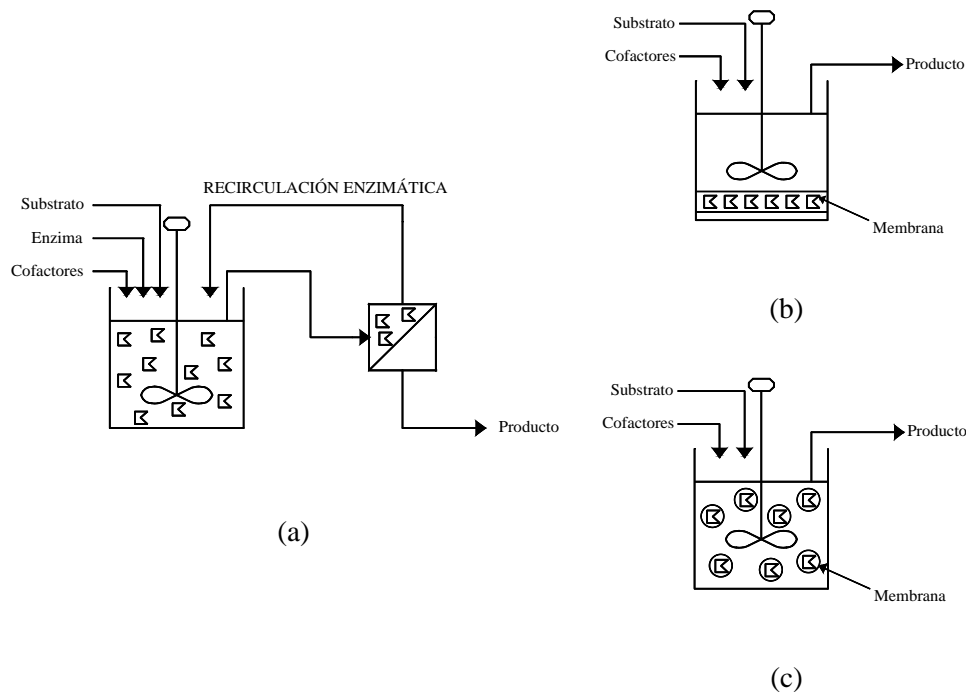


Figura 1.4. Configuraciones de reactores continuos de membrana: (a) reactor de tanque agitado combinado con una membrana de separación, (b) reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada en la matriz de la membrana y (c) reactor de tanque agitado con enzima atrapada en geles, fibras o microcápsulas

Reactores enzimáticos con enzima inmovilizada en la membrana

La principal característica de estos reactores es que la enzima está inmovilizada en la membrana, bien dentro de la matriz o bien en su superficie. La reacción ocurre de manera simultánea a la separación de los productos (Gekas, 1986; Prazeres & Cabral, 2001). Cuando la inmovilización tiene lugar por unión covalente la interacción se produce entre un grupo activado de la membrana y un grupo funcional de la proteína, generalmente grupos amino de residuos básicos (Guisán *et al.*, 1997). Si la inmovilización está basada en la adsorción, tienen lugar fuerzas de Van der Waals o interacciones electrostáticas entre la enzima y el soporte (Lante *et al.*, 2000). Por último, las enzimas pueden haber sido atrapadas en una matriz polimérica durante el proceso de preparación de la membrana

(Isono & Nakajima, 2000) o encapsuladas por filtración en sus poros (Bohdziewicz, 1998).

Reactores enzimáticos de membrana extractiva

El principio de operación de estos reactores se basa en la extracción selectiva de sustratos de la corriente de alimentación mediante membranas específicas. El contacto entre la enzima y el sustrato se realiza una vez el sustrato se haya difundido a través de la membrana hacia el lugar donde se encuentra la enzima, ya sea libre o inmovilizada (Prazeres & Cabral, 1994). Estos reactores sólo pueden operar con sustratos de bajo peso molecular. Los productos generados se difunden de nuevo a través de la membrana hasta alcanzar la corriente de salida.

El mayor inconveniente de estos reactores reside en que la difusión es el principal mecanismo de transporte de los sustratos. Por tanto, el comportamiento cinético de la enzima es inferior que en el caso de que la enzima estuviese libre. Además el control de las condiciones de operación en la zona en que se encuentra la enzima también está limitado por la baja velocidad de transporte de los compuestos al medio (Kelsey *et al.*, 1990). Los reactores de fibra hueca son comúnmente empleados como reactores extractivos debido a la alta superficie de contacto que facilita la transferencia de compuestos.

6.2. Otros reactores enzimáticos

Para evitar que la enzima abandone el reactor en la corriente de salida, los reactores enzimáticos en continuo deben constar de un sistema de retención. Otras configuraciones de reactor, además de aquellas que emplean membranas, son las basadas en la inmovilización de las enzimas, por procesos de interacción iónica, enlace covalente, entrecruzamiento, encapsulación o atrapamiento. Las enzimas inmovilizadas pueden ser empleadas en reactores de tanque agitado, de lecho fijo o de lecho fluidizado. En el Capítulo 5 se hace una mayor revisión de los tipos de reactores enzimáticos basados en enzimas inmovilizadas y de sus aplicaciones.

6.3. Aplicaciones

El concepto de reactor enzimático puede ser aplicado a cualquier reacción enzimática con el objetivo de alcanzar una alta productividad en procesos en continuo. Tradicionalmente estos reactores han sido empleados principalmente en

la hidrólisis de macromoléculas (Kinoshita *et al.*, 1986) y síntesis de moléculas (Godjevargova *et al.*, 2004). En los últimos años se está extendiendo el uso de reactores enzimáticos en el tratamiento de aguas residuales (Tabla 1.5). Esta tecnología permite, no sólo la degradación de compuestos, sino también la recuperación de productos de valor de las corrientes de salida. Esta característica hace que esta técnica sea interesante para la reutilización de aguas de proceso contaminadas (Livingston, 1994; Brindle & Stephenson, 1996).

Tabla 1.5. Aplicación de reactores enzimáticos al tratamiento de aguas residuales

<i>Enzima</i>	<i>Fuente</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Referencia</i>
<i>Reactor con enzima inmovilizada en la membrana</i>			
Crudo enzimático	<i>Pseudomonas sp.</i>	Efluente fenólico	Bohdziewicz, 1998
Polifenol oxidasa	<i>Agaricus bisporum</i>	Efluentes de planta de carbón (fenoles)	Edwards <i>et al.</i> , 1999
Lacasa	<i>Pyricularia oryzae</i>	Fenoles	Lante <i>et al.</i> , 2000
Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	Pesticida fenilurea	Jolival <i>et al.</i> , 2000
Lacasa y MnP	<i>Trametes versicolor</i>	Efluente de industria petroquímica	Edwards <i>et al.</i> , 2002
Crudo enzimático	<i>Pseudomonas</i>	Fenol y cianuro	Bodzek <i>et al.</i> , 1996
<i>Reactor de membrana extractiva</i>			
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Agua residual sintética (glucosa)	Kojima <i>et al.</i> , 1995
Glicerol deshidrogenasa	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Oxidación de etanol	Liese <i>et al.</i> , 1996
Cianurasa	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	Aguas residuales con cianuro	Basheer <i>et al.</i> , 1993
<i>Reactor de contacto directo</i>			
Peroxidasa de soja	Semillas de soja	Agua residual sintética (fenoles)	Flock <i>et al.</i> , 1999
Pectoliasa	<i>Aspergillus japonicus</i>	Depolimerización de ácido galacturónico	Gallifuoco <i>et al.</i> , 2001
Crudo enzimático	<i>Pseudomonas syringae</i>	Fenol	Erhan <i>et al.</i> , 2002

7. Referencias

- Adler, E. (1977) Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Science and Technology* **11**, 169-218.
- Aitken, M. D., Venkatadri, R. and Irvine, R. L. (1989) Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research* **23**(4), 443-450.
- Arslan-Alaton, I., Cokgor, E. U., Ongunsu, I., Akakinci, A. and Sahin, A. (2004) Decolourization and detoxification of reactive dye-bath effluents by ozonation. *Fresenius Environmental Bulletin* **13**(10), 1049-1052.
- Asada, Y., Watanabe, A., Irie, T., Nakayama, T. and Kuwahara, M. (1995) Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese(II) peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1251**(2), 205-209.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. (1996) Microbial decolourisation of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology* **58**, 217-227.
- Bandara, J., Nadochenko, J., Kiwi, J. and Pulgarin, C. (1997) Dynamics of oxidant addition as a parameter in the modelling of dye mineralization (Orange II) via advanced oxidation technologies. *Water Science and Technology* **35**, 87-93.
- Basheer, S., Kut, Ö. M., Prenosil, J. E. and Bourne, J. R. (1993) Development of an enzyme membrane reactor for treatment of cyanide-containing wastewaters from the food industry. *Biotechnology and Bioengineering* **41**(4), 465-473.
- Baughman, G. L. and Weber, E. J. (1994) Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environmental Science and Technology* **28**, 267-276.
- Bechtold, T., Mader, C. and Mader, J. (2002) Cathodic decolourization of textile dyebaths: Tests with full scale plant. *Journal of Applied Electrochemistry* **32**(9), 943-950.
- Bhunja, A., Durani, S. and Wangikar, P. P. (2001) Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering* **72**, 562-567.
- Bisschops, I. and Spanjers, H. (2003) Literature review on textile wastewater characterisation. *Environmental Technology* **24**, 1399-1411.
- Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G. and Vicent, T. (2004) Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* **38**, 2166-2172.
- Blázquez, P. (2005) Desenvolupament d'un procés a escala pilot per al tractament del colorant Gris Lanaset G amb *Trametes versicolor*. Departament d'Enginyeria Química, Universitat Autònoma de Barcelona. Tesis doctoral.
- Böckle, B., Martínez, M. J., Guillén, F. and Martínez, A. T. (1999) Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(3), 923-928.

- Bodzek, M., Bohdziewicz, J. and Malgorzata, M. (1996) Immobilized enzyme membranes for phenol and cyanide decomposition. *Journal of Membrane Science* **113**, 373-384.
- Bogan, B. W. and Lamar, R. T. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1597-1603.
- Bogan, B. W., Lamar, R. T. and Hammel, K. E. (1996) Fluorene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **1996**, 1788-1792.
- Bohdziewicz, J. (1998) Biodegradation of phenol by enzymes from *Pseudomonas* sp. immobilized onto ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry* **33**(8), 811-818.
- Bollag, J. M., Shuttleworth, K. L. and Anderson, D. H. (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(12), 3086-3091.
- Brindle, K. and Stephenson, T. (1996) The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering* **49**(6), 601-610.
- Buschmann, H. J. (1992) Cucurbituril as a ligand for the complexation of cations in aqueous solutions. *Inorganica Chimica Acta* **193**, 93-97.
- Call, H. P. and Mücke, I. (1997) History, overview and applications of mediated ligninolytic system, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *Journal of Biotechnology* **53**(2-3), 163-202.
- Carliell, C. M., Barclay, S. J., Naidoo, N., Buckley, C. A., Mulholland, D. A. and Senior, S. (1994) Anaerobic decolorisation of reactive dyes in conventional sewage treatment processes. *Water SA* **20**, 341-344.
- Carliell, C. M., Barclay, S. J., Shaw, C., Wheatley, A. D. and Buckley, C. A. (1998) The effect of salts used in textile dyeing on microbial decolourisation of a reactive dye. *Environmental Technology* **19**, 1133-1137.
- Cooper, V. A. and Nicell, J. A. (1996) Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research* **30**(4), 954-964.
- Couto, S. R., Rivela, I., Muñoz, M. R. and Sanromán, A. (2000) Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-448 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology* **74**, 159-164.
- Cripps, C., Bumpus, J. A. and Aust, S. D. (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(4), 1114-1118.
- Chagas, E. P. and Durrant, L. R. (2001) Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology* **29**, 473-477.
- Chang, C. N., Lin, J. G., Chao, A. C. and Liu, C. S. (1996) Modified Nernst model for on-line control of the chemical oxidation decoloring process. *Water Science and Technology* **34**, 151-157.

- Chivukula, M. and Renganathan, V. (1995) Phenolic azo dyes oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(12), 4374-4377.
- Chivukula, M., Spadaro, J. P. and Renganathan, V. (1995) Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* **34**, 7765-7772.
- Christie, R. M. (2003) La química del color. Zaragoza (España), Editorial Acirbia, S.A.
- Chung, K. T., Stevens, S. E. J. and Cerniglia, C. R. (1992) The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews of Microbiology* **18**, 175-190.
- de Jong, E., Field, J. A. and de Bont, J. A. (1992) Evidence for a new extracellular peroxidase. Manganese-inhibited peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *FEBS Letters* **299**(1), 107-110.
- Delée, W., O'Neill, C., Hawkes, F. R. and Pinheiro, H. M. (1998) Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **73**, 323-335.
- Dobbs, R. A., Shan, Y., Wang, L. and Govind, R. (1995) Sorption on wastewater solids: elimination of biological activity. *Water Environmental Research* **67**, 327-329.
- Donlon, B., Razo-Flores, E., Luijten, M., Swarts, H., Lettinga, G. and Field, J. (1997) Detoxification and partial mineralization of the azo dye Mordant Orange I in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 83-90.
- Duran, R., Deschler, C., Precigou, S. and Goulas, P. (2002) Degradation of chlorophenols by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of 3,4-dichlorophenol on extracellular peroxidase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 284-288.
- Eaton, D., Chang, H. M. and Kirk, T. K. (1980) Fungal decolorization of Kraft bleach plant effluent. *Tappi Journal* **63**, 103-109.
- Edwards, W., Bownes, R., Leukes, W. D., Jacobs, E. P., Sanderson, R., Rose, P. D. and Burton, S. G. (1999) A capillary membrane bioreactor using immobilized polyphenol oxidase for the removal of phenols from industrial effluents. *Enzyme and Microbial Technology* **24**(3-4), 209-217.
- Edwards, W., Leukes, W. D. and Bezuidenhout, J. J. (2002) Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. *Desalination* **149**, 275-278.
- El-Sharkawy, E. A. (2001) Adsorption of textile dyes on to activated carbons synthesized from solid waste: Decolourizing power in relation to surface properties. *Adsorption Science and Technology* **19**(10), 795-811.
- Erhan, E., Keskinler, B., Akay, G. and Algur, O. F. (2002) Removal of phenol from water by membrane-immobilized enzymes. Part I. Dead-end filtration. *Journal of Membrane Science* **206**, 361-373.

- Feijoo, G. and Lema, J. M. (1995) Tratamiento de efluentes de industrias de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes mediante hongos. *Afinidad* **52**(457), 171-180.
- Fitzgerald, S. and Bishop, P. L. (1995) Two stage anaerobic/aerobic treatment of sulfonated azo dyes. *Journal of Environmental Science. Health A* **30**, 1251-1276.
- Flock, C., Bassi, A. and Gijzen, M. (1999) Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **74**, 303-309.
- Forgacs, E., Cserháti, T. and Oros, G. (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International* **30**, 953-971.
- Fu, Y. and Viraraghavan, T. (2001) Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology* **79**, 251-262.
- Gahr, F., Hermanutz, F. and Opperman, W. (1994) Ozonation - an important technique to comply with new German law for textile wastewater treatment. *Water Science and Technology* **30**, 255-263.
- Gallifuoco, A., Alfani, F., Cantarella, M. and Viparelli, P. (2001) Studying enzyme-catalyzed depolymerization in continuous reactors. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **40**, 5184-5190.
- Gekas, V. C. (1986) Artificial membranes as carriers for the immobilisation of biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 450-461.
- Giorno, L. and Drioli, E. (2000) Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotechnology* **18**(8), 339-349.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1741-1747.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1985) Purification and properties of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **242**, 329-341.
- Godjevargova, T., Dayal, R. and Turmanova, S. (2004) Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. *Macromolecular Bioscience* **4**, 950-956.
- Gómez-Toribio, V., Martínez, A. T., Martínez, M. J. and Guillén, F. (2001) Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **268**, 4787-4793.
- Guaratini, C. C. I. and Zaroni, M. V. B. (2000) Textile dyes. *Química Nova* **23**(1), 71-78.
- Guillén, F., Martínez, M. J., Muñoz, C. and Martínez, A. T. (1997) Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **339**(1), 190-199.
- Guisán, J. M., Bastida, A., Blanco, R. M., Fernández-Lafuente, R. and García-Junceda, E. (1997) Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. Reduction of

- steric problems. *Methods in Biotechnology. Immobilization of Enzymes and Cells.* Bickerstaff, G. F. Totowa (N.J.), Humana Press Inc. **1**: 261-275.
- Gutiérrez, M. C. and Crespi, M. (1999a) Colorantes reactivos en los efluentes textiles: nuevos tratamientos para su eliminación. *Tecnología del Agua* **195**, 42-49.
- Gutiérrez, M. C. and Crespi, M. (1999b) A review of electrochemical treatments for colour elimination. *Journal of Society of Dyers and Colourists* **115**(11), 342-345.
- Hammel, K. E., Kalyanaraman, B. and Kirk, T. K. (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *Journal of Biological Chemistry* **261**(36), 16948-16952.
- Hammel, K. E. and Tardone, P. J. (1988) The oxidative 4-dechlorination of polychlorinated phenols is catalyzed by extracellular fungal lignin peroxidases. *Biochemistry* **27**(17), 6563-6568.
- Hassan, M. M. and Hawkyard, C. J. (2002) Decolourisation of aqueous dyes by sequential oxidation treatment with ozone and Fenton's reagent. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **77**(7), 834-841.
- Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 125-135.
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. (1998a) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters* **165**, 43-50.
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. (1998b) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2788-2793.
- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegab, I. and Fritsche, W. (1998) Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 399-404.
- Hofrichter, M., Vares, T., Scheibner, K., Galkin, S., Sipilä, J. and Hatakka, A. (1999) Mineralization and solubilization of synthetic lignin (DHP) by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology* **67**, 217-228.
- Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 454-466.
- Ince, N. H. and Gonenc, D. T. (1997) Treatability of a textile azo dye by UV/H₂O₂. *Environmental Technology* **18**, 179-185.
- Isono, Y. and Nakajima, M. (2000) Membrane phase separation of aqueous/alcohol biphasic mixture and its application for enzyme bioreactor. *Progress in Biotechnology* **2000**(16), 63-68.
- Jain, R., Bhargava, M. and Sharma, N. (2003) Treatment and decolourisation of an azo dye in industrial effluent. *Journal of Scientific and Industrial Research* **62**(8), 813-819.

- Janikowski, T. B., Velicogna, D., Punt, M. and Daugulis, A. J. (2002) Use of two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 368-376.
- Johansson, T. and Nyman, P. O. (1993) Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**(1), 49-56.
- Jolival, C., Brenon, S., Caminade, E., Mougin, C. and Pontié, M. (2000) Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *Journal of Membrane Science* **180**, 103-113.
- Jönsson, L. J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.-O. and Hahn-Hagerdal, B. (1998) Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 691-697.
- Kanmani, S. and Thanasekaran, K. (2003) A comparative study on UV and solar photocatalytic decolourisation of low salt cotton textile dyeing wastewaters. *Indian Journal of Environmental Protection* **23**(1), 47-53.
- Kanmani, S. and Thanasekaran, K. (2004) Photocatalytic decolourisation of textile dyeing wastewaters using indigenous titanium dioxide. *Journal of Industrial Pollution Control* **20**(2), 267-276.
- Karhunen, E., Kanterlinen, A. and Niku-Paavola, M. L. (1990) Mn-dependent peroxidase from the lignin-degrading white rot fungus *Phlebia radiata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **279**(1), 25-31.
- Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H. J. and Mattes, R. (1997) Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3684-3690.
- Kelsey, L. J., Pillarella, M. R. and Zydney, A. L. (1990) Theoretical analysis of convective flow profiles in a hollow-fiber membrane bioreactor. *Chemical Engineering Science* **45**, 3211-3220.
- Kim, H.-Y. and Song, H.-G. (2000) Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by white-rot fungus *Irpex lacteus*. *Biotechnology Letters* **22**, 969-975.
- Kinoshita, S., Chua, J. W., Kato, N., Yoshida, T. and Taguchi, H. (1986) Hydrolysis of cellulose by cellulases of *Sporotrichum cellulophilum* in an ultrafilter membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology* **8**, 691-695.
- Kirby, N., McMullan, G. and Marchant, R. (1995) Decolourisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters* **17**(7), 761-764.
- Kiwi, J., Pulgarin, C., Peringer, P. and Grätzel, M. (1993) Beneficial effects of homogeneous photo-Fenton pretreatment upon the biodegradation of anthraquinone sulfonate in waste water treatment. *Applied Catalysis B-Environmental* **3**, 85-89.

- Knapp, J. S., Newby, P. S. and Reece, L. P. (1995) Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 664-668.
- Knapp, J. S. and Newby, P. S. (1999) The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi. *Water Research* **33**, 575-577.
- Kojima, H., Ogawa, M., Tamai, S., Yamada, M. and Hasunuma, M. (1995) Oxidation of glucose by glucose oxidase entrapped in hollow fiber membrane. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **28**(5), 623-626.
- Kuan, I. C., Johnson, K. A. and Tien, M. (1993) Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complex. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20064-20070.
- Kudlich, M., Keck, A., Klein, J. and Stolz, A. (1997) Localization of the enzyme system involved in the anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3691-3694.
- Kumar, M. N. V. R., Sridhari, T. R., Bhavani, K. D. and Dutta, P. K. (1998) Trends in color removal from textile mill effluents. *Colorage* **40**, 25-34.
- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Gomes de Moraes, S. and Durán, N. (2002) New tendencies on textile effluent treatment. *Química Nova* **25**(1), 78-82.
- Kuo, W. G. (1992) Decolorizing dye wastewater with Fenton's reagent. *Water Research* **26**, 881-886.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* **169**, 247-250.
- Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P. (2000) Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process in Biochemistry* **36**(1-2), 51-58.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M. and Cho, N.-S. (1999) Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* **27**, 175-185.
- Liese, A., Karutz, M., Kamphuis, J., Wandrey, C. and Kragl, U. (1996) Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: Overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnology and Bioengineering* **51**(5), 544-550.
- Lin, S. H. and Peng, C. F. (1995) A continuous Fenton's process for treatment of textile wastewater. *Environmental Technology* **16**, 693-699.
- Lin, S. H. and Peng, C. F. (1996) Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. *Water Research* **30**, 587-592.
- Liu, J. Q. and Liu, H. T. (1992) Degradation of azo dyes by algae. *Environmental Pollution* **75**, 273-278.

- Livingston, A. G. (1994) Extractive membrane bioreactors: a new process technology for detoxifying chemical industry wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **60**, 117-124.
- López, C., Mielgo, I., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2002) Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *Journal of Biotechnology* **99**(3), 249-257.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. and Huttermann, A. (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**(5), 335-341.
- Manimekalai, R. and Swaminathan, T. (2000) Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering* **22**, 29-33.
- Martínez, M. J., Böckle, B., Camarero, S., Guillén, F. and Martínez, A. T. (1996a) MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat-straw solid-state fermentation. 211th ACS National Meeting, New Orleans, LA.
- Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. and Martínez, A. T. (1996b) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **237**(2), 424-432.
- McClung, S. M. and Lemley, A. T. (1994) Electrochemical treatment and HPLC analysis of wastewater containing acid dyes. *Textile Chemist and Colorist* **26**, 17-22.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I. M., Marchant, R. and Smyth, W. F. (2001) Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 81-87.
- Méndez-Paz, D., Omil, F. and Lema, J.M. (2005a) Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **36**, 264-272.
- Méndez-Paz, D., Omil, F. and Lema, J.M. (2005b) Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under fed-batch and continuous conditions. *Water Research* **39**, 771-778.
- Mester, T. and Field, J. A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isoenzyme produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15412-15417.
- Mester, T. and Tien, M. (2000) Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation* **46**, 51-59.
- Meyer, U. (1981) Biodegradation of synthetic organic colorants. Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds. London, Academic Press.
- Mielgo, I., López, C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2003a) Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology Progress* **19**(2), 325-331.
- Mielgo, I., Palma, C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema, J.M. (2003b) Covalent immobilisation of manganese peroxidases (MnP) from

Phanerochaete chrysosporium and *Bjerkandera* sp. BOS55. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 769-775.

Moldes, D. (2005) Aplicación de enzimas ligninolíticos para la degradación de contaminantes modelo. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo. Tesis Doctoral.

Moreira, M. T., Feijoo, G., Mester, T., Mayorga, P., Sierra-Alvarez, R. and Field, J. A. (1998) Role of organic acids on the manganese-independent biobleaching system of *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(7), 2409-2417.

Moreira, M. T., Palma, C., Mielgo, I., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2001a) *In vitro* degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* **75**(3), 362-368.

Moreira, M. T., Sierra-Alvarez, R., Lema, J. M., Feijoo, G. and Field, J. A. (2001b) Oxidation of lignin in eucalyptus kraft pulp by manganese peroxidase from *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Bioresource Technology* **78**, 71-79.

Moreira, P. R., Almeida-Vara, E., Sena-Martins, G., Polónia, I., Malcata, F. X. and Cardoso Duarte, J. (2001c) Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via a novel *Bjerkandera* sp. strain. *Journal of Biotechnology* **89**(107-111).

Nakayama, T. and Amachi, T. (1999) Fungal peroxidase: its structure, function, and application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**, 185-198.

Namasivayam, C., Muniasamy, N., Gayatri, K., Rani, M. and Ranganathan, K. (1996) Removal of dyes from aqueous solutions by cellulosic waste orange peel. *Bioresource Technology* **57**, 37-43.

Namasivayam, C. and Arisi, D. J. S. E. (1997) Removal of congo red from wastewater by adsorption onto red mud. *Chemosphere* **34**, 401-417.

Nie, G., Reading, N. S. and Aust, S. D. (1999) Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**, 328-334.

O'Neill, C., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M. and Delée, W. (1999) Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **74**, 1009-1018.

Ochoa, G. J. R. (1995) Técnicas electroquímicas para el tratamiento de efluentes industriales. *Ingeniería Química* **4**, 125-131.

Ogutveren, U. B., Gonen, N. and Kopal, S. (1992) Removal of dye stuffs from waste water: electrocoagulation of Acilan Blau using soluble anode. *Journal of Environmental Science. Health A* **27**, 1237-1247.

Ollikka, P., Alhoniemi, K., Leppänen, V. M., Glumoff, T., Rajola, T. and Suominen, I. (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 4010-4016.

- Pagga, U. and Brown, D. (1986) The degradation of dyestuffs: part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* **15**(4), 479-491.
- Panswad, T. and Luangdilok, W. (2000) Decolorization of reactive dyes with different molecular structures under different environmental conditions. *Water Research* **34**, 4177-4184.
- Pasti, M. B. and Crawford, D. L. (1991) Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade lignocellulose. *Canadian Journal of Microbiology* **37**, 902-907.
- Paszczynski, A., Huynh, V.-B. and Crawford, R. (1985) Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* **29**, 37-41.
- Pelegri, R., Peralta-Zamora, P., de Andrade, A. R., Reyes, J. and Durán, N. (1999) Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Applied Catalysis B-Environmental* **22**, 83-90.
- Peralta-Zamora, P., Kunz, A., Gómez de Morales, S., Pelegri, R., de Capos Moleiro, P., Reyes, J. and Durán, N. (1999) Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. *Chemosphere* **38**, 835-852.
- Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R. and Vázquez-Duhalt, R. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white-rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3805-3809.
- Poots, V. J. P. and McKay, J. J. (1976) The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents - I Peat. *Water Research* **10**, 1061-1066.
- Porter, J. J. and Gomes, A. C. (2000) The rejection of anionic dyes and salt from water solutions using a polypropylene microfilter. *Desalination* **128**(1), 81-90.
- Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S. (1994) Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 738-750.
- Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S. (2001) Enzymatic membrane reactors. Multiphase bioreactor design. Cabral, J. M. S., Mota, M. and Tramper, J. London, Taylor&Francis. **16**: 135-180.
- Reddy, C. A. (1995) The potential for white rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Optical Biotechnology* **6**, 320-328.
- Reife, A. and Freeman, H. S. (1996) Environmental chemistry of dyes and pigments. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D. and Sanchez, J. (2004) Progress in enzymatic membrane reactors - a review. *Journal of Membrane Science* **242**, 189-196.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* **77**, 247-255.

- Russ, R., Rau, R. and Stolz, A. (2000) The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1429-1434.
- Sack, U., Hofrichter, M. and Fritsche, W. (1997) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiology Letters* **152**, 227-234.
- Sanromán, M. A., Pazos, M. and Cameselle, C. (2004) Optimisation of electrochemical decolourisation process of an azo dye, Methyl Orange. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **79**(12), 1349-1353.
- Scheibner, K. and Hofrichter, M. (1998) Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidases. *Journal of Basic Microbiology* **38**, 51-59.
- Schliephake, K., Mainnaring, D. E., Lonergan, G. T., Jones, I. K. and Baker, W. L. (2000) Transformation and degradation of the diazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 100-107.
- Shore, J. (1996) Advances in direct dyes. *Indian Journal of Fibre & Textile Research* **21**, 1-29.
- Shu, H.-Y. and Huang, C.-R. (1995) Ultraviolet enhanced oxidation for color removal of azo dye wastewater. *American Dyestuff Reporter* **8**, 30-96.
- Slokar, Y. M. and Le Marechal, A. M. (1997) Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes Pigments* **37**, 335-356.
- Soares, G. M. B., de Amorim, M. T. P. and Costa-Ferreira, M. (2001) Use of laccase together with redox mediators to decolorize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* **89**, 123-129.
- Solozhenko, E. G., Soboleva, N. M. and Goncharuk, V. V. (1995) Decolorization of azo dye solutions by Fenton's oxidation. *Water Research* **29**(9), 2206-2210.
- Spadaro, J. T., Gold, M. H. and Renganathan, V. (1992) Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(8), 2397-2401.
- Sumathi, S. and Manju, B. S. (2000) Uptake of reactive dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 347-355.
- Swamy, J. and Ramsay, J. A. (1999) The evaluation of white-rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* **24**, 130-137.
- Tang, W. Z. and An, H. (1995) Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of acid blue 40 by TiO₂/UV in aqueous solution. *Chemosphere* **31**, 4171-4183.
- Thompson, D. N., Hames, B. R., Reddy, C. A. and Grethlein, H. E. (1998) *In vitro* degradation of natural insoluble lignin in aqueous media by the extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioengineering* **57**, 704-717.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. and Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* **46**, 1-15.

- Ullah, M. A., Bedford, C. T. and Evans, C. S. (2000) Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**(2), 230-234.
- van Aken, B., Cameron, M. D., Stahl, J. D., Plumat, A., Naveau, H., Aust, S. D. and Agathos, S. N. (2000) Glutathione-mediated mineralization of ¹⁴C-labeled 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese-dependent peroxidase H5 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 659-664.
- Vandevivere, P. C., Bianchi, R. and Verstraete, W. (1998) Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **72**, 289-302.
- van der Zee, F. P., Bouwman, R. H. M., Strik, D. P. B. T. B., Lettinga, G. and Field, J. A. (2001) Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **75**, 691-701.
- van Lier, J. B., van der Zee, F. P., Tan, N. C. G., Rebac, S. and Kleerebezem, R. (2001) Advances in high-rate anaerobic treatment: staging of reactor systems. *Water Science and Technology* **44**, 15-25.
- Vinodgopal, K., Wynkoop, D. E. and Kamat, P. V. (1996) Environmental photochemistry on semiconductor surfaces: photosensitized degradation of a textile azo dye, acid orange 7, on TiO₂ particles using visible light. *Environmental Science and Technology* **30**, 1660-1666.
- Vyas, B. R. M. and Molitoris, H. P. (1995) Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourisation of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3919-3927.
- Wagner, M. and Nicell, J. A. (2001) Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Science and Technology* **43**(2), 253-260.
- Walker, G. M. and Weatherley, L. R. (1997) Adsorption of acid dyes on to granular activated carbon in fixed beds. *Water Research* **31**, 2093-2101.
- Wariishi, H., Akaleswaran, L. and Gold, M. H. (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* **27**, 5365-5370.
- Wariishi, H., Dunford, H. B., MacDonald, I. D. and Gold, M. H. (1989) Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **264**(6), 3335-3340.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1991) *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **176**, 269-275.
- Waring, D. R. and Hallas, G. (1990) The chemistry and application of dyes. New York and London.

Weisburger, J. H. (2002) Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research* **506-507**, 9-20.

Wesenberg, D., Kyriakides, I. and Agathos, S. N. (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* **22**, 161-187.

Wong, Y. and Yu, J. (1999) Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* **33**(16), 3512-3520.

Yesilada, O., Fiskin, K. and Yesilada, E. (1995) The use of white-rot fungus *Funalia troglia* (Malatya) for the decolourization and phenol removal from olive mill wastewater. *Environmental Technology* **16**, 95-100.

Yesilada, O., Asma, D. and Cing, S. (2003) Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry* **38**, 933-938.

Yoshida, H. and Takemori, T. (1997) Adsorption of direct dye on cross-linked chitosan fiber. *Water Science and Technology* **35**, 29-37.

Zollinger, H. (1987) Colour chemistry: Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. New York, VCH Publishers.

Capítulo 2

Materiales y métodos

Resumen

En este capítulo se detallan los materiales y métodos empleados en la realización de la tesis doctoral. Se describen los medios de cultivo para la conservación y el mantenimiento de la cepa de *Bjerkandera* sp. BOS55, así como los medios aplicados para la producción de la enzima manganeso peroxidasa. Se hace una revisión de las distintas etapas de preparación del crudo enzimático para su posterior aplicación en los ensayos de decoloración. Se detallan además las diversas técnicas analíticas empleadas para la medida de la actividad enzimática, para la determinación de la proteína y para la determinación de las concentraciones del tinte Orange II y de los productos obtenidos en su degradación. La metodología específica de cada capítulo se describirá posteriormente en su correspondiente apartado de Materiales y métodos.

Índice

1. Compuestos químicos	61
2. Producción de manganeso peroxidasa	61
2.1. Microorganismo	61
2.2. Producción	61
2.3. Ultrafiltración	63
2.4. Microfiltración y diálisis	63
3. Valoraciones enzimáticas	64
3.1. Medida de actividad manganeso peroxidasa	64
3.2. Valoración de la proteína total	64
4. Métodos analíticos	65
4.1. Determinación de la concentración de Orange II por espectrofotometría	65
4.2. Determinación de concentraciones por cromatografía (HPLC)	66
5. Referencias	68

1. Compuestos químicos

El tinte Orange II (85%), ácido 4-hidroxibenzenosulfónico, ácido sulfanílico, ácido benzenosulfónico, 2-naftol, 1-amino-2-naftol, peróxido de hidrógeno (33%) y los ácidos carboxílicos malónico, acético y láctico, en forma de sus correspondientes sales de sodio, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Alemania). El compuesto 1,2-naftoquinona se obtuvo en Janssen Chimica (Bélgica). El sulfato de manganeso y las sales sódicas de los ácidos oxálico, cítrico y tartárico fueron suministrados por Panreac (España).

2. Producción de manganeso peroxidasa

2.1. Microorganismo

La enzima manganeso peroxidasa (MnP) se obtuvo a partir del hongo ligninolítico *Bjerkandera* sp. BOS55. La cepa fue aislada y determinada (Field *et al.*, 1992) y depositada a 4°C como ATCC 90940 en American Type Culture Collections (Rockville, MD).

2.2. Producción

La cepa *Bjerkandera* sp. BOS55 se mantuvo en tubos inclinados a 4°C con el medio de conservación descrito en la Tabla 2.1 (Mester *et al.*, 1995). Para iniciar su crecimiento, el microorganismo se transfirió a placas Petri con el medio de mantenimiento descrito en la Tabla 2.2 y estas se incubaron a 30°C durante 5 d.

Tras este período de incubación se utilizaron cilindros de agar de aproximadamente 5 mm de diámetro como inóculo para su crecimiento en un medio más rico en nutrientes. Se colocaron cuatro o cinco trozos circulares de agar en un matraz Fernsbach de 1,8 L que contenía 200 mL del medio descrito en la Tabla 2.3 (Tien & Kirk, 1988). El microorganismo se mantuvo en condiciones estáticas a 30°C durante 5 d, tiempo necesario para el recubrimiento total de toda la superficie del medio. Una vez generada la biopelícula en el Fernsbach, el hongo *Bjerkandera* sp. BOS55 fue triturado durante 1 min en condiciones estériles y el micelio homogeneizado fue utilizado como preinóculo para el medio de producción en una proporción del 10%. Los cultivos se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 250 mL con el medio descrito en la Tabla 2.4. Los Erlenmeyers se incubaron en un baño con agitación orbital a 30°C y 150 rpm para favorecer la

formación de pellets. Tras 4 o 5 d, y al alcanzar un nivel de actividad MnP entre 200 y 400 U/L, se inoculó el fermentador.

Tabla 2.1. Medio de conservación para hongos ligninolíticos

Agar	15 g/L	KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
Glucosa	20 g/L	MgSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 g/L
Peptona	5,0 g/L	Serrín	2,0 g/L
Extracto de levadura	2,0 g/L	pH	5,5

Tabla 2.2. Medio de mantenimiento para hongos ligninolíticos

Agar	15 g/L	Extracto de malta	3,5 g/L
Glucosa	10 g/L	pH	5,5

Tabla 2.3. Medio de cultivo para hongos ligninolíticos

Glucosa	10 g/L	CaCl ₂	0,1 g/L
Peptona	5,0 g/L	Trazas de sales	100 mL/L
Tiamina	2,0 mg/L	pH	4,5

Trazas de sales

MgSO ₄	3,0 g/L	CuSO ₄	0,1 g/L
MnSO ₄	0,5 g/L	H ₃ BO ₄	0,01 g/L
NaCl	1,0 g/L	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,01 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/L	AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,01 g/L
CoCl ₂	0,1 g/L	Nitilotriacetato	1,5 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/L		

Tabla 2.4. Medio de producción de MnP de *Bjerkandera* sp. BOS55

Suero de leche	25 g/L	MnSO ₄	500 μM
Peptona	2,0 g/L	Tween	0,05% (v/v)
Tiamina	2,0 mg/L	pH	4,5

El fermentador utilizado fue un BIOSTAT E[®] Braun Biotech Internacional, Melsungen (Alemania), de 10 L de capacidad en el que se habían añadido 9 L del medio empleado en los matraces Erlenmeyer (Tabla 2.4). El fermentador se inoculó con 1 L de cultivo procedente de los mismos. Las condiciones de operación fueron las siguientes: agitación de 150 rpm, aireación de 8 L/min y 30°C con pH de 4,5 a tiempo inicial. Los sensores de temperatura, pH, redox y concentración de oxígeno disuelto, junto con la adquisición automatizada de datos, permitieron la monitorización y/o el control del proceso.

Entre 48 y 72 h se alcanzaron máximos de actividad MnP entre 800 y 900 U/L. En ese momento la fermentación se detuvo, el cultivo se filtró a través de filtros de microfibras de vidrio GF/C (Whatman) y el líquido extracelular se congeló. En dicha congelación precipitan los polisacáridos presentes en el medio facilitando así el proceso de ultrafiltración posterior.

2.3. Ultrafiltración

Se realizó un proceso de ultrafiltración con el objetivo de reducir el volumen de líquido extracelular y concentrar la enzima. El equipo de ultrafiltración tangencial está compuesto por un minisette acrílico Filtrón, Pall (USA). Se emplearon membranas de 10 kDa para concentrar la enzima aproximadamente unas 20 o 30 veces, de forma que los 10 L de medio iniciales se redujeron a 400 o 500 mL. Se añadió MnSO₄ a la enzima concentrada con la finalidad de minimizar las pérdidas de actividad enzimática.

2.4. Microfiltración y diálisis

Previo a la utilización del crudo enzimático en los ensayos de decoloración, se realizó una etapa de centrifugación seguida de una filtración con el objetivo de eliminar los polisacáridos que pudieran haberse formado durante el tiempo en que la enzima permaneció congelada tras su concentración. La centrifugación se realizó en tubos de 10 mL en una centrífuga Labofuge 200, Heraeus Sepatech GMBH (Alemania). Tras 5 min, se separó el centrifugado del líquido extracelular y a continuación se microfiltró a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,45 µm y modelo HAWPO2500 (Millipore).

Antes de llevar a cabo la mayor parte de los procesos de decoloración también se realizó una diálisis para eliminar las sales que pudiesen permanecer en

el líquido extracelular. El crudo enzimático se dializó frente a tampón acetato 10 mM a pH 4,5 a 4°C durante 15 h. Se emplearon membranas de celulosa con un corte de 12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU), de modo que la enzima, de tamaño mayor, quedase retenida.

3. Valoraciones enzimáticas

3.1. Medida de actividad manganeso peroxidasa

La actividad manganeso peroxidasa se midió a partir de la oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) a cerulignona (3,3',5,5'-tetrametoxi-p-difenoquinona) a 30°C y 468 nm (Field *et al.*, 1992). Se trabajó con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A (Shimadzu, Kioto, Japón). La mezcla de reacción contiene una concentración final de malonato de sodio 50 mM (pH 4,5), DMP 1 mM, 600 µL de sobrenadante/agua destilada, MnSO₄ 1 mM y H₂O₂ 0,4 mM. El volumen final de reacción es de 1 mL. La reacción se inicia por la adición de H₂O₂. El coeficiente de extinción molar utilizado es 49.600 M⁻¹·cm⁻¹ (Wariishi *et al.*, 1992). Una unidad de actividad representa 1 µmol de DMP oxidado por min.

3.2. Valoración de la proteína total

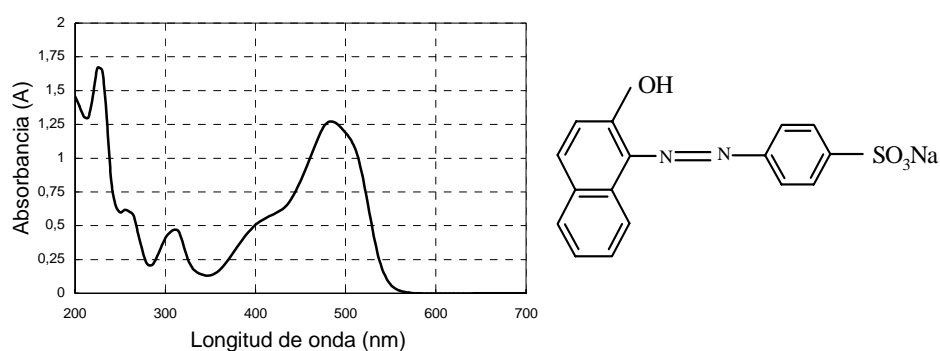
Para la medida de la proteína total se empleó el método Bradford (Bradford, 1976) en el cual se utiliza el reactivo Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD laboratories GmbH). El método está basado en el cambio de absorbancia a 595 nm de una disolución ácida de Coomassie brilliant Blue G-250 al quedar este colorante unido a las proteínas. Se empleó albúmina de suero bovino (Sigma Chemical CO, St Louis) como patrón de proteína. El método permite trabajar con concentraciones entre 0 y 20 mg/L. La recta de calibrado que relaciona la absorbancia a 595 nm y la concentración de proteína es la siguiente:

$$\text{Concentración de proteína (mg/L)} = 27,89 \cdot \text{Abs}_{595 \text{ nm}} - 0,6714 \quad (R^2 = 0,998)$$

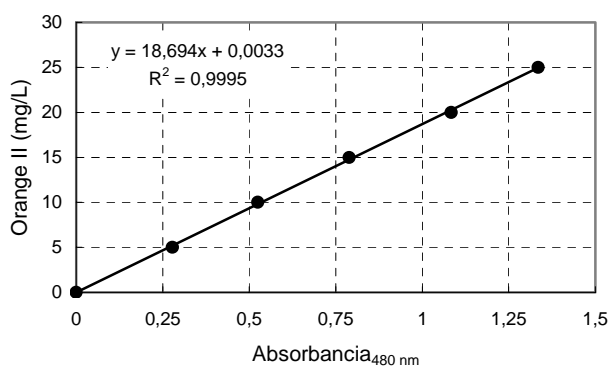
4. Métodos analíticos

4.1. Determinación de la concentración de Orange II por espectrofotometría

Para determinar la concentración de Orange II en los ensayos de decoloración se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A. Previamente se evaluó la longitud de onda para la cual la absorbancia de la muestra es máxima (Figura 2.1).



La concentración de Orange II en las muestras se calculó a partir de la recta de calibrado que se muestra en la Figura 2.2, realizada a una longitud de onda de 480 nm, para la cual la absorbancia de Orange II es máxima.



4.2. Determinación de concentraciones por cromatografía (HPLC)

El problema que presenta el seguimiento de la degradación del tinte Orange II mediante la técnica espectrofotométrica es que durante el transcurso de la reacción se generan productos que presentan cierta absorbancia a la longitud de onda de trabajo. Las señales se superponen y la medida de la concentración de Orange II puede ser ligeramente superior a la real. Para solventar este problema se midió la concentración de tinte mediante HPLC, que permitió a su vez determinar la concentración de algunos de los productos de la degradación.

Los análisis de cromatografía líquida se llevaron a cabo en un HPLC Hewlett Packard ChemStation equipado con un detector de array de diodos HP 1090 M serie II. Se inyectaron 25 μL de muestra a través de una columna LiChrospher[®] 100 RP-18 (4 mm d.i. x 250 mm longitud) que contiene partículas empacadas de 5 μm de tamaño (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). Se empleó como fase móvil una disolución de 30% de acetonitrilo y 70% de carbonato amónico 0,03 M a pH 7,9 con un caudal de 0,8 mL/min en condiciones isocráticas a 30°C. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 231 nm. Los tiempos de retención en esas condiciones fueron de 2,03-2,04 min para ácido 4-hidroxibencenosulfónico, 2,00-2,01 min para ácido sulfanílico, 6,8-7,0 min para Orange II y 10,8-10,9 min para 1,2-naftoquinona. Las rectas de calibrado para los tres primeros compuestos se muestran en la Figura 2.3.

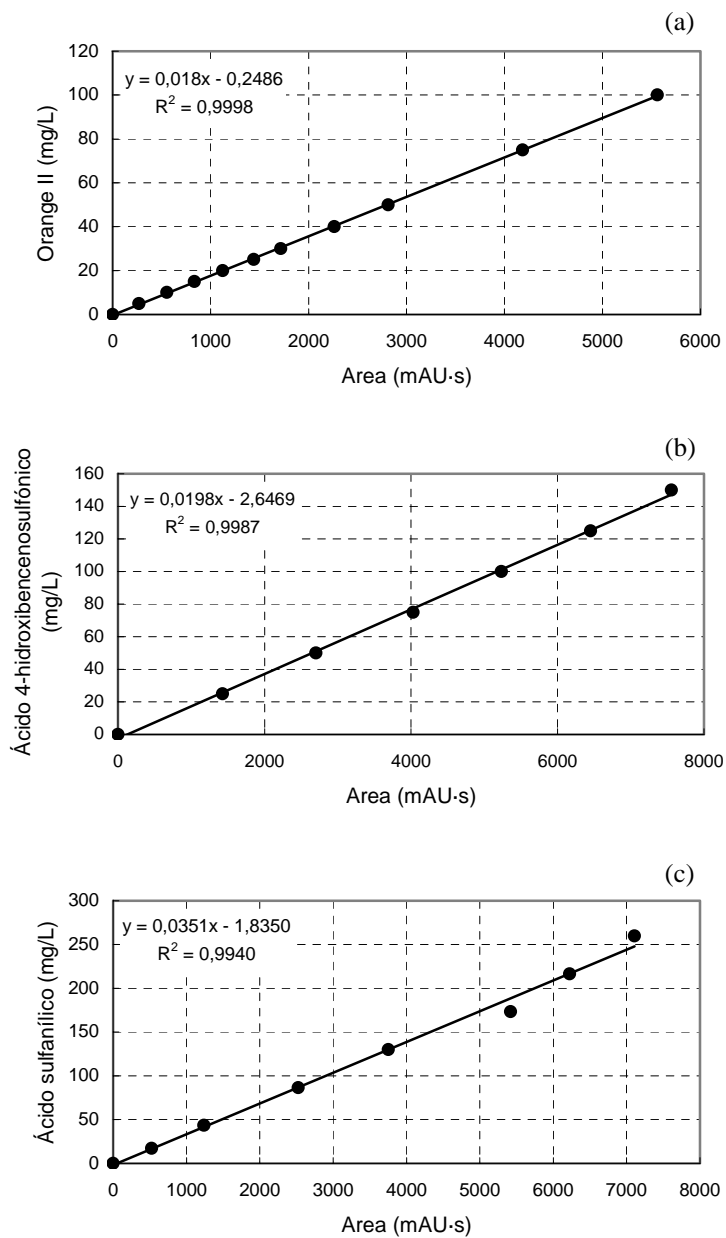


Figura 2.3. Rectas de calibrado por cromatografía líquida: (a) Orange II, (b) ácido 4-hidroxibencenosulfónico, (c) ácido sulfanílico

5. Referencias

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Field, J. A., de Jong, E., Feijoo, G. and de Bont, J. A. M. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(7), 2219-2226.

Mester, T., Peña, M. and Field, J. A. (1995) Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**, 778-784.

Tien, M. and Kirk, T. K. (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* **161**, 238-249.

Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 23688-23695.

Capítulo 3

Cinética de la degradación de Orange II en discontinuo

Resumen

El modelado de un proceso es un aspecto básico para su posterior escalado y control. En este capítulo se presenta un modelo cinético para la degradación del tinte azo Orange II. Se aplicó el método de las velocidades iniciales en ensayos en discontinuo, en los que se variaron las concentraciones iniciales de sustrato y las velocidades de adición de H_2O_2 . Trabajando con concentraciones de sustrato elevadas, hasta valores de 2 g/L, se observó que el sustrato tiene un cierto carácter inhibitorio sobre la cinética de la degradación. Los datos de velocidades de reacción presentaron un ajuste adecuado a un modelo de Haldane de inhibición por sustrato. Sin embargo no se obtuvo inhibición a concentraciones por debajo de 500 mg/L de Orange II, condiciones que representan los valores más comunes en efluentes de plantas textiles reales. Por tanto a concentraciones inferiores a 500 mg/L es más adecuado hablar de una cinética de Michaelis-Menten con respecto a Orange II, y con una dependencia lineal de primer orden con respecto a la velocidad de adición de H_2O_2 .

Índice

1. Introducción	71
2. Materiales y métodos	73
2.1. Preparación del crudo enzimático	73
2.2. Medio de degradación	73
2.3. Ensayos de degradación	74
3. Resultados y discusión	74
3.1. Cinética en función de la concentración de Orange II	74
3.2. Cinética en función de la concentración de Orange II y H ₂ O ₂	79
4. Conclusiones	85
5. Referencias	89

1. Introducción

La obtención de una ecuación cinética que modelice la degradación de compuestos constituye la clave para escalar los procesos y para diseñar un sistema que permita el control de los mismos. Cuando se trata de reacciones enzimáticas la cinética se complica debido a la posible desactivación de la enzima como consecuencia, bien de condiciones externas o bien de la presencia de compuestos inhibidores, que pueden ser incluso productos de la degradación o los propios sustratos.

En función del significado físico que presenten, las ecuaciones cinéticas se pueden clasificar en tres grupos: *i*) ecuaciones físicas, basadas en modelos que explican las etapas que tienen lugar en la reacción enzimática; *ii*) ecuaciones empíricas o matemáticas, que introducen variables que no tienen significado físico; *iii*) ecuaciones mixtas, que proceden de un compromiso entre las ecuaciones cinéticas físicas y los modelos matemáticos (Gallifuoco *et al.*, 2001).

Las ecuaciones físicas proceden de modelos más o menos complejos que intentan describir las reacciones enzimáticas en función de los parámetros que intervienen en ellas. Los modelos muy complejos y que dependen de un gran número de parámetros generalmente consiguen un buen ajuste de los datos experimentales, pero son poco prácticos en el diseño de procesos. Otros modelos reducen el número de variables para lograr ecuaciones más simples y útiles. Se han propuesto varias expresiones de velocidad de reacción para las reacciones enzimáticas. El mecanismo de Michaelis-Menten es uno de los más sencillos (Ecuación 1), y se basa en la formación de un complejo enzima-sustrato donde tiene lugar la transformación de dicho sustrato al producto, que se libera de la enzima. Otros mecanismos consideran inhibiciones debidas a la presencia de compuestos inhibitorios externos o al propio sustrato o producto. Uno de los modelos propuestos basados en la inhibición por sustrato corresponde al modelo de Haldane (Ecuación 2).

$$r = \frac{r_m S}{K_M + S} \quad (1)$$

$$r = \frac{r_m S}{K_M + S + K_I S^2} \quad (2)$$

donde r es la velocidad de reacción, S es la concentración de sustrato, r_m es la velocidad máxima, K_M es la constante de Michaelis-Menten y K_I es la constante de inhibición.

Las ecuaciones empíricas son expresiones matemáticas que a menudo resultan muy generales y poco predictivas. Sin embargo, presentan una serie de ventajas que las hacen útiles para el modelado de procesos: ajustan bien los datos experimentales y son ecuaciones sencillas de fácil aplicación. Por último las ecuaciones mixtas se usan cuando se conoce la dependencia física de la velocidad de reacción frente a una o varias variables, pero no frente a otras.

Se proponen dos tipos de métodos para evaluar los parámetros cinéticos de reacciones enzimáticas: *i*) métodos diferenciales, en los que se obtiene la velocidad de reacción directamente de la pendiente de la curva de concentración de sustrato o de producto frente al tiempo; *ii*) métodos integrales, en los que se integra la ecuación de velocidad y se obtiene una expresión para la variación de la concentración frente al tiempo (Bódalo *et al.*, 1999).

Los métodos diferenciales se aplican sobre ensayos en discontinuo, donde se obtiene la curva de la variación de la concentración con el tiempo. Estos métodos presentan la ventaja de que un solo ensayo proporciona un gran número de pares de puntos, aunque cuanto más suave es la pendiente de la curva, más difícil es determinar el valor con precisión. Otro inconveniente de estos métodos es que la actividad enzimática debe permanecer constante durante la reacción. Para solventar estas desventajas se trabaja con el método de las velocidades iniciales, en el que las concentraciones de productos, sustratos y enzima se consideran constantes y la pendiente inicial de la curva se puede determinar fácilmente. Como contrapartida, este método presenta dos desventajas: por una parte, cada par de puntos se obtiene en un ensayo diferente; por otra parte, en este método casi nunca se trabaja en las mismas condiciones que aquellas correspondientes a una situación real, puesto que los reactores en continuo suelen operar con conversiones elevadas (Bódalo *et al.*, 1999).

Los métodos integrales se basan en valores obtenidos en estado estacionario, por lo que se requiere un ensayo distinto para obtener cada par de puntos. Esto implica una mayor complejidad y un mayor consumo de tiempo (Alfani *et al.*, 1990). Otro inconveniente es la dificultad de integración de algunas ecuaciones cinéticas. Debido a esto, casi todos los autores realizan el modelado de las

reacciones enzimáticas en procesos en discontinuo y posteriormente aplican las constantes cinéticas obtenidas a los ensayos en continuo (Bódalo *et al.*, 2001a; Gallifuoco *et al.*, 2001). Algunos autores aplican en los ensayos en continuo un valor de r_m diferente al obtenido en los ensayos en batch. Bowski *et al.* (1972) utilizan un valor de $r_m/2$ y Nakajima *et al.* (1992) consideran $r_m/10$.

En el presente capítulo se pretende obtener el modelo cinético de la degradación del tinte azo Orange II mediante la enzima MnP, en procesos en discontinuo, por medio de la aplicación del método de las velocidades iniciales.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación del crudo enzimático

El crudo enzimático procedente de la fermentación del hongo *Bjerkandera* sp. BOS55, una vez descongelado, se centrifugó en tubos de 10 mL a 12.000xg en centrífuga Labofuge 200, Heraeus Sepatech GMBH (Alemania). Tras 5-10 min se separó el centrifugado del sobrenadante y este se filtró a través de filtros de membrana de celulosa de 0,45 μm (Millipore). La actividad enzimática del crudo tras ambos procesos osciló entre 3.000 y 10.000 U/L.

2.2. Medio de degradación

La selección del medio de degradación del tinte azo Orange II en ensayos en discontinuo se basó en estudios previos en los que se determinaron las condiciones más adecuadas para conseguir una velocidad óptima de degradación del tinte (Mielgo *et al.*, 2003). El medio empleado estuvo compuesto por un ácido orgánico (acético u oxálico), Mn^{2+} , MnP y Orange II en las concentraciones que se indican en la Tabla 3.1. El pH se ajustó a 4,5 previo a la adición de la enzima.

Tabla 3.1. Medio y condiciones para la degradación enzimática de Orange II

Ácido orgánico	1 mM	MnP	200 U/L
MnSO ₄	33 μM	Volumen	25 mL
Orange II	50-2000 mg/L	Temperatura	22 \pm 2°C
H ₂ O ₂	5-50 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$	pH	4,5

2.3. Ensayos de degradación

Los ensayos de degradación se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL de capacidad con 25 mL de medio descrito en la Tabla 3.1. La reacción se inició al añadir H₂O₂, que se bombeó en continuo mediante una bomba peristáltica de velocidad variable Masterflex[®]C/L[®] Cole-Parmer (Illinois, EEUU). Los caudales de adición de H₂O₂ fueron de 40 µL/min, de manera que se prepararon disoluciones base de 3,125-31,25 mM para conseguir velocidades de adición entre 5 y 50 µmol/L·min. En todos los ensayos se realizó un seguimiento de la concentración de Orange II mediante espectrofotometría, y de la actividad enzimática, tal y como se describe en el Capítulo 2 de Materiales y métodos.

Con el objetivo de observar la posible inhibición por sustrato, se realizaron ensayos por duplicado a una única velocidad de adición de H₂O₂ (50 µmol/L·min) y un amplio rango de concentraciones iniciales de Orange II (100-250-500-750-1000-1250-1500-1750-2000 mg/L), utilizando ácido acético, tal como se había considerado en estudios previos (Mielgo *et al.*, 2003).

A continuación se estudió la cinética del proceso en función de los dos parámetros que afectan en mayor grado a la velocidad de reacción, que son la concentración de sustrato y la velocidad de adición de H₂O₂. Para ello se realizaron ensayos en discontinuo a diferentes concentraciones iniciales de Orange II (50-100-200-300-500 mg/L) y diferentes velocidades de adición de H₂O₂ (5-15-25-50 µmol/L·min), empleando oxálico como ácido carboxílico.

Para excluir la posibilidad de que la decoloración fuese debida a un proceso distinto a la reacción enzimática, se realizó un control con MnP inactivada térmicamente.

3. Resultados y discusión

3.1. Cinética en función de la concentración de Orange II

Teniendo en cuenta el ciclo catalítico de la enzima MnP, se puede observar que el sustrato que reacciona con cada una de las formas de la enzima es diferente en las distintas etapas. Así, el sustrato en la oxidación de MnP nativa al compuesto I es H₂O₂. La primera etapa de reducción, de MnP I a MnP II, se realiza mediante la oxidación de una molécula de Mn²⁺ a Mn³⁺. Por último, la

tercera etapa, de reducción de la forma MnP II a MnP nativa, se realiza mediante la oxidación de otro compuesto que actúa como sustrato (Glenn & Gold, 1985). Los compuestos oxidados obtenidos actúan a su vez como oxidantes de otros compuestos, que resultan ser los dadores finales de electrones, y por lo tanto los sustratos finales de la oxidación enzimática. Cuando la cinética de la reacción enzimática propiamente dicha es más rápida que la de oxidación de los compuestos finales, esta última reacción se considera la etapa limitante del proceso, y por ello, la cinética global coincide con la cinética de degradación de dichos compuestos finales. Por este motivo, en términos cinéticos, se considera el Orange II como el sustrato de la degradación enzimática.

Se realizaron ensayos de degradación a distintas concentraciones iniciales de Orange II con el fin de observar el efecto de la concentración de sustrato en la cinética de degradación. Se trabajó con las mismas concentraciones iniciales de ácido acético, Mn^{2+} y MnP en todos los ensayos, y se siguió la concentración de Orange II durante 1 h, a intervalos de 1 min durante los 10 primeros minutos y de 5 min hasta la finalización de los experimentos. Los perfiles de decoloración para las concentraciones iniciales de 100-500-1000-1500-2000 mg/L se muestran en la Figura 3.1.

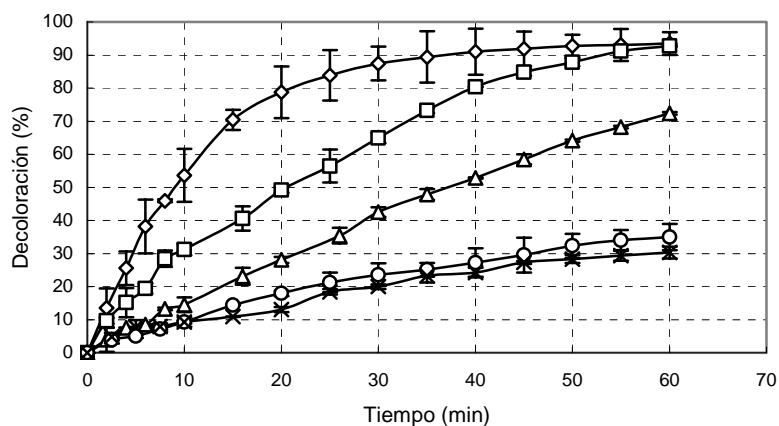


Figura 3.1. Decoloración de Orange II en ensayos en discontinuo a diferentes concentraciones iniciales de tinte: (◇) 100 mg/L; (□) 500 mg/L; (△) 1000 mg/L; (○) 1500 mg/L; (×) 2000 mg/L

Aplicando el método de las velocidades iniciales, se consideraron las pendientes de degradación de cada ensayo en el intervalo de tiempo tal que los pares de puntos proporcionaran una cinética de primer orden con respecto al sustrato. Para determinar ese intervalo se realizó una representación de $\ln(S/S_0)$ frente al tiempo y se calculó la constante cinética k de cada ensayo como la pendiente de los puntos que constituyen una recta. Los valores de dichas constantes y las velocidades de reacción calculadas a partir de las mismas se representan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos de la degradación de Orange II a diferentes concentraciones iniciales

S_0 (mg/L)	$k \cdot 10^3$ (min^{-1})	$r_0 = k \cdot S_0$ (mg/L·min)
102	81,2	8,3
257	52,7	13,5
519	33,1	17,2
733	21,8	16,0
960	17,8	17,1
1197	12,9	15,4
1447	9,15	13,2
1744	8,35	14,6
1995	6,70	13,4

Como se puede observar en la Tabla 3.2, las mayores velocidades de degradación se obtuvieron en el intervalo entre 500 y 1000 mg/L de Orange II. A partir de esta concentración la velocidad de reacción disminuye, lo cual indica un posible comportamiento cinético de inhibición por sustrato. Se realizó un ajuste de estos datos al modelo de Haldane (Ecuación 2), cuya linealización se representa en la Ecuación 3 y Figura 3.2.

$$\frac{1}{r} = \frac{K_M}{r_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{r_m} + \frac{K_I}{r_m} S \quad (3)$$

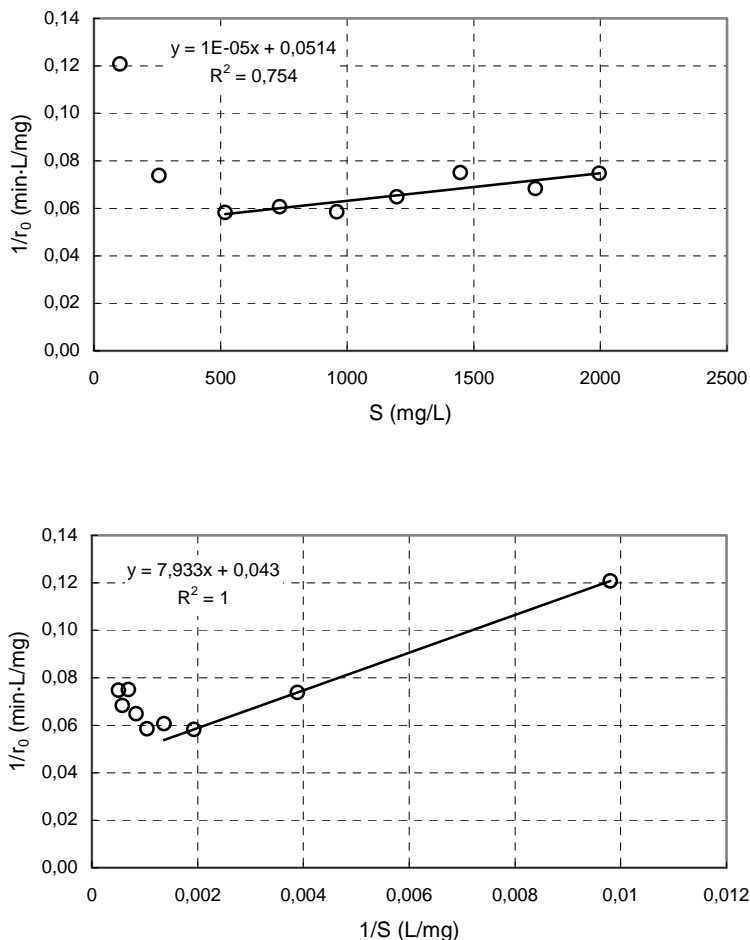


Figura 3.2. Linealización de los datos experimentales de velocidad de degradación de Orange II mediante un modelo de inhibición por sustrato

Para valores elevados de S , el primer término del segundo miembro de la Ecuación 3 pierde importancia, por lo que resulta una expresión lineal de S . Por el contrario, para valores pequeños de S , es el tercer término del segundo miembro de la Ecuación 3 el que resulta menos significativo. De ahí que las linealizaciones sean efectivas para el cálculo de K_I en el primer caso y K_M en el segundo. Las constantes cinéticas obtenidas r_m , K_M y K_I se representan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros cinéticos del modelo de inhibición por sustrato

r_m (mg/L·min)	K_M (mg/L)	K_I (L/mg)
23,3	184	$2,33 \cdot 10^{-4}$

El valor de la constante de inhibición es muy pequeño, lo que indica que la inhibición sólo se produce cuando las concentraciones de Orange II son elevadas. Por otro lado, la disminución en la velocidad de reacción no es demasiado alta incluso para concentraciones del orden de 2 g/L, como se puede observar en la Figura 3.3, en la que se corrobora el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales.

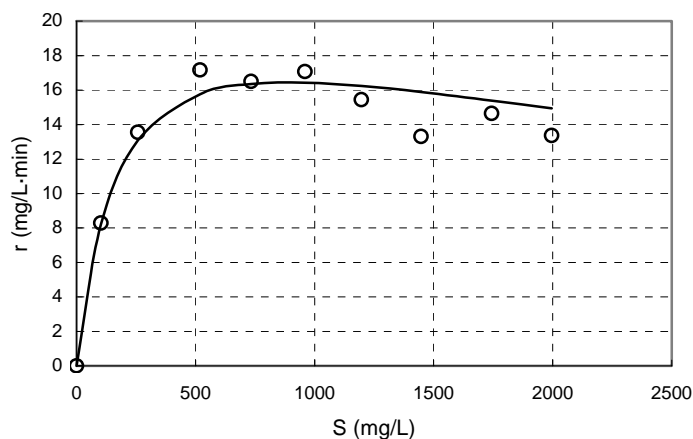


Figura 3.3. Comprobación del modelo cinético de inhibición por sustrato: (○) datos experimentales; (—) modelo cinético

La obtención de un modelo cinético que ajuste los datos experimentales es de gran utilidad para el diseño de un reactor en continuo y su escalado. En primer lugar, el modelo ofrece información acerca del tipo de reactor más adecuado para el proceso. En el caso de un proceso de inhibición por sustrato, un reactor de mezcla completa minimiza la posible ralentización que pueda surgir debida a la presencia de altas concentraciones de sustrato. La disponibilidad de un modelo cinético resulta de gran utilidad para el diseño de reactores, aunque es necesario estudiar la aplicabilidad de la ecuación obtenida a otras configuraciones de reactor

(Bódalo *et al.*, 2001a; Willeman *et al.*, 2002; Cantarella *et al.*, 2004). Por último, el modelo permite realizar simulaciones que describan el comportamiento del reactor en estados no estacionarios y la respuesta del sistema a cambios en las condiciones de trabajo similares a los que puedan tener lugar en un proceso real (Bódalo *et al.*, 2001b).

3.2. Cinética en función de la concentración de Orange II y H₂O₂

Los ácidos orgánicos desempeñan un doble papel en la reacción enzimática con MnP: por un lado actúan como tampón, manteniendo el pH del medio en un valor tal que la actividad enzimática sea máxima y la pérdida de enzima por desestabilización sea mínima; por otro lado, actúan como estabilizadores del ion generado, Mn³⁺, por sí solo inestable en disolución acuosa, mediante la formación de un complejo (Wariishi *et al.*, 1989). La constitución de estas formas complejadas con Mn³⁺ ayuda además a la disociación de los complejos MnP I-Mn²⁺ y MnP II-Mn²⁺. Los ácidos di o tri-carboxílicos, como el ácido malónico o el ácido oxálico, son los más adecuados para la formación de estos complejos, pues los monocarboxílicos, como el ácido acético, presentan un único punto de unión al ion Mn³⁺, con lo cual la complejación no podría tener lugar. Con el objetivo de favorecer la estabilización del ion oxidante Mn³⁺, se realizaron ensayos de decoloración con ácido oxálico como ácido orgánico.

El H₂O₂ es sustrato de la reacción enzimática de oxidación de la forma MnP nativa a MnP I, de manera que puede ser considerado, junto con el tinte Orange II, en el modelo cinético del proceso de degradación. Sin embargo se debe tener en cuenta que el H₂O₂ tiene una doble función en la reacción enzimática. Por una parte, como sustrato de la primera reacción del ciclo catalítico, un aumento en la concentración de H₂O₂ debería favorecer la cinética de la degradación enzimática. Pero por otra parte, el H₂O₂ actúa sobre la forma MnP II dando lugar a una forma MnP III inactiva (Timofeevski *et al.*, 1998), con lo cual una excesiva concentración de H₂O₂ puede provocar una elevada pérdida de actividad enzimática. Con el objetivo de llegar a un compromiso entre la cinética de la reacción y la pérdida de actividad, se estudiaron diversas estrategias de adición de H₂O₂ al medio de reacción (Mielgo *et al.*, 2003) y se concluyó que un bombeo en continuo permite adecuar la adición de H₂O₂ al consumo que tiene lugar en el reactor, de manera que la concentración puntual sea prácticamente nula y la desactivación enzimática sea mínima.

Con el objetivo de obtener un modelo cinético en función de las concentraciones de Orange II y de H_2O_2 , se planteó realizar ensayos de degradación en discontinuo a diferentes concentraciones iniciales de ambos substratos, y realizar un seguimiento de las cinéticas de desaparición de los mismos, aplicando el método de las velocidades iniciales para determinar los parámetros cinéticos. Sin embargo, se ha de considerar que la operación en continuo persigue una estrategia de adición de H_2O_2 tal que las concentraciones puntuales en el reactor sean prácticamente nulas. Moreira *et al.* (2001) midieron la concentración de H_2O_2 en ensayos en discontinuo mediante un electrodo de epoxi-grafito y obtuvieron que el consumo de H_2O_2 es del orden de $0,17 \mu\text{mol } H_2O_2$ por unidad enzimática y min. Para evitar la desactivación, la adición de H_2O_2 en el reactor en continuo estará dentro de un rango que no debería superar este valor, que equivale a unos $34 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{L}\cdot\text{min}$ para las condiciones de trabajo. Con esta velocidad de adición la concentración puntual de H_2O_2 debería ser prácticamente nula. Por este motivo, el modelo cinético no puede ser una función de la concentración de H_2O_2 , sino de la velocidad de adición del mismo, que presenta una relación directa con la cinética de degradación.

En función de lo indicado, el modelo cinético propuesto supone un compromiso entre un modelo físico con respecto a la concentración de Orange II y un modelo empírico con respecto a la velocidad de adición de H_2O_2 .

Se realizaron ensayos de degradación enzimática de Orange II en discontinuo a diferentes concentraciones iniciales de Orange II (50-100-200-300-500 mg/L) y diferentes velocidades de adición de H_2O_2 (5-15-25-50 $\mu\text{mol } H_2O_2/\text{L}\cdot\text{min}$) en un medio conteniendo oxalato, Mn^{2+} y MnP en las concentraciones presentadas en el capítulo de Materiales y métodos. Se siguió la concentración de Orange II durante 1 h, a intervalos de 1 min durante los 10 primeros minutos y de 5 min hasta la finalización de los experimentos. Los resultados se muestran en las Figuras 3.4 y 3.5.

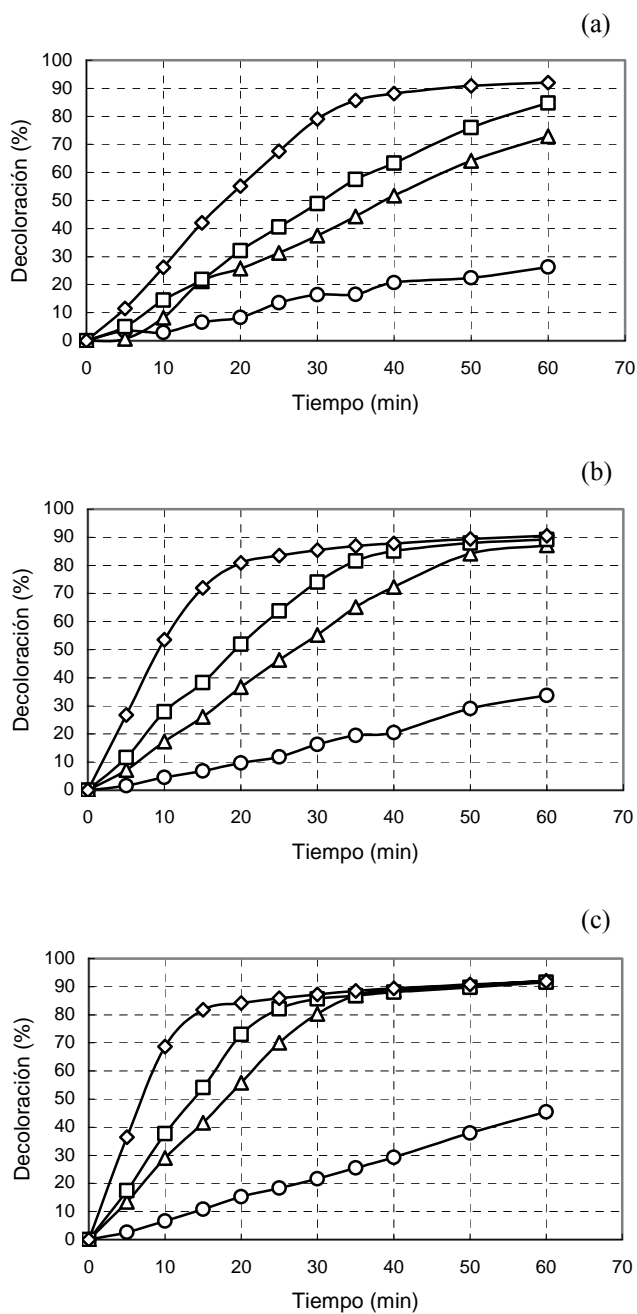


Figura 3.4. Decoloración de Orange II en ensayos a diferentes velocidades de adición de H₂O₂: (◇) 50 μmol/L·min; (□) 25 μmol/L·min; (Δ) 15 μmol/L·min; (○) 5 μmol/L·min; y diferentes concentraciones de Orange II: (a) 500 mg/L; (b) 300 mg/L; (c) 200 mg/L

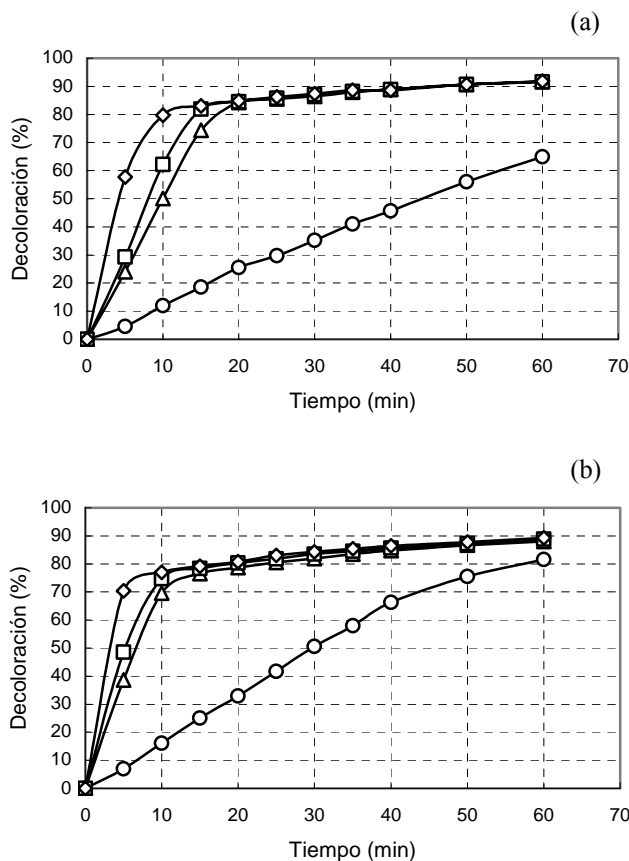


Figura 3.5. Decoloración de Orange II en ensayos a diferentes velocidades de adición de H₂O₂: (◇) 50 μmol/L·min; (□) 25 μmol/L·min; (Δ) 15 μmol/L·min; (○) 5 μmol/L·min; y diferentes concentraciones de Orange II: (a) 100 mg/L; (b) 50 mg/L

En la mayoría de las condiciones aplicadas se alcanzó una decoloración superior al 90% tras 60 min. Para una concentración de Orange II elevada fue necesaria una mayor cantidad de H₂O₂ para lograr una decoloración entorno a ese valor. Sin embargo, una adición de 5 μmol/L·min no fue suficiente para degradar el 90% del tinte aun cuando la concentración inicial de este fue de 50 mg/L.

En la Tabla 3.4 se presentan los valores de las velocidades iniciales para cada uno de los ensayos realizados. Por trabajar con concentraciones de sustrato iguales o inferiores a 500 mg/L, y tal como se ha visto en el apartado anterior, no cabe esperar fenómenos de inhibición por sustrato (Orange II). Sólo en el caso de una adición de H₂O₂ elevada, de 50 μmol/L·min, se pudo observar cierta

inhibición a concentraciones de 500 mg/L de Orange II, debida probablemente a una inhibición parcial de la enzima. Por otra parte, se observa que existe una relación entre las velocidades cinéticas y la velocidad de adición de H₂O₂.

Tabla 3.4. Velocidades de degradación de Orange II a diferentes concentraciones iniciales de tinte y diferentes velocidades de adición de H₂O₂

<i>Velocidades de degradación (mg/L·min)</i>				
<i>Concentración inicial de Orange II (mg/L)</i>	<i>Velocidad de adición de H₂O₂ (μmol/L·min)</i>			
	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>25</i>	<i>50</i>
<i>50</i>	0,84	3,42	4,93	7,10
<i>100</i>	1,10	4,97	6,10	11,6
<i>200</i>	1,47	5,48	6,99	13,1
<i>300</i>	1,65	5,36	7,24	15,2
<i>500</i>	2,24	6,11	8,00	13,3

En las condiciones de operación, el término de inhibición de la ecuación de Haldane determinado anteriormente no sería significativo con respecto al resto de los términos de la ecuación. Se consideró por ello el modelo más sencillo de Michaelis-Menten con respecto a la concentración de Orange II, y una función lineal con respecto a la velocidad de adición de H₂O₂, como se presenta en la Ecuación 4.

$$r = \frac{r_m S}{K_M + S} (K_{H_2O_2} + Q_{H_2O_2}) \quad (4)$$

donde $K_{H_2O_2}$ es la constante de la función de la adición de H₂O₂ y $Q_{H_2O_2}$ es la velocidad de adición de H₂O₂. Si bien la constante cinética r_m ya no tiene el significado de velocidad máxima, se seguirá manteniendo esta nomenclatura. Para una velocidad de adición de H₂O₂ constante, se puede considerar una velocidad máxima r_m' para cada uno de los valores de velocidad de adición, de manera que la Ecuación 4 se puede transformar en la Ecuación 5, en donde el término de la velocidad máxima aparente resulta una función lineal de la velocidad de adición de H₂O₂, para valores de este iguales o inferiores a 50 μmol/L·min.

$$r = \frac{r_m' S}{K_M + S} \quad \text{donde } r_m' = r_m (K_{H_2O_2} + Q_{H_2O_2}) \quad (5)$$

Los valores de r_m' y K_M para cada valor de velocidad de adición se expresan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Parámetros cinéticos de la degradación de Orange II a diferentes velocidades de adición de H_2O_2

Parámetros cinéticos	Velocidad de adición de H_2O_2 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)			
	5	15	25	50
r_m' (mg/L·min)	2,20	6,61	8,24	17,5
K_M (mg/L)	85,8	44,3	34,0	68,8

Considerando un valor medio de K_M , que no debe variar con la velocidad de adición de H_2O_2 , se obtiene una regresión lineal entre el valor de la velocidad máxima aparente r_m' y la velocidad de adición de H_2O_2 , determinándose los parámetros cinéticos de la Ecuación 4, que se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Parámetros del modelo cinético en función de la concentración de Orange II y la adición de H_2O_2

r_m (mg/ μmol)	K_M (mg/L)	$K_{H_2O_2}$ ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)
0,33	58,2	2,4

A partir de estos parámetros cinéticos se puede comprobar cómo el modelo propuesto ajusta los datos experimentales, para cada una de las velocidades de adición de H_2O_2 de trabajo (Figura 3.6). El error entre los datos experimentales y los propuestos por el modelo es menor del 5% en la mayoría de los casos, lo que indica que el tipo de modelo aplicado y los valores de las constantes cinéticas obtenidos son adecuados para describir el sistema de reacción.

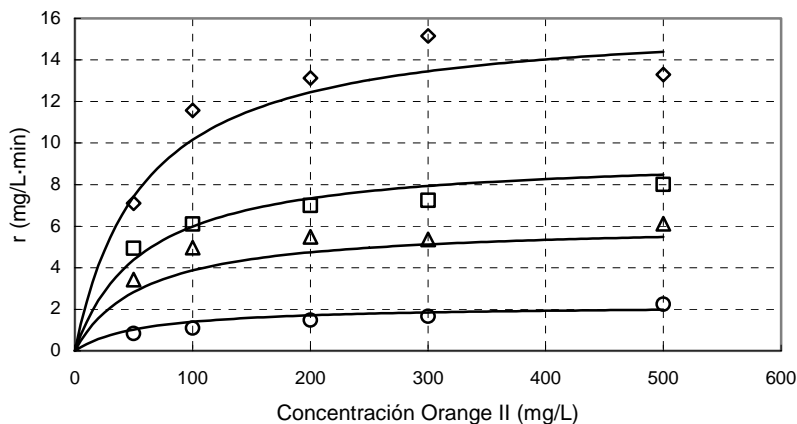


Figura 3.6. Comprobación del modelo cinético en función de la concentración de Orange II y la velocidad de adición de H_2O_2 : (◇) $50 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$; (□) $25 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$; (Δ) $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$; (○) $5 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$; (—) datos simulados por el modelo cinético

4. Conclusiones

La oxidación enzimática del tinte azo Orange II mediante la enzima MnP constituye un método muy efectivo para su degradación. Las condiciones en las cuales la oxidación es más rápida y la actividad enzimática se ve menos afectada han sido ampliamente estudiadas en trabajos anteriores (Moreira *et al.*, 2001; Mielgo *et al.*, 2003).

La presencia del ion Mn^{2+} juega un papel importante en el ciclo catalítico de la enzima MnP. Numerosos autores mantienen que la enzima comúnmente denominada manganeso peroxidasa tiene actividad independiente de Mn^{2+} , con lo cual podría recibir el nombre más adecuado de peroxidasa versátil (Heinfling *et al.*, 1998; Mester & Field, 1998), aunque la eficiencia catalítica de la enzima es mucho más elevada en presencia de Mn^{2+} que en presencia de otros substratos aromáticos (Heinfling *et al.*, 1998). Sin embargo una concentración muy elevada de Mn^{2+} en el medio ralentiza la degradación de Orange II (Mielgo *et al.*, 2003). Por otra parte, la presencia de Mn^{2+} en el medio favorece la estabilidad de la enzima (Palma *et al.*, 1997). Con el fin de llegar a un compromiso entre la cinética de la degradación y la estabilidad enzimática, se seleccionó $33 \mu\text{M}$ como

la concentración más adecuada para los ensayos de degradación (Mielgo *et al.*, 2003).

El crudo enzimático es el factor más costoso del proceso. Por ello, para determinar el valor de actividad enzimática más adecuado se consideraron parámetros económicos. Por encima de 150-200 U/L de MnP no se apreciaron grandes cambios en cuanto a la cinética del proceso. Por ello, se consideró ese rango como el más adecuado para los procesos de degradación (Mielgo *et al.*, 2003).

El ácido orgánico juega un doble papel en el medio de degradación, pues ayuda a mantener el pH de la disolución en el valor óptimo para favorecer la estabilidad de la enzima, y por otra parte actúa como estabilizador del ion Mn^{3+} generado mediante la formación de un complejo. Sin embargo, concentraciones muy elevadas de ácido orgánico afectan negativamente a la estabilidad de la enzima, y con ello, al grado de decoloración alcanzado (Mielgo *et al.*, 2003). Esto es debido a que los ácidos son oxidados por el propio Mn^{3+} y producen radicales que afectan a la estabilidad enzimática, a la vez que la cantidad de Mn^{3+} disponible para la degradación del sustrato se reduce, afectando a la cinética de la degradación (Hofrichter *et al.*, 1998). En estudios previos se llegó a una concentración óptima de ácido orgánico de 1 mM (Mielgo *et al.*, 2003).

No sólo se debe considerar la concentración sino también el tipo de ácido, pues la formación de un complejo exige la presencia de un ácido no monocarboxílico, que no tiene capacidad quelante. Sin embargo, se operó en ausencia de ácido en ensayos previos y se alcanzaron buenos niveles de degradación de Orange II, aunque se produjo una mayor desestabilización de la enzima como consecuencia de la ausencia de un medio tampón (Mielgo *et al.*, 2003). Se consideró que podría ser el propio Orange II, que tiene carácter ácido y está presente en una concentración considerable, el que tuviese una cierta capacidad quelante con respecto al Mn^{3+} , de manera que pudiese estabilizar al ion y favorecer su propia degradación.

Una forma de realizar la selección del ácido carboxílico puede ser en función de la cinética de degradación en presencia de cada uno de los ácidos. De esta forma, si se consideran ambas cinéticas obtenidas en el presente capítulo y se comparan para una misma velocidad de adición de H_2O_2 , de 50 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$, se obtiene la representación de la Figura 3.7, en la que se observa que la cinética de

degradación en presencia de ácido oxálico es más rápida que en presencia de acético. Este hecho está corroborado a su vez por los valores de la constante de Michaelis para los distintos ácidos. El valor de K_M para el ácido acético es unas tres veces superior al del ácido oxálico (184 frente a 58 mg/L), lo que indica que a concentraciones pequeñas de Orange II la velocidad de degradación es mucho mayor en presencia de oxálico. Sin embargo, la velocidad de degradación máxima en el caso del acético es mayor que para el oxálico (23 y 19 mg/L·min, respectivamente), lo que significaría que a concentraciones de Orange II mayores de las representadas en la gráfica la presencia de acético favorecería la velocidad de degradación.

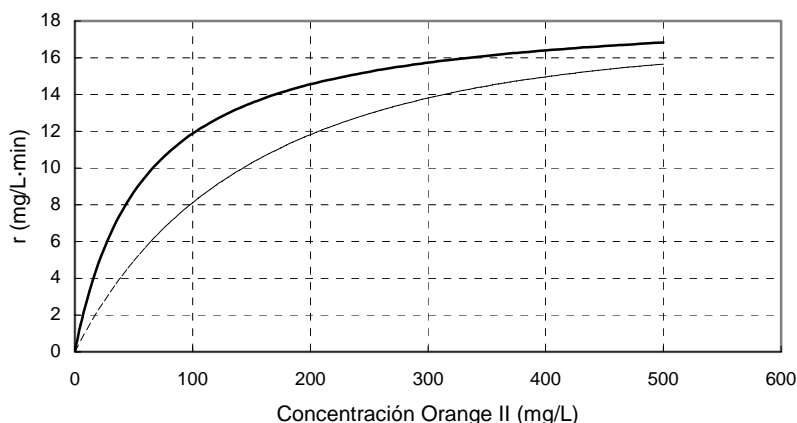


Figura 3.7. Comparación entre los modelos cinéticos de la degradación de Orange II en presencia de: (---) ácido acético; (—) ácido oxálico

Para facilitar la obtención y posterior aplicación de las ecuaciones cinéticas se asumieron una serie de consideraciones: el proceso es isotérmico, el volumen de reacción es constante y el reactor está perfectamente agitado. A partir de estas suposiciones se aplicó el método diferencial de velocidades iniciales, en el que se consideró la pendiente inicial de degradación de Orange II para cada concentración inicial de tinte. Se podría considerar un método diferencial que tomase todos los pares de puntos de concentración frente a tiempo para realizar el cálculo de los parámetros cinéticos, de forma que ganasen más peso aquellos puntos obtenidos a concentraciones bajas de tinte, por ser los más abundantes. Sin embargo, el parámetro cinético r_m es una función lineal de la concentración de

enzima, que no se mantiene constante a lo largo del proceso, sino que sufre una cierta desactivación. Diversos autores consideraron una cinética de desactivación de la enzima, que podría venir dada por la Ecuación 6 (Sehanputri & Hill, 2000; Bódalo *et al.*, 2004).

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d t} \quad (6)$$

donde E es la actividad enzimática a tiempo t , E_0 es la actividad enzimática inicial, k_d es la constante de desactivación de primer orden y t es el tiempo. Esta ecuación se podría aplicar a la ecuación cinética, aunque dificultaría el cálculo de los parámetros.

El modelo propuesto para la degradación de Orange II es un modelo semi-empírico, que resulta de la combinación del modelo de Michaelis-Menten con respecto a la concentración de Orange II y un modelo matemático con respecto a la velocidad de adición de H_2O_2 . Concentraciones muy elevadas de tinte producen un efecto inhibitorio en la reacción enzimática, de manera que la velocidad de reacción disminuye, aunque muy levemente. El modelo es útil para determinar la concentración de tinte que aporta una cinética más elevada, que está entorno a 750 mg/L. Sin embargo a medida que la concentración inicial aumenta, el porcentaje de decoloración alcanzado es menor, lo que implica que tras la reacción puede permanecer en el medio una concentración de tinte elevada. La concentración de Orange II se ha de seleccionar teniendo en cuenta ambos factores, cinética y decoloración, con el objetivo de alcanzar una decoloración adecuada en un tiempo reducido.

El efecto del H_2O_2 en la ecuación cinética resulta ejercer una dependencia lineal con respecto, no a su concentración puntual (que es prácticamente nula), sino a su velocidad de adición. El modelo indica que a medida que aumenta la velocidad de adición de H_2O_2 (hasta 50 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) la degradación de tinte tiene lugar a mayor velocidad. Para velocidades más altas de adición de H_2O_2 deberá considerarse el aspecto de desactivación de MnP debido a concentraciones elevadas de H_2O_2 . La determinación del caudal óptimo de H_2O_2 ha de resultar un compromiso entre la velocidad de la degradación y la desactivación enzimática.

En conclusión, el modelo cinético propuesto es una herramienta útil para conocer la cinética del proceso, ya que por medio de ella se puede estudiar cómo los diversos parámetros (ácido carboxílico, concentración de Orange II, velocidad

de adición de H₂O₂) afectan a la velocidad de degradación del tinte, y permite decidir cuáles son las condiciones que favorecen una cinética más rápida.

5. Referencias

Alfani, F., Gallifuoco, A. and Cantarella, M. (1990) Study of Michaelis-Menten kinetics with linear-type product inhibition in ultrafiltration membrane reactors: mathematical model, experimental and data correlation. *The Chemical Engineering Journal* **43**, B43-B51.

Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J., León, G., Máximo, M. F., Hidalgo, A. M. and Montiel, M. C. (1999) Kinetic calculations in the enzymatic resolution of DL-amino acids. *Enzyme and Microbial Technology* **24**, 381-387.

Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J., Máximo, M. F. and Montiel, M. C. (2001a) Ultrafiltration membrane reactors for enzymatic resolution of amino acids: design model and optimization. *Enzyme and Microbial Technology* **28**, 355-361.

Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Máximo, M. F. and Hidalgo, A. M. (2001b) Simulation of transient state in enzymatic membrane reactors for resolution of DL-valine and experimental validation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **76**, 978-984.

Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Máximo, M. F. and Montiel, M. C. (2004) Study of L-aminoacylase deactivation in an ultrafiltration membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 261-266.

Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Frezzini, R., Spera, A. and Alfani, F. (2004) A study in UF-membrane reactor on activity and stability of nitrile hydratase from *Microbacterium imperiale* CBS 498-74 resting cells for propionamide production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **29**, 105-113.

Gallifuoco, A., Alfani, F., Cantarella, M. and Viparelli, P. (2001) Studying enzyme-catalyzed depolymerization in continuous reactors. *Industrial Engineering and Chemical Research* **40**, 5184-5190.

Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1985) Purification and properties of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **242**, 329-341.

Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. (1998) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters* **165**, 43-50.

Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Vares, T., Friedrich, M., Jäger, M. G. and Fritsche, W. (1998) Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS Letters* **434**, 362-366.

Mester, T. and Field, J. A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isoenzyme produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15412-15417.

Mielgo, I., López, C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2003) Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology Progress* **19**(2), 325-331.

Moreira, M. T., Palma, C., Mielgo, I., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2001) *In vitro* degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* **75**(3), 362-368.

Palma, C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (1997) Enhanced catalytic properties of MnP by exogenous addition of manganese and hydrogen peroxide. *Biotechnology Letters* **19**(3), 263-267.

Sehanputri, P. S. and Hill, C. G. (2000) Biotechnology for the production of nutraceuticals enriched in conjugated linoleic acid: II. Multiresponse kinetics of the hydrolysis of corn oil by a *Pseudomonas* sp. lipase immobilized in a hollow-fiber reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **69**(4), 450-456.

Timofeevski, S. L., Reading, N. S. and Aust, S. D. (1998) Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**(2), 287-295.

Wariishi, H., Dunford, H. B., MacDonald, I. D. and Gold, M. H. (1989) Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **264**(6), 3335-3340.

Willeman, W. F., Straathof, A. J. J. and Heijnen, J. J. (2002) Comparison of a batch, fed-batch and continuously operated stirred-tank reactor for the enzymatic synthesis of (R)-mandelonitrile by using a process model. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **24**, 281-287.

Capítulo 4

Degradación en continuo de Orange II en un reactor enzimático de membrana¹

Resumen

En este capítulo se presenta el estudio de un reactor enzimático de membrana para la oxidación en continuo del tinte azo Orange II mediante MnP. La configuración consistió en un reactor de tanque agitado asociado a una membrana de ultrafiltración, que permitió la retención y recirculación de la enzima, mientras que los productos y sustratos pasaron a través de la membrana y se eliminaron junto con el efluente. Con el objetivo de maximizar la eficacia del sistema, en términos de tinte degradado por unidad de enzima consumida, se estudiaron diversas estrategias de dosificación de enzima en un único pulso, pulsos periódicos o bien en continuo. Adicionalmente, se estudió la influencia de diversos parámetros tales como la actividad enzimática, velocidad de dosificación de H₂O₂, concentración de ácido orgánico y tiempo de residencia hidráulico. Las mejores condiciones permitieron obtener una decoloración superior al 90% con una mínima pérdida de actividad enzimática, alcanzándose una eficacia de 42,5 mg de Orange II oxidado por unidad de enzima MnP consumida, valor 16 veces superior al máximo obtenido en ensayos en discontinuo. El sistema se mantuvo estable durante 18 d, sin necesidad de limpieza o reemplazo de la membrana. Por último, se realizó una simulación mediante la aplicación de la ecuación cinética propuesta en el Capítulo 3 a los ensayos en continuo. El análisis de los datos muestra un ajuste satisfactorio entre los datos experimentales y los simulados para la operación del reactor tanto en estado estacionario como en no estacionario.

¹ López, C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2004) Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnology Progress* **20**, 74-81.

Índice

1. Introducción	93
2. Materiales y métodos	97
2.1. Operación del reactor enzimático de membrana	97
2.2. Técnicas analíticas	101
3. Resultados y discusión	102
3.1. Eficacia de la membrana	102
3.2. Estrategias de adición de MnP	103
3.3. Optimización de la operación en continuo	107
3.4. Dinámica del proceso en continuo	115
3.5. Operación en estado no estacionario	120
3.6. Modelización	123
4. Conclusiones	127
5. Referencias	129

1. Introducción

Los procesos de conversión enzimática se aplican tanto a producción como a degradación de compuestos. Generalmente las reacciones enzimáticas tienen lugar en reactores en discontinuo, cuyo uso es simple a cualquier escala y sólo es necesario el control de pH y temperatura. Al final de la reacción la enzima se inactiva antes de recuperar los productos finales (Ríos *et al.*, 2004). Sin embargo, los procesos en batch presentan una serie de desventajas, como son:

- i) Altos costes de operación
- ii) Baja productividad
- iii) Frecuentes procesos de arranque y parada
- iv) Oscilaciones de batch a batch, lo que conlleva gran variabilidad en la calidad de los productos
- v) Necesidad de recuperar la enzima o preparación de enzima fresca en el arranque de cada nuevo proceso

Frente a estas limitaciones, un proceso enzimático en continuo permite un mejor control del proceso y una mayor productividad, con productos de calidad homogénea (Prazeres & Cabral, 1994; López *et al.*, 2002). Para conseguir un proceso en continuo económicamente viable es necesario evitar la pérdida de actividad enzimática en el efluente. Con este objetivo se utilizan los reactores enzimáticos asociados a membranas de ultrafiltración, que son apropiadas para la separación de los biocatalizadores, de manera que puedan ser reutilizados (Bódalo *et al.*, 2001). Un reactor enzimático de membrana aporta ventajas adicionales al proceso en continuo: la integración de un paso de purificación en el proceso; una distribución homogénea de la enzima; el uso de la enzima nativa; la posibilidad de adición de enzima fresca para mantener la actividad en el reactor a pesar de la desactivación; además no es necesario llevar a cabo procedimientos de inmovilización enzimática, que pueden resultar largos y costosos (Bódalo *et al.*, 2001).

En contrapartida, las principales desventajas que presenta un reactor enzimático de membrana son una posible mayor desactivación enzimática y la pérdida de eficacia de transferencia de materia a través de la membrana (Prazeres & Cabral, 1994).

La pérdida de actividad enzimática en los reactores de membrana puede deberse a varias causas: *i)* pequeños activadores iónicos de la actividad enzimática pueden atravesar la membrana y salir del reactor; *ii)* se puede producir una adsorción de la enzima en la membrana que puede dar lugar a alteraciones de la conformación enzimática; *iii)* la enzima se puede envenenar en contacto con la membrana (Prazeres & Cabral, 1994); *iv)* por último, las fuerzas de rozamiento y fricción con las paredes a menudo son causa de desactivación, ya que en ocasiones existe una relación directa entre el aumento de la velocidad de recirculación y la caída de actividad (Bódalo *et al.*, 2004).

La pérdida de eficacia en la transferencia de materia es fundamentalmente debida a la polarización y al ensuciamiento de la membrana (Prazeres & Cabral, 1994). La polarización es inducida por la acumulación de solutos en una capa adyacente a la membrana, que provoca un gradiente de concentraciones, disminuyendo el flujo de solutos a través de la membrana y el caudal de permeado. Algunas soluciones para combatir la polarización son el incremento de la velocidad de recirculación, el bombeo de un flujo a contracorriente o el lavado de la membrana entre operaciones sucesivas del reactor. El ensuciamiento de la membrana está causado por deposiciones de solutos en los poros, lo que limita la capacidad de filtración. El proceso es irreversible y produce una reducción en el flujo de permeado y aumento del rechazo. Para evitarlo se ha de realizar un pretratamiento de la alimentación para eliminar los compuestos de tamaño tal que pudieran quedar retenidos en los poros (Edwards *et al.*, 2002; Ríos *et al.*, 2004).

Las membranas se pueden clasificar en función de diversos criterios:

- i) Material.* Se utilizan principalmente materiales cerámicos o polímeros sintéticos. Los cerámicos son más resistentes a altas temperaturas, al ataque por compuestos químicos y a la presión, aunque son más costosos. Los polímeros sintéticos son los más empleados, ya que, aunque menos resistentes, son más baratos. Dentro de estos se incluyen nylon, polipropileno, poliamida, poliacrilonitrilo, acetato de celulosa, celulosa, politetrafluoroetileno, carbón o polisulfona (Prazeres & Cabral, 2001).
- ii) Tamaño de poro.* La mayoría de las membranas utilizadas para la retención de enzimas son de ultrafiltración ya que la mayor parte de las enzimas tienen pesos moleculares entre 500 y 100.000 Da. El tamaño de poro de la membrana se define como el peso molecular de un macrosoluto capaz de ser

retenido en un 90% bajo condiciones de filtración definidas (Hildebrandt, 1991).

- iii) *Distribución del tamaño de poro.* Las membranas son simétricas si hay una uniformidad en el tamaño de poro, o asimétricas, si el tamaño de poro varía continuamente en una dirección. En este caso son menos propensas al ensuciamiento, de manera que permiten mayores caudales de flujo permeado (Prazeres & Cabral, 2001).
- iv) *Disposición.* Las membranas pueden ser laminares, dispuestas en módulos de placa plana o en espiral; tubulares, dispuestas en módulo de carcasa y tubo; o de fibra hueca (Giorno & Drioli, 2000).

La selección de la membrana se realiza normalmente por tanteo, aunque hay dos aspectos principales que deben ser considerados: el tamaño de poro y la naturaleza química de las especies en disolución y de la propia membrana. El tamaño de poro debe ser el adecuado para retener la enzima y dejar pasar el producto a su través. Se define un coeficiente, llamado coeficiente de rechazo, por la Ecuación 1.

$$\sigma = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (1)$$

en donde σ es el coeficiente de rechazo; C_p es la concentración en el caudal de permeado y C_r es la concentración en el caudal de retenido. La retención más adecuada implica un coeficiente de rechazo de 0 para los productos, para facilitar la permeación, y 1 para la enzima, para asegurar su retención (Prazeres & Cabral, 2001). Por otra parte se debe tener en cuenta la naturaleza química de la membrana y los solutos, pues las interacciones entre ellos, ya sean electrostáticas, hidrofóbicas o hidrofílicas, originan una capa que disminuye la permeabilidad. Por último, han de tenerse en cuenta características tales como la morfología, porosidad, distribución de los poros, temperatura y pH de trabajo, resistencia a la presión y precio.

La Tabla 4.1 muestra algunas de las aplicaciones más comunes de los reactores enzimáticos acoplados a una membrana.

Tabla 4.1. Aplicaciones de los reactores enzimáticos de membrana

<i>Aplicación</i>	<i>Enzima</i>	<i>Referencia</i>
<i>Hidrólisis de macromoléculas</i>		
Celobiosa	Celobiasa	Hong <i>et al.</i> , 1981
Peptina	Endopectinasa	Rodríguez-Nogales <i>et al.</i> , 2005
Chitosán	Crudo enzimático	Kuo <i>et al.</i> , 2004
Proteína de pescado	Proteasa	Nakajima <i>et al.</i> , 1992
Almidón	Glucoamilasa	Slominska <i>et al.</i> , 1998
κ -caseinomacropéptido	Tripsina	Martin-Orue <i>et al.</i> , 1999
N-acetil-DL-metionina	Acilasa	Bódalo <i>et al.</i> , 2001
Ácido poligalacturónico	Peptoliasa	Gallifuoco <i>et al.</i> , 2001
<i>Síntesis de compuestos</i>		
Oligodextranos	Endodextranasa	Mountzouris <i>et al.</i> , 2002
Oligosacáridos pécticos	Pectina	Olano-Martin <i>et al.</i> , 2001
(R)-(-)-fenilacetilcarbinol	Piruvato descarboxilasa	Iwan <i>et al.</i> , 2001
Leucina	Leucina deshidrogenasa	Wichmann <i>et al.</i> , 2000
Eritrulosa	Transcetolasa	Bongs <i>et al.</i> , 1997
Ácido lactobiónico	Gluc-fruc oxidorreductasa	Satory <i>et al.</i> , 1997
Xilitol	Aldosa reductasa	Kulbe <i>et al.</i> , 1992
<i>Degradación de compuestos</i>		
Cianuro	Cianurasa	Basheer <i>et al.</i> , 1993
Fenol y 2-clorofenol	Peroxidasa de soja	Flock <i>et al.</i> , 1999
Metil-fenil-sulfuro	Cloroperoxidasa	Pasta <i>et al.</i> , 1999

En este capítulo se estudia la degradación en continuo del tinte azo Orange II en un reactor enzimático de membrana. Mediante la modificación de las condiciones de operación, se pretenderá maximizar la eficacia del sistema, que se define como la relación entre el tinte degradado y la enzima necesaria para su degradación.

2. Materiales y métodos

2.1. Operación del reactor enzimático de membrana

Descripción del sistema

El sistema consta de un reactor continuo de tanque agitado de 250 mL acoplado a una membrana de ultrafiltración, que permite la retención de la enzima y su recirculación al reactor (Figura 4.1). El volumen adicional proporcionado por la unidad de ultrafiltración y las conducciones representa 150 mL.

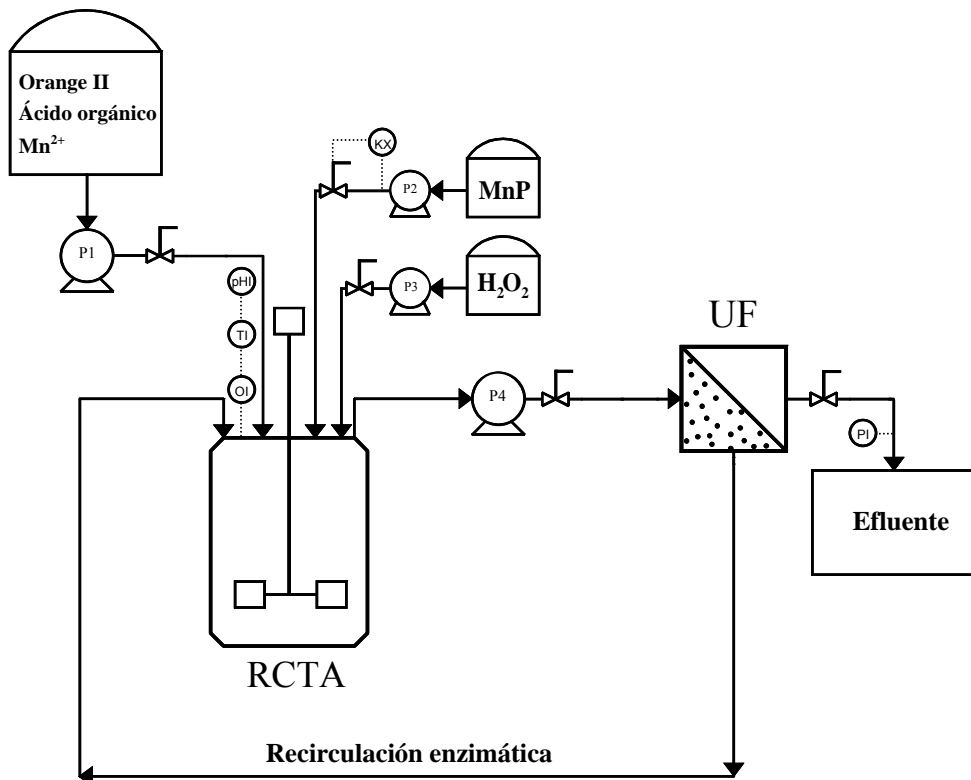


Figura 4.1. Esquema del reactor enzimático de membrana. P: bombas de velocidad variable; UF: membrana de ultrafiltración; RCTA: reactor continuo de tanque agitado

La membrana es de polietersulfona (Prep/Scale™-TFF Millipore, Billerica, MA, EEUU) enrollada en espiral, con un tamaño de poro de 10 kDa y una superficie de 0,09 m². Se dispone en posición vertical en un soporte que consta de un manómetro indicando la presión de la entrada de la membrana. Se alimenta por

su parte inferior, por lo tanto el flujo es ascendente y paralelo a la superficie de la membrana. El caudal de permeado atraviesa la membrana y abandona el cartucho por un conducto interior. La relación entre el caudal de permeado y de retenido se establece por medio de una válvula incorporada en la parte superior del soporte.

El proceso se inicia por adición de tres disoluciones al reactor por medio de bombas peristálticas de velocidad variable: *i*) una disolución de Orange II (0,1-0,5 g/L), MnSO_4 (33 μM) y ácido orgánico (1 mM), por medio de una bomba Masterflex[®]L/S[®] Cole-Parmer (Illinois, EEUU) (P1); *ii*) MnP (7.000 U/L) y *iii*) H_2O_2 (94-312 mM), mediante dos bombas Masterflex[®]C/L[®] Cole-Parmer (Illinois, EEUU) (P2 y P3). Se empleó una cuarta bomba peristáltica Masterflex[®]L/S[®] para bombear el efluente del reactor hacia el cartucho de ultrafiltración (P4).

Preparación y mantenimiento de la membrana

Los cartuchos Prep/Scale TFF se disponen con una disolución al 0,1% de cloruro de alquil-benzil-dimetil amonio. Cuando la membrana se usa por primera vez es necesario realizar una purga para eliminar las disoluciones de limpieza y almacenamiento. Tras cada uso, se debe llevar a cabo una limpieza, precedida y seguida de purgas para eliminación de disoluciones de trabajo y limpieza.

El procedimiento de purga de la membrana comienza por el vaciado de la disolución que contiene, mediante la agitación del cartucho invertido. A continuación se bombean 7 L de agua microfiltrada y desionizada a 45°C con un caudal de 1 L/min a una presión máxima de 20 psi (1,4 bar), pues a presiones mayores se puede producir la ruptura de las gomas flexibles empleadas en las bombas peristálticas. El volumen total de agua se distribuye de la siguiente manera: en primer lugar se hacen pasar 2 L de agua a través de la línea de retenido, a continuación 4 L a través de la membrana, y por último 1 L de nuevo a través de la línea de retenido.

La limpieza se realiza con una disolución de NaOH 0,1 N a 45°C. Se preparan 4 L de disolución y se bombean a través de la membrana a un caudal de 4 L/min, abriendo la válvula de la línea de permeado de manera que el flujo se reparta entre ambas líneas y que la presión no sea mayor de 20 psi. La disolución se recircula durante los 60 min de limpieza. Esta misma disolución es la que se utiliza para el almacenamiento de la membrana.

Estudio de la eficacia de la membrana

La eficacia de la membrana se evaluó por medio del cálculo del coeficiente de rechazo del sustrato (Orange II) y de la enzima. Con respecto al tinte Orange II, se hizo pasar una disolución de 100 mg/L a un caudal de 180 mL/min a través de la membrana y se determinó la concentración de tinte en las líneas de retenido y de permeado. Se consideró, además, el caso de que todo el caudal pasase a través de la membrana (Figura 4.2a), comprobándose así la posible adsorción del tinte sobre la superficie de la misma.

El coeficiente de rechazo con respecto a MnP se analizó mediante un procedimiento similar. Se bombeó un caudal de 180 mL/min de una disolución conteniendo 125 U/L de MnP, de los cuales 20 mL/min pasaron a través de la membrana. Se consideró el caso de que todo el caudal fuese recirculado (Figura 4.2b), y la pérdida de actividad enzimática se comparó con un control en paralelo en un reactor de tanque agitado sin recirculación, con el objetivo de comprobar la estabilidad de la enzima tras 180 min de estrés mecánico.

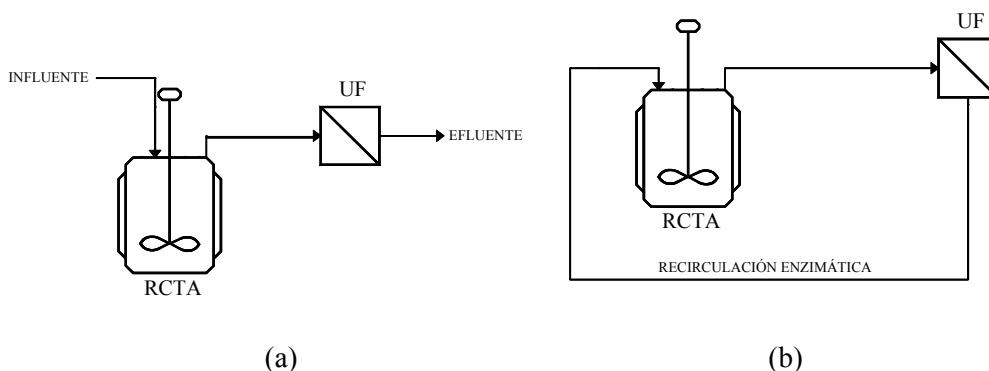


Figura 4.2. Esquema de los ensayos realizados para la determinación de la eficacia de la membrana: (a) interacción entre Orange II y la membrana; (b) estabilidad de la enzima

Ensayos de decoloración en continuo

Tras el llenado del reactor y las conducciones con la disolución de alimentación, formada por Orange II, Mn^{2+} y ácido orgánico, se adiciona la enzima MnP y se ponen en marcha las bombas de alimentación y recirculación, iniciando así el ciclo catalítico de la enzima. El caudal de la bomba de alimentación se mantuvo entre 2,78 y 25 mL/min, para operar a tiempos de residencia hidráulica (TRH) entre 90 min y 10 min. Se trabajó a velocidades de

dosificación de H_2O_2 de 15 a 50 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ empleando disoluciones de H_2O_2 entre 94 y 312 mM con un caudal de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. La adición de enzima se realizó mediante tres estrategias: *i*) una única adición al comienzo del ensayo; *ii*) adición en *fed-batch* (un pulso cada hora); *iii*) adición en continuo a una velocidad tal que permita mantener la actividad enzimática en un valor deseado. La corriente de salida se bombeó hacia la membrana a una velocidad de recirculación 12 veces superior a la de alimentación. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se tomaron muestras del reactor y del flujo de permeado, y se midió la actividad enzimática y la concentración de Orange II (Figura 4.3).

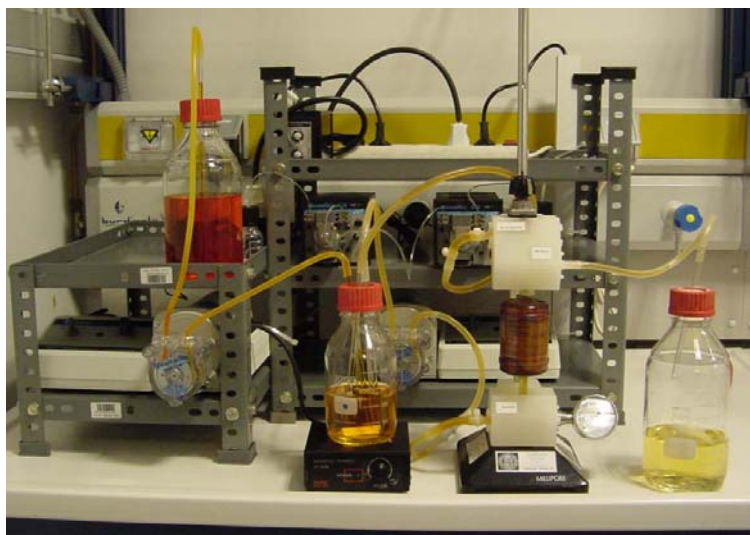


Figura 4.3. Equipo para la decoloración de Orange II en un reactor enzimático de membrana

Para comprobar que la decoloración no tenga lugar mediante una reacción no enzimática, se realizaron controles en paralelo con enzima desactivada térmicamente y no se observó cambio en la concentración de tinte en ningún caso.

En los casos indicados se realizó el ensayo de decoloración en un fermentador BIOSTAT Q de Braun-Biotech International (Melsungen, Alemania) de 1 L, con 500 mL de medio de reacción. El reactor dispone de medida de pH, temperatura y oxígeno disuelto, con un sistema de adquisición de datos *on line* controlado por un ordenador.

2.2. Técnicas analíticas

La concentración de Orange II se midió espectrofotométricamente y, en los casos indicados, por HPLC. La actividad MnP se midió por espectrofotometría mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol. Las técnicas fueron descritas en el Capítulo 2 de Materiales y métodos.

La concentración de oxígeno disuelto se midió mediante un oxímetro Oxi 340 WTW (Alemania).

Carbono orgánico total

El carbono orgánico total (COT) es una medida directa del contenido de la materia orgánica total en una muestra. El COT se midió con un analizador Shimadzu TOC-5000, que lo calcula como la diferencia entre el carbono total (CT) e inorgánico (CI). Se utilizó aire de alta pureza como gas portador a 150 mL/min. El equipo determina el carbono total a partir del CO₂ que se produce durante la combustión catalítica de la muestra a 680°C, empleando como catalizador de oxidación platino inmovilizado sobre esferas de alúmina. El carbono inorgánico se obtiene a partir del CO₂ que se produce por reacción con H₃PO₄ al 25%. El CO₂ se mide ópticamente, después de haber eliminado la humedad, en un detector de infrarrojo no dispersivo (NDIR).

Nitrógeno total Kjeldahl

El nitrógeno total Kjeldahl (NTK) comprende el nitrógeno orgánico y el amoniacal. El NTK se midió en un analizador de nitrógeno orgánico total Dohrmann DN-1900. Se determina como la diferencia entre el nitrógeno total (NT) y el nitrógeno inorgánico (NI). El gas portador fue oxígeno con un 99,999% de pureza. El nitrógeno total se calcula a partir del NO₂ que se produce durante la combustión catalítica de la muestra a 850°C. Posteriormente, mediante una reducción química con H₂SO₄ catalizada por VaCl₃ a 80°C se determina el NI (NO₃⁻, NO₂⁻). Se elimina la humedad y se hace reaccionar con O₃ para obtener NO₂ en un estado excitado. La vuelta de este óxido a su estado fundamental provoca la emisión de un protón, a partir del cual se puede llevar a cabo la determinación de NI mediante quimioluminiscencia, empleando un tubo multiplicador.

3. Resultados y discusión

3.1. Eficacia de la membrana

Con el objetivo de comprobar la idoneidad de la membrana de polietersulfona seleccionada, se calcularon los coeficientes de rechazo con respecto al sustrato y a la enzima. Para ello, se hicieron pasar disoluciones de Orange II y de MnP a través de la membrana durante 60 min, y se analizaron las concentraciones en la línea de retenido y permeado al cabo de ese tiempo. En la Tabla 4.2 se muestran los valores de dichas concentraciones y de los coeficientes de rechazo hallados a partir de la Ecuación 1.

Tabla 4.2. Coeficientes de rechazo de la membrana con respecto a Orange II y MnP

	<i>Concentración alimentación</i>	<i>Concentración retenido</i>	<i>Concentración permeado</i>	<i>Coefficiente de rechazo</i>
<i>Orange II</i>	92,78 mg/L	92,55 mg/L	90,46 mg/L	0,023
<i>MnP</i>	120 U/L	120 U/L	0 U/L	1

Ambos valores de los coeficientes de rechazo (0 para los sustratos y productos y 1 para la enzima) resultan idóneos para asegurar la capacidad de la membrana para la separación de sustratos y productos y retención de la actividad enzimática dentro del reactor.

En experimentos adicionales, en que se forzó a pasar todo el caudal de Orange II a través de la membrana, sin línea de retenido, se comprobó que el 98% del tinte se recuperó en la corriente de permeado, indicativo de que no se produce adsorción física del tinte sobre la membrana.

Por otra parte, la estabilidad de la enzima frente al estrés mecánico quedó demostrada en un ensayo en que se hizo recircular enzima durante 180 min a través de la membrana. Tras este tiempo, se conservó el 95% de la actividad enzimática inicial, valor aproximadamente igual al del control en un sistema agitado sin recirculación.

3.2. Estrategias de adición de MnP

El principal objetivo de este trabajo se centró en el desarrollo de un sistema de decoloración en continuo en el que se persiguió la maximización de la eficacia del proceso, definida como la relación entre la cantidad de tinte degradado (en mg/h) y los requerimientos de enzima para la degradación (en U/h). Dichos requerimientos comprenden el consumo y la desestabilización de la enzima en la reacción y se pueden establecer como la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de degradación. Se hace necesario conocer este valor para establecer la velocidad de adición de enzima necesaria para mantener un valor constante en el reactor y conseguir de esta forma un proceso en continuo.

Se realizaron ensayos de degradación de Orange II en el reactor continuo de tanque agitado. Para ello se procedió al llenado del reactor y conducciones con la disolución de alimentación indicada en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Condiciones de los ensayos de decoloración

Volumen	250 mL	Alimentación	
TRH	60 min	Orange II	100 mg/L
MnP inicial	200 U/L	MnSO ₄	33 μM
Velocidad dosificación H ₂ O ₂	50 μmol/L·min	Ácido acético	1 mM
Caudal alimentación	4,17 mL/min		

Las concentraciones de Mn²⁺, ácido orgánico, enzima inicial, velocidad de dosificación de H₂O₂ y el tipo de ácido empleado se eligieron en base a estudios previos realizados en discontinuo (Mielgo *et al.*, 2003). El tiempo de residencia de 1 h se tomó a partir de consideraciones cinéticas, pues en función de la ecuación cinética hallada en el Capítulo 3 se obtuvo que dicho TRH permite una decoloración del efluente entorno al 90%.

Adición de MnP en un único pulso

El consumo de enzima se determinó mediante un ensayo en que se realizó una única adición inicial de MnP al reactor enzimático. En dicho ensayo se tomaron muestras periódicas para analizar decoloración del tinte, actividad MnP y oxígeno disuelto en el reactor (Figura 4.4).

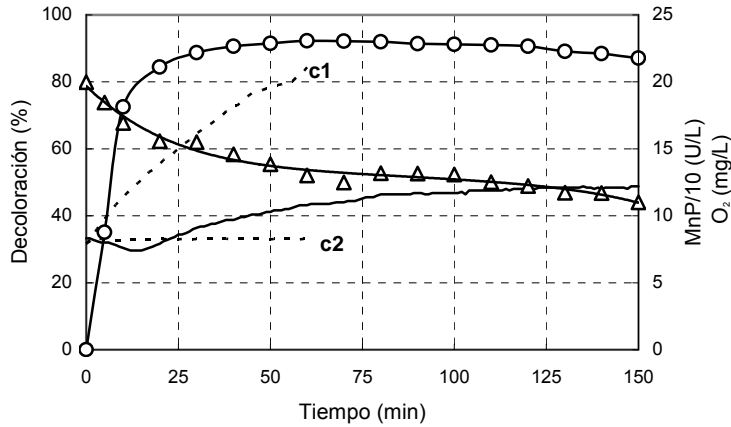


Figura 4.4. Decoloración de Orange II en un ensayo con una única adición de MnP: (○) decoloración; (Δ) actividad enzimática; (-) oxígeno disuelto; C1: oxígeno disuelto, control sin adición de Orange II; C2: oxígeno disuelto, control sin adición de MnP

Al comienzo tuvo lugar una mayor pérdida de actividad enzimática, coincidente con la degradación inicial del tinte. A partir de los 40 min se alcanzó una decoloración del 90%, que se mantuvo prácticamente constante hasta el final del ensayo. El consumo medio de enzima obtenido por evaluación de la pendiente de la curva fue de 37 U/L·h, que permitió establecer la velocidad de adición de MnP para mantener un nivel constante de enzima en el reactor. La constante de desactivación enzimática k_d calculada a partir de la Ecuación 2 (Sehanputri & Hill, 2000) tiene un valor de 0,204 h⁻¹.

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d t} \quad (2)$$

La concentración inicial de oxígeno disuelto en el reactor fue de 8,3 mg/L, que corresponde a la solubilidad de oxígeno en la mezcla de reacción a 23°C. Durante los primeros 15 min, la concentración de oxígeno disminuyó hasta alcanzar un mínimo de 7,4 mg/L, y dicha disminución se produjo de forma simultánea a la máxima pendiente de decoloración. A continuación tuvo lugar el proceso opuesto, con un aumento en la concentración de oxígeno durante los siguientes 60 min hasta que se alcanzó un valor constante de aproximadamente 12 mg/L.

La influencia de la fuente de oxígeno se investigó en dos ensayos control: uno de ellos sin adición de Orange II (C1 en Figura 4.4) y otro sin adición de MnP (C2 en Figura 4.4). En el primer caso la concentración de oxígeno aumentó linealmente a lo largo de todo el experimento, hasta valores superiores a los alcanzados en presencia de tinte (21 frente a 12 mg/L tras 60 min). El oxígeno se genera en la reacción entre el Mn^{3+} producido en el ciclo catalítico de la enzima y el H_2O_2 adicionado, y tiene especial relevancia cuando no hay presencia de substratos que puedan ser oxidados (Aitken & Irvine, 1990; Pérez & Jeffries, 1992; Martínez *et al.*, 1996). Otros trabajos presentan que MnP puede tener cierta actividad catalasa, que es dependiente de Mn^{2+} y es inhibida por oxalato o cualquier otro substrato de MnP (Timofeevski *et al.*, 1998; Gómez-Toribio *et al.*, 2001). Por último, otra fuente de oxígeno podría ser la reacción entre el compuesto III de MnP con Mn^{3+} , que da lugar a la generación de la enzima nativa y a la liberación de O_2 (Timofeevski *et al.*, 1998). El oxígeno generado se utilizó luego en la degradación del tinte (Spadaro & Renganathan, 1994; Chivukula *et al.*, 1995; López *et al.*, 2004). La diferencia entre las pendientes de la curva C1 y la de ensayo informa sobre la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación de Orange II. En los experimentos realizados sin adición de MnP, el nivel de oxígeno no varió durante el ensayo, lo que indica que la adición de H_2O_2 por sí misma no da lugar a la generación de oxígeno.

Adición de MnP en fed-batch

En un ensayo llevado a cabo en el reactor enzimático se consideraron adiciones de MnP en pulsos. Tras los primeros 200 min de reacción, se adicionaron pulsos de MnP cada hora con el objetivo de mantener el nivel de enzima entre 100 y 200 U/L, durante un tiempo de operación total de 10 h (Figura 4.5).

La mayor eficacia de decoloración, superior al 90%, se mantuvo durante los primeros 120 min, mientras la actividad MnP fue superior a 120 U/L; posteriormente, hasta los 200 min, la actividad fue menor de 100 U/L, con lo que la decoloración disminuyó al 80%. La adición de un nuevo pulso de enzima en ese instante favoreció la recuperación de la eficacia de decoloración. Aparentemente, se requiere un mínimo de actividad MnP entorno a 120 U/L, para mantener una operación eficaz. Los porcentajes menores de decoloración

observados a 360 y 440 min correspondieron a fallos operacionales en la bomba de dosificación de H_2O_2 .

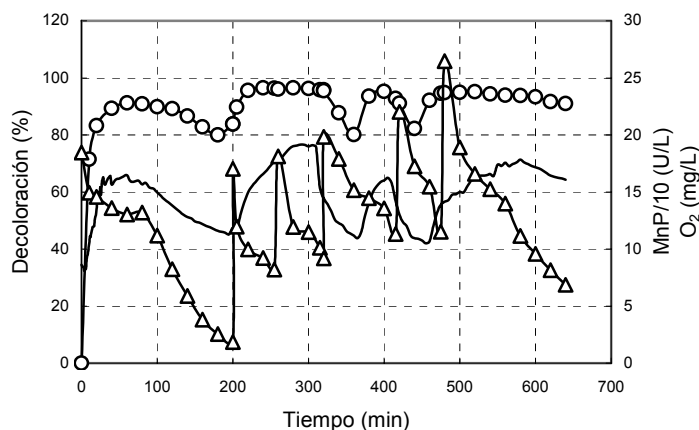


Figura 4.5. Decoloración de Orange II en un ensayo con adición de MnP en pulsos: (○) decoloración; (Δ) actividad enzimática; (-) oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto siguió un perfil similar a los ensayos anteriores. Se produjo una disminución inicial de oxígeno hasta valores de 7,4 mg/L de forma simultánea a la máxima pendiente de decoloración. A partir de ese momento se produjo un aumento hasta valores de 15 mg/L, que coincidió con los valores más altos de decoloración. Paralelamente a la reducción en la decoloración, la concentración de oxígeno se redujo como consecuencia de la pérdida de actividad enzimática. Los fallos de dosificación de H_2O_2 a los 360 y 440 min ocasionaron las respectivas caídas en la concentración de oxígeno disuelto hasta alcanzar un nivel de 10 mg/L. Este hecho es debido a que cuando no se adiciona H_2O_2 al reactor, no se produce oxígeno en la reacción.

Adición en continuo de MnP

En los siguientes experimentos la enzima MnP se añadió de forma continua al reactor enzimático con el objetivo de mantener una actividad constante dentro del reactor. El ensayo, realizado en las mismas condiciones que los anteriores, dadas por la Tabla 4.3, con un bombeo continuo de MnP para mantener un nivel de 200 U/L en el reactor, fue un proceso estable en que se alcanzó una

decoloración del 96% y una eficacia de 2,6 mg/U. Los datos comparativos de las tres estrategias de adición de enzima se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Datos comparativos de las distintas estrategias de adición de MnP

<i>Estrategia de adición de MnP</i>	<i>MnP (U/L)</i>	<i>Adición de MnP (U/L·h)</i>	<i>Decoloración (%)</i>	<i>Eficacia (mg Orange II/U)</i>
Único pulso inicial	200-108	0	91,0	-
<i>Fed-batch</i>	100-250	62,8	96,3	1,53
Continuo	225	37,2	95,7	2,58

Una adición de MnP en continuo favorece la eficacia del proceso, con un menor consumo de enzima, manteniéndose un alto nivel de decoloración.

3.3. Optimización de la operación en continuo

Con el objetivo de mejorar el proceso, bien sea mediante la disminución de consumo de enzima o mediante el aumento de la capacidad de degradación de tinte, se estudió el efecto de diversos factores: *i)* nivel de actividad enzimática; *ii)* velocidad de dosificación de H₂O₂; *iii)* naturaleza de ácido orgánico; *iv)* tiempo de residencia. Todos los ensayos se realizaron en el reactor enzimático de membrana con un volumen de 250 mL y concentraciones en la alimentación de 100 mg/L de Orange II, 33 μM de MnSO₄ y 1 mM de ácido orgánico. Los ensayos tuvieron una duración de entre 4 y 8 h.

Efecto de la actividad MnP

Se consideraron dos valores de actividad MnP en el reactor: 125 U/L, valor seleccionado a partir de los resultados previos obtenidos en el ensayo de alimentación de MnP en *fed-batch*; y 225 U/L, valor considerado en los ensayos de decoloración en discontinuo (Mielgo *et al.*, 2003). La velocidad de dosificación de H₂O₂ fue de 50 μmol/L·min y el ácido empleado fue el ácido acético. En la Tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos una vez alcanzado el estado estacionario.

Tabla 4.5. Datos comparativos de los ensayos a distintos valores de actividad MnP

<i>MnP</i> (U/L)	<i>TRH</i> (min)	<i>VCO</i> (g Orange II/L·h)	<i>Decoloración</i> (%)	<i>Eficacia</i> (mg Orange II/U)	<i>H₂O₂/OII</i> (mol/mol)
125	60	0,1	95,5	2,2	10,5
	30	0,2	91,3	4,3	5,3
	20	0,3	84,8	6,4	3,5
	15	0,4	78,3	7,9	2,6
225	60	0,1	95,7	2,4	10,5
	20	0,3	91,1	7,6	3,5
	15	0,4	93,8	11,0	2,6
	10	0,6	91,9	14,6	1,8

Para cada uno de los niveles de actividad propuestos se evaluó la importancia del TRH, desde 60 a 10 min. A medida que el TRH se hizo menor, la capacidad de degradación aumentó mientras que la pérdida de actividad enzimática se mantuvo prácticamente constante, dando como resultado un aumento de la eficacia del sistema. Cuando la velocidad de carga de Orange II (VCO) fue 0,1 g/L·h, el sistema alcanzó una alta decoloración incluso trabajando con una baja carga de actividad enzimática. Sin embargo, al aumentar la VCO hasta 0,3 g/L·h, el sistema con menor actividad decoloró el tinte inicialmente, pero a continuación tuvo lugar una desestabilización del proceso, con una acumulación del tinte en el reactor (Figura 4.6). Esta desestabilización se repitió cuando se incrementó la VCO.

Por el contrario, el ensayo realizado a 225 U/L con VCO de 0,3 g/L·h permitió alcanzar una operación estable, con una alta decoloración (91,1 %) y una elevada eficacia (7,6 mg/U). La mayor eficacia (11 mg/U) se consiguió cuando se aumentó la VCO hasta 0,4 g/L·h, y sólo se produjo desestabilización cuando la VCO alcanzó el valor de 0,6 g/L·h. Por lo tanto se seleccionó este nivel de actividad en los ensayos posteriores.

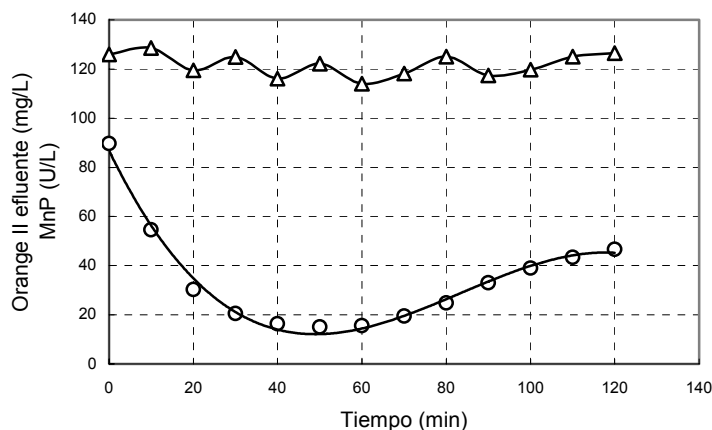


Figura 4.6. Decoloración de Orange II en un ensayo con VCO de 0,3 g/L-h y TRH de 20 min: (○) concentración de Orange II en el efluente; (Δ) actividad enzimática

La actividad MnP afecta a la estequiometría y la cinética del proceso: la estequiometría implica el conocimiento de la cantidad de MnP y H_2O_2 necesarios para degradar una cierta cantidad de tinte. Una vez determinadas las relaciones entre concentraciones, la cinética limita el proceso. En base a los resultados se observó que la capacidad del sistema se vio incrementada al trabajar a mayores actividades enzimáticas, y una baja actividad no es capaz de completar la decoloración del tinte en un período prolongado. Este fenómeno se atribuyó a la estequiometría del proceso.

Efecto de la velocidad de dosificación de H_2O_2

La velocidad de dosificación de H_2O_2 es de gran importancia en el proceso, por ser esencial para la activación del ciclo catalítico de la enzima; sin embargo, un exceso de H_2O_2 produce la desactivación enzimática (Wariishi *et al.*, 1988). Teniendo en cuenta que ambos factores, velocidad de decoloración y desactivación enzimática, determinan la eficacia del sistema de decoloración, es necesario comprobar el efecto que produce en ellos la velocidad de adición de H_2O_2 . Para ello se realizaron ensayos en discontinuo, en matraces Erlenmeyer de 100 mL con dosificación de H_2O_2 en continuo por medio de una bomba peristáltica. Las condiciones de los ensayos se presentan en la Tabla 4.6. Se

realizó un seguimiento de la actividad enzimática y la concentración de Orange II durante el experimento.

Tabla 4.6. Condiciones de los ensayos en discontinuo a diferentes velocidades de dosificación de H₂O₂

Ácido acético	1 mM	MnP	200 U/L
MnSO ₄	33 μM	Volumen	25 mL
Orange II	100 mg/L	Temperatura	22±2°C
H ₂ O ₂	5-50 μmol/L·min	pH	4,5

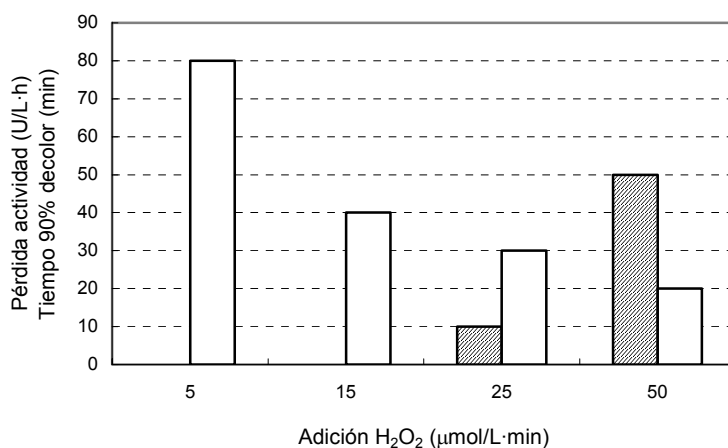


Figura 4.7. Efecto de la velocidad de dosificación de H₂O₂ en la velocidad de decoloración y la actividad enzimática en ensayos en discontinuo. Barras rayadas: pérdida horaria de actividad enzimática; barras blancas: tiempo correspondiente al 90% de decoloración

En la Figura 4.7 se observa que a medida que se incrementó la velocidad de dosificación de H₂O₂ de 5 a 50 μmol/L·min, el tiempo necesario para conseguir un 90% de decoloración disminuyó desde 80 a 20 min. Por el contrario, la pérdida de actividad enzimática descendió desde 40 U/L·h en el ensayo con la máxima velocidad de adición hasta un valor prácticamente nulo para velocidades de dosificación de 15 y 5 μmol/L·min. Una dosificación de 15 μmol/L·min permite, por tanto, una buena decoloración con una mínima pérdida de actividad enzimática.

Teniendo en cuenta estos resultados, se llevaron a cabo ensayos en continuo, en el reactor enzimático de membrana, intentando combinar una rápida operación con una mínima pérdida de actividad enzimática. Se consideraron tres velocidades de dosificación: 50, 25 y 15 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ y diferentes valores de TRH, pues a medida que se disminuyó la adición, la capacidad de degradación se hizo más lenta, y por lo tanto, fue necesario aumentar el TRH para conseguir un alto nivel de decoloración. Se trabajó con ácido acético como ácido orgánico y con una actividad enzimática de 200 U/L. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Datos comparativos de los ensayos a distintos valores de dosificación de H_2O_2

H_2O_2 ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$)	TRH (min)	VCO (g/L·h)	Decoloración (%)	Eficacia (mg/U)	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{OII}$ (mol/mol)
50	60	0,1	95,7	2,4	10,5
	20	0,3	91,1	7,6	3,5
	15	0,4	93,8	11,0	2,6
25	45	0,133	91,5	11,8	4,0
	30	0,2	86,9	13,7	2,6
	20	0,3	81,9	15,4	1,8
15	45	0,133	88,9	12,2	2,4

Como se indicó al estudiar el efecto de la actividad enzimática, a medida que disminuye el tiempo de residencia, y por tanto aumenta la VCO, la eficacia del sistema aumenta. Sin embargo, esta tendencia está limitada por la cinética de la reacción: cuando el TRH no es suficiente para realizar la degradación, tiene lugar una desestabilización del sistema, disminuyendo el porcentaje de decoloración. La Tabla 4.7 muestra que cuando la velocidad de dosificación de H_2O_2 disminuye de 50 a 25 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$, la cinética de la reacción se ralentiza, con lo cual se deben emplear TRH mayores para conseguir decoloraciones similares. Comparando ambas velocidades de adición para el mismo TRH de 20 min se observó que la decoloración disminuyó del 91,1 al 81,9%. A pesar de la menor capacidad de degradación de tinte, la eficacia del sistema aumentó considerablemente, de 7,6 a 15,4 mg/U, debido a una menor desestabilización enzimática.

Una menor velocidad de dosificación de H_2O_2 resulta más conveniente de cara a lograr una mejor eficacia, aunque para mantener la conversión se debe aumentar el TRH, buscando así un compromiso entre la eficacia y la decoloración. Por ello se aumentó el TRH hasta 45 min, obteniéndose buenos niveles de eficacia. Si se comparan los resultados con los obtenidos al adicionar $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ de H_2O_2 se observa que, si bien en ambos casos se obtuvo una decoloración similar, la eficacia del proceso se mejoró, con lo que se selecciona la velocidad de adición de $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ para los próximos ensayos.

Efecto del ácido orgánico

El ácido orgánico juega un doble papel en el proceso de decoloración. Por por una parte actúa como sistema tampón manteniendo el pH en el nivel requerido, y por la otra, tiene la capacidad de complejación con el Mn^{3+} generado. El tipo de ácido orgánico que se emplee puede tener efecto tanto en la cinética de la reacción como en la estabilidad de la enzima. Para realizar este estudio se consideraron tres ácidos: acético, malónico y oxálico. Además se tuvieron en cuenta las mejores condiciones experimentales hasta el momento: 200 U/L de MnP y $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ de H_2O_2 . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Datos comparativos de los ensayos con distintos ácidos orgánicos

<i>Ácido orgánico</i>	<i>TRH (min)</i>	<i>VCO (g/L·h)</i>	<i>Decoloración (%)</i>	<i>Eficacia (mg/U)</i>	<i>H₂O₂/OII (mol/mol)</i>
Acético	45	0,133	88,9	12,2	2,4
Malónico	45	0,133	83,7	13,2	2,4
Oxálico	45	0,133	82,1	20,4	2,4

Se alcanzó una mayor decoloración mediante el uso de acético con respecto a la obtenida con los ácidos malónico y oxálico, trabajando al mismo TRH. Sin embargo, la presencia de ácido oxálico produce una mejora considerable de la estabilidad de la enzima, dando lugar a un aumento de la eficacia global del sistema. Por consiguiente, este ácido resulta el más adecuado para la decoloración de Orange II en el reactor enzimático.

En trabajos previos se comprobó que el tinte actúa como un ácido hidroxílico con una cierta capacidad de complejación de Mn^{3+} (Mielgo *et al.*, 2003). Esto explica que el proceso pueda tener lugar en presencia de acético, un ácido monocarboxílico. En todo caso, en procesos en continuo resulta más interesante emplear otros ácidos dicarboxílicos, como el oxálico, que además de la función tampón ejercen un efecto protector sobre la actividad MnP.

Efecto del tiempo de residencia hidráulico

Una vez establecidas las condiciones experimentales más adecuadas para maximizar la capacidad de degradación del tinte y la eficacia del proceso (actividad MnP, 200 U/L; velocidad de adición de H_2O_2 de 15 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$; y ácido oxálico como ácido carboxílico), se determinó el TRH que, aumentando la capacidad de degradación de tinte, permitiera una alta decoloración. Para ello se disminuyó la VCO de 0,133 a 0,067 $\text{g/L}\cdot\text{h}$ al variar el TRH de 45 a 90 min. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Datos comparativos de los ensayos con diferentes TRH

<i>TRH</i> (min)	<i>VCO</i> (g/L·h)	<i>Decoloración</i> (%)	<i>Eficacia</i> (mg/U)	<i>H₂O₂/OII</i> (mol/mol)
45	0,133	82,1	20,4	2,4
60	0,1	85,3	19,6	3,2
90	0,067	89,1	15,9	4,7

Teniendo en cuenta la máxima eficacia de decoloración, el valor óptimo correspondió a un TRH de 90 min, con un incremento significativo de la decoloración con respecto a un TRH de 45 min (de 82,1 a 89,1%). En los tres experimentos se obtuvo un consumo muy bajo de enzima, entre 4 y 5 U/L·h, lo que supuso un valor de eficacia del orden de 20 mg/U. La operación a un TRH de 60 min permitió una alta decoloración y una eficacia muy elevada, casi 8 veces superior a la obtenida en los primeros ensayos en continuo realizados en este sistema.

Oxígeno disuelto en estado estacionario

El seguimiento de la concentración de oxígeno disuelto en los diferentes ensayos de decoloración permitió comprobar la influencia de ciertas variables de operación. En los ensayos de alimentación de MnP en pulsos se había observado una variación de la concentración de oxígeno cuando se producían fallos en el caudal de dosificación de H₂O₂; además, se observó que el valor de oxígeno disuelto cuando se alcanza el estado estacionario depende de la VCO aplicada. En la Figura 4.8 se muestran las concentraciones de oxígeno en el estado estacionario para distintas condiciones de operación, empleando ácido acético.

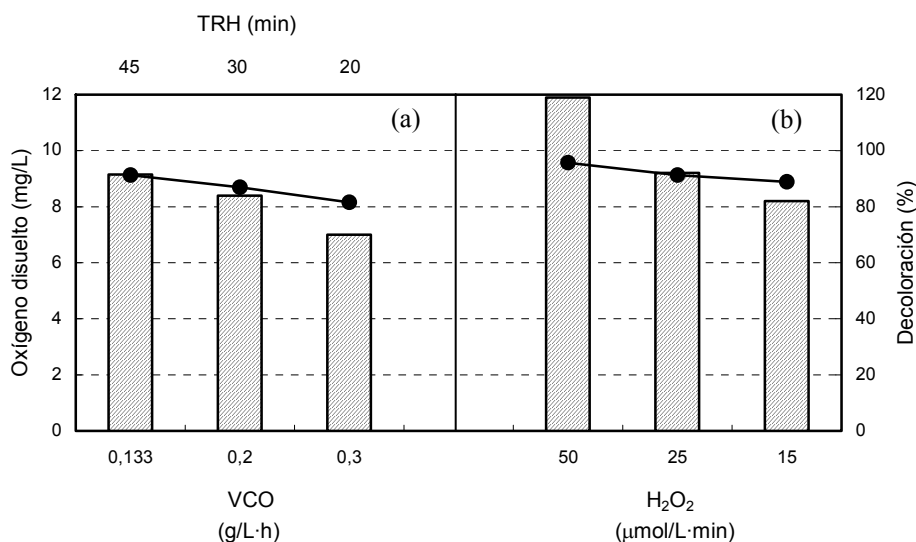


Figura 4.8. Concentración de oxígeno disuelto (barras) y decoloración (●) en estado estacionario en experimentos llevados a cabo en las siguientes condiciones: (a) velocidad de dosificación de H₂O₂: 25 μmol/L·min; (b) TRH de 45 min

La Figura 4.8a muestra que el oxígeno disuelto en estado estacionario disminuyó a medida que se disminuyó el TRH, hasta valores por debajo de saturación con un TRH de 20 min. El valor de oxígeno disuelto en estado estacionario es el resultado del balance entre el oxígeno consumido en la degradación del tinte y el producido como consecuencia de la actividad enzimática. Este balance da lugar a valores más bajos de oxígeno al aumentar el consumo, es decir, a mayores valores de la VCO.

Por otra parte, un aumento en la velocidad de adición de H_2O_2 provoca el aumento de la concentración de oxígeno (Figura 4.8b). Así, una dosificación de $50 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ ocasionó un exceso de oxígeno comparado con el nivel de saturación, mientras que una dosificación de $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ mantuvo la concentración de oxígeno entorno a 8 mg/L . Una alta concentración de H_2O_2 favorece su reacción con el Mn^{3+} generado enzimáticamente, de manera que se libera una mayor cantidad de oxígeno (Martínez *et al.*, 1996). Esto significa que un valor elevado de oxígeno disuelto indica un exceso de la concentración de H_2O_2 con respecto a la estequiométricamente necesaria para la reacción enzimática. Las Tablas 4.5, 4.7, 4.8 y 4.9 indican la relación molar de H_2O_2 y Orange II en cada uno de los ensayos. Para un TRH de 45 min y una dosificación de $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ de H_2O_2 , cuando se alcanzan 8 mg/L de oxígeno disuelto en el estado estacionario, resulta una relación de 2,4 mol/mol. Un valor superior resulta estequiométricamente excesivo provocando una desactivación innecesaria de la enzima.

3.4. Dinámica del proceso en continuo

El estudio del comportamiento dinámico del reactor enzimático se llevó a cabo por medio de operaciones en continuo de larga duración, en que el objetivo no fue únicamente observar los parámetros obtenidos en estado estacionario, sino mantener dicho estado y comprobar la respuesta del sistema a diferentes cambios en las condiciones de operación, y por lo tanto, evaluar la estabilidad del proceso de decoloración.

Ensayo continuo con variación de la VCO

La optimización de las condiciones de operación del sistema permitió mejorar su eficacia minimizando la pérdida de actividad enzimática y maximizando la capacidad de degradación de tinte. La degradación de tinte se puede incrementar al aumentar la VCO en el sistema, que depende tanto del TRH como de la concentración de Orange II en la alimentación. Para estudiar cómo afecta este último factor a la eficacia del sistema, se llevó a cabo un ensayo de 18 días de duración en que se partió de las condiciones de operación establecidas en los ensayos previos, descritas en la Tabla 4.10, incrementándose secuencialmente la VCO de $0,1$ a $0,3 \text{ g/L}\cdot\text{h}$. Se determinó regularmente la concentración de oxígeno disuelto, el carbono orgánico total (COT), el nitrógeno total Kjeldahl

(NTK) y las concentraciones de Orange II en el reactor y en la corriente de salida, tanto por espectrofotometría como por HPLC, para poder diferenciar entre Orange II y otros compuestos que podrían formar parte del efluente y absorber a la misma longitud de onda que el tinte.

Tabla 4.10. Condiciones de los ensayos de decoloración

Volumen	250 mL	Alimentación	
TRH	60 min	Orange II	100 mg/L
MnP	200 U/L	MnSO ₄	33 µM
Dosificación H ₂ O ₂	15 µmol/L·min	Ácido oxálico	1 mM
Caudal alimentación	4,17 mL/min		

Se mantuvieron las condiciones en estado estacionario durante los 8 primeros días (Figura 4.9). A partir de ese momento la concentración de Orange II en el influente se fue aumentando de manera paulatina, y tras cada cambio, la concentración a la salida del reactor se estabilizó en un corto período de tiempo, menor que 3 veces el TRH, de manera que el sistema rápidamente recuperó el estado estacionario (Figura 4.9a). A medida que la VCO aumentó desde 0,1 a 0,3 g/L·h, el porcentaje de decoloración del sistema disminuyó de 95,9 a 89,3% (Tabla 4.11), aunque la capacidad de degradación de tinte aumentó considerablemente, lo que debería producir un aumento de la eficacia del sistema. Sin embargo, la estabilidad de la enzima se vio afectada a esta alta carga de tinte, bien sea por un efecto inhibitorio del propio sustrato o de los productos formados en la degradación, de manera que la eficacia del sistema disminuyó de 42,5 mg/U para la VCO de 0,23 g/L·h hasta 26,7 mg/U para la VCO de 0,29 g/L·h. Considerando que una concentración de 300 mg/L de Orange II en el influente (a VCO de 0,3 g/L·h) resulta poco frecuente a nivel real, se considera que una VCO entorno a 0,25 g/L·h resulta la más adecuada, pues permite un porcentaje de decoloración elevado, de 92,9%, y una eficacia de 42,5 mg/U, que es un valor 16 veces superior al obtenido en los primeros ensayos de degradación de Orange II en continuo en el reactor enzimático de membrana.

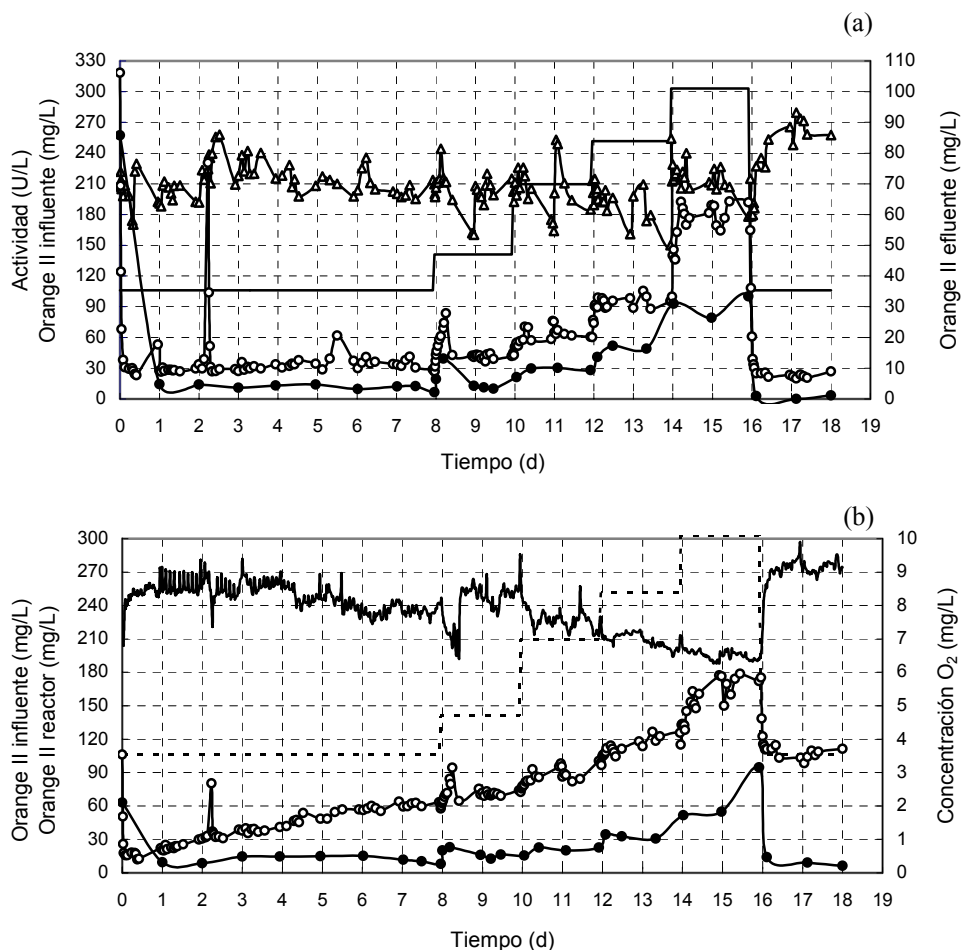


Figura 4.9. Ensayo de decoloración con incrementos sucesivos de la VCO. (a): (Δ) actividad enzimática; (-) Orange II en el influente; (\circ) Orange II en el effluente (espectrofotometría); (\bullet) Orange II en el effluente (HPLC); (b): (---) Orange II en el influente; (\circ) Orange II en el reactor (espectrofotometría); (\bullet) Orange II en el reactor (HPLC); (-) oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto en el reactor experimentó un descenso paralelo al aumento de la VCO en el sistema (Figura 4.9b), hasta valores de unos 7 mg/L. La mayor capacidad de degradación se obtuvo a la máxima VCO, aplicando una relación de 1 mol H₂O₂ por mol de Orange II (Tabla 4.11). Esta relación resulta suficiente para la degradación del tinte, ya que cada mol de H₂O₂ en el ciclo catalítico de la enzima intercambia 2 e⁻, que son los que libera 1 mol de

Orange II en su mecanismo de degradación (Goszczyński *et al.*, 1994; Spadaro & Renganathan, 1994; Chivukula *et al.*, 1995).

Tabla 4.11. Datos comparativos de las distintas etapas de un proceso en continuo con variación de la VCO. Las concentraciones de Orange II fueron determinadas por HPLC

Períodos (d)	VCO (g/L·h)	Degradación (g/L·h)	Decoloración (%)	Eficacia (mg/U)	H ₂ O ₂ /OII (mol/mol)
0-8	0,103	0,098	95,9	19,8	3,0
9-10	0,130	0,123	95,0	24,7	2,2
11-12	0,192	0,183	95,2	36,6	1,5
13-14	0,229	0,212	92,9	42,5	1,3
15-16	0,291	0,260	89,3	26,7	1,0
17-18	0,103	0,102	98,8	20,4	3,0

El color en el reactor se incrementó a medida que se aumentó la VCO (Figura 4.9b). Cuando se recuperó la VCO de 0,1 g/L·h, el color se mantuvo por encima del valor inicial. Sin embargo, la concentración de Orange II medida por HPLC mantuvo una tendencia similar en el reactor y en el efluente.

El incremento de color en el reactor pudo deberse a la coloración natural de las proteínas y demás compuestos del crudo enzimático, con tamaño superior al tamaño de corte de la membrana, que quedaron retenidos en el reactor, y se acumularon como consecuencia de la adición continua de enzima. Se analizó el COT y el NTK en el interior del reactor y en la corriente de salida durante 16 d (Figura 4.10), y se observó que el efluente mantuvo niveles muy bajos, mientras que la concentración en el interior del reactor fue creciente.

Otra posible causa del color en el reactor pudo ser la formación de un precipitado de Mn. El Mn³⁺ generado en el ciclo catalítico de la enzima es inestable en disolución acuosa en ausencia de compuestos complejantes, dismutándose en Mn²⁺ y Mn⁴⁺, que precipita como MnO₂. Este precipitado tiene un color parduzco, similar al obtenido en el reactor tras varios días de operación. Se realizaron análisis de la concentración de Mn soluble en las corrientes de entrada y salida del reactor, así como en el medio de reacción, tras haber filtrado las muestras. Se obtuvo que las concentraciones medias en el influente y efluente fueron 34 y 30 μM respectivamente, mientras que en el medio fue de 161 μM tras

8 d de reacción. Estos datos parecen indicar que se produce una cierta acumulación de Mn en el interior del reactor.

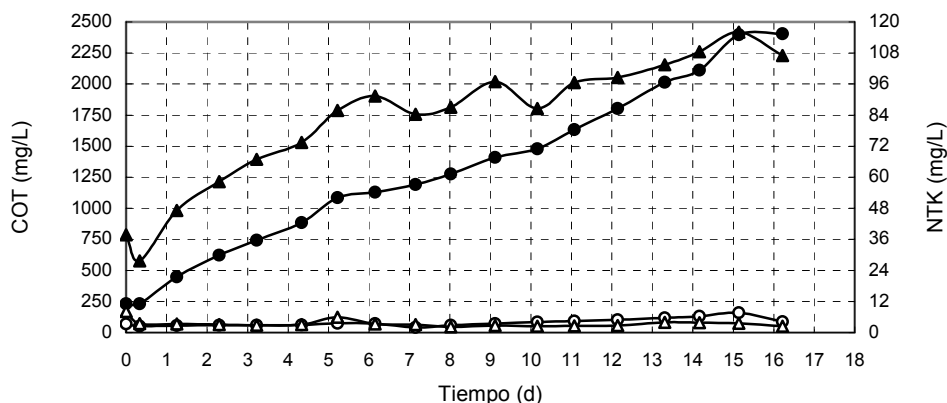


Figura 4.10. Ensayo de decoloración con incrementos sucesivos de la VCO: (○) COT; (Δ) NTK; símbolos abiertos: concentraciones en el efluente; símbolos cerrados: concentraciones en el reactor

A pesar del color parduzco en el medio, el sistema se mantuvo estable durante los 18 d de operación, sin necesidad de limpiar la membrana. La implementación de este proceso a mayor escala implicaría la necesidad de trabajar con varias membranas, de manera que se procediese a la limpieza de una mientras la otra estuviese en operación.

Ensayo continuo con variación de la adición de H_2O_2

Se realizó un nuevo ensayo de 6 d de duración en el que se estudió la relación entre la adición de H_2O_2 y Orange II. Para ello se consideraron las condiciones de partida descritas en la Tabla 4.10; al cabo de 1 d se aumentó la VCO a 0,26 g/L·h y con estas condiciones se aumentó paulatinamente la velocidad de dosificación de H_2O_2 .

Tabla 4.12. Datos comparativos de las distintas etapas de un proceso en continuo con variación de H₂O₂. Las concentraciones de Orange II fueron determinadas por HPLC

<i>Períodos</i> (d)	<i>VCO</i> (g/L·h)	<i>H₂O₂</i> (μ mol/L·min)	<i>Decoloración</i> (%)	<i>Eficacia</i> (mg/U)	<i>H₂O₂/OII</i> (mol/mol)
0-1	0,093	15	98,4	18,3	3,4
1-2	0,260	15	91,4	40,9	1,0
2-3	0,260	19,5	93,7	27,2	1,4
3-4	0,260	22,5	97,7	22,2	1,6
4-6	0,260	19,5	91,7	29,5	1,4

Una relación equimolar entre H₂O₂ y Orange II dio lugar a una buena decoloración y una alta eficacia, de 41 mg/U (Tabla 4.12). A medida que se aumentó la adición de H₂O₂, la velocidad de decoloración aumentó, pero también la pérdida de actividad enzimática, con lo que el resultado global fue una disminución de la eficacia del sistema. Este ensayo corroboró la conclusión de que una relación 1:1 entre H₂O₂ y Orange II es la más adecuada para realizar la degradación del tinte en un reactor enzimático en continuo.

3.5. Operación en estado no estacionario

El estudio del comportamiento del reactor en estado no estacionario aporta información sobre la estabilidad del sistema, pues indica cómo reacciona este ante una sobrecarga similar a la que podría tener lugar en un proceso real y muestra la capacidad del sistema para recuperar el estado estacionario. Se realizó un ensayo de 9 d de duración en un fermentador BIOSTAT Q (Figura 4.11) con 500 mL de medio de reacción, en el que se aplicaron las condiciones de partida descritas en la Tabla 4.13. Cada 24 h se modificaron algunos parámetros de operación tales como VCO, TRH y la velocidad de adición de H₂O₂, durante períodos de 1 h, de forma que se multiplicaron los valores usuales por factores de 0,5 y 2, y la temperatura varió desde la ambiente (22°C) hasta 20°C y 30°C. Se realizó el seguimiento del oxígeno disuelto, pH y concentración de Orange II en el reactor y el efluente, mediante medidas espectrofotométricas y HPLC.

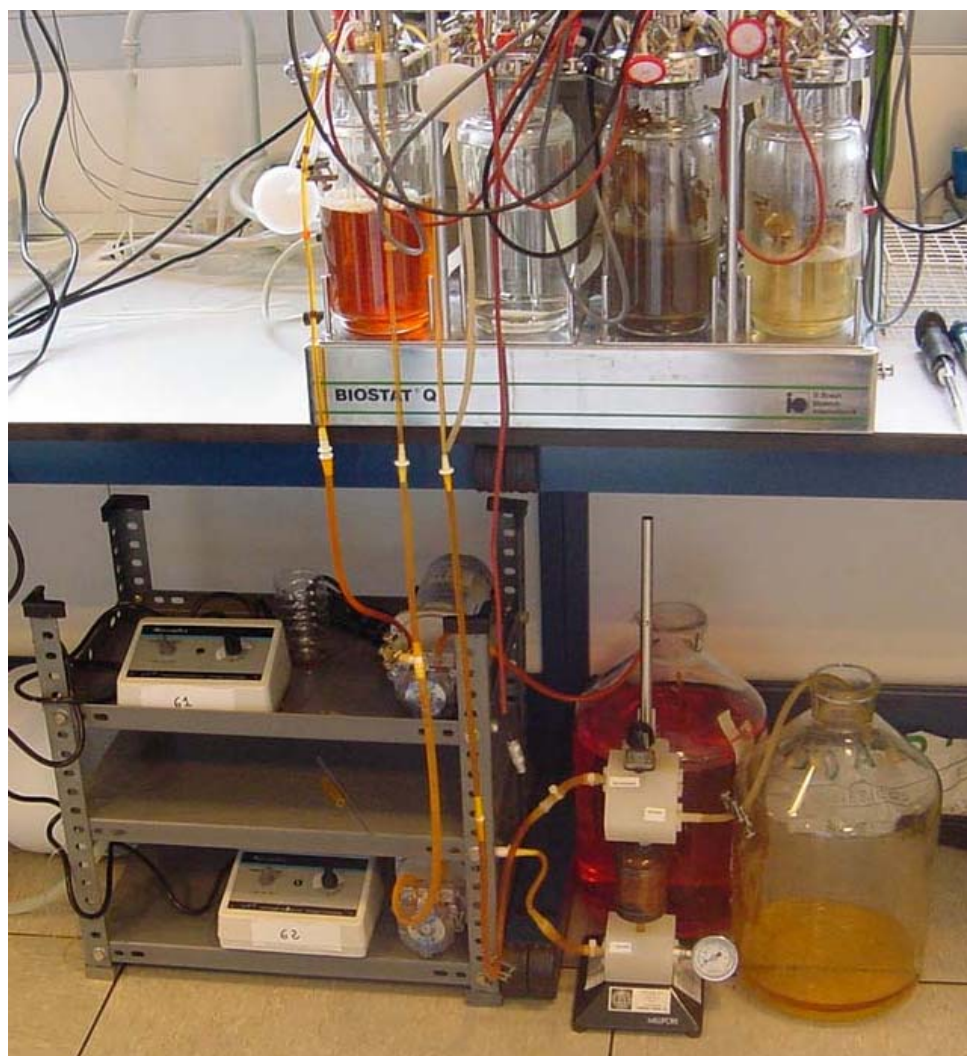


Figura 4.11. Equipo para la decoloración de Orange II en un fermentador BIostat Q asociado a una membrana de ultrafiltración

Tabla 4.13. Condiciones del ensayo de decoloración con sobrecargas

Volumen	500 mL	Alimentación	
TRH	60 min	Orange II	100 mg/L
MnP	200 U/L	MnSO ₄	33 μ M
Dosificación H ₂ O ₂	15 μ mol/L·min	Ácido oxálico	1 mM
Caudal alimentación	8,33 mL/min		

Tras alcanzar el estado estacionario, se alimentó el reactor durante 1 h con una disolución de tinte de 200 mg/L, de manera que la VCO se duplicó (Sobrecarga 1 en Figura 4.12). Se observó un aumento de la concentración de Orange II en el efluente y una disminución de la concentración de oxígeno disuelto, debido al mayor consumo causado por la mayor carga de Orange II. Las respuestas de las variaciones de TRH siguieron los mismos perfiles (Sobrecargas 2 y 9 en Figura 4.12). En conclusión, una disminución del TRH, es decir, un aumento de VCO, da lugar a una menor decoloración y menor concentración de oxígeno disuelto; por el contrario, un aumento del TRH, es decir, una disminución de la VCO, da lugar a un pequeño aumento de la decoloración y de la concentración de oxígeno disuelto.

Las perturbaciones en la velocidad de adición de H_2O_2 ocasionaron las variaciones más altas en la concentración de oxígeno disuelto, por lo tanto este es el parámetro que más influye en el balance entre el oxígeno producido y el consumido (Sobrecargas 3, 4 y 8 en Figura 4.12). Un incremento en la dosificación de H_2O_2 (Sobrecarga 4) no mejora la decoloración, ya que una relación equimolar H_2O_2 /Orange II es suficiente para alcanzar una buena decoloración. Sin embargo, a partir del día 6 la VCO se duplicó, de manera que la relación H_2O_2 /Orange II disminuyó a 0,5. Al realizar la sobrecarga 8 la relación tomó el valor de 1 y la decoloración mejoró. Se corrobora, por tanto, que una relación equimolar es la más adecuada para realizar la degradación de Orange II.

Las variaciones de temperatura, en un rango de $10^\circ C$ (Sobrecargas 5, 6, 7 y 10 en Figura 4.12), apenas afectaron a la decoloración, y causaron ligeras variaciones en la concentración de oxígeno disuelto, que fueron debidas al propio efecto de la temperatura sobre la solubilidad del oxígeno.

Durante los períodos de sobrecarga los parámetros medidos sufrieron modificaciones, aunque después de cada perturbación el sistema se recuperó rápidamente alcanzando de nuevo el estado estacionario. Estos parámetros son fácilmente medibles *on line*, de manera que se puede establecer un sistema de control con el fin de evitar tales perturbaciones y mantener las condiciones de estado estacionario en el reactor.

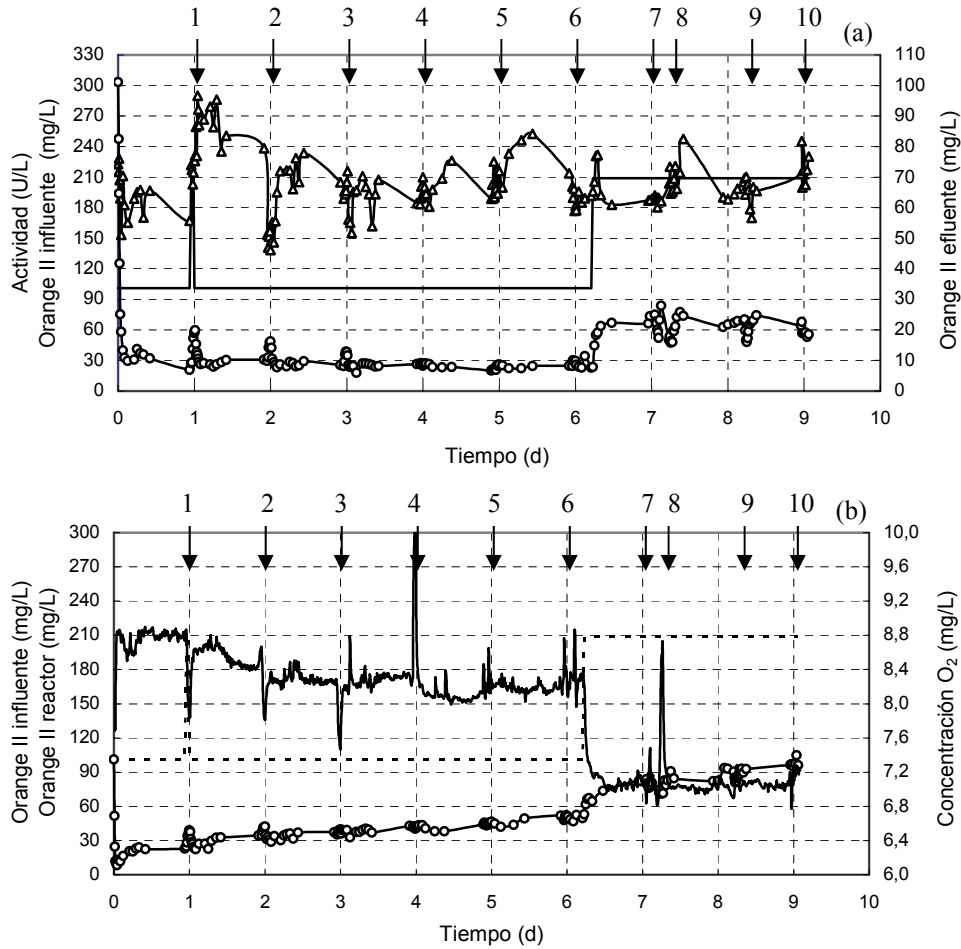


Figura 4.12. Ensayo de decoloración con sobrecargas. (a): (Δ) actividad enzimática; (—) Orange II en el influente; (○) Orange II en el efluente; (b): (---) Orange II en el influente; (—) Orange II en el reactor; (○) oxígeno disuelto. Modificaciones: (1) Orange II 200 mg/L; (2) TRH 30 min; (3) H₂O₂ 7,5 μmol/L·min; (4) H₂O₂ 30 μmol/L·min; (5) T 20°C; (6) T 30°C; (7) T 20°C; (8) H₂O₂ 30 μmol/L·min; (9) TRH 90 min; (10) T 30°C

3.6. Modelización

Con el objetivo de obtener una ecuación de diseño que permita simular los datos experimentales y optimizar los resultados, se formuló un modelo para la decoloración enzimática de Orange II en el reactor de membrana. Para obtener las ecuaciones matemáticas que describieron ese modelo se asumieron una serie de consideraciones: *i*) el contenido del reactor está perfectamente mezclado y se

mantienen condiciones isotérmicas durante el proceso; *ii*) el volumen del reactor es la suma del volumen del tanque más el volumen ocupado por la membrana y las interconexiones; *iii*) la reacción de decoloración sigue una cinética de Michaelis-Menten con respecto al sustrato Orange II y es una función lineal de la velocidad de adición de H₂O₂ (Ecuación 3), tal como se determinó en el Capítulo 3.

$$r = \frac{r_m S}{K_M + S} (K_{H_2O_2} + Q_{H_2O_2}) \quad (3)$$

donde: r_m es la velocidad máxima,

K_M es la constante de Michaelis-Menten con respecto a Orange II,

S es la concentración de Orange II,

$K_{H_2O_2}$ es la constante de la función de la dosificación de H₂O₂,

$Q_{H_2O_2}$ es la velocidad de dosificación de H₂O₂.

A partir de un balance de sustrato al reactor, y suponiendo un estado no estacionario, la Ecuación 3 se deriva en la Ecuación 4.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{S_0 - S}{\tau} - \frac{r_m S}{K_M + S} (K_{H_2O_2} + Q_{H_2O_2}) \quad (4)$$

donde τ es el tiempo de residencia hidráulico. Los valores empleados para cada uno de los parámetros anteriores se resumen en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Parámetros del modelo cinético en función de la concentración de Orange II y la dosificación de H₂O₂

r_m (mg/ μ mol)	K_M (mg/L)	$K_{H_2O_2}$ (μ mol/L·min)
0,331	58,2	2,36

Para la resolución numérica de la Ecuación 4 se aplicó el método de diferencias finitas, pues las condiciones iniciales son conocidas en cada ensayo. Se llevaron a cabo simulaciones mediante el empleo de un programa cuya secuencia de cálculo se representa en la Figura 4.13.

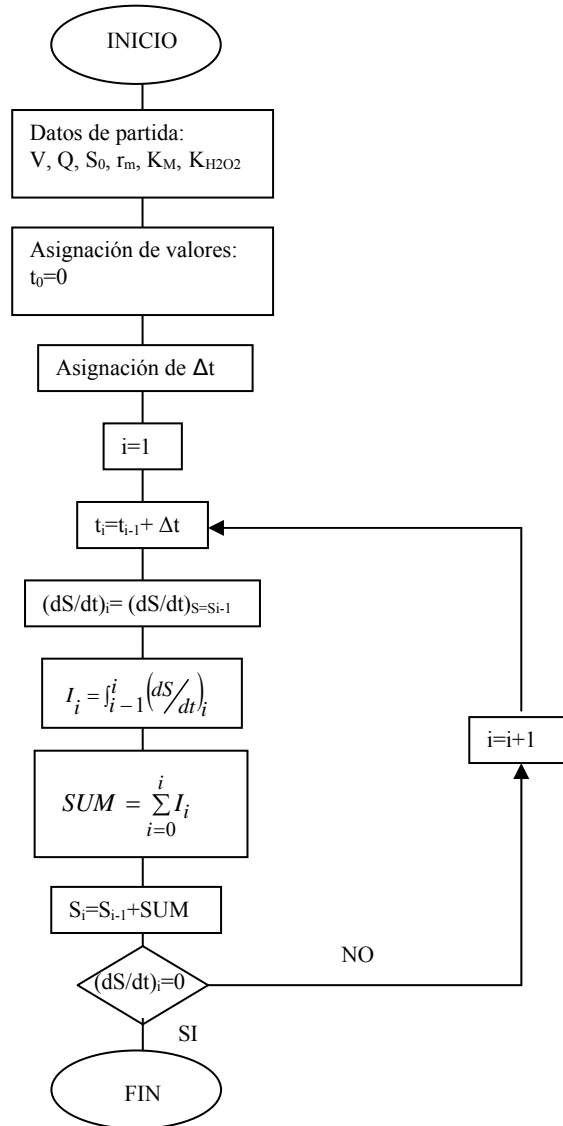


Figura 4.13. Diagrama de flujo del programa de simulación

Las Figuras 4.14 y 4.15 muestran simulaciones de ensayos a distintas condiciones.

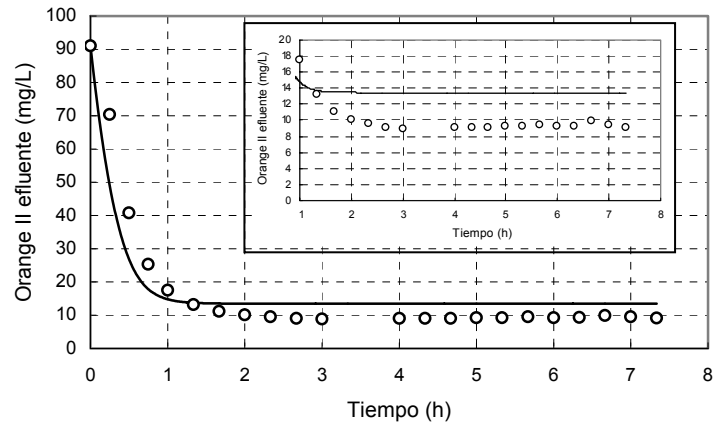


Figura 4.14. Datos experimentales (○) y simulados (-) en un ensayo con TRH de 72 min, concentración inicial de Orange II de 91,1 mg/L y dosificación de H₂O₂ de 15 μmol/L·min

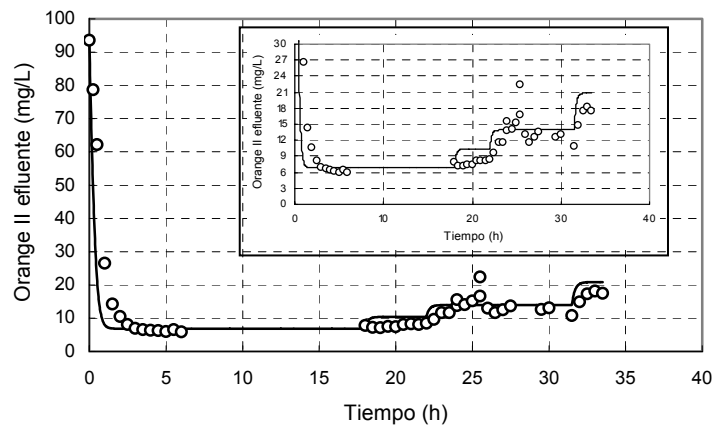


Figura 4.15. Datos experimentales (○) y simulados (-) en un ensayo con TRH de 144, 96, 72 y 48 min, concentración inicial de Orange II de 93,6 mg/L y dosificación de H₂O₂ de 15 μmol/L·min

Por último se comprobó el modelo propuesto en el ensayo en que se provocaron perturbaciones del estado estacionario mediante sobrecargas de 1 h de duración. La Figura 4.16 muestra que el modelo ajusta correctamente los datos

experimentales, pues propone una tendencia similar a la obtenida de forma experimental. No se ha tenido en cuenta la temperatura en el desarrollo del modelo, de manera que los cambios de temperatura en el ensayo no aportan modificaciones en los datos simulados, si bien tampoco son apreciables las variaciones que este factor ejerce sobre los datos experimentales.

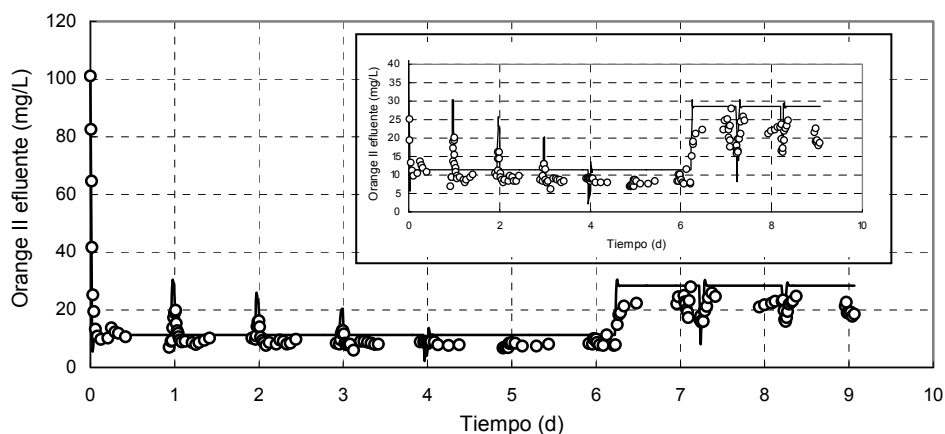


Figura 4.16. Datos experimentales (○) y simulados (-) en un ensayo con sobrecargas. TRH de 96 min, concentración inicial de Orange II de 101,1 y 209 mg/L y dosificación de H_2O_2 de $15 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$

El modelado del proceso podría ser útil como herramienta de optimización. Sin embargo, si se considera la eficacia del sistema como variable a optimizar, no sería suficiente simular la decoloración sino que sería necesario conocer el comportamiento de la enzima y simular su desactivación.

4. Conclusiones

El objetivo de este capítulo se basó en la maximización de la eficacia del sistema, en términos de cantidad de tinte degradado por unidad enzimática consumida, tratando de minimizar el uso de enzima. El incremento de la eficacia del sistema pasa por la determinación de las concentraciones óptimas de los distintos factores que afectan a la estequiometría y la cinética del proceso.

La estequiometría implica el establecimiento de las cantidades de enzima y H_2O_2 necesarias para degradar una cantidad de tinte. Así, se encontró que la relación equimolar entre la concentración de H_2O_2 y Orange II resulta la más

adecuada. Por otra parte se encontró que el nivel de MnP requerido se debe mantener en el entorno de 200 U/L. Una vez establecidas estas relaciones, la cinética fue la responsable de las limitaciones del proceso.

El seguimiento de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor permitió determinar su relación con el proceso de degradación de Orange II. El oxígeno es generado por la presencia de H_2O_2 y Mn^{3+} , y a la vez es consumido en la ruta de degradación del tinte. La tendencia del oxígeno en el reactor es indicativa de la dinámica del proceso: una sobrecarga de tinte, fallos en la dosificación de H_2O_2 o una disminución en el nivel de actividad enzimática causan una disminución de la concentración de oxígeno disuelto. Por el contrario, un incremento en la concentración indica una dosis extra de H_2O_2 , que implicaría una mayor velocidad de desactivación enzimática y, por lo tanto, mayor consumo de MnP. Teniendo esto en cuenta, se puede considerar este parámetro como muy significativo cuando se quiere mantener un estado estacionario durante un período de tiempo prolongado. Así como las medidas *on line* de actividad enzimática son de difícil implementación por el momento, el oxígeno disuelto es una variable fácilmente medible que proporciona una gran información en el control del proceso.

Los resultados obtenidos mediante la configuración de reactor propuesta indican que es posible su aplicación a la degradación de aguas residuales que contienen tintes. La simplicidad de operación, relacionada principalmente con el control de la dosificación de H_2O_2 , permite que este sistema sea considerado para aplicaciones a mayor escala. El acoplamiento de una membrana de ultrafiltración al reactor de tanque agitado puede realizarse a escala industrial sin grandes complicaciones, pues hoy en día la ultrafiltración se aplica comúnmente en la separación de sólidos, carga orgánica o metales pesados (Brindle & Stephenson, 1996). Debido a esto, en el mercado se dispone de una gran oferta de membranas, de diferentes materiales y disposiciones, que satisfacen los requisitos demandados, ya sea a nivel industrial o de laboratorio. En este sistema es necesario disponer de dos membranas de ultrafiltración en paralelo, de manera que una esté operativa mientras la otra se limpia y acondiciona. En este trabajo, el sistema trabajó durante 18 días seguidos sin necesidad de parada para limpieza y mantenimiento.

La ecuación cinética establecida en los ensayos en discontinuo, función de la concentración de sustrato y de la velocidad de dosificación de H_2O_2 , permitió

simular los ensayos realizados en el reactor de membrana, tanto durante los estados estacionarios como durante los de transición. Diversos autores implementaron en sus modelos en continuo valores modificados de las constantes cinéticas obtenidas en ensayos en discontinuo. Bowski *et al.* (1972) emplearon una $r_m' = r_m/2$ y Nakajima *et al.* (1992) emplearon un valor de $r_m' = r_m/10$. Sin embargo, los parámetros utilizados en la ecuación cinética propuesta en este trabajo fueron los mismos que los obtenidos en los ensayos en discontinuo. Esto confirma que el método de las velocidades iniciales para la determinación de parámetros cinéticos es adecuado y aplicable a procesos en continuo. El modelo obtenido se podría utilizar para el diseño y simulación de un reactor enzimático de membrana, así como para su optimización.

5. Referencias

- Aitken, M. D. and Irvine, R. L. (1990) Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**, 405-414.
- Basheer, S., Kut, Ö. M., Prenosil, J. E. and Bourne, J. R. (1993) Development of an enzyme membrane reactor for treatment of cyanide-containing wastewaters from the food industry. *Biotechnology and Bioengineering* **41**(4), 465-473.
- Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J., Máximo, M. F. and Montiel, M. C. (2001) Ultrafiltration membrane reactors for enzymatic resolution of amino acids: design model and optimization. *Enzyme and Microbial Technology* **28**, 355-361.
- Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Máximo, M. F. and Montiel, M. C. (2004) Study of L-aminoacylase deactivation in an ultrafiltration membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 261-266.
- Bongs, J., Hahn, D., Schörken, U., Sprenger, G. A., Kragl, U. and Wandrey, C. (1997) Continuous production of erythrose using transketolase in a membrane reactor. *Biotechnology Letters* **19**(3), 213-216.
- Bowski, L., Shah, P. M., Ryu, D. Y. and Vieth, W. R. (1972) Process simulation of sucrose hydrolysis on invertase in a continuous flow stirred tank/ultrafiltration reaction system. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **3**, 229-239.
- Brindle, K. and Stephenson, T. (1996) The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering* **49**(6), 601-610.
- Chivukula, M., Spadaro, J. P. and Renganathan, V. (1995) Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* **34**, 7765-7772.
- Edwards, W., Leukes, W. D. and Bezuidenhout, J. J. (2002) Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and

laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. *Desalination* **149**, 275-278.

Flock, C., Bassi, A. and Gijzen, M. (1999) Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **74**, 303-309.

Gallifuoco, A., Alfani, F., Cantarella, M. and Viparelli, P. (2001) Studying enzyme-catalyzed depolymerization in continuous reactors. *Industrial Engineering and Chemical Research* **40**, 5184-5190.

Giorno, L. and Drioli, E. (2000) Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotechnology* **18**(8), 339-349.

Gómez-Toribio, V., Martínez, A. T., Martínez, M. J. and Guillén, F. (2001) Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **268**, 4787-4793.

Goszczynski, S., Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M. B., Crawford, R. L. and Crawford, D. L. (1994) New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Journal of Bacteriology* **176**, 1339-1347.

Hildebrandt, J. R. (1991) Membranes for bioprocessing: Design considerations. In: *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*. Costa, C. A. and Cabral, J. S. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 363-378.

Hong, J., Tsao, G. T. and Wankat, P. C. (1981) Membrane reactor for enzymatic hydrolysis of cellobiose. *Biotechnology and Bioengineering* **23**, 1501-1516.

Iwan, P., Goetz, G., Schmitz, S., Hauer, B., Breuer, M. and Pohl, M. (2001) Studies on the continuous production of (R)-(-)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**(4-6), 387-396.

Kulbe, K. D., Schmidt, H., Schmidt, K. and Scholze, H. A. (1992) Continuous synthesis of xylitol by NAD(P)H-linked aldose reductase in a charged ultrafiltration membrane-enzyme reactor. *Progress in Biotechnology* **7**, 565-572.

Kuo, C. H., Chen, C. C. and Chiang, B. H. (2004) Process characteristics of hydrolysis of chitosan in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of Food Science* **69**(7), E332-E337.

López, C., Mielgo, I., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2002) Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *Journal of Biotechnology* **99**(3), 249-257.

López, C., Valade, A. G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B. and Lema, J. M. (2004) Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **335**, 135-149.

Martin-Orue, C., Henry, G. and Bouhallab, S. (1999) Tryptic hydrolysis of K-caseinomacropptide: Control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology* **24**, 173-180.

- Martínez, M. J., Böckle, B., Camarero, S., Guillén, F. and Martínez, A. T. (1996) MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat-straw solid-state fermentation. 211th ACS National Meeting, New Orleans, LA.
- Mielgo, I., López, C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2003) Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology Progress* **19**(2), 325-331.
- Mountzouris, K. C., Gilmour, S. G. and Rastall, R. A. (2002) Continuous production of oligodextrans via controlled hydrolysis of dextran in an enzyme membrane reactor. *Journal of Food Science* **67**(5), 1767-1771.
- Nakajima, N., Shoji, T. and Nabetani, H. (1992) Protease hydrolysis of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. *Process in Biochemistry* **27**, 155-160.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. (2001) Continuous production of pectic oligosaccharides in an enzyme membrane reactor. *Journal of Food Science* **66**(7), 966-971.
- Pasta, P., Carrea, G., Monzani, E., Gaggero, N. and Colonna, S. (1999) Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidation of methyl phenyl sulfide with dihydroxyfumaric acid/oxygen or ascorbic acid/oxygen as oxidants. *Biotechnology and Bioengineering* **62**(4), 489-493.
- Pérez, J. and Jeffries, T. W. (1992) Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2402-2409.
- Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S. (1994) Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 738-750.
- Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S. (2001) Enzymatic membrane reactors. In: *Multiphase bioreactor design*. Cabral, J. M. S., Mota, M. and Tramper, J. London, Taylor&Francis. **16**: 135-180.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D. and Sánchez, J. (2004) Progress in enzymatic membrane reactors - a review. *Journal of Membrane Science* **242**, 189-196.
- Rodríguez-Nogales, J. M., Ortega, N., Pérez-Mateos, M. and Busto, M. D. (2005) Operational stability and kinetic study of a membrane reactor with pectinases from *Aspergillus niger*. *Journal of Food Science* **70**(2), E104-E108.
- Satory, M., Furlinger, M., Haltrich, D., Kulbe, K. D., Pittner, F. and Nidetzky, B. (1997) Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology Letters* **19**(12), 1205-1208.
- Sehanputri, P. S. and Hill, C. G. (2000) Biotechnology for the production of nutraceuticals enriched in conjugated linoleic acid: II. Multiresponse kinetics of the hydrolysis of corn oil by a *Pseudomonas* sp. lipase immobilized in a hollow-fiber reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **69**(4), 450-456.
- Slominska, L., Grajek, W., Grzeskowiak, A. and Gocalek, M. (1998) Enzymatic starch saccharification in an ultrafiltration membrane reactor. *Starch* **50**(9), 390-396.

Spadaro, J. T. and Renganathan, V. (1994) Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **312**(1), 301-307.

Timofeevski, S. L., Reading, N. S. and Aust, S. D. (1998) Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**(2), 287-295.

Wariishi, H., Akaleswaran, L. and Gold, M. H. (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* **27**, 5365-5370.

Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A. F. and Kula, M. R. (2000) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* **67**(6), 791-804.

Capítulo 5

Inmovilización de MnP

Resumen

En este capítulo se realiza el estudio de diferentes técnicas de inmovilización enzimática de MnP para su posterior aplicación en la degradación en continuo de Orange II. Se estudiaron soportes basados en interacciones iónicas y en enlaces covalentes, y se analizaron diversos factores: capacidad de retención de enzima, pérdida de actividad enzimática durante el proceso de inmovilización, estabilidad de la enzima inmovilizada, interacción entre el soporte y el tinte Orange II, facilidad del proceso de activación del soporte y coste. Se seleccionó como más adecuado para la inmovilización de MnP un soporte de agarosa-glutaraldehído, en que se produce una unión covalente entre los grupos aldehído del soporte y los grupos amino de la superficie de la enzima. El proceso de activación de este soporte es relativamente sencillo, la retención enzimática es del 100% y la estabilidad térmica es buena; como contrapartida, la pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización es de un 50%, la interacción entre el soporte y el tinte es muy elevada y el soporte no es recuperable.

Índice

1. Introducción	135
2. Materiales y métodos	144
2.1. Compuestos químicos	144
2.2. Preparación del crudo enzimático	145
2.3. Activación de los soportes e inmovilización	145
2.4. Estudios de estabilidad	150
2.5. Determinación de conductividades	151
2.6. Estudios de adsorción de Orange II sobre los derivados	151
2.7. Técnicas analíticas	151
3. Resultados y discusión	152
3.1. Estudios de estabilidad	152
3.2. Inmovilización de MnP sobre distintos tipos de soportes	154
3.3. Estabilidad de los derivados frente a la temperatura	157
3.4. Comparación de conductividades	158
3.5. Adsorción de Orange II sobre el soporte	159
4. Conclusiones	160
5. Referencias	162

1. Introducción

Las enzimas han sido ampliamente utilizadas en procesos industriales por su elevada eficacia catalítica, su alto grado de especificidad y su capacidad para trabajar en condiciones suaves de temperatura, presión y pH (Krajewska, 2004). Sin embargo, su aplicación industrial se ha visto generalmente limitada por una serie de factores, tales como su disponibilidad en pequeñas cantidades, sus altos costes y su frecuente inestabilidad en las condiciones de reacción deseadas (van de Velde *et al.*, 2002). Algunas de estas desventajas del uso de enzimas se pueden evitar mediante la inmovilización, proceso mediante el cual se confina a la enzima en una región definida del espacio, de manera que se pueda usar repetida y continuamente (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000). Las ventajas y desventajas de la inmovilización enzimática se presentan en la Tabla 5.1 (van de Velde *et al.*, 2002; Bornscheuer, 2003).

Tabla 5.1. Ventajas y desventajas de la inmovilización enzimática

<i>Ventajas</i>
Fácil separación y recuperación de enzima y productos
Reutilización
Aumento de la estabilidad térmica y resistencia contra agentes desnaturalizantes
Robustez
Fácil detención de las reacciones
Facilidad de operación en continuo
Flexibilidad de diseño de biorreactores
Prevención de la contaminación de proteína en el producto
Prevención más simple de la contaminación microbiana
<i>Desventajas</i>
Disminución de la actividad enzimática en el proceso de inmovilización
Aumento de la constante de Michaelis-Menten
Limitaciones de transferencia de materia
Coste extra
Aumento del volumen de catalizador
Búsqueda de un método adecuado de inmovilización

Los primeros trabajos de inmovilización enzimática se realizaron en 1960 (Bar-Eli & Katchalski, 1960), y desde entonces se han estudiado numerosos métodos de inmovilización sobre una variedad de soportes. Las características que debe tener un soporte para ser la base del proceso de inmovilización enzimática se muestran en la Tabla 5.2 (Krajewska, 2004).

Tabla 5.2. Requisitos de un soporte para inmovilización enzimática

Alta afinidad por proteínas	Regenerabilidad
Disponibilidad de grupos funcionales reactivos	No toxicidad y biocompatibilidad
Hidrofilicidad	Biodegradabilidad
Estabilidad mecánica y rigidez	Coste reducido

La selección del soporte y método adecuados para la inmovilización de una determinada enzima y para una aplicación concreta se realiza mediante ensayo-error. Se deben tener en cuenta una serie de consideraciones económicas, prácticas y técnicas:

- i) El proceso de activación del soporte para promover la unión con la enzima debe ser sencillo
- ii) El proceso de inmovilización debe realizarse en condiciones suaves, que no provoquen la desactivación de la enzima
- iii) La inmovilización debe dar como resultado una alta retención enzimática
- iv) La estabilidad del derivado frente a temperatura, pH y resistencia mecánica debe ser elevada
- v) Los procesos de activación del soporte e inmovilización deben tener bajo coste
- vi) En aplicaciones concretas como la de degradación de tintes, el soporte no debería tener interacción con el tinte

Según el tipo de enlace entre la enzima y el soporte, los métodos de inmovilización enzimática se pueden clasificar en métodos físicos o químicos. Los métodos físicos proporcionan una unión débil entre la enzima y el soporte, de manera que apenas se modifica la estructura nativa de ambos; debido a eso, la estabilidad de la enzima rara vez aumenta. Como contrapartida, la unión se puede romper dando lugar a una recuperación del soporte (Durán *et al.*, 2002). Los

métodos químicos generan enlaces entre enzima y soporte, produciendo uniones más fuertes. En función de los grupos que entren a formar parte de esta unión y de la conformación de la proteína tras la inmovilización, la estabilidad de la misma puede incrementarse, pues el centro activo de la enzima puede verse protegido de procesos intermoleculares (agregación, proteólisis) o de interacciones con factores externos (aire, disolventes orgánicos inmiscibles) que pueden tener efecto negativo sobre la estabilidad (Mateo *et al.*, 2000a). Sin embargo, en numerosas ocasiones la inmovilización no afecta, o incluso afecta negativamente, a la estabilidad de la enzima (Gianfreda & Scarfi, 1991). Por otra parte, las uniones covalentes son más difíciles de romper, de manera que la reversibilidad del proceso es más compleja y los soportes no son recuperables. Los principales métodos físicos y químicos se esquematizan en la Figura 5.1 (van de Velde *et al.*, 2002).

Métodos físicos

- i) *Interacción iónica*: Los grupos cargados de la enzima interaccionan con los grupos del soporte de carga opuesta. La estabilidad del preparado es sensible a cambios en pH y fuerza iónica, por lo tanto el soporte es fácil de regenerar.
- ii) *Atrapamiento*: Se trata de un método de inmovilización mediante el cual se genera una matriz (gel, membrana...) donde las enzimas quedan retenidas. No se produce enlace o modificación de la estructura de la enzima, por lo tanto el atrapamiento es un método de inmovilización suave. Su principal desventaja es la dificultad para conseguir un tamaño de poro adecuado, pues si el poro es grande hay pérdida de proteína a su través, pero si es pequeño existen problemas de difusión de sustratos y productos.
- iii) *Encapsulación*: Se lleva a cabo mediante membranas poliméricas, que se crean alrededor de las enzimas de manera que estas quedan retenidas en cápsulas. Su aplicación tiene las mismas limitaciones que el atrapamiento.

Métodos químicos

- i) *Enlace covalente*: El enlace se produce por reacción entre los grupos reactivos de la superficie de la proteína y del soporte. A menudo es necesaria una activación previa del soporte con grupos adecuados para su unión a la enzima. Las uniones pueden ser uni o multipuntuales: estas son más fuertes pero pueden producir cambios estructurales ocasionando caída de actividad.

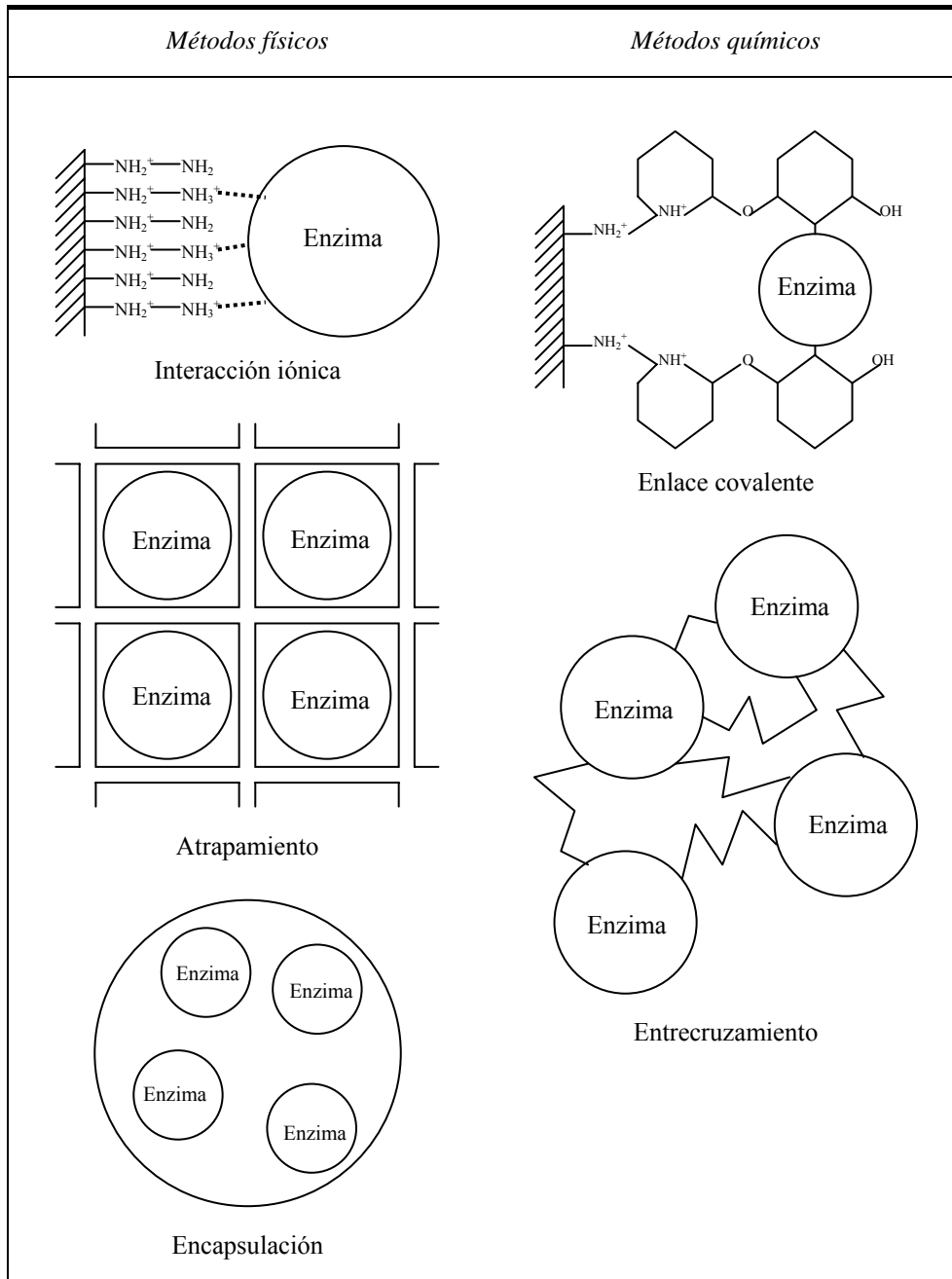


Figura 5.1. Métodos de inmovilización enzimática

ii) *Entrecruzamiento*: Esta técnica implica la unión entre moléculas de enzima por medio de enlaces covalentes, empleando compuestos bi- y multifuncionales como mediadores de dichos enlaces. Al no ser necesario el uso de un soporte, este método puede resultar más económico y no genera residuos, aunque es de difícil control.

En la Tabla 5.3 se describen algunos de los métodos empleados para la inmovilización de una gran variedad de enzimas, así como su campo de aplicación. Actualmente son varios los trabajos en que se emplean enzimas inmovilizadas para la eliminación de compuestos recalcitrantes, entre ellos, tintes y efluentes de la industria papelera.

Los primeros trabajos acerca del estudio de técnicas de inmovilización de MnP son del año 1995. Grabski *et al.* (1995) llevaron a cabo una inmovilización covalente entre los grupos carboxilo de la enzima y los grupos amino del soporte polimérico Emphaze™, obteniendo eficacias de unión de 40-50%. Peralta-Zamora *et al.* (1998) aplicaron un método de intercambio iónico para inmovilizar MnP y LiP en la resina Amberlita IRA-400, obteniendo una retención casi total de la actividad enzimática al cabo de 30 min. Van Aken *et al.* (2000) coinmovilizaron MnP y glucosa oxidasa mediante un enlace covalente en soporte de sílice, utilizando glutaraldehído como compuesto de unión. Se produjo una pérdida de actividad enzimática del 40% en el proceso de inmovilización, pero aumentó la estabilidad frente a H₂O₂ y pH. Sasaki *et al.* (2001) estudiaron la retención de la enzima MnP por adsorción sobre un soporte FSM-16 con diferentes tamaños de poro. En dicho proceso se consiguió una alta estabilidad enzimática cuando el diámetro del poro era aproximadamente igual al tamaño de la enzima. Por último, Mielgo *et al.* (2003) estudiaron la inmovilización de MnP por enlace covalente con un soporte de agarosa activado con moléculas de glutaraldehído, en el que la unión tiene lugar entre los grupos aldehído del soporte y los grupos amino o amino terminal de la enzima, grupos muy reactivos que se encuentran usualmente en la superficie de la enzima y no suelen formar parte del sitio activo. En este trabajo se encontró que una unión multipuntual realizada a baja fuerza iónica permitió alcanzar un 100% de retención e incrementar la estabilidad de la enzima.

En este capítulo se pretende realizar un estudio de diferentes métodos de inmovilización de MnP y analizar el más conveniente de cara a su aplicación en el proceso de degradación en continuo de Orange II.

Tabla 5.3. Aplicación de las técnicas de inmovilización enzimática

<i>Enzima</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Referencia</i>
<i>Intercambio iónico</i>		
Glucosa oxidasa y catalasa	Producción ácido glucónico	Godjevargova <i>et al.</i> , 2004
Amiloglucosidasa	Producción de glucosa	Oh & Kim, 2000
Lacasa	Decoloración de tintes	Abadulla <i>et al.</i> , 2000
LiP y MnP	Decoloración efluentes industria papelera	Peralta-Zamora <i>et al.</i> , 1998
<i>Intercambio iónico + atrapamiento</i>		
HRP	Oxidación de 1,2-diaminobenceno	Li & Takahashi, 2000
Glucoamilasa	Producción de glucosa	Tanriseven <i>et al.</i> , 2002
<i>Atrapamiento</i>		
Dextranosacarasa	Producción de dextranos	Reischwitz <i>et al.</i> , 1995
Fenol oxidasa	-	Palmieri <i>et al.</i> , 1994
Naringinasa	Hidrólisis de naringina	Norouzian <i>et al.</i> , 1999
Glucosa oxidasa	-	Blandino <i>et al.</i> , 2000
<i>Encapsulación</i>		
Glucosa oxidasa	-	Olea & Faure, 2003
<i>Enlace covalente</i>		
Lactasa	-	Illanes <i>et al.</i> , 2000
Glucosa oxidasa	Determinación de glucosa	Vodopivec <i>et al.</i> , 2000
MnP y glucosa oxidasa	Degradación de xenobióticos	van Aken <i>et al.</i> , 2000
MnP	Oxidación de contaminantes orgánicos	Grabski <i>et al.</i> , 1995
MnP	-	Mielgo <i>et al.</i> , 2003

El proceso de inmovilización se realizó con dos tipos de soporte base: *i*) agarosa 6 BCL, proporcionada por Hispanagar S.A. (Burgos, España); *ii*) Sepabeads, una resina sintética con grupos epóxido proporcionada por Resindion S.R.L. (Mitsubishi Chemical Corp.). Estos soportes se sometieron a procesos de activación, por adición de grupos reactivos capaces de interactuar iónica o covalentemente con la enzima. Las Figuras 5.2 y 5.3 muestran los distintos derivados resultantes de dichas uniones.

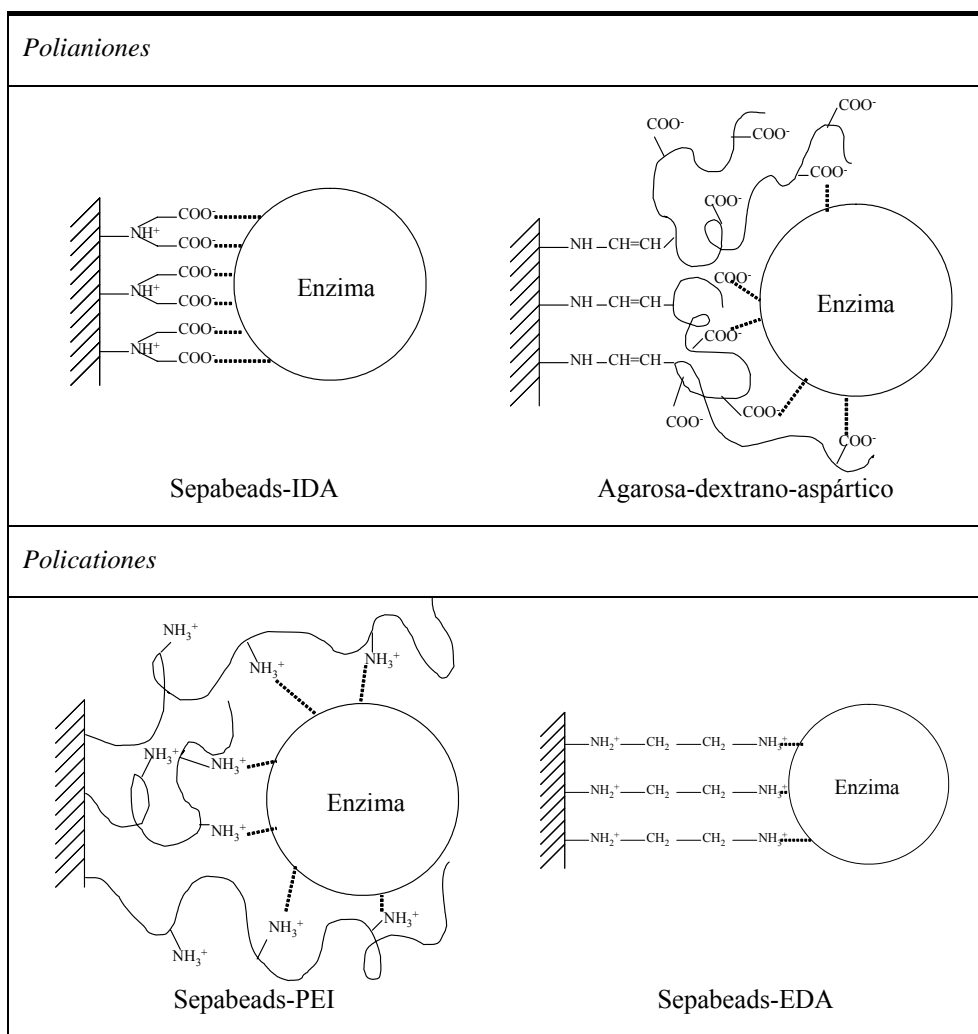


Figura 5.2. Métodos de inmovilización enzimática de MnP basados en intercambio iónico

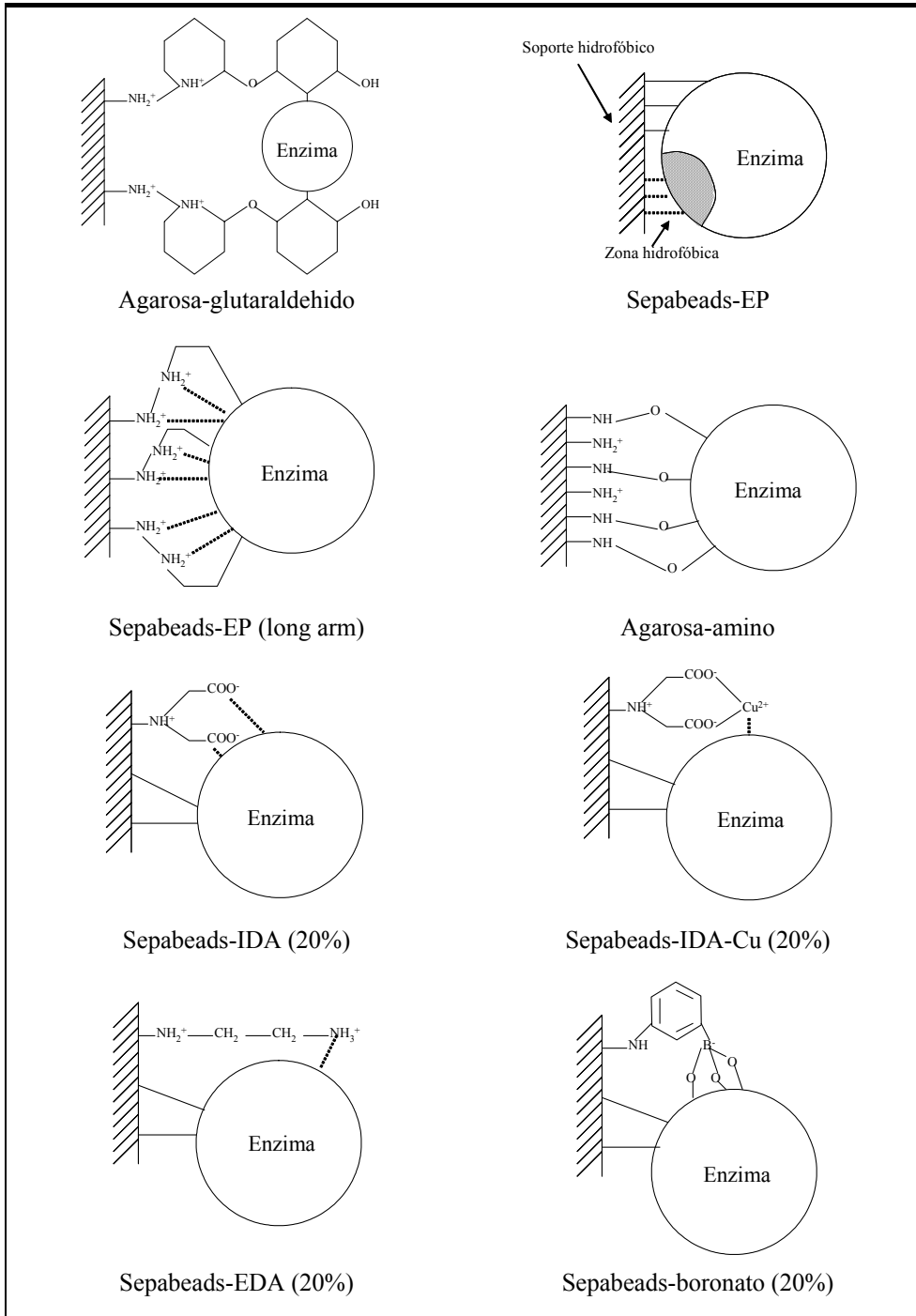


Figura 5.3. Métodos de inmovilización enzimática de MnP basados en enlace covalente

Inmovilización por interacción iónica

Estos soportes basan su unión en la interacción entre la carga del propio soporte y la de los aminoácidos de la enzima. En el momento en que una fuerza externa (alta fuerza iónica en el medio...) provoque la desorción de la enzima, el soporte se recupera con sus características iniciales. Sin embargo, dado que la unión es débil, la estabilidad de la enzima rara vez aumenta. Se utilizaron dos tipos de soportes de intercambio iónico:

Polianiones: El soporte se activa con cargas negativas, que interaccionan con los grupos con carga positiva de la enzima. Entre estos se utilizaron:

- i) Sepabeads-IDA: Se promueve el enlace de los grupos epóxido del soporte con el ácido iminodiacético (IDA). Los grupos carboxílicos de este se unen posteriormente a los grupos amino de la enzima.
- ii) Agarosa-dextrano-aspártico: La agarosa se une a largas cadenas de dextrano que a su vez están unidas a grupos aspártico, los cuales proporcionan las cargas negativas al soporte.

Policationes: El soporte se activa con cargas positivas, que interaccionan con los grupos con carga negativa de la enzima.

- iii) Sepabeads-PEI: El soporte se activa con polietilenimina (PEI), que es un polímero con un gran número de aminos primarios y secundarios. Al tratarse de un polímero, puede amoldarse a la forma de la enzima protegiendo el sitio activo y con él, la estabilidad de la enzima (Mateo *et al.*, 2000b).
- iv) Sepabeads-EDA: El soporte se activa con etilendiamina (EDA), de manera que se forma una capa de cargas positivas (aminos primarios) sobre la superficie del soporte.

Inmovilización por enlace covalente

Estos soportes se unen a la enzima mediante una unión covalente, a menudo multipuntual y por tanto más fuerte, permitiendo una mayor estabilidad de la enzima, aunque el soporte no es recuperable. Se utilizaron los siguientes soportes basados en enlace covalente:

- v) Agarosa-glutaraldehído: La agarosa se activa con grupos glutaraldehído en un porcentaje mayor o menor con el fin de obtener soportes de alta

activación (para favorecer la unión multipuntual de la enzima) o de baja activación (para favorecer la unión unipuntual) (Guisán *et al.*, 1997).

- vi) Sepabeads-EP: Este soporte comercial cargado de grupos epóxido no se modifica, con el fin de que la enzima, en un primer momento, se una al soporte hidrofóbico a través de sus zonas hidrofóbicas, en condiciones de alta fuerza iónica, y en segundo lugar, cuando la enzima se encuentre próxima a los grupos epóxidos, se una a estos covalentemente (Mateo *et al.*, 2000a).
- vii) Sepabeads-EP (long arm): Es una modificación comercial del anterior, en que los grupos epóxido se encuentran unidos al propio soporte mediante una cadena aminada, de manera que la enzima se une al soporte por fuerzas iónicas, y una vez próxima a los grupos epóxido, sea posible su unión covalente a estos.
- viii) Agarosa-amino: El soporte de agarosa se activa con grupos amino que se unen a los aldehidos de la enzima, obtenidos tras la oxidación previa de los posibles azúcares que la rodean, en el caso de que la enzima esté glicosilada (Guisán *et al.*, 1997).
- ix) Soportes multifuncionales: Sepabeads-IDA, Sepabeads-IDA-Cu, Sepabeads-EDA y Sepabeads-boronato. Estos soportes se obtienen tras la modificación de un 10-20% de los grupos epóxido del soporte, con grupos IDA, IDA-Cu, EDA o boronato, de manera que la enzima se una en primer lugar con estos grupos por interacción iónica, y a continuación forme enlace covalente con los grupos epóxido que no han sido modificados (Mateo *et al.*, 2000c).

2. Materiales y métodos

2.1. Compuestos químicos

El soporte comercial Sepabeads-EC3, con grupos epóxido en su superficie y grado de entrecruzamiento 3, fue suministrado por Resindion S.R.L. (Mitsubishi Chemical Corp., Tokio, Japón) y el soporte de agarosa con entrecruzamiento del 6% se obtuvo de Iberagar-Sociedade Luso-Espanhola de Coloides Marinhos S.A. (Coima, Portugal). Antes de su utilización, ambos soportes deben lavarse con aproximadamente 1 L de agua por cada 10 g.

2.2. Preparación del crudo enzimático

El crudo enzimático procedente de la fermentación del hongo *Bjerkandera* sp. BOS55 se centrifugó en tubos de 10 mL a 12.000xg y el líquido extracelular se filtró a través de filtros de 0,45 µm, tal como se indicó en el Capítulo 2 de Materiales y Métodos. A continuación se realizó una diálisis frente a tampón fosfato 5 mM a pH 7, en relación 1:1000 cambiando el medio 2 veces, durante 24 h y a 4°C. Se emplearon membranas de celulosa con un corte de 12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU).

2.3. Activación de los soportes e inmovilización

Los soportes comerciales empleados pasaron por procesos de activación en que se les añadieron grupos reactivos (Figuras 5.2 y 5.3). Durante los procesos de inmovilización se realizó un seguimiento de la actividad enzimática en el sobrenadante y en el total de la suspensión. La diferencia entre ambas proporcionó el valor de la actividad MnP retenida en el soporte. Así, se comprobó la capacidad de retención del soporte y la estabilidad del derivado durante el proceso, pues en ocasiones las condiciones de inmovilización son severas y alteran la conformación de la proteína. En el caso de los derivados basados en una interacción iónica entre los grupos del soporte y de la enzima, tras la inmovilización se procedió a realizar una desorción para comprobar la fortaleza de la unión. Para ello, se aumentó progresivamente la fuerza iónica del medio y se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante y la suspensión, hasta que toda la actividad del derivado se obtuvo en el sobrenadante.

i) Sepabeads-IDA

Para la activación del soporte se tomaron 10 g de Sepabeads-EC3, se lavaron y se unieron a 18 mL de una disolución de borato sódico 100 mM y ácido iminodiacético (IDA) 2 M a pH 11. Tras 24 h de agitación, los grupos epóxido que no reaccionaron se bloquearon con mercaptoetanol al 2% (w/v), y tras 14-16 h se lavó el soporte.

La inmovilización se realizó con una relación soporte:derivado de 1:10, es decir, 1 g de soporte se llevó a 10 mL de derivado, con malonato 5 mM pH 4 y MnSO₄ 0,5 mM. Para ello se tomó 1 g de Sepabeads-IDA, se añadió el volumen de malonato necesario, se comprobó el pH y se añadió el crudo enzimático de

MnP con el fin de que la actividad final en el derivado fuese de 200 U/L. Se tomaron muestras de sobrenadante y suspensión hasta que la actividad MnP en el sobrenadante fue nula.

ii) Agarosa-dextrano-aspártico

Se disolvieron 1,67 g de dextrano en 50 mL de agua, y se oxidó el 80% de los grupos -OH con 3,49 g de periodato, para su posterior unión a los grupos aspártico. Tras 2 h de agitación a temperatura ambiente, en campana, el dextrano-aldehído obtenido se dializó frente a agua, para eliminar el periodato en exceso y el formaldehído que se forma al romper los azúcares durante la oxidación. La diálisis se realizó en relación 1:100 cambiando el medio unas 5-6 veces, durante 2-3 d. Tras esto se unió, en relación de volúmenes iguales, el dextrano-aldehído con aspártico 3 M pH 7,5 que contenía 200 mM de tri-metil-amino-borano, que actúa de estabilizante de la base de Schiff. La solución resultante se agitó durante toda la noche con agitación magnética, en un recipiente cerrado. A esta disolución se añadió un 10% (v/v) de tampón carbonato 500 mM pH 10,5 con borohidruro sódico 100 mg/mL, que reduce los grupos aldehído que no reaccionaron con el aspártico. Se agitó magnéticamente en campana, en recipiente cerrado, durante 30 min. Tras este tiempo, se disminuyó el pH hasta 6 con HCl. Se dializó frente a agua durante 2-3 d.

La unión de los dextranos al soporte de agarosa se realizó tras la oxidación del 20% restante de los grupos alcoholes del dextrano. Para ello se añadieron 0,872 g de periodato a la disolución anterior, se agitó magnéticamente durante 2 h a temperatura ambiente y se realizó una diálisis para eliminar el formaldehído que se forma al oxidar los azúcares del dextrano, ya que es muy reactivo. La unión con el soporte se realizó uniendo, en relación 1:10 (1 mL de agarosa por cada 10 mL de disolución final), agarosa-amino de baja activación (10-15 μ moles/mL) con dextrano-aspártico con 50 mM de fosfato pH 7,5. A esta disolución se añadió de forma sólida tri-metil-amino-borano hasta alcanzar 150 mM. Se agitó suavemente durante 24 h a temperatura ambiente. La reducción de los grupos oxidados del dextrano que no se unieron al soporte se realizó añadiendo carbonato 500 mM pH 10,5 con 10 mg/mL de borohidruro al 10% (v/v), y se agitó durante 30 min. Posteriormente el soporte se lavó abundantemente con agua y se secó a vacío.

La inmovilización se realizó en relación 1:10 con malonato 5 mM pH 4 y MnSO_4 0,5 mM. Se comprobó la desorción añadiendo fosfato en adiciones de 25 mM, hasta que toda la actividad enzimática se midió en el sobrenadante.

iii) Sepabeads-PEI

Se pesaron y lavaron 50 g de Sepabeads-EC3 y se añadieron a una disolución de 200 g/L de polietilenimina (PEI) de peso molecular 25.000, a pH 10 para favorecer la ruptura de los grupos epóxidos del soporte y la formación de más enlaces entre los OH del soporte y los grupos NH_2 de la PEI. Se agitó la disolución resultante a 100 rpm durante 48 h a temperatura ambiente. El soporte se lavó abundantemente con agua y se secó. Los grupos epóxidos que no reaccionaron con la disolución de PEI se bloquearon con 250 mL de etilendiamina 2 M a pH 10. Se agitó durante 16-18 h, se lavó el soporte con agua y se secó a vacío.

La inmovilización se realizó en relación soporte:derivado de 1:10 con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO_4 0,5 mM. Se comprobó la desorción del derivado nuevo y envejecido mediante la adición de fosfato de 25 en 25 mM.

iv) Sepabeads-EDA

Se unieron 10 g de Sepabeads-EC3 a 18 mL de una disolución de etilendiamina (EDA) 500 mM pH 11. Se agitó durante 24 h y se bloquearon los grupos epóxido que no reaccionaron con mercaptoetanol al 2% (w/v). Tras 14-16 h, se lavó el soporte con abundante agua y se secó a vacío. La inmovilización sobre el soporte totalmente activado se realizó en relación 1:10, con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO_4 0,5 mM.

v) Agarosa-glutaraldehido

Para obtener un soporte agarosa-glutaraldehido totalmente activado, se deben generar grupos dioles en la superficie del soporte. Para ello se resuspendieron 150 g de agarosa en 30 mL de agua y se unieron a 50 mL de una disolución de NaOH 1,7 N conteniendo 28,5 mg/mL de borohidruro sódico. Se adicionó lentamente glicidol (2,3-epoxipropanol) 2 M para efectuar la eterificación de la agarosa. Se mantuvo una agitación suave durante 18 h a temperatura ambiente, el gel se lavó con abundante agua destilada y se secó a vacío. Se obtuvo así el gel gliceril, con unos 75 μmoles de grupos reactivos

(dioles) por mL de gel. Este gel gliceril se oxidó con 75 μ moles de periodato por mL de gel durante 1-2 h, de manera que se obtuvieron grupos aldehído, constituyendo el gel glioxil (Guisán *et al.*, 1997). Tras este tiempo se lavó el soporte con agua y se añadieron 858 mL de EDA 2 M pH 10, agitándose durante 2 h, con lo que se obtuvieron grupos amino primarios y secundarios. Los posibles grupos nitro que se hubieron podido formar durante el ajuste de pH de la EDA se redujeron con borohidruro de sodio (10 mg por mL de disolución) y se agitó durante otras 2 h. El gel se lavó con 1 L de acetato de sodio 0,1 M pH 4 (con el fin de detener la reducción), 1 L de borato de sodio 0,1 M pH 10 (para ajustar el pH) y abundante agua destilada. Se obtuvo así el gel agarosa-amino. Para la obtención del gel agarosa-glutaraldehído, 20 g de gel amino se unieron a 22,4 mL de fosfato 0,2 M pH 7 y 33,6 mL de glutaraldehído al 25%. Se ajustó el pH a 7 y se agitó durante 12-14 h. Tras este tiempo se lavó el soporte abundantemente con agua y se secó. Los soportes glutaraldehído se utilizaron el mismo día que se obtuvieron.

La inmovilización se realizó en relación 1:3 con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO_4 0,5 mM. La reducción de los grupos que no reaccionaron con la enzima se llevó a cabo tras 24 h llevando 2 g de soporte, en un baño de hielo, a 200 mL con bicarbonato de sodio 200 mM pH 8,1, y añadiendo 0,1 mg de borohidruro de sodio por mL de suspensión. Al cabo de 20 min, se añadieron otros 20 mg. Tras 1 hora se lavó con acetato a pH 5 y luego con agua.

vi) Sepabeads-EP

La inmovilización de MnP en el soporte comercial Sepabeads-EP se realizó en relación soporte:derivado 1:3, en presencia de fosfato 1 M pH 7 y MnSO_4 0,5 mM. Tras la inmovilización, se lavó y secó el derivado y se bloquearon los grupos epóxidos que no reaccionaron con la enzima mediante la adición de 5,75 mL de glicina 3 M pH 7 por g de soporte. El derivado se mantuvo en agitación 12-14 h, se lavó con abundante agua y se secó (Wheatley & Schmidt Jr., 1999; Mateo *et al.*, 2000a).

vii) Sepabeads-EP (long arm)

La inmovilización de MnP sobre el soporte Sepabeads-EP (long arm) se realizó en relación 1:10 con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO_4 0,5 mM. Tras 1 d de

inmovilización, los derivados se bloquearon con glicina 3 M pH 7, para evitar la reactividad de los epóxidos que no hubieron reaccionado con la enzima.

viii) Agarosa-amino

En el caso de una enzima como la MnP, altamente glicosilada, se realizó previamente la oxidación de los grupos OH de los azúcares que la rodean. Para ello se añadieron 10 μ moles/mL de periodato sódico al crudo enzimático, y se agitó durante 1 h, midiendo la actividad de la enzima para evaluar si el oxidante afecta a su estabilidad. Al cabo de este tiempo la enzima se dializó para eliminar el periodato sobrante, y se inmovilizó sobre agarosa-amino, altamente activada, obtenida tal como se describió anteriormente, como etapa en la obtención de los geles agarosa-glutaraldehído (Guisán *et al.*, 1997).

La inmovilización se realizó en relación 1:3 con alta fuerza iónica, es decir, fosfato 1 M pH 7 y MnSO_4 0,5 mM. Tras 24 h de inmovilización, los grupos carboxilo de la enzima que no reaccionaron se redujeron con borohidruro, siguiendo un proceso similar al empleado con los soportes de agarosa-glutaraldehído.

ix) Sepabeads-IDA (20%)

Se tomaron 10 g de Sepabeads-EC3, se lavaron y se unieron a 18 mL de una disolución de borato sódico 100 mM y ácido iminodiacético 2 M a pH 8. El derivado se agitó durante 1 h, se lavó con agua y se secó a vacío. De este modo se activa un 10-20% de los grupos epóxido del soporte. La inmovilización se realizó en relación 1:3 a baja fuerza iónica, con malonato 5 mM pH 4 y MnSO_4 0,5 mM. Tras la misma, el derivado se bloqueó con glicina 3 M pH 7, tal y como se describe en los soportes Sepabeads-EP y Sepabeads-EP (long arm) (Mateo *et al.*, 2000c).

x) Sepabeads-IDA-Cu (20%)

A 2 g de Sepabeads-IDA se adicionaron 0,496 g de sulfato de cobre y 11,42 mL de agua. El derivado resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó con agua. La inmovilización en el soporte activado al 10-20% se realizó en relación 1:3 con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO_4 0,5 mM. Tras la inmovilización el derivado se bloqueó con glicina 3 M pH 7 (Mateo *et al.*, 2000c).

xi) Sepabeads-EDA (20%)

Para obtener un soporte con un 10-20% de los grupos activados, se unieron 10 g de Sepabeads-EC3 con 18 mL de una disolución de EDA 500 mM pH 7. Se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras esto, el derivado se lavó con abundante agua y se secó a vacío. La inmovilización se realizó en relación 1:3 a baja fuerza iónica y pH 7, es decir, con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO₄ 0,5 mM. Tras la misma, el derivado se bloqueó con glicina 3 M pH 7 (Mateo *et al.*, 2000c).

xii) Sepabeads-boronato (20%)

Para activar el 10-20% de los grupos epóxido del soporte, se preparó una disolución de aminofenilborónico al 2% (w/v) disuelto en un 20% de dioxano o acetonitrilo, y se ajustó el pH a 8. Tras esto se unieron 10 g de Sepabeads-EC3 con 33 mL de dicha disolución y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El derivado se lavó abundantemente con agua. La inmovilización se realizó en relación 1:3 con fosfato 5 mM pH 7 y MnSO₄ 0,5 mM. Tras la misma, el derivado se bloqueó con glicina 3 M pH 7 (Mateo *et al.*, 2000c).

2.4. Estudios de estabilidad

Efecto de las sales en la estabilidad de MnP soluble e inmovilizada

Se estudió el efecto de diferentes sales sobre la estabilidad de MnP soluble e inmovilizada. Para ello se trabajó con dos disoluciones enzimáticas, una con MnP inmovilizada sobre Sepabeads-EA y otra con MnP soluble, que se empleó como control. En ambas disoluciones se añadieron las sales NaCl, NaH₂PO₄, (NH₄)H₂PO₄, K₃PO₄, KCl y (NH₄)₂SO₄ en adiciones de 100 en 100 mM hasta una concentración de 300 mM. Se determinó la actividad MnP en el sobrenadante y en la suspensión en el caso de la enzima inmovilizada, y se observó el efecto de las sales en la estabilidad del derivado.

Efecto de los metales sobre la estabilidad de la enzima soluble

Se estudió el efecto de sales de metales sobre la estabilidad de la enzima MnP en disolución. Para ello se consideraron las sales ZnCl₂, NiCl₂, CuSO₄ y CoCl₂ en concentraciones de 1 mM, y se observó la pérdida de actividad enzimática tras 3 d, a temperatura ambiente.

Estabilidad de los derivados frente a la temperatura

Se determinó la estabilidad de la enzima inmovilizada en los diferentes soportes en un baño a temperaturas de 37 y 50°C, mediante la determinación de la actividad enzimática del derivado frente al tiempo.

2.5. Determinación de conductividades

Se realizó un análisis comparativo de las conductividades que presentan disoluciones de distintas concentraciones de fosfato mono y dihidratado (5-10-25-50 mM), así como disoluciones del medio de decoloración (Orange II 100 mg/L, Acetato de sodio 1 mM, MnSO₄ 33 µM), agua destilada y agua del grifo. Las conductividades se analizaron con un conductivímetro Crisol 524 (Barcelona, España).

2.6. Estudios de adsorción de Orange II sobre los derivados

La adsorción del tinte en el soporte se analizó mediante ensayos en que se pusieron en contacto 0,5 g de los distintos tipos de soportes con 4,5 mL de una disolución de Orange II de 400 mg/L, y se midió la concentración en el sobrenadante transcurridas 4 h.

2.7. Técnicas analíticas

La concentración de Orange II se midió espectrofotométricamente, como se indicó en el Capítulo 2 de Materiales y métodos. La actividad MnP se midió por espectrofotometría mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol. La medida de MnP en las suspensiones se realizó mediante agitación magnética en la celda del espectrofotómetro. La muestra para la medida de MnP en el sobrenadante se tomó mediante filtros de punta de pipeta de 0,45 µm Lida (Wisconsin, EEUU). Las técnicas fueron descritas en el Capítulo 2 de Materiales y métodos.

3. Resultados y discusión

3.1. Estudios de estabilidad

Efecto de las sales en la estabilidad de MnP soluble e inmovilizada

Previo a los estudios de inmovilización de MnP sobre diferentes tipos de soportes, se intentó determinar la sal más adecuada para ser empleada como tampón en los procesos de inmovilización y, posteriormente, como medio de aporte de fuerza iónica en los procesos de desorción de la enzima. Para ello se trabajó con enzima MnP inmovilizada sobre el soporte comercial Sepabeads-EA, que contiene grupos amino primarios y secundarios, y se observó la pérdida de actividad en el total de la suspensión a medida que se aumentó la fuerza iónica del medio con la adición de distintos tipos de sales en concentraciones crecientes.

Tabla 5.4. Efecto de las sales en la estabilidad de MnP soluble e inmovilizada

<i>Pérdida de actividad (%)</i>						
<i>Sal</i>	<i>MnP soluble</i>			<i>MnP inmovilizada</i>		
	<i>Concentración sal (mM)</i>			<i>Concentración sal (mM)</i>		
	<i>100</i>	<i>200</i>	<i>300</i>	<i>100</i>	<i>200</i>	<i>300</i>
<i>NaCl</i>	0,2	0,3	14,2	51,9	66,5	74,9
<i>NaH₂PO₄</i>	20,1	14,6	-	0	0	0
<i>(NH₄)H₂PO₄</i>	6,9	14,7	-	0	0	0
<i>K₃PO₄</i>	11,2	18,1	-	12,7	50,2	60,5
<i>KCl</i>	1,2	17,0	-	55,8	70,3	-
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	14,9	20,9	-	28,2	30,8	-

La sal que produjo menor desestabilización de la enzima libre fue NaCl (Tabla 5.4). Sin embargo, los cloruros, tanto de Na como de K, provocaron una alta desestabilización del derivado a concentraciones tan bajas como 100 mM, que no fueron suficientes para producir la desorción de la enzima en ninguno de los casos. Las sales dibásicas de fosfato, sin embargo, no afectaron a la estabilidad de los derivados en concentraciones hasta 300 mM, valor para el cual todas las sales causaron la desorción total de la enzima. La sal elegida para

aportar la fuerza iónica necesaria para los procesos de inmovilización, así como para los estudios de desorción de la enzima sobre el derivado fue, finalmente, el fosfato de sodio.

Efecto de los metales sobre la estabilidad de la enzima soluble

Con el fin de estudiar la unión de la enzima MnP a soportes que provocan la adsorción por medio de un metal cargado positivamente, se estudió el efecto de las sales de distintos tipos de metales sobre la estabilidad de la enzima soluble. Para ello se realizó un seguimiento de la actividad enzimática al diluir una muestra de enzima sobre disoluciones de sales de Zn, Ni, Cu y Co en concentración 1 mM. La Figura 5.4 muestra la desactivación producida tras 3 d a temperatura ambiente.

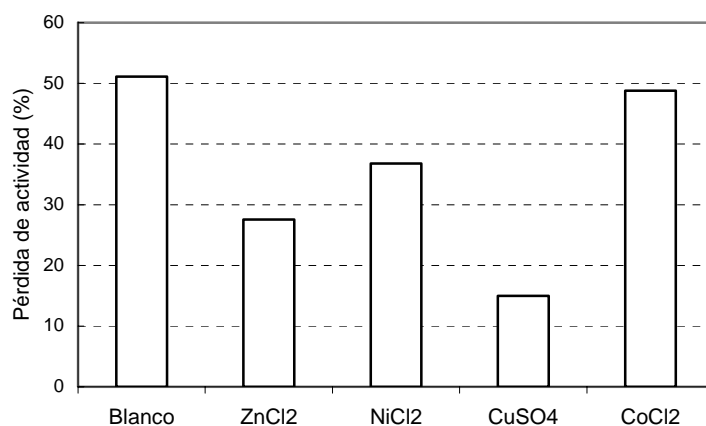


Figura 5.4. Efecto de los metales en la estabilidad de MnP soluble

Todos los metales estudiados estabilizaron la enzima, pues los ensayos en presencia de metales mostraron una menor pérdida de actividad enzimática que el control en ausencia de metal. Entre ellos, la sal de cobre fue la más eficaz, tal vez por el efecto combinado de la presencia de Cu y de sulfato, mientras que las demás sales analizadas fueron cloruros, que se había observado que afectan en mayor proporción a la estabilidad enzimática. En base a estos resultados, se eligió el Cu como el metal a emplear en los soportes basados en la adsorción con presencia de metales.

3.2. Inmovilización de MnP sobre distintos tipos de soportes

Se estudió la inmovilización de la enzima MnP en diferentes tipos de soportes, basados tanto en la interacción iónica como en el enlace covalente. Durante el proceso de inmovilización, se realizó un seguimiento de la actividad enzimática en el total de la suspensión y en el sobrenadante. El primer valor indica la pérdida de actividad que sufre la enzima durante el proceso de inmovilización, por estar sometida a condiciones de pH, temperatura o presencia de compuestos que pueden causar su inhibición. La actividad enzimática en el sobrenadante indica la cantidad de enzima que no es retenida por el soporte durante el proceso. La diferencia entre ambos valores indica la capacidad de retención del soporte. Paralelamente se analizó la actividad enzimática de un control, constituido por MnP soluble, en las mismas condiciones que la enzima sometida al proceso de inmovilización. La Figura 5.5 muestra un proceso de inmovilización de MnP sobre un soporte comercial Sepabeads-EA.

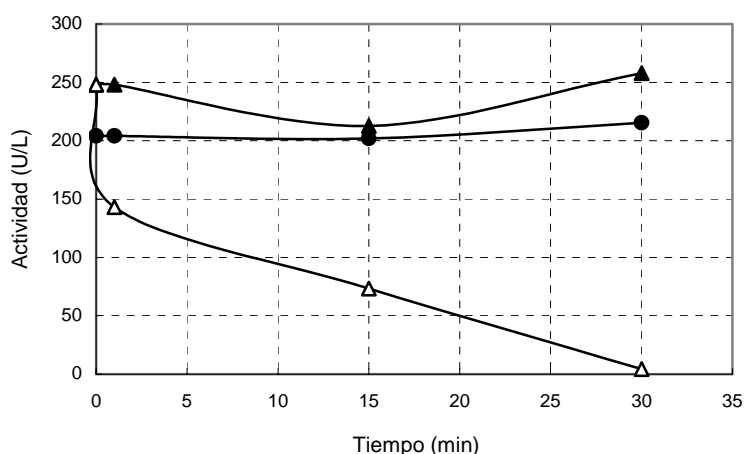


Figura 5.5. Inmovilización de MnP sobre un soporte comercial Sepabeads-EA: (●) control; (▲) actividad de la suspensión; (Δ) actividad del sobrenadante

En los casos en que la inmovilización tuvo lugar mediante un proceso de interacción iónica, se llevaron a cabo procesos de desorción, mediante la aplicación de altas cargas de fuerza iónica, por medio de NaH_2PO_4 , para provocar la unión entre los iones del medio y el soporte o la enzima. Durante dichos procesos, se analizó la actividad enzimática en un control, la suspensión y el sobrenadante. La fortaleza de la unión viene determinada por la concentración de

sal necesaria para provocar la desorción de la enzima desde el derivado al sobrenadante. La Figura 5.6 muestra un proceso de desorción de MnP inmovilizada sobre el soporte comercial Sepabeads-EA.

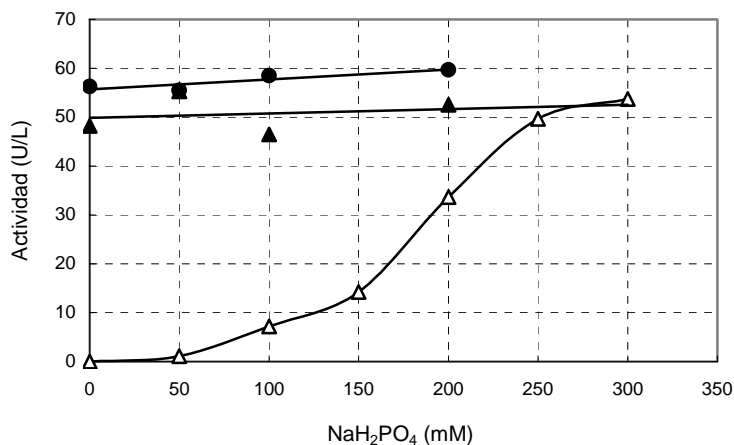


Figura 5.6. Desorción de MnP sobre un soporte comercial Sepabeads-EA: (●) control; (▲) actividad de la suspensión; (Δ) actividad del sobrenadante

Tabla 5.5. Características de los procesos de inmovilización de MnP

<i>Soporte</i>	<i>Tiempo inmovilización (h)</i>	<i>Retención enzimática (%)</i>	<i>Pérdida actividad del derivado (%)</i>
<i>Interacción iónica</i>			
Sepabeads-IDA	22	60,6	0
Agarosa-dextrano-aspárt.	2	93,9	0
Sepabeads-PEI	<0,5	100	0
Sepabeads-EDA	0,5	100	0
<i>Enlace covalente</i>			
Agarosa-glutaraldehido	3	100	47,3
Sepabeads-EP	30	45	62
Sepabeads-EP (long arm)	30	45	12
Agarosa-amino	1	100	60
Multifuncionales	24	0	0

Los resultados de los procesos de inmovilización de MnP sobre los distintos soportes empleados se presentan en la Tabla 5.5. Mediante los procesos de inmovilización por interacción iónica se consiguieron retenciones elevadas y mínima pérdida de actividad enzimática. Esto es debido a que los procesos tuvieron lugar en condiciones suaves, a baja fuerza iónica y un pH adecuado para mantener la actividad enzimática. Dentro de estos métodos, los basados en soportes catiónicos dieron lugar a inmovilizaciones más rápidas y retenciones totales de la actividad enzimática en el soporte, de lo que se deduce que en la superficie de la enzima predominan los grupos cargados negativamente. Los soportes con grandes cadenas poliméricas, como son agarosa-dextrano-aspártico y Sepabeads-PEI, provocaron interacciones más rápidas y retenciones mayores que los correspondientes soportes con cadenas más cortas, debido a que las cadenas más largas permiten que el soporte se amolde más a la conformación de la enzima y evitan modificaciones en su estructura.

La fuerza de los enlaces proporcionados por los distintos soportes se analizó en función de la fuerza iónica necesaria para provocar la desorción de la enzima (Tabla 5.6). El soporte Sepabeads-IDA no se consideró por su baja capacidad de retención enzimática. El soporte aniónico agarosa-dextrano-aspártico dio lugar a una inmovilización débil, ya que con una fuerza iónica de 50 mM se produjo una desorción del 63%, y esta fue casi total cuando la concentración de fosfato fue de 150 mM. Sin embargo, los soportes catiónicos ocasionaron enlaces más fuertes, siendo necesaria una concentración de 300 mM para la desorción de la enzima.

Tabla 5.6. Características de los procesos de desorción de MnP en los soportes basados en interacción iónica

<i>Porcentaje de desorción (%)</i>				
<i>Soporte</i>	<i>Concentración de NaH₂PO₄ (mM)</i>			
	<i>100</i>	<i>150</i>	<i>200</i>	<i>300</i>
Agarosa-dextrano-aspárt.	86,9	94,9	98,0	100
Sepabeads-PEI	30,9	-	69,0	83,1
Sepabeads-EDA	15,5	27,1	64,0	97,1

El éxito de los procesos de inmovilización por enlace covalente fue función de los grupos del soporte disponibles para reaccionar con la enzima (Tabla 5.5). Los soportes con grupos glutaraldehído y amino consiguieron una retención del 100%, mientras que los soportes con grupos epóxido no dieron lugar a buenas inmovilizaciones. Las pérdidas de actividad enzimática en los procesos de inmovilización covalente fueron elevadas, debido a que estos métodos requieren una etapa posterior de bloqueo de los grupos reactivos que no reaccionaron con la enzima, que se suele llevar a cabo en condiciones severas de pH y mediante la adición de compuestos que afectan a la estabilidad de la enzima.

3.3. Estabilidad de los derivados frente a la temperatura

El estudio de la estabilidad de la enzima MnP inmovilizada sobre los distintos soportes se aceleró mediante un aumento de la temperatura hasta valores de 37 y 50°C, y se comparó la pérdida de actividad enzimática de los mismos frente a la de un control con enzima soluble.

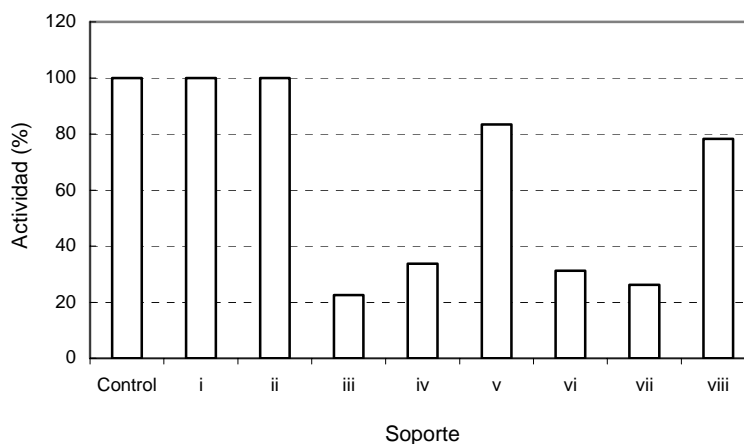


Figura 5.7. Estabilidad de los derivados tras 4 h a 37°C: (i) Sepabeads-IDA; (ii) Agarosa-detrano-aspártico; (iii) Sepabeads-PEI; (iv) Sepabeads-EDA; (v) Agarosa-glutaraldehído; (vi) Sepabeads-EP; (vii) Sepabeads-EP (long arm); (viii) Agarosa-amino

La enzima soluble mantuvo el total de su actividad tras 4 h a 37°C (Figura 5.7). Las uniones iónicas dieron como resultado derivados de alta estabilidad cuando se basaron en soportes polianiónicos; sin embargo, los soportes policatiónicos, que tenían mejores propiedades de inmovilización, dieron lugar a

derivados de muy baja estabilidad (soportes *iii* y *iv* en Figura 5.7). Entre los derivados covalentes más estables se encuentran agarosa-glutaraldehido y agarosa-amino.

Se evaluó a 50°C la estabilidad de los derivados con mejores resultados (Figura 5.8). Se descartó el derivado de Sepabeads-IDA por ofrecer una baja capacidad de retención enzimática. El derivado de agarosa-dextrano-aspártico presentó una alta estabilidad térmica, mejor que la de la enzima soluble, al contrario que los soportes basados en uniones covalentes, que presentaron mayor desactivación. Generalmente las uniones iónicas no contribuyen a mejorar la estabilidad enzimática, aunque en el caso de soportes con largas cadenas poliméricas, estas pudieron rodear y proteger a la enzima de agentes externos. Las uniones covalentes pueden modificar la conformación de la enzima y, con ello, favorecer o perjudicar la actividad enzimática.

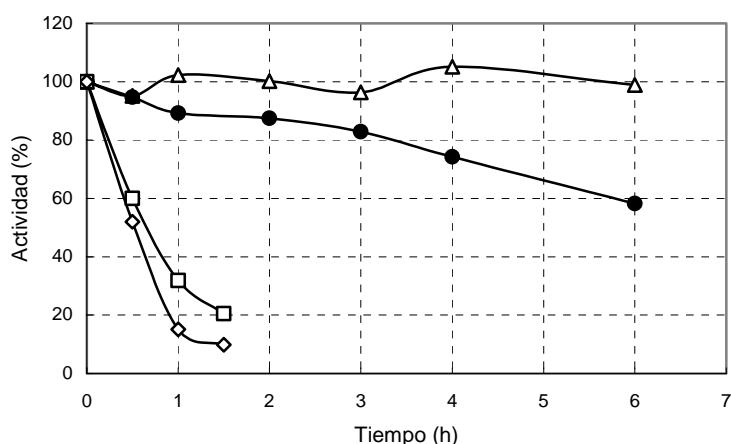


Figura 5.8. Estabilidad de los derivados a 50°C: (●) control; (Δ) agarosa-dextrano-aspártico; (□) agarosa-glutaraldehido; (◇) agarosa-amino

3.4. Comparación de conductividades

Dado que los derivados basados en interacciones iónicas sufren un proceso de reversibilidad cuando se ven sometidos a fuerzas iónicas en el medio, se analizó la conductividad del medio en que se aplicará la enzima inmovilizada, que es el medio de degradación de Orange II, y se comparó con la conductividad de fosfato de sodio a diferentes concentraciones (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Conductividades de disoluciones de fosfato de sodio y medio de degradación de Orange II

<i>Disolución</i>	<i>Concentración</i>	<i>Conductividad (μS)</i>
NaH ₂ PO ₄	5 mM	368
	10 mM	691
	25 mM	1586
	50 mM	3120
Na ₂ HPO ₄	5 mM	827
	10 mM	1544
	25 mM	3360
	50 mM	5780
Orange II Acetato de sodio MnSO ₄	100 mg/L 1 mM 33 μM	145,5
Agua destilada	-	1,4
Agua del grifo	-	102,4

La disolución de 50 mM de NaH₂PO₄, en que se desorbió un 63% de la enzima inmovilizada sobre agarosa-dextrano-aspártico, tiene una conductividad de 3120 μS , valor superior en más de 20 veces al correspondiente a la conductividad de la mezcla de reacción en que se aplicará la enzima inmovilizada. Por lo tanto, no cabe esperar problemas de desorción, aun considerando un efluente que tuviese como base agua del grifo.

3.5. Adsorción de Orange II sobre el soporte

Como último paso para realizar la selección del soporte adecuado para la inmovilización de la enzima MnP, y teniendo en cuenta la aplicación concreta para la que se pretende destinar la enzima inmovilizada, se consideró el estudio de la adsorción del tinte Orange II a cada uno de los soportes. Para ello se analizó el porcentaje de retención de Orange II en dichos soportes tras 4 h de puesta en contacto con una disolución de 400 mg/L de tinte (Figura 5.9).

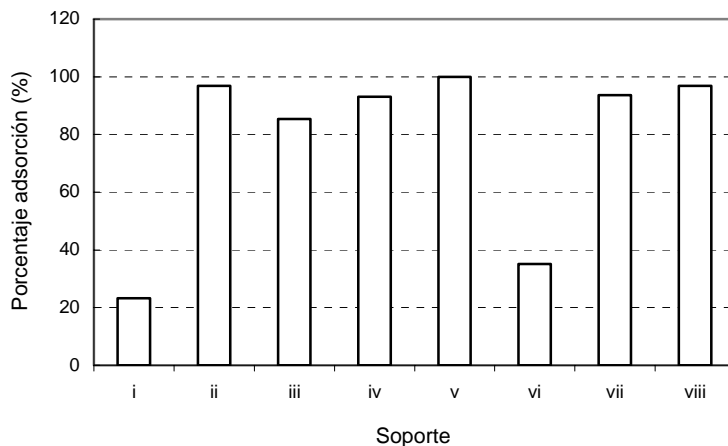


Figura 5.9. Adsorción de 400 mg/L de Orange II tras 4 h: (i) Sepabeads-EC3; (ii) Sepabeads-EA; (iii) Agarosa-detrano-aspártico; (iv) Sepabeads-PEI; (v) Agarosa-glutaraldehído; (vi) Sepabeads-EP; (vii) Sepabeads-EP (long arm); (viii) Agarosa-amino

Se analizó la adsorción que producen los soportes comerciales Sepabeads-EC3 y Sepabeads-EA: el primero es la base que se activa para la obtención de los demás soportes Sepabeads y está formado por grupos epóxido en su superficie; el segundo está constituido por grupos amino. Sepabeads-EC3 apenas adsorbió Orange II, mientras que Sepabeads-EA alcanzó una adsorción próxima al 100%. El resto de los soportes estudiados adsorbieron cerca del 100% de los 400 mg/L de tinte con los que se pusieron en contacto, con la excepción de Sepabeads-EP. Se deduce que los soportes que contienen grupos amino, que son la mayoría de los soportes estudiados, adsorben el tinte Orange II en gran extensión. La adsorción probablemente se produce entre los grupos amino y los grupos sulfónicos de las moléculas de Orange II.

4. Conclusiones

La selección de un soporte para la inmovilización enzimática es un proceso basado tradicionalmente en ensayo y error. Se realizaron ensayos con una gran variedad de soportes de distintas naturalezas, activados a partir de dos soportes base: agarosa, un gel polimérico con grupos alcohólicos en su superficie; y Sepabeads, una resina epoxiacrítica con buenas propiedades mecánicas. Se analizaron una serie de factores a partir de los derivados obtenidos, y los

resultados se consideraron para la selección del derivado más adecuado para su aplicación en la degradación enzimática de Orange II.

En primer lugar, se analizó la capacidad de retención de la enzima y, de forma paralela, la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de inmovilización. Los derivados basados en interacciones iónicas presentaron una alta retención enzimática, excepto el soporte Sepabeads-IDA, y mantuvieron la actividad durante el proceso. Dentro de estos, los soportes policationicos ofrecieron enlaces más fuertes. Por el contrario, el derivado de agarosa-dextrano-aspártico presentó una muy fácil desorción; sin embargo, la fuerza iónica necesaria para producir la desorción y la reversibilidad de los enlaces es muy superior a la fuerza iónica presente en el medio de degradación de Orange II, como indicaron los valores de conductividades para ambas disoluciones. Esto permite considerar este derivado como una alternativa para la inmovilización de MnP. Entre los derivados basados en enlaces covalentes, sólo el de agarosa-glutaraldehído y agarosa-amino consiguieron una retención total, pero las condiciones de inmovilización fueron severas y afectaron a la estabilidad enzimática en proporciones del 50 y 60% respectivamente. El derivado de agarosa-amino implicó la oxidación de los grupos alcohólicos presentes en los azúcares situados alrededor de las enzimas y el posterior bloqueo de los grupos que no reaccionaron con el soporte. Dado que el grado de glicosilación de la enzima es un factor dependiente en gran medida de las condiciones de cada fermentación, el derivado obtenido de esta forma puede variar considerablemente; teniendo en cuenta esto y el hecho de que la pérdida de actividad durante el bloqueo de los grupos fue considerable, se desestimó este derivado como posible opción a la inmovilización de la enzima.

Como segundo factor se analizó la estabilidad de los derivados frente a la temperatura. Los soportes policationicos dieron lugar a derivados de muy baja estabilidad. Por el contrario, el derivado aniónico de agarosa-dextrano-aspártico presentó una estabilidad superior a la de la enzima soluble, y el de agarosa-glutaraldehído mantuvo también una estabilidad aceptable, con lo cual se consideraron estos dos últimos soportes como candidatos para la inmovilización de MnP.

Para llevar a cabo el proceso de decoloración de Orange II mediante enzima MnP inmovilizada, se pretende que la interacción entre el tinte y el soporte sea nula, para evitar fenómenos de adsorción que enmascaren el propio proceso de

degradación del tinte. Se consideró como tercer factor la interacción entre ambos, pero no fue factor determinante, pues los dos soportes fueron capaces de adsorber casi el 100% de la concentración de tinte considerada, que fue 4 veces superior a la empleada en los ensayos de decoloración.

Como factores adicionales se deben tener en cuenta el coste del soporte y la facilidad del proceso de activación y posterior inmovilización de la enzima. Ambos soportes fueron activados a partir de agarosa, con lo cual el coste no fue un factor determinante. Sin embargo, sí hubo una considerable diferencia en la dificultad de activación. El proceso de activación del soporte de agarosa-dextrano-aspartico es laborioso y de aproximadamente 15 d de duración, mientras que los soportes de agarosa-glutaraldehido se pueden activar en 3 d. Teniendo en cuenta la posibilidad de aplicación del proceso de decoloración a escala industrial, son necesarias grandes cantidades de enzima inmovilizada fresca para reponer la enzima consumida durante el proceso, con lo cual la sencillez de activación del soporte se convierte en una prioridad. Debido a esto, se consideró el soporte de agarosa-glutaraldehido como el más adecuado para la inmovilización de MnP y posterior aplicación en la decoloración en continuo de Orange II.

El soporte agarosa-glutaraldehido interacciona covalentemente con la enzima, de manera que da lugar a enlaces multipuntuales fuertes tipo base de Schiff entre los grupos aldehido del soporte y los grupos amino de la enzima. Esto aporta la ventaja de que la retención es fuerte y la enzima no se desorbe del soporte; como contrapartida, el proceso no es reversible y el soporte no es recuperable.

5. Referencias

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. and Gübitz, G. M. (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8), 3357-3362.
- Bar-Eli, A. and Katchalski, E. (1960) A water-insoluble trypsin derivative and its use as a trypsin column. *Nature* **188**, 856-857.
- Blandino, A., Macías, M. and Cantero, D. (2000) Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 319-324.
- Bornscheuer, U. T. (2003) Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. *Angewandte Chemie, International Edition* **42**(29), 3336-3337.

Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A. and Gianfreda, L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **6179**, 1-25.

Gianfreda, L. and Scarfí, M. R. (1991) Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry* **109**, 97-128.

Godjevargova, T., Dayal, R. and Turmanova, S. (2004) Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. *Macromolecular Bioscience* **4**, 950-956.

Grabski, A. C., Coleman, P. L., Drtina, G. J. and Burgess, R. R. (1995) Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on azlactone-functional polymers and generation of Mn³⁺ by the enzyme-polymer complex. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **55**, 55-73.

Guisán, J. M., Bastida, A., Blanco, R. M., Fernández-Lafuente, R. and García-Junceda, E. (1997) Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. Reduction of steric problems. In: *Methods in Biotechnology. Immobilization of Enzymes and Cells*. Bickerstaff, G. F. Totowa (N.J.), Humana Press Inc. **1**: 261-275.

Illanes, A., Wilson, L. and Tomasello, G. (2000) Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 270-278.

Katchalski-Katzir, E. and Kraemer, D. M. (2000) Eupergit^R C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 157-176.

Krajewska, B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 126-139.

Li, B. and Takahashi, H. (2000) New immobilization method for enzyme stabilization involving a mesoporous material and an organic/inorganic hybrid gel. *Biotechnology Letters* **22**, 1953-1958.

Mateo, C., Abián, O., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J. M. (2000a) Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 509-515.

Mateo, C., Abián, O., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J. M. (2000b) Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnology and Bioengineering* **68**(1), 98-105.

Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abián, O., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J. M. (2000c) Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* **1**, 739-745.

Mielgo, I., Palma, C., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2003) Covalent immobilisation of manganese peroxidases (MnP) from

Phanerochaete chrysosporium and *Bjerkandera* sp. BOS55. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 769-775.

Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D. N. and Moazami, N. (1999) Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decombens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **15**, 501-502.

Oh, J. T. and Kim, J. H. (2000) Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on non-porous PS/PNaSS microspheres. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 356-361.

Olea, D. and Faure, C. (2003) Quantitative study of the encapsulation of glucose oxidase into multilamellar vesicles and its effect on enzyme activity. *Journal of Chemical Physics* **119**(12), 6111-6118.

Palmieri, G., Giardina, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberini, M. and Sannia, G. (1994) A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 151-158.

Peralta-Zamora, P., Gomes de Moraes, S., Esposito, E., Antunes, R., Reyes, J. and Durán, N. (1998) Decolorization of pulp mill effluents with immobilized lignin and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Technology* **19**, 521-528.

Reischwitz, A., Reh, K. D. and Buchholz, K. (1995) Unconventional immobilization of dextranase with alginate. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 457-461.

Sasaki, T., Kajino, T., Li, B., Sugiyama, H. and Takahashi, H. (2001) New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(5), 2208-2212.

Tanriseven, A., Uludag, Y. B. and Dogan, S. (2002) A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 406-409.

van Aken, B., Ledent, P., Naveau, H. and Agathos, S. N. (2000) Co-immobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* and glucose oxidase from *Aspergillus niger* on porous silica beads. *Biotechnology Letters* **22**, 641-646.

van de Velde, F., Lourenco, N. D., Pinheiro, H. M. and Bakker, M. (2002) Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Advances Synthesis & Catalysis* **344**(8), 815-835.

Vodopivec, M., Berovic, M., Jancar, J., Podgornik, A. and Strancar, A. (2000) Application of convective interaction media disks with immobilised glucose oxidase for on-line glucose measurements. *Analytica Chimica Acta* **407**, 105-110.

Wheatley, J. B. and Schmidt Jr., D. E. (1999) Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. *Journal of Chromatography A* **849**, 1-12.

Capítulo 6

Degradación en continuo de Orange II en un reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada

Resumen

En este capítulo se desarrolla un proceso de degradación en continuo del tinte Orange II mediante un reactor de tanque agitado con MnP inmovilizada sobre un soporte de agarosa-glutaraldehído. La optimización del sistema se centró en el aumento de la estabilidad de la enzima y de la eficacia del proceso de decoloración. Se estudió la estabilidad enzimática frente a factores tales como agitación, temperatura y velocidad de adición de H_2O_2 . Para mejorar la eficacia del proceso el reactor se operó con diferentes concentraciones de Orange II (50-200 mg/L) y diferentes tiempos de residencia hidráulicos (1-2 h). Las mejores condiciones permitieron alcanzar una decoloración superior al 80% con una eficacia de 29,3 mg de Orange II/U, valor superior al hallado en el reactor enzimático de membrana. Por último, se modificó la ecuación cinética propuesta en el Capítulo 3 y se aplicó a los ensayos en continuo con enzima inmovilizada, de manera que se obtuvo un buen ajuste entre los datos experimentales y teóricos.

Índice

1. Introducción	167
2. Materiales y métodos	168
2.1. Inmovilización de MnP	168
2.2. Saturación de los derivados	169
2.3. Estabilidad de los derivados	169
2.4. Operación en continuo	170
2.5. Técnicas analíticas	171
3. Resultados y discusión	172
3.1. Saturación de los derivados	172
3.2. Estabilidad de los derivados	174
3.3. Operación en continuo	176
3.4. Operación en estado no estacionario	179
3.5. Modelización	181
4. Conclusiones	184
5. Referencias	186

1. Introducción

La principal ventaja de la utilización de enzimas inmovilizadas es que permiten la catálisis heterogénea de reacciones enzimáticas. A partir de este hecho derivan otras ventajas económicas, ecológicas y toxicológicas, que se han tratado más detalladamente en el Capítulo 5. Sin embargo, los procesos de inmovilización enzimática a menudo son complejos y encarecen el coste total de un proceso industrial. Para que los reactores enzimáticos basados en técnicas de inmovilización sean económicamente viables, es conveniente que cumplan una serie de requisitos:

- i)* La actividad específica del derivado, en términos de unidades de enzima por g de soporte empleado, debe ser lo más elevada posible
- ii)* El soporte puede emplearse para desempeñar otra función paralela, generalmente de separación entre sustratos y productos, de forma que se favorezca la cinética de la reacción
- iii)* El soporte debe tener resistencia mecánica y no debe interaccionar con los sustratos de la reacción enzimática

Las reacciones enzimáticas basadas en el empleo de enzimas inmovilizadas se pueden llevar a cabo en diferentes configuraciones de reactor: *i)* reactores de lecho fijo con flujo descendente; *ii)* reactores de lecho fluidizado, con flujo ascendente; *iii)* reactores con enzima inmovilizada sobre una membrana; *iv)* reactores de tanque agitado. La selección del reactor más adecuado es función de la propia reacción deseada, aunque también del tipo de soporte y del derivado que se obtiene tras la unión de este a la enzima. Así, en ocasiones, soportes que son muy adecuados para formar un lecho fijo, una vez unidos a la enzima pierden esta capacidad; por el contrario, partículas que se suspenden adecuadamente formando un lecho fluidizado, cuando están unidas a la enzima presentan tendencia a agregarse. Como consecuencia, se hace necesario un mayor caudal de influente para mantener la fluidización, disminuyendo así el área superficial de intercambio y, por lo tanto, la actividad catalítica.

A nivel industrial, es escasa la información que se ha hecho pública acerca de procesos biocatalíticos en que se emplean enzimas inmovilizadas. A menudo, las grandes compañías no ofrecen información acerca de los métodos que

emplean para la inmovilización de los biocatalizadores (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000). En el campo medioambiental, se han realizado estudios acerca de la degradación de compuestos recalcitrantes, principalmente compuestos fenólicos, en reactores operados en continuo basados en la utilización de enzima inmovilizada (Tabla 6.1). Para la inmovilización del biocatalizador se emplearon métodos tanto físicos, basados en fenómenos de adsorción, como químicos, basados en uniones covalentes, en reactores de lecho fijo, de lecho fluidizado y de membrana.

Tabla 6.1. Procesos en continuo basados en el empleo de enzimas inmovilizadas

<i>Enzima</i>	<i>Método de inmovilización</i>	<i>Configuración de reactor</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Referencia</i>
Lacasa	Adsorción	Reactor de membrana	Degradación de fenoles	Lante <i>et al.</i> , 2000
Lacasa	Covalente	Lecho fluidizado	Degradación de fenoles	Hublik & Schinner, 2000
Lacasa y tirosinasa	Adsorción	Lecho fijo	Degradación de fenoles	Krastanov, 2000
MnP	Adsorción	Lecho fijo	Bioblanqueo	Sasaki <i>et al.</i> , 2001
MnP	Covalente	Lecho fijo	Oxidación de clorofenoles	Grabski <i>et al.</i> , 1998

En este capítulo se desarrolla un reactor continuo de tanque agitado con enzima MnP inmovilizada sobre un soporte activado con grupos glutaraldehido, para la degradación del tinte Orange II.

2. Materiales y métodos

2.1. Inmovilización de MnP

La enzima MnP se inmovilizó en geles de agarosa-glutaraldehido de alta activación. La agarosa con grado de entrecruzamiento del 6% fue suministrada por Iberagar-Sociedade Luso-Espanhola de Coloides Marinhos S.A. (Coima, Portugal). Se activó para obtener una agarosa-glutaraldehido de alta densidad de

grupos aldehído (75 $\mu\text{mol/mL}$) (Guisán *et al.*, 1997; Mielgo *et al.*, 2003), tal como se describió en el Capítulo 5. El proceso de inmovilización se llevó a cabo añadiendo 100 g (142 mL) de soporte activado a una disolución de fosfato de sodio 5 mM pH 7 y MnSO_4 0,5 mM, conteniendo el crudo enzimático (alrededor de 80 g de proteína, que corresponden a 200 U de MnP). La mezcla se agitó a 60 rpm a temperatura ambiente. Tras 2 h, cuando ya no se detectó actividad MnP en el sobrenadante, se detuvo la reacción por medio de la adición de 100 mL de bicarbonato sódico 200 mM pH 8,1 y 10 mg de borohidruro sódico por g de soporte. Una vez transcurridos 20 min, se añadieron otros 10 mg de borohidruro por g de soporte y tras 1 h el derivado se lavó con 1 L de acetato de sodio 0,1 M pH 5 y abundante agua destilada.

2.2. Saturación de los derivados

Con el objetivo de minimizar la cantidad de soporte necesaria para inmovilizar la enzima, se realizaron experimentos de saturación del soporte con MnP. Para ello se añadió MnP durante el proceso de inmovilización, hasta que se detectó enzima en el sobrenadante.

En cuanto a la interacción entre el derivado y el tinte Orange II, se realizaron ensayos con el objetivo de conocer la cantidad de tinte necesaria para saturar el soporte, considerando tanto el derivado saturado como el no saturado de enzima. Los ensayos se llevaron a cabo añadiendo pulsos de 125 μL de una disolución de Orange II de 20 g/L a 5 mL de mezcla del derivado en agua, en proporción adecuada para que la actividad MnP resultante fuese de 200 U/L, que corresponde a la actividad inicial comúnmente utilizada en los ensayos de degradación. Se realizó un control en paralelo sin derivado. Se midió la concentración de Orange II en el control y en el sobrenadante hasta que todo el tinte adicionado se detectó en el sobrenadante, es decir, hasta que el derivado alcanzó la saturación. El tinte adsorbido por g de derivado se calculó como la diferencia entre la cantidad de Orange II en el control y la cantidad de Orange II en el sobrenadante una vez alcanzada la saturación.

2.3. Estabilidad de los derivados

El efecto de condiciones tales como temperatura y agitación en la estabilidad de los derivados se estudió en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de

agua con la cantidad de derivado apropiada para que la actividad inicial de MnP fuese de 200 U/L. Los ensayos se llevaron a cabo mediante dos alternativas de agitación: magnética y de palas; con una velocidad de agitación tal que proporcionase el mismo efecto sobre los derivados de agarosa-glutaraldehído. Se realizaron dos controles en paralelo sin agitación: en uno de ellos el derivado se disolvió en agua; en el otro se disolvió en una disolución de oxalato de sodio 1 mM pH 4,5 y MnSO_4 33 μM . Para observar el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima inmovilizada, este ensayo se llevó a cabo a dos temperaturas diferentes: 4°C y temperatura ambiente (22°C). La actividad MnP se determinó durante 8 d.

El H_2O_2 es un cosustrato de MnP, pero puede causar su desactivación si la concentración de H_2O_2 es elevada. El efecto de la velocidad de adición de H_2O_2 sobre la estabilidad de la enzima libre e inmovilizada se estudió en matraces Erlenmeyer con 25 mL del medio conteniendo 1 mM de oxalato sódico pH 4,5, 33 μM de MnSO_4 y enzima libre o inmovilizada con una actividad inicial de 200 U/L. La disolución de H_2O_2 se bombeó a 24 $\mu\text{L}/\text{min}$ con cuatro velocidades de adición diferentes: 15, 25, 50 y 100 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$. La actividad MnP se midió durante 8 h.

2.4. Operación en continuo

El proceso en continuo se estudió en base a dos configuraciones de reactor: un reactor continuo de tanque agitado y un reactor de lecho fluidizado (Figura 6.1).

Se operó con un reactor continuo de tanque agitado de 100 mL con un filtro de pipeta colocado en la corriente de efluente para retener la enzima inmovilizada en el interior del reactor. Se bombearon al reactor dos disoluciones: *i*) la disolución de alimentación, constituida por oxalato sódico 1 mM pH 4,5, MnSO_4 33 μM y Orange II a diferentes concentraciones (50-200 mg/L); *ii*) la disolución de H_2O_2 a un flujo de 24 $\mu\text{L}/\text{min}$ y una concentración tal que la velocidad de adición fue de 15 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$. Se aplicaron diferentes tiempos de residencia hidráulicos (TRH), entre 1 y 2 h, de manera que la velocidad de carga de Orange II (VCO) varió entre 50 y 200 mg/L·h. Se midió la concentración de Orange II durante el ensayo, pero no fue posible determinar la actividad MnP debido a la fuerte interacción entre el derivado y el tinte, que impidió la medida de

absorbancia a la longitud de onda de 468 nm, empleada para la determinación de la actividad MnP. Los ensayos se detuvieron cuando la concentración de Orange II en el sobrenadante alcanzó la concentración en la disolución de alimentación, lo que fue una indicación de que desapareció la actividad enzimática.

Se operó en un reactor de lecho fluidizado de 180 mL con enzima inmovilizada. Se alimentaron las dos disoluciones consideradas en los ensayos del reactor de tanque agitado, y se aplicó un TRH de 1 h, para lo cual se consideró una velocidad de alimentación de 3 mL/min. Para conseguir una buena fluidización del lecho fue necesario incorporar una corriente de recirculación; sin embargo, la heterogeneidad de forma y masa del derivado dificultó la fluidización, quedando retenida una alta proporción de soporte en la capa inferior y superior del reactor, mientras que el porcentaje de derivado fluidizado fue mínimo. Por este motivo se descartó la operación en este tipo de reactor con el derivado considerado.

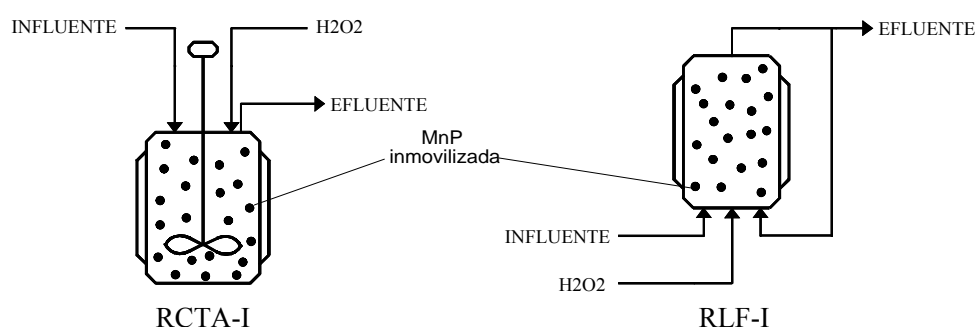


Figura 6.1. Configuraciones de reactor para la degradación de Orange II con enzima inmovilizada. RCTA-I: reactor continuo de tanque agitado; RLF-I: reactor de lecho fluidizado

2.5. Técnicas analíticas

La concentración de Orange II se midió espectrofotométricamente. La actividad MnP se midió por espectrofotometría mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol. La medida de MnP en las suspensiones se realizó mediante agitación magnética en la celda del espectrofotómetro. La muestra para la medida de MnP en el sobrenadante se tomó mediante filtros de punta de pipeta de 0,45 μm Lida (Wisconsin, EEUU). Las técnicas espectrofotométricas se describieron en el Capítulo 2 de Materiales y métodos.

3. Resultados y discusión

3.1. Saturación de los derivados

Saturación con MnP

Uno de los principales inconvenientes en el desarrollo de una estrategia de reacción en continuo mediante enzimas inmovilizadas reside en el coste del soporte. Por lo tanto, la minimización de la cantidad de soporte requerida se convierte en un objetivo primordial. Antes del desarrollo de la metodología para la degradación de Orange II, se intentó maximizar la actividad MnP que puede quedar retenida en el soporte, mediante la adición de enzima en el proceso de inmovilización hasta que se detectó actividad en el sobrenadante. La actividad específica obtenida en los ensayos de inmovilización previos con agarosa-glutaraldehído, resultante de la inmovilización de 600 U/L de enzima en una relación 1:3 soporte:derivado, fue de 1,2 U/g. Tras la saturación del derivado con MnP, ese valor se incrementó 9 veces, hasta 10,4 U/g.

Saturación con Orange II

La posible interacción entre el tinte y la enzima inmovilizada es un aspecto que gana importancia cuando se trabaja en procesos discontinuos. La concentración de tinte en el sobrenadante disminuye debido a la adsorción en el soporte o al propio proceso de degradación enzimática. Sin embargo, cuando se trabaja en una operación en continuo, esta interacción pierde importancia, pues una vez el derivado ha sido completamente saturado con Orange II, todo el tinte que desaparece está siendo degradado.

Aun así, se llevaron a cabo ensayos con el objetivo de conocer la cantidad de tinte necesaria para saturar 1 g de soporte. Los dos derivados, no saturado (1,2 U/g) y saturado (10,4 U/g) con enzima, se añadieron a agua con una proporción tal que la concentración final de enzima fue de 200 U/L, valor empleado en los ensayos de decoloración. Así, se suspendieron 0,9 y 0,1 g de derivado, respectivamente, en un volumen total de 5 mL. La Figura 6.2 representa la concentración de Orange II adsorbido en cada derivado y la correspondiente al Orange II medido en el sobrenadante.

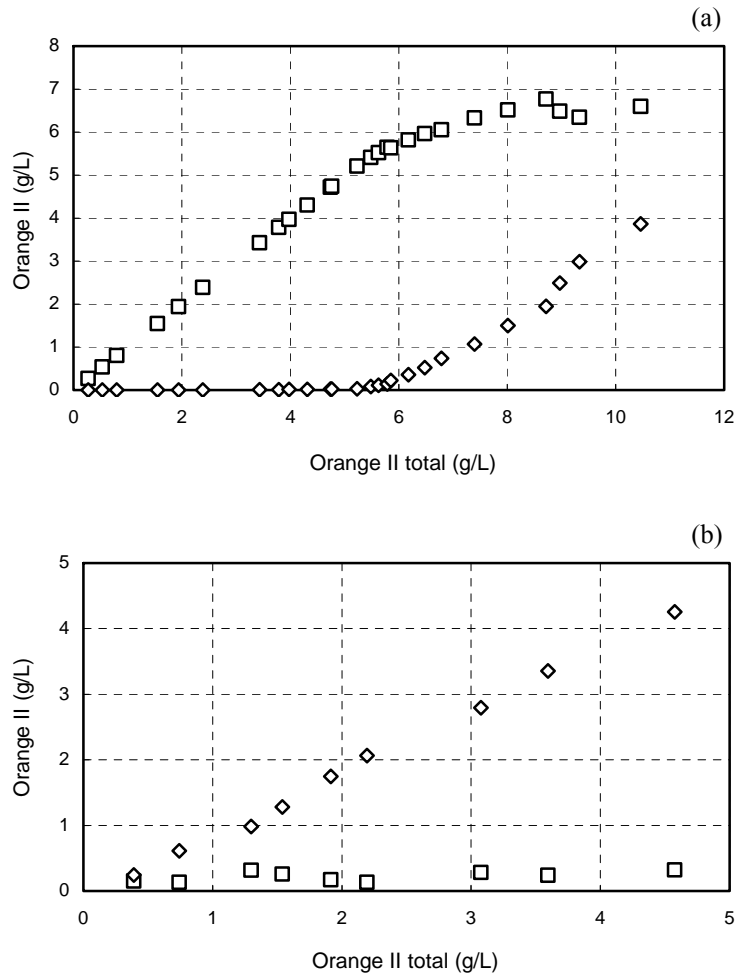


Figura 6.2. Isothermas de adsorción: (□) Orange II adsorbido; (◇) Orange II en el sobrenadante. (a) derivado no saturado con MnP; (b) derivado saturado con MnP

El Orange II total adsorbido por el derivado se hizo constante cuando el derivado se saturó por completo. Las Figuras 6.2a y 6.2b muestran que esos valores son aproximadamente 6,5 y 0,22 g/L de Orange II. Considerando el total de enzima inmovilizada en el medio, la adsorción de Orange II fue de 0,054 y 0,013 g Orange II/g de derivado, respectivamente. Estos datos indican que es favorable trabajar con el derivado previamente saturado de MnP, no sólo porque es necesaria una menor cantidad de soporte, sino también porque se adsorbe una menor cantidad de Orange II.

3.2. Estabilidad de los derivados

Efecto de la agitación y temperatura

La inmovilización puede favorecer la resistencia térmica y mecánica de la enzima; sin embargo, en ocasiones la unión entre la enzima y el soporte puede cambiar la conformación de la enzima, de manera que puede perder resistencia. Con el objetivo de comprobar la resistencia de la enzima a diferentes tipos de agitación (magnética y de palas), se suspendieron 480 mg de derivado en un volumen total de 25 mL y se midió la actividad MnP durante 8 d. Se realizaron dos controles en paralelo sin agitación, uno de ellos disolviendo el derivado en agua y el otro usando una disolución de MnSO_4 y oxalato, que aumentan la estabilidad de la enzima. Los resultados se muestran en la Figura 6.3.

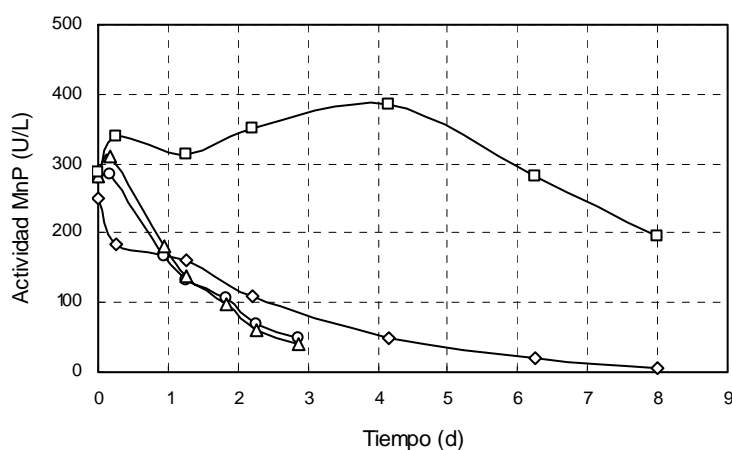


Figura 6.3. Estabilidad de MnP inmovilizada a temperatura ambiente: (Δ) agitación magnética; (○) agitación de palas; (◇) sin agitación; (□) sin agitación, en presencia de oxalato y MnSO_4

La agitación, tanto magnética como de palas, apenas afectó a la estabilidad de la enzima inmovilizada. Sin embargo, se observó que la enzima es más estable cuando se diluye en una disolución de MnSO_4 y oxalato a pH 4,5, como ocurre cuando se trabaja con enzima libre. En presencia de estos compuestos la enzima inmovilizada se mantuvo durante más de 4 d sin pérdida de actividad, mientras que en su ausencia y con agitación, la pérdida de actividad fue de 100 U/L·d.

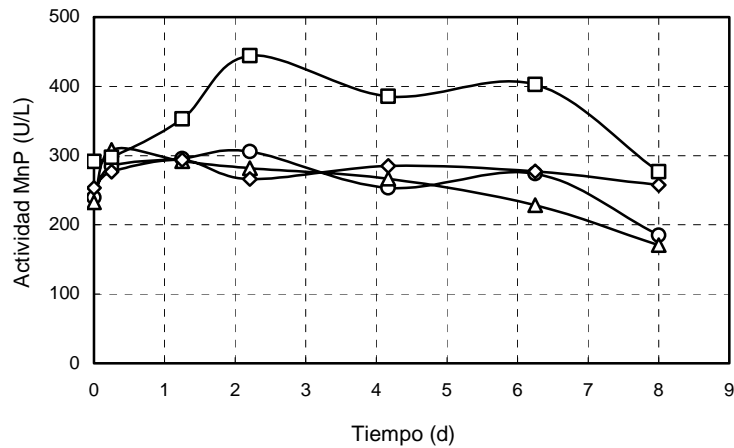


Figura 6.4. Estabilidad de MnP inmovilizada a 4°C: (Δ) agitación magnética; (○) agitación de palas; (◇) sin agitación; (□) sin agitación, en presencia de oxalato y MnSO₄

Se llevaron a cabo ensayos similares a 4°C (Figura 6.4), pero no se observó una caída de la actividad enzimática en ninguna de las condiciones estudiadas a lo largo de los 8 d. Por lo tanto, una baja temperatura de trabajo permite mantener la estabilidad enzimática durante más tiempo; como contrapartida, las altas temperaturas mejoran la cinética de la reacción. Por lo tanto, se consideraron como condiciones más adecuadas para la operación en continuo del reactor enzimático la agitación magnética, por ser de operación más sencilla, y la temperatura ambiente ($22\pm 2^\circ\text{C}$).

Efecto de la velocidad de adición de H₂O₂

Debido a la menor accesibilidad de los sustratos a la enzima inmovilizada en un soporte, la transferencia de materia en la reacción enzimática y, por lo tanto, la cinética, son más lentas que las de la enzima libre. Un incremento en la velocidad de adición de H₂O₂ debería aumentar la velocidad de la reacción enzimática, pero una concentración elevada de H₂O₂ puede afectar a la estabilidad de la enzima libre (Wariishi *et al.*, 1988). La nueva conformación de la enzima inmovilizada podría proteger la zona donde actúa el H₂O₂, aumentando su estabilidad frente al mismo, o bien debilitar esa zona, disminuyendo la estabilidad de la enzima.

La pérdida de actividad en MnP libre e inmovilizada se estudió en ensayos con diferentes velocidades de adición de H₂O₂ (15, 25, 50 y 100 μmol/L·min). El medio de reacción consistió en oxalato 1 mM pH 4,5, MnSO₄ 33 μM y una actividad MnP inicial de 200 U/L. Se midió la actividad de la suspensión hasta que no se detectó enzima.

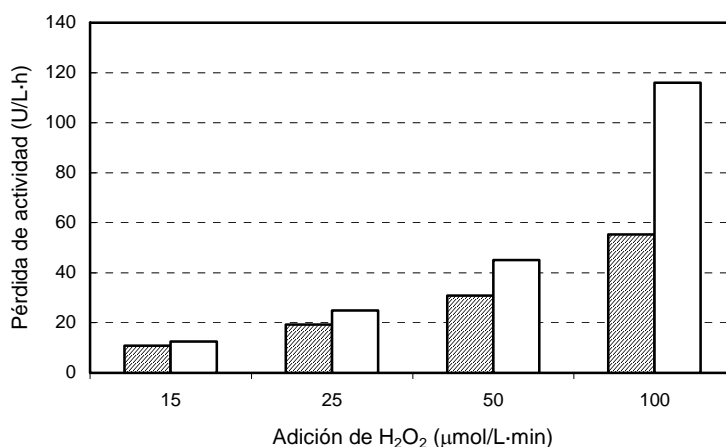


Figura 6.5. Pérdida de actividad enzimática debida a la adición de H₂O₂ a diferentes velocidades de adición. Barras rayadas: MnP libre; barras vacías: MnP inmovilizada

Al trabajar a velocidades de adición de H₂O₂ bajas, la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada es prácticamente la misma que la pérdida de enzima libre (Figura 6.5). Sin embargo, a mayor velocidad de adición, mayor diferencia entre MnP libre e inmovilizada. Se seleccionó para los ensayos posteriores la velocidad de adición de 15 μmol/L·min, que ya se había empleado en la decoloración en continuo con enzima libre.

3.3. Operación en continuo

Tras la selección de las mejores condiciones estudiadas (derivado saturado con MnP, temperatura ambiente, agitación magnética y adición de 15 μmol/L·min de H₂O₂), se desarrolló un proceso de degradación en continuo de Orange II. El sistema consistió en un reactor continuo de tanque agitado donde la enzima se retuvo en el reactor por medio de un pequeño filtro de punta de pipeta (Figura 6.6). El objetivo del trabajo fue la maximización de la eficacia del proceso,

definida como la relación entre los mg de Orange II degradados por unidad de enzima consumida.



Figura 6.6. Equipo para la decoloración de Orange II en un reactor de tanque agitado con MnP inmovilizada

La adsorción del tinte Orange II sobre el soporte de agarosa-glutaraldehído empleado para la inmovilización de MnP provocó una serie de problemas: *i*) durante la etapa inicial del proceso, en que el soporte no estaba saturado, la disminución de color en el efluente fue debida a dos procesos que se superponen: la adsorción y la degradación enzimática; *ii*) no fue posible hacer un seguimiento de la actividad enzimática, porque el soporte con el tinte adsorbido presenta absorbancia a la misma longitud de onda en que se determina la actividad MnP; debido a esto, no se pudo mantener una concentración constante de enzima en el interior del reactor, por tanto fue imposible alcanzar un estado estacionario. Estos problemas obligaron a trabajar bajo una serie de condiciones. En primer lugar, se evitó discernir entre el Orange II degradado y adsorbido durante los primeros momentos del ensayo, durante un tiempo que se pudo calcular en base a la capacidad teórica máxima de adsorción del soporte. Por otra parte, no se midió la actividad MnP, y se consideró como valor de decoloración en estado estacionario aquel alcanzado tras la saturación del soporte. Cuando la concentración de Orange II comenzó a aumentar, se consideró que los valores de actividad enzimática eran insuficientes para mantener un estado estacionario. Aun así, se realizó el

seguimiento de la reacción hasta que la concentración en el efluente alcanzó a la del influente (Figura 6.7).

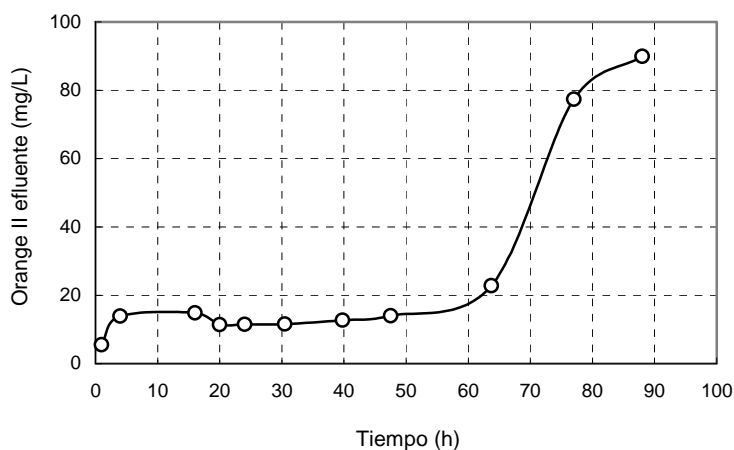


Figura 6.7. Ensayo de decoloración en continuo con enzima MnP inmovilizada

Se realizaron ensayos intentando conseguir un aumento de la eficacia del sistema por medio de la modificación de los valores de velocidad de carga de Orange II (VCO), de la misma manera que se había realizado en el reactor enzimático de membrana. Para ello se modificó el tiempo de residencia hidráulico (TRH) y la concentración de Orange II en el influente. La Tabla 6.2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6.2. Datos comparativos de procesos de decoloración en continuo a diferentes velocidades de carga de Orange II (VCO)

<i>Orange II</i> <i>influyente (mg/L)</i>	<i>TRH</i> <i>(h)</i>	<i>VCO</i> <i>(g/L·h)</i>	<i>Decoloración</i> <i>(%)</i>	<i>Eficacia</i> <i>(mg/U)</i>
100	1	0,1	82	29,3
100	2	0,05	86	15,5
50	1	0,05	77	13,7
100	1	0,1	82	29,3
200	1	0,2	55	39,6

Se partió de las condiciones empleadas en los ensayos en continuo en el reactor enzimático de membrana, es decir, una concentración de 100 mg/L de Orange II en el influente y 1 h de TRH, alcanzándose una decoloración del 82%. Se disminuyó la VCO de 0,1 a 0,05 g/L·h mediante un aumento del TRH a 2 h, pero no se alcanzó una importante mejora de la decoloración y la eficacia del sistema disminuyó de 29,3 a 15,5 mg/U. Se obtuvo el mismo resultado cuando la VCO se disminuyó a 0,05 g/L·h por medio de la reducción de la concentración de Orange II en la alimentación. Por otra parte, un incremento de 0,1 a 0,2 g/L·h causó una mejora de la eficacia del proceso de 29,3 a 39,6 mg/U, aunque el porcentaje de degradación bajó del 82 al 55%. Por lo tanto, al trabajar con 100 mg/L de tinte y 1 h de TRH el sistema alcanza buenos resultados de decoloración y eficacia (82% y 29,3 mg/U, respectivamente), siendo esta incluso mayor que la obtenida durante el tratamiento en continuo de Orange II con enzima libre en las mismas condiciones (20 mg/U) (López *et al.*, 2004).

3.4. Operación en estado no estacionario

El estudio del comportamiento del reactor en estado no estacionario da información acerca de la estabilidad del sistema. Se realizó un ensayo de 42 h de duración, por etapas, de manera que se detuvo la reacción y se retomó en las mismas condiciones al día siguiente. El propósito de este modo de operación fue realizar todas las perturbaciones antes de que la actividad de la enzima inmovilizada fuese nula, ya que no hubo reemplazo ni adición de enzima fresca. Se aplicaron las condiciones de partida recogidas en la Tabla 6.3. Se realizaron modificaciones cada 7 h durante períodos de 1 h. Dichas modificaciones correspondieron a parámetros de operación tales como la concentración de Orange II en el influente, velocidad de adición de H₂O₂ y TRH, multiplicando sus valores usuales por factores de 0,5 y 2. Se realizó un seguimiento de la concentración de Orange II en el efluente.

Tabla 6.3. Condiciones del ensayo de decoloración con sobrecargas

Volumen	100 mL	Concentraciones alimentación	
TRH	60 min	Orange II	100 mg/L
MnP	200 U/L	MnSO ₄	33 μM
Velocidad adición H ₂ O ₂	15 μmol/L·min	Ácido oxálico	1 mM
Caudal alimentación	1,67 mL/min		

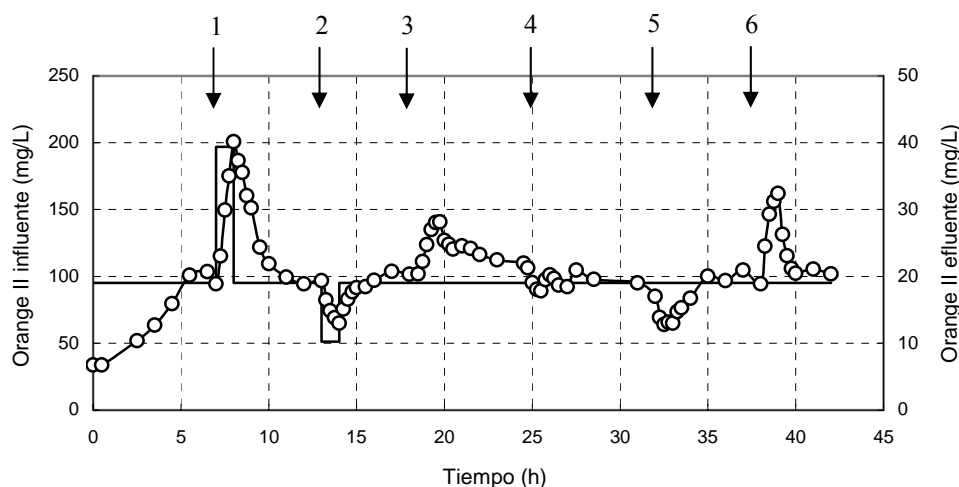


Figura 6.8. Ensayo de decoloración con sobrecargas: (-) Orange II en el influente; (○) Orange II en el efluente. Pulsos: (1) Orange II 200 mg/L; (2) Orange II 50 mg/L; (3) H₂O₂ 7,5 µmol/L·min; (4) H₂O₂ 30 µmol/L·min; (5) TRH 120 min; (6) TRH 30 min

Durante las primeras 5 h de ensayo, hubo una superposición de dos efectos: la adsorción de Orange II en el derivado y la degradación del tinte por la enzima MnP inmovilizada. Tras ese tiempo la concentración de Orange II en el efluente alcanzó un valor constante de 20 mg/L (Figura 6.8), de lo que se deduce que el soporte se saturó de tinte y el único proceso responsable de la eliminación de color fue la degradación enzimática. Una vez estabilizado el proceso, se realizó una sobrecarga de la concentración de tinte en la alimentación, que pasó de 100 a 200 mg/L, de manera que se duplicó la VCO de 0,1 a 0,2 g/L·h (Sobrecarga 1 en Figura 6.8). El resultado fue un aumento de la concentración de tinte en el efluente hasta 40 mg/L. Cuando cesó el pulso, el sistema recuperó el estado estacionario en unas 3 h. Por el contrario, una disminución de la VCO a la mitad (Sobrecarga 2 en Figura 6.8) dio lugar a un aumento de la decoloración, recuperándose de nuevo el sistema en menos de 3 h una vez hubo finalizado la perturbación. Respuestas similares se obtuvieron cuando la VCO se modificó por medio de la variación del TRH a valores del doble y la mitad del valor inicial (Sobrecargas 5 y 6), con rápidas recuperaciones. Cuando la velocidad de adición de H₂O₂ disminuyó a la mitad, la concentración de Orange II aumentó, aunque el efecto fue menor que el causado por las variaciones de VCO (Sobrecarga 3). Sin embargo, cuando se duplicó la adición de H₂O₂, apenas se observó el efecto en la decoloración. Esto es debido a que el H₂O₂ adicionado es suficiente para degradar

la carga de tinte que entra al sistema, y un aumento de la velocidad de adición de H_2O_2 sólo consigue desestabilizar la enzima y aumentar la pérdida de actividad.

3.5. Modelización

Con el objetivo de obtener una ecuación de diseño que permita simular los datos experimentales y predecir el comportamiento del sistema ante posibles perturbaciones, se realizó la modelización del proceso de degradación de Orange II mediante un reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada. El empleo de enzima inmovilizada parece conllevar de partida una disminución de la velocidad de degradación, pero además implica otra serie de desventajas, que dificultan el proceso de modelización: *i)* la adsorción del tinte en el soporte de inmovilización invalida los valores tomados durante el período en que dicho fenómeno enmascara el proceso de degradación; esto implica que no se pueda aplicar el método de las velocidades iniciales para obtener los parámetros cinéticos; *ii)* debido a la absorbancia que presenta el soporte cargado con tinte, no se puede determinar la actividad enzimática durante el proceso, de manera que no hay adición de enzima fresca y la pérdida de actividad hace que no se prolongue el estado estacionario.

Para este fin se empleó una ecuación cinética basada en una relación de Michaelis-Menten con respecto al sustrato Orange II y una función lineal de la velocidad de adición de H_2O_2 (Ecuación 1), tal como se dedujo en el Capítulo 3.

$$r = \frac{r_m S}{K_M + S} (K_{H_2O_2} + Q_{H_2O_2}) \quad (1)$$

donde r_m es la velocidad máxima, K_M es la constante de Michaelis-Menten con respecto a Orange II, S es la concentración de Orange II, $K_{H_2O_2}$ es la constante de la función de la adición de H_2O_2 y $Q_{H_2O_2}$ es la velocidad de adición de H_2O_2 .

Dado que el modelo con enzima inmovilizada no se puede basar en el método de las velocidades iniciales, se consideró determinar los parámetros cinéticos a partir de los valores obtenidos en los estados estacionarios. En este caso, la Ecuación 1 se deriva en la Ecuación 2.

$$\frac{S_0 - S}{\tau} = \frac{r_m S}{K_M + S} (K_{H_2O_2} + Q_{H_2O_2}) \quad (2)$$

donde τ es el tiempo de residencia hidráulico. En los ensayos en continuo con MnP inmovilizada no se consideraron diferentes velocidades de adición de H_2O_2 , con lo cual la relación entre este parámetro y la velocidad de degradación no se pudo determinar a partir de los datos experimentales. Se consideró la misma función dependiente del H_2O_2 que con la enzima libre; y de la misma forma, la constante de Michaelis- Menten se tomó a partir de la ecuación cinética obtenida por medio de los ensayos en discontinuo con la enzima libre. Por lo tanto, a partir de los datos de ensayos en continuo con MnP inmovilizada, a diferentes VCO, se determinó únicamente el valor de r_m , que es el que puede estar sujeto a un cambio más acusado. Los valores considerados para cada uno de los parámetros anteriores se resumen en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Parámetros del modelo cinético en función de la concentración de Orange II y la adición de H_2O_2 , con MnP inmovilizada

r_m (mg/ μ mol)	K_M (mg/L)	$K_{H_2O_2}$ (μ mol/L·min)
0,269	58,2	2,36

Se consideró como procedimiento de resolución numérica de la Ecuación 2 el método de diferencias finitas, pues las condiciones iniciales son conocidas en cada ensayo. Se llevaron a cabo simulaciones mediante el empleo de un programa sencillo, cuya secuencia de cálculos se presentó en el Capítulo 4. La Figura 6.9 muestra la simulación de un ensayo con MnP inmovilizada. Debido a que el modelo no tiene en cuenta la adsorción inicial del tinte sobre el soporte, los valores iniciales no se ajustan a los datos experimentales, en los que se produce una fuerte adsorción. Por otra parte, debido a que el modelo considera que existe un estado estacionario con actividad MnP constante, no tiene en cuenta la caída de actividad que se produce a partir de las 70 h, y por lo tanto, no ajusta los datos experimentales, en los que se observó una pérdida de capacidad de decoloración del sistema a consecuencia de la falta de enzima.

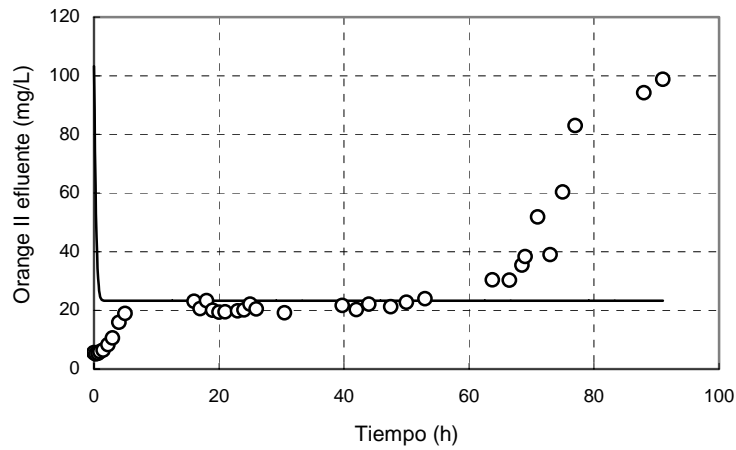


Figura 6.9. Datos experimentales (○) y simulados (-) en un ensayo con TRH de 60 min y concentración inicial de Orange II de 103,2 mg/L

Sin embargo, se puede justificar la validez del modelo comparando los datos obtenidos en los estados estacionarios. La Tabla 6.5 muestra una comparación entre los datos experimentales y los simulados.

Tabla 6.5. Comparación entre los datos experimentales y simulados en procesos continuos en estado estacionario con enzima MnP inmovilizada

<i>Orange II</i> <i>influyente (mg/L)</i>	<i>TRH</i> <i>(h)</i>	<i>VCO</i> <i>(g/L·h)</i>	<i>Decoloración</i> <i>experim. (%)</i>	<i>Decoloración</i> <i>simul. (%)</i>
100	1	0,1	82	78
100	2	0,05	86	89
50	1	0,05	77	81
100	1	0,1	82	78
200	1	0,2	55	71

Por último, se comprobó el modelo propuesto en el ensayo en que se realizaron perturbaciones del estado estacionario por medio de sobrecargas de 1 h de duración. La Figura 6.10 muestra la correlación.

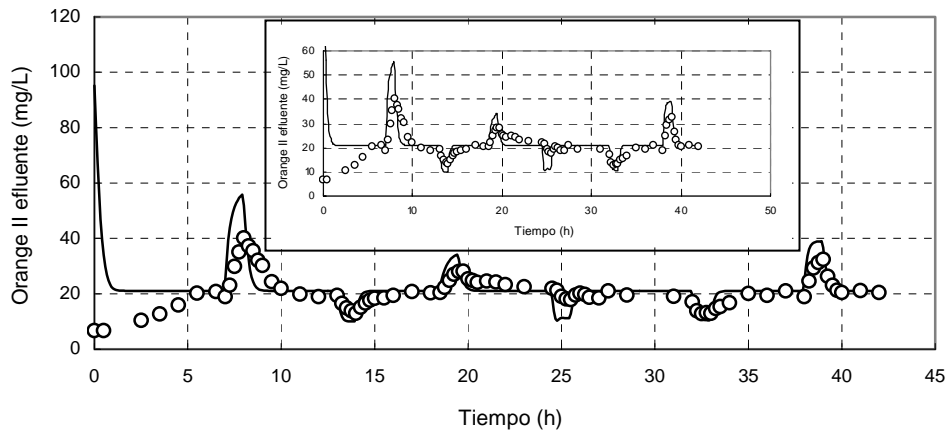


Figura 6.10. Datos experimentales (○) y simulados (-) en un ensayo con sobrecargas. TRH de 60 min y concentración inicial de Orange II de 103,2 mg/L

El modelo propuesto da una tendencia muy similar a la obtenida de forma experimental, dando mayor importancia al efecto que tiene la VCO sobre la decoloración que al efecto de la velocidad de adición de H_2O_2 . Además, las variaciones con respecto al estado estacionario son mayores cuando las modificaciones en la VCO son debidas a cambios en la concentración de Orange II en el influente que cuando se deben a variaciones del TRH.

4. Conclusiones

El principal objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un sistema para la degradación en continuo del tinte Orange II mediante MnP inmovilizada, intentando minimizar el coste total del proceso. Con este objetivo son dos los factores principales que se deben optimizar: el soporte de inmovilización y el consumo de enzima.

Se minimizaron los requerimientos de agarosa, no sólo porque el soporte es caro para un tratamiento en continuo donde la enzima consumida debe ser reemplazada constantemente por nueva enzima inmovilizada, sino también porque el Orange II se adsorbe fuertemente al soporte. La cantidad total teórica de enzima que se puede inmovilizar en el soporte de agarosa-glutaraldehido es difícil de determinar. La agarosa empleada está altamente cargada con grupos glutaraldehido (75 $\mu\text{mol/mL}$) que pueden reaccionar multipuntualmente con las

diferentes proteínas que se encuentran en el crudo enzimático. Dependiendo del tamaño y de la cantidad de proteínas, las unidades de MnP que pueden interaccionar con el soporte pueden variar considerablemente. Los ensayos realizados para maximizar este valor dieron como resultado 10 U de MnP inmovilizada por g de agarosa-glutaraldehído, que es un valor sobre 9 veces superior al obtenido en trabajos previos (Mielgo *et al.*, 2003). El soporte saturado de enzima permite disminuir el requerimiento de agarosa durante el proceso de decoloración y, por lo tanto, el Orange II que se adsorbe en el derivado. Incluso considerando la adsorción de Orange II por g de soporte, este valor es 4 veces menor que el obtenido con el soporte cargado con 1 U/g. Esto podría ser debido a que hay más grupos activos en el soporte unidos a proteínas presentes en el crudo enzimático y, por lo tanto, quedan menos grupos disponibles para la unión con Orange II.

El segundo factor que se puede optimizar para minimizar el coste total del proceso es el consumo de enzima, tanto en cuanto a la estabilidad como a la eficacia (mg de Orange II degradado por unidad de enzima consumida). La estabilidad se estudió frente a factores tales como agitación, temperatura y velocidad de adición de H₂O₂, intentando conseguir un equilibrio entre estabilidad enzimática y cinética de la reacción. La eficacia se estudió en procesos en continuo, partiendo de las condiciones empleadas en los trabajos previos en el reactor continuo de tanque agitado asociado a una membrana, con enzima libre (López *et al.*, 2004). Debido a que la cinética de la enzima inmovilizada es más lenta, se modificaron parámetros como TRH y concentración de Orange II en el influente, intentando mejorar la decoloración. Los mejores resultados se obtuvieron con 100 mg/L de Orange II y 1 h de TRH; con estos valores se alcanzó una eficacia de 29,3 mg/U, mayor que la obtenida en el proceso en continuo con enzima libre (20 mg/U). Esto indica que el proceso de inmovilización aporta cierta estabilidad a la enzima. Sin embargo, si se tiene en cuenta el porcentaje de enzima desactivada durante el proceso de inmovilización, que es del 50%, la eficacia se reduce a la mitad.

El problema de adsorción de tinte en el soporte, aunque no impide el proceso en continuo, sí dificulta el seguimiento del mismo, y el posterior análisis y modelización de los resultados. Aun así, y tomando como punto de partida el modelo cinético obtenido con enzima libre, se pudo llegar a establecer un modelo que defina el proceso con enzima inmovilizada. Dado que en el mismo no fue

considerada la adsorción ni la pérdida de actividad enzimática, el modelo no simula los datos iniciales ni finales de los ensayos realizados, sino simplemente los valores alcanzados en estado estacionario. El modelo se podría completar realizando un estudio más exhaustivo del proceso de adsorción del tinte y desactivación enzimática, pero el proceso se complicaría por ser muy difícil la determinación de estos parámetros.

El sistema basado en enzima inmovilizada presenta una serie de dificultades frente a un sistema basado en enzima libre: alta pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización (50%); obstrucción del filtro; cinética más lenta; control más complejo debido a la dificultad para medir la actividad MnP; necesidad de un sistema para reemplazar la enzima usada por enzima nueva; generación de residuos; proceso de modelado complejo si se tiene en cuenta la adsorción del tinte. Sin embargo, la operación del sistema es sencilla, pues el número de bombas es menor, no hay cambios de presión por ensuciamiento de la membrana y es más fácil mantener un volumen constante en el reactor. Estas ventajas hacen que el sistema pueda ser considerado como una alternativa para la degradación en continuo de tintes y compuestos recalcitrantes.

5. Referencias

- Grabski, A. C., Grimek, H. J. and Burgess, R. R. (1998) Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn^{III}-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. *Biotechnology and Bioengineering* **60**(2), 204-215.
- Guisán, J. M., Bastida, A., Blanco, R. M., Fernández-Lafuente, R. and García-Junceda, E. (1997) Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose. Strategies for enzymes stabilization by multipoint attachment. In: *Methods in Biotechnology. Immobilization of Enzymes and Cells*. Bickerstaff, G. F. Totowa (N.J.), Humana Press Inc. **1**: 277-287.
- Hublik, G. and Schinner, F. (2000) Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 330-336.
- Katchalski-Katzir, E. and Kraemer, D. M. (2000) Eupergit^R C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**, 157-176.
- Krastanov, A. (2000) Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and Polycar adsorption. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **24**, 383-388.
- Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P. (2000) Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process in Biochemistry* **36**(1-2), 51-58.

López, C., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2004) Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnology Progress* **20**(1), 74-81.

Mielgo, I., Palma, C., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Moreira, M. T., Feijoo, G. and Lema, J. M. (2003) Covalent immobilisation of manganese peroxidases (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera* sp. BOS55. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 769-775.

Sasaki, T., Kajino, T., Li, B., Sugiyama, H. and Takahashi, H. (2001) New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(5), 2208-2212.

Wariishi, H., Akaleswaran, L. and Gold, M. H. (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* **27**, 5365-5370.

Capítulo 7

Mecanismo de degradación enzimática de Orange II¹

Resumen

En este capítulo se aplicaron las técnicas analíticas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas por ionización con electrospray (ESI-MS) y cromatografía líquida (HPLC) para determinar los compuestos de degradación de Orange II. Mediante estos análisis realizados *ex situ* sin tratamiento previo de las muestras, se determinaron nueve productos de la transformación del tinte y se propusieron tres vías para la degradación de Orange II: *i*) ruptura simétrica del enlace azo que da lugar a la formación de sulfanilato y 1-amino-2-naftol; *ii*) ruta asimétrica que genera 1,2-naftoquinona y 4-diazonio benzenosulfonato, que se transforma a continuación a 4-hidroxibenzenosulfonato y benceno-sulfonato; *iii*) ruta asimétrica que da lugar a 2-naftol y 4-hidroxibenzenosulfonato.

¹ López, C., Valade, A. G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B. and Lema, J. M. (2004) Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by *ex situ* ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **335**, 135-149.

Índice

1. Introducción	191
2. Materiales y métodos	196
2.1. Compuestos químicos	196
2.2. Ensayos de degradación	196
2.3. Espectroscopía de RMN ¹ H	197
2.4. Análisis por HPLC	198
2.5. Test de toxicidad	199
2.6. Síntesis de sal de diazonio	199
2.7. Técnicas analíticas	199
3. Resultados y discusión	199
3.1. Estequiometría de la reacción enzimática	199
3.2. Identificación de los productos de degradación por RMN	201
3.3. Identificación de los productos de degradación por HPLC	205
3.4. Degradación enzimática de los productos intermedios	207
3.5. Propuesta de mecanismo	208
3.6. Toxicidad	211
4. Conclusiones	212
5. Referencias	213

1. Introducción

El principal objetivo del tratamiento de aguas residuales con compuestos cromóforos es, sin duda, la eliminación del color, teniendo normalmente un papel secundario la eliminación de la carga orgánica. En el caso de que el efluente tuviese un carácter tóxico, resultaría también un objetivo importante la detoxificación.

En el caso de colorantes que no ejercen una actividad tóxica, como el Orange II, los productos de degradación podrían, bajo ciertas condiciones, dar lugar a un aumento de la toxicidad. Así, por ejemplo, la degradación reductiva de la molécula de Orange II, bajo condiciones anaerobias, comienza por la ruptura del grupo azo, dando lugar a aminas aromáticas (sulfanilato y 1-amino-2-naftol (Zimmermann *et al.*, 1982)) que pueden atravesar con mayor facilidad las membranas celulares, aumentando por tanto la toxicidad cerca de 100 veces (Gottlieb *et al.*, 2003).

Una de las principales ventajas de la degradación enzimática de Orange II debería ser la menor toxicidad del efluente generado, por lo que resulta de interés el estudio detallado del mecanismo de degradación metabólica y la identificación de los productos de degradación enzimática para explicar la posible toxicidad del efluente.

Diversos autores realizaron estudios para intentar elucidar el mecanismo de la degradación de tintes azo mediante reacciones catalizadas por peroxidasas. Se proponen principalmente dos tipos de ruptura: una ruptura asimétrica, de manera que el enlace azo permanece intacto formando parte de uno de los productos resultantes de la ruptura; una ruptura simétrica, en que se rompe el doble enlace N=N. Los principales trabajos acerca del mecanismo son:

- i) Spadaro & Renganathan (1994) estudiaron el mecanismo de degradación del tinte azo Disperse Yellow 3 naftol por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Se describió la liberación de nitrógeno molecular a partir del enlace azo y la formación de dos productos finales principales: 1,2-naftoquinona y acetanilida (Figura 7.1). Si el mecanismo de degradación de Orange II fuese similar, los productos finales de la degradación serían 1,2-naftoquinona y bencenosulfonato.

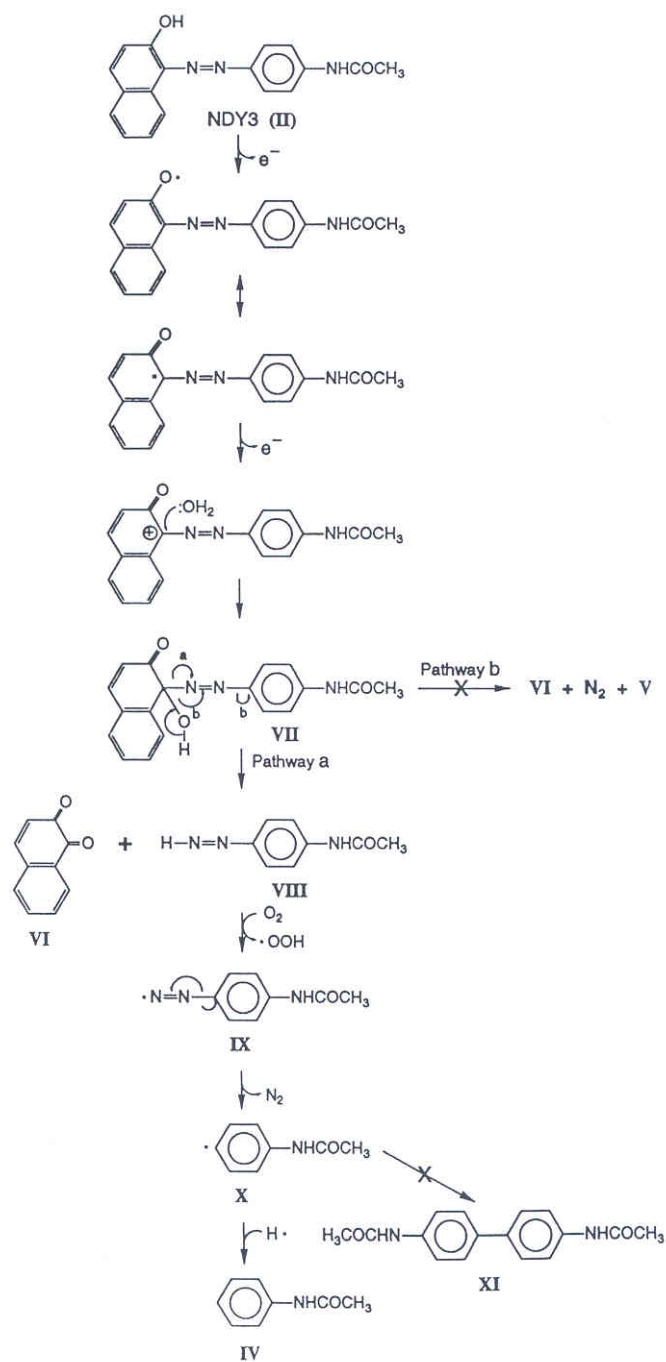


Figura 7.1. Mecanismo de degradación de Disperse Yellow 3 naftol propuesto por Spadaro & Renganathan (1994)

ii) Goszczyński *et al.* (1994) sugirieron dos mecanismos diferentes para la degradación de tintes azo sulfonados (Figura 7.2). El primero se basa en la ruptura simétrica del grupo azo que daría lugar a la formación de quinona monoimina y derivados nitroso como productos de oxidación directos; el segundo mecanismo es una ruptura asimétrica que conduce a la formación de quinona y derivados fenil diaceno. Estos compuestos pueden seguir reaccionando mediante reacciones espontáneas y dar lugar a la formación de productos secundarios. Estos autores emplearon como técnicas analíticas cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) y GC-MS tras la extracción y derivatización de las muestras. Una degradación análoga de Orange II conduciría a la formación de 1-amino-2-naftol y sulfanilato como productos de la vía simétrica y 1,2-naftoquinona, bencenosulfonato y 4-hidroxibencenosulfonato como productos de la vía asimétrica.

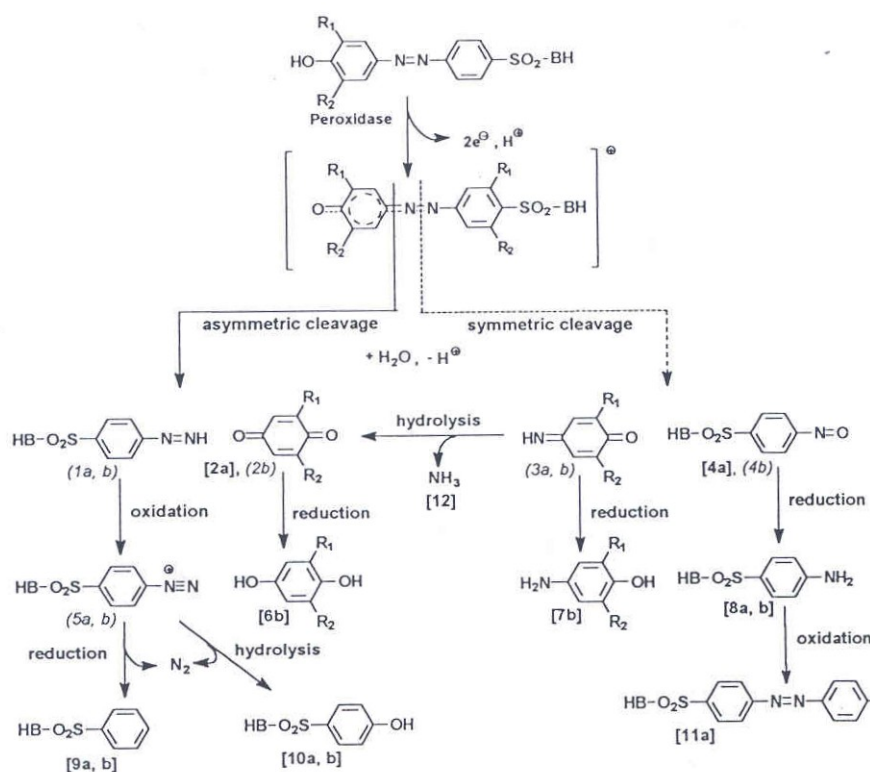


Figura 7.2. Mecanismo de degradación de tintes azo sulfonados propuesto por Goszczyński *et al.* (1994)

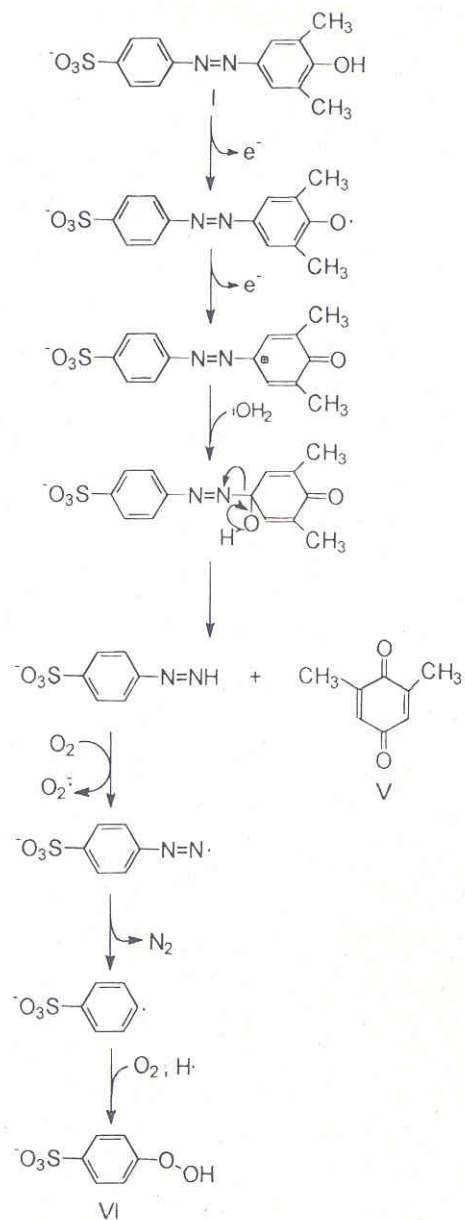


Figura 7.3. Mecanismo de degradación de 4-(4'-sulfofenilazo)-2,6-dimetilfenol propuesto por Chivukula *et al.* (1995)

- iii) Finalmente, Chivukula *et al.* (1995) caracterizaron 1,2-naftoquinona y 4-sulfonfenilhidroperóxido como productos finales de la degradación de Orange II mediante el empleo de HPLC, GC-MS, bombardeo rápido de átomos-espectrometría de masas (FAB-MS) y espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) (Figura 7.3).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica basada en la absorción de energía en la zona de radiofrecuencia por parte de algunos átomos, sometidos a un campo magnético intenso y de alta homogeneidad. Durante el período de resonancia, los núcleos se orientan en la dirección del campo, y cuando este cesa los núcleos atraviesan un período de relajación durante el cual emiten una señal de frecuencias. Mediante la aplicación de la transformada de Fourier, dicha señal dependiente del tiempo, se transforma en un espectro dependiente de la frecuencia. Para la determinación de los productos de degradación de una reacción enzimática, la técnica de RMN ofrece algunas ventajas frente a otras técnicas empleadas previamente (Fan, 1996; Brecker & Ribbons, 2000; Combourieu *et al.*, 2000; Delort & Combourieu, 2000):

- i) Es una técnica no destructiva
- ii) No requiere tratamiento previo de las muestras
- iii) Es una técnica cualitativa y cuantitativa, y permite la determinación de concentraciones sin la necesidad de estándares comerciales o sintéticos
- iv) Se pueden combinar espectros en una (1D) o dos dimensiones (2D) para la identificación de los compuestos
- v) Dada la rapidez de la técnica, es muy apropiada para la utilización en la identificación de compuestos inestables

En este capítulo se combinaron las técnicas de RMN y HPLC para la identificación y cuantificación de los productos intermedios y finales de la degradación enzimática de Orange II. Además, se analizó la ecotoxicidad del tinte Orange II y de los productos de degradación que fueron identificados, mediante su efecto en *Photobacterium phosphoreum* (ensayo Microtox).

2. Materiales y métodos

2.1. Compuestos químicos

Los compuestos Orange II, bencenosulfonato, sulfanilato y 2-naftol se obtuvieron de Sigma (Alemania). 4-hidroxibencenosulfonato y 1-amino-2-naftol fueron suministrados por Aldrich (Alemania). 1,2-naftoquinona se adquirió en Janssen Chimica (Bélgica). Trimetilsililpropionato de sodio deuterado (TSPd₄) fue suministrado por Eurisotop (Francia). Sus estructuras se muestran en la Figura 7.4.

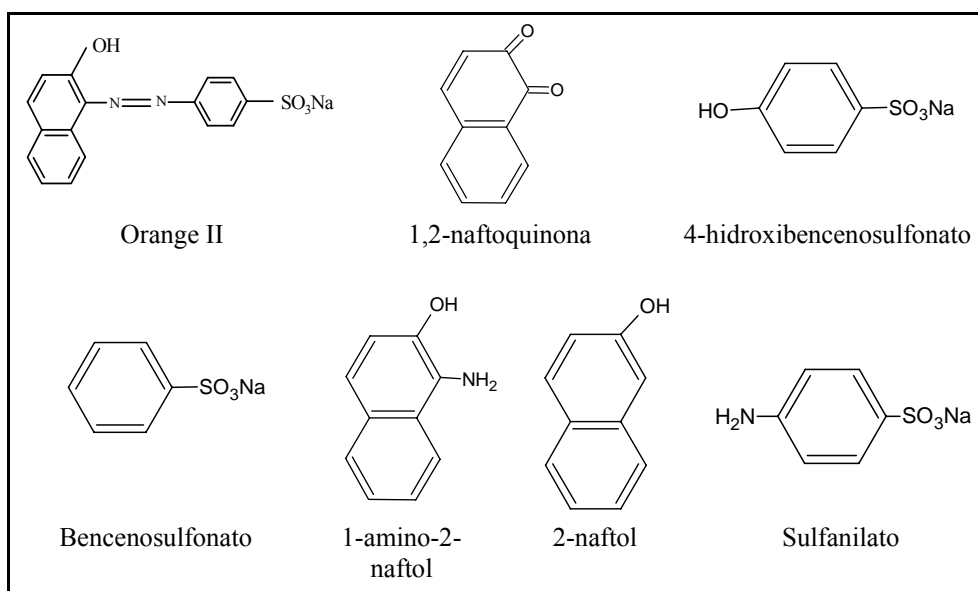


Figura 7.4. Estructura de Orange II y de posibles productos de degradación

2.2. Ensayos de degradación

Los ensayos de degradación se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 50 mL del medio de reacción, que consistió en: 200 U/L de MnP, oxalato 1 mM, pH 4,5, MnSO₄ 15 μM y una concentración 1,2 mM de Orange II, bencenosulfonato, sulfanilato o 4-hidroxibencenosulfonato. La reacción comenzó con la adición de H₂O₂ mediante una bomba peristáltica con un flujo de 27,2 μmol/L·min. Se realizaron controles en paralelo: un primer control sin adición de H₂O₂ y un segundo sin sustrato pero con MnP y adición en continuo de H₂O₂.

2.3. Espectroscopía de RMN ^1H

Preparación de las muestras

Se tomaron muestras cada 10 min, de las cuales 540 μL se adicionaron a 60 μL de una disolución 5 mM de TSPd₄ en agua deuterada (D₂O). Se consideró TSPd₄ como referencia para el desplazamiento químico de los compuestos (0 ppm) y para la cuantificación.

Espectros de RMN ^1H

Los espectros de RMN del protón se llevaron a cabo a 25°C y a 500 MHz en un espectrómetro Avance 500 Bruker (Broker Biospin, Rheinstetten, Alemania) equipado con un electrodo inverso de resonancia triple (^1H , ^{13}C , ^{15}N) con tubos de 5 mm de diámetro conteniendo 600 μL de muestra. La señal del agua se eliminó mediante una secuencia de saturación de pulsos en dos fases. La supresión de la señal del disolvente da lugar a resultados más precisos en términos de cuantificación que los obtenidos mediante el gradiente clásico de doble pulso Watergate. Se realizaron aproximadamente 256 scans (pulso de 90°, 7 μs ; pulso de saturación, 3 s; retraso de relajación, 1 s; tiempo de adquisición, 4,679 s; 65.536 datos). Se aplicó un filtro de 1 Hz antes de la transformación de Fourier y se realizó la corrección de la línea base antes de la integración usando un software Broker. Bajo estas condiciones, el límite de detección y cuantificación estuvo sobre el rango de 1 y 10 μM , respectivamente.

Cuantificación de metabolitos

La concentración de metabolitos se calculó de la forma expresada en la Ecuación 1:

$$[m] = 1,1 \cdot \frac{9A_0[TSPd_4]}{bA_{ref}} \quad (1)$$

donde $[m]$ es la concentración del metabolito m ; A_0 es el área de la resonancia del metabolito m en el espectro de RMN; $[TSPd_4]$ es la concentración del compuesto de referencia; A_{ref} es el área de la resonancia del compuesto de referencia; b es el número de protones del metabolito m en la señal integrada; 9 es el número de protones que resuenan a 0 ppm y 1,1 es un factor que procede de la dilución de TSPd₄.

Espectros de RMN ¹H en dos dimensiones

Con el objetivo de correlacionar las señales de los espectros en 1D pertenecientes a la misma molécula, se realizaron ensayos de espectroscopía en 2D (TOCSY) con supresión de la resonancia del agua por medio de una secuencia Watergate. Las anchuras de los espectros se ajustaron en las dos dimensiones para abarcar todas las señales de interés. Se adquirieron las respuestas de 8 barridos por cada 256t₁ incrementos. Se aplicó la función seno en ambas dimensiones antes de la transformada de Fourier en 2D.

2.4. Análisis por HPLC

Los análisis de cromatografía líquida se llevaron a cabo en un HPLC Hewlett Packard ChemStation equipado con un detector de array de diodos 1090 M Serie II. Se empleó una columna LiChrospher 100 RP-18 (4 mm diámetro interno y 250 mm de longitud) que contiene partículas empacadas de 5 μm (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). Se inyectaron 25 μL de muestra y se empleó como fase móvil una disolución de 30% de acetonitrilo y 70% de carbonato de amonio 0,03 M pH 7,9, a un flujo de 0,8 mL/min en condiciones isocráticas y 30°C. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 231 nm. Los tiempos de retención para los distintos compuestos analizados fueron los indicados en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Tiempos de retención por HPLC de los compuestos del mecanismo de degradación de Orange II

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
Sulfanilato	2,00-2,01
4-hidroxibencenosulfonato	2,03-2,04
Bencenosulfonato	2,07-2,08
1-amino-2-naftol	3,2-3,3 y 10,8-10,9
1,2-naftoquinona	3,2-3,3 y 10,8-10,9
2-naftol	4,5-4,6
Orange II	6,8-7,0

2.5. Test de toxicidad

La toxicidad de las muestras se determinó mediante el test de toxicidad Microtox (Azur Environmental, Newark, EEUU). Este test emplea una bacteria marina que emite luminiscencia, *P. phosphoreum*, como organismo para realizar el bioensayo. Se expone esta bacteria a las muestras, diluidas en agua Milli-Q si fuera necesario, y se mide el efecto tóxico en el organismo. La reducción de la emisión de luz generalmente es proporcional a la concentración de los contaminantes presentes. En los ensayos se calcularon dos valores de EC_{50} , tras 5 y 15 min de exposición de la bacteria a las muestras a 15°C. La orden del 13 de Octubre de 1989 acerca de los Métodos de Caracterización de Residuos Tóxicos y Peligrosos establece que un agua residual es tóxica si presenta un EC_{50} (tras 15 min a 15°C) igual o menor de 3000 ppm.

2.6. Síntesis de sal de diazonio

Se disolvieron 2,2 g de ácido sulfúrico en 20 mL de una disolución de carbonato sódico al 10%. Después de la solubilización completa y el enfriamiento en un baño de hielo, se añadió 1 g de $NaNO_2$. Esta disolución se añadió a otra que contenía 10 g de hielo y 3 mL de ácido clorhídrico concentrado (Sikharulidze *et al.*, 1979). Se realizaron espectros RMN en esta disolución sin ninguna purificación. Sin embargo, fue necesario ajustar el pH a 5 para poder comparar los datos obtenidos con los espectros de las muestras de reacción.

2.7. Técnicas analíticas

La actividad MnP se midió por espectrofotometría mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol. La técnica se describió en el Capítulo 2 de Materiales y métodos.

3. Resultados y discusión

3.1. Estequiometría de la reacción enzimática

Hasta el momento se habían identificado y cuantificado dos productos de la degradación enzimática de Orange II: 4-hidroxibencenosulfonato y 1,2-naftoquinona (Mielgo, 2002). Se realizó un ensayo de degradación de Orange II

en discontinuo para determinar y cuantificar dichos productos de degradación. Se partió de una concentración de tinte elevada, de 300 mg/L, con el objetivo de obtener mayores concentraciones de los compuestos formados y facilitar de esta forma la cuantificación. El ensayo se realizó en un matraz Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 50 mL del medio de reacción con 200 U/L de MnP, oxalato 1 mM pH 4,5 y $MnSO_4$ 33 μ M. Se tomaron muestras cada 10 min y se analizaron por HPLC. Se cuantificaron Orange II, 4-hidroxibencenosulfonato y 1,2-naftoquinona (Figura 7.5).

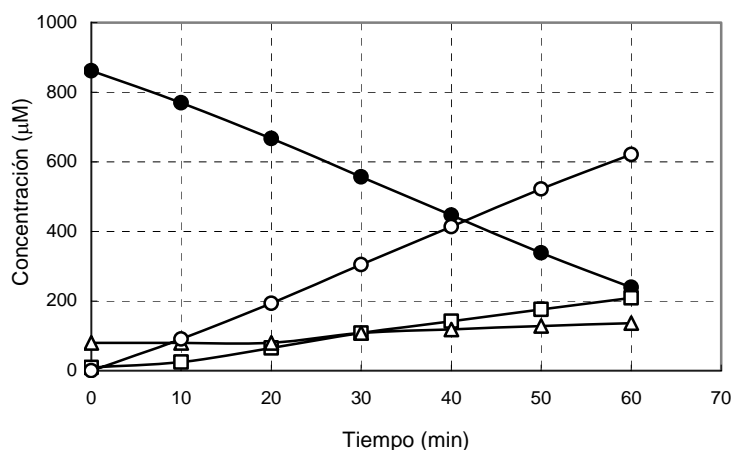


Figura 7.5. Perfil de degradación enzimática de Orange II por HPLC: (●) Orange II; (○) Orange II degradado; (Δ) 1,2-naftoquinona; (□) 4-hidroxibencenosulfonato

Teniendo en cuenta una estequiometría equimolar entre el tinte Orange II degradado y los productos obtenidos, la concentración de estos tras la degradación debería coincidir con la cantidad de tinte degradado. Sin embargo, sólo un 30% del tinte dio lugar a la formación de 4-hidroxibencenosulfonato y menos de un 20% correspondió a 1,2-naftoquinona. De esto se deduce que, o bien estos productos no son productos finales, de manera que siguen reaccionando hasta llegar a otros que sí lo son; o bien existen otras vías alternativas de degradación.

3.2. Identificación de los productos de degradación por RMN

La Figura 7.6 representa los espectros RMN de las muestras de degradación enzimática de Orange II tomadas de 0 a 6 h. A tiempo 0 sólo son visibles las señales correspondientes a Orange II. El desplazamiento químico de estas señales varía a medida que la concentración decrece, lo que es usual en compuestos aromáticos funcionalizados y podría ser debido a la presencia de 15 μM de Mn^{2+} , que es paramagnético.

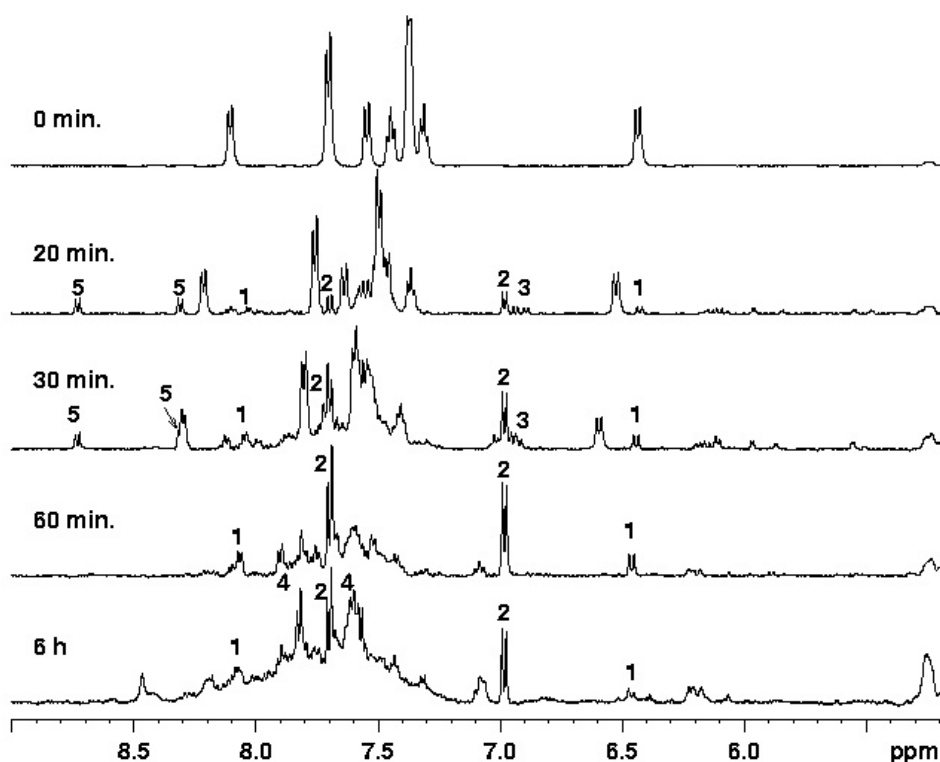


Figura 7.6. Espectros RMN ¹H *ex situ* de las muestras de degradación de Orange II tomadas tras 0, 20, 30, 60 min y 6 h: (1) 1,2-naftoquinona; (2) 4-hidroxibencenosulfonato; (3) sulfanilato; (4) bencenosulfonato; (5) 4-diazonio bencenosulfonato

Tras 20 min decrecen las señales de Orange II, mientras que aparecen nuevas resonancias. Un primer compuesto, constituido por las señales que resuenan a 6,42, 7,57, 7,65, 7,71 y 8,03 ppm, es 1,2-naftoquinona (1 en Figura 7.6), como se pudo observar por comparación con un espectro llevado a cabo a una disolución

con un patrón del compuesto. Las señales de 1,2-naftoquinona crecieron con el tiempo desde 10 a 60 min en un rango de 25 a 142 μM . A partir de este punto, la concentración disminuyó lentamente hasta 50 μM , probablemente debido a la descomposición del propio compuesto (Figura 7.7).

Un segundo compuesto, al que le corresponden las señales a 6,95 y 7,64 ppm, fue identificado como 4-hidroxibencenosulfonato al compararlo con el correspondiente patrón (2 en Figura 7.6). Este compuesto ya apareció en la muestra de 10 min y su concentración aumentó hasta el valor de 271 μM a los 60 min. Posteriormente, la concentración disminuyó hasta un valor de 50 μM (Figura 7.7).

Un tercer compuesto, con dos resonancias a 6,89 y 7,58 ppm, se identificó como 4-aminobencenosulfonato o sulfanilato (3 en Figura 7.6). La pequeña variación en el desplazamiento químico ($<0,05$ ppm) observada en los patrones en concentraciones entre 0,1 y 0,5 mM no afectó a la interpretación del espectro. La concentración de sulfanilato alcanzó un valor de 30 μM a los 10 min y luego decreció lentamente hasta valores no detectables (Figura 7.7).

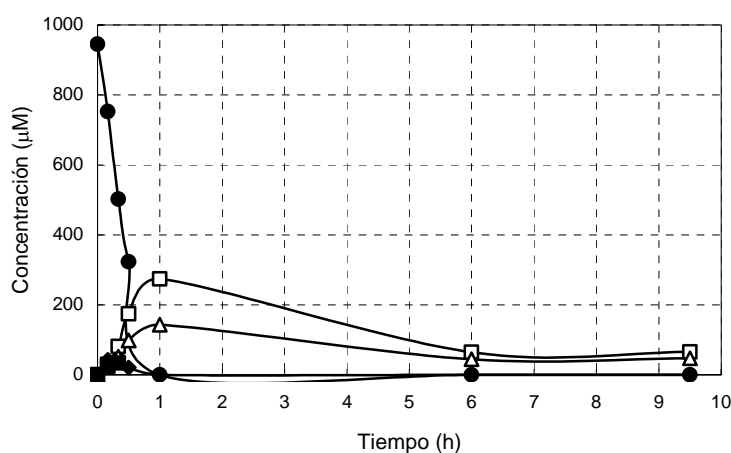


Figura 7.7. Perfil de degradación enzimática de Orange II por HPLC: (●) Orange II; (Δ) 1,2-naftoquinona; (□) 4-hidroxibencenosulfonato; (■) sulfanilato; (◆) 4-diazonio bencenosulfonato

En el espectro de RMN se encontraron otras señales a 7,56 y 7,82 ppm, y tras comparación con el patrón correspondiente se determinó que pertenecían a un cuarto compuesto: bencenosulfonato (4 en Figura 7.6). Este compuesto no se

pudo cuantificar, dado que las señales se solapaban con muchas otras. La importancia de este compuesto se puso de manifiesto observando la alta intensidad de las mismas al final de la cinética (Figura 7.8).

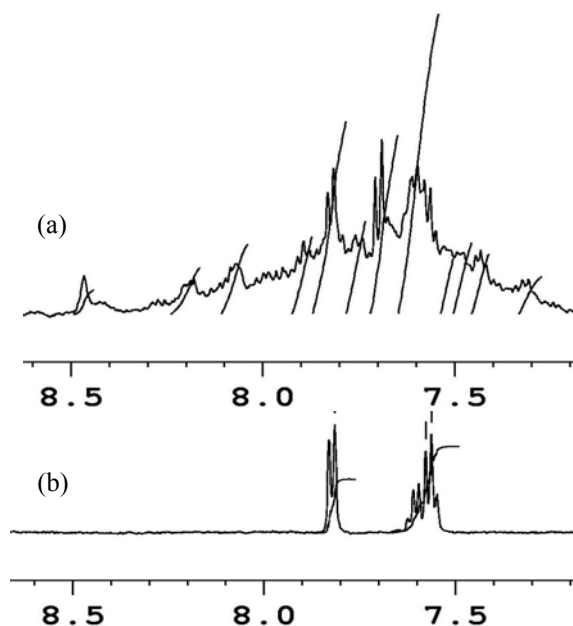


Figura 7.8. Comparación de espectros RMN: (a) muestra de degradación enzimática de Orange II tras 9 h; (b) bencenosulfonato 0,5 mM

Entre los tiempos de 10 y 30 min aparecieron varias señales en el rango de 5,30 a 6,20 ppm (Figura 7.6), y desaparecieron rápidamente a temperatura ambiente. Estas señales, en el rango de desplazamiento químico de los alquenos, podrían proceder de la lisis de la enzima MnP o de cualquier otro compuesto presente en el crudo. Sin embargo, no aparecieron en las muestras control con enzima pero sin sustrato, por lo cual se deduce que podrían corresponder a alquenos inestables que se formaron tras la apertura de los anillos de compuestos aromáticos.

A los 20 min aparecieron dos dobletes a 8,30 y 8,72 ppm, que parecen corresponder a algún compuesto inestable, pues tras 60 min a temperatura ambiente, incluso sin la acción de la enzima, desaparecieron (5 en Figura 7.6). La alta inestabilidad de dicho compuesto hizo pensar en la posible presencia de 4-diazonio bencenosulfonato. De hecho, esta sal fue propuesta como una etapa

clave en el mecanismo de degradación de los tintes azo, pero nunca se identificó independientemente del método analítico empleado (Goszczyński *et al.*, 1994; Chivukula *et al.*, 1995). La presencia de este compuesto y su cuantificación son cruciales para decidir si existe una ruta de degradación asimétrica. Para comprobar la veracidad de este compuesto, se sintetizó a 0°C (Sikharulidze *et al.*, 1979) y se analizó el espectro RMN del medio de reacción a diferentes condiciones de temperatura, pH, concentración y tiempo. Se obtuvieron buenos resultados cuando se realizó el espectro dentro de los 5 min siguientes al inicio de la reacción, pues se eliminaron los problemas de la descomposición térmica de la sal de diazonio. El espectro del producto sintético mostró la presencia de dos dobletes a 8,30 y 8,72 ppm, idénticos a los observados en las muestras de la cinética (Figura 7.9).

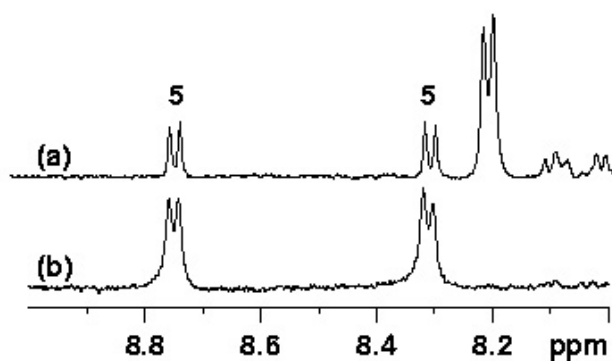


Figura 7.9. Comparación de espectros RMN: (a) muestra de degradación enzimática de Orange II tras 15 min; (b) 4-diazonio bencenosulfonato obtenido sintéticamente

La sal de diazonio se hidroliza para dar 4-hidroxibencenosulfonato y bencenosulfonato (March, 2001) y, por lo tanto, puede constituir una fuente de generación de estos productos durante la reacción de degradación. De hecho, los espectros RMN ^1H realizados a la muestra sintética a 25°C tras 1 y 4 h mostraron la aparición de bencenosulfonato y 4-hidroxibencenosulfonato, confirmando así este mecanismo. Además aparecieron varios compuestos adicionales varias horas después del comienzo de la reacción, durante la descomposición de la sal de diazonio, que no se pudieron identificar.

Con el objetivo de determinar la importancia de esta ruta de degradación por medio de la sal de diazonio, sería necesario cuantificar sus señales. Sin embargo,

debido a la descomposición térmica de la muestra durante el análisis, que dura aproximadamente 30 min, la cuantificación no fue precisa. Aun así, se pudo determinar que la sal alcanzada corresponde aproximadamente a un 10% de la degradación de Orange II (Figura 7.7). Para corroborar esta ruta, se realizó un ensayo de degradación de Orange II donde el H₂O₂ se sintetizó *in situ* mediante glucosa oxidasa. La síntesis se llevó a cabo a 12°C, para evitar la descomposición térmica y evitar la pérdida de actividad de las enzimas empleadas. En estas condiciones, la degradación enzimática fue de un 70%, y la estabilidad del 4-diazonio bencenosulfonato aumentó considerablemente, de manera que la producción aumentó hasta el 20% de la degradación de Orange II.

La cantidad de compuestos de degradación formada constituye aproximadamente un 30% del Orange II degradado cuando los productos se cuantifican por RMN (Figura 7.7). Los espectros de degradación (Figura 7.6) muestran que aparecen muchas señales de gran anchura a partir de los 60 min. Estas señales podrían corresponder a compuestos aromáticos con un cierto grado de insolubilidad que proceden de reacciones de oxidación paralelas o de la descomposición biótica o abiótica de los metabolitos descritos anteriormente.

3.3. Identificación de los productos de degradación por HPLC

Se realizaron análisis por HPLC para confirmar la presencia de los productos de degradación que, debido a sus bajas concentraciones, se determinaron con dificultad mediante RMN. Se emplearon compuestos comerciales como patrones y se compararon sus tiempos de retención y sus espectros de absorbancia con los de las muestras de degradación. La Figura 7.10 muestra el cromatograma de una muestra de degradación tras 1 h de reacción enzimática. El tinte Orange II tiene un tiempo de retención aproximado de 6,9 min, aunque dicho tiempo varió dependiendo de la concentración. De hecho, a medida que la degradación avanzó, disminuyó el espectro de absorbancia del tinte y aumentó el tiempo de retención.

Las señales que aparecen en la muestra de degradación a 1,59 y 1,86 min se observaron también en una muestra de crudo enzimático. La señal a 2,01 min se identificó como 4-hidroxibencenosulfonato al compararla con el compuesto patrón (Compuesto 2 en Figura 7.10).

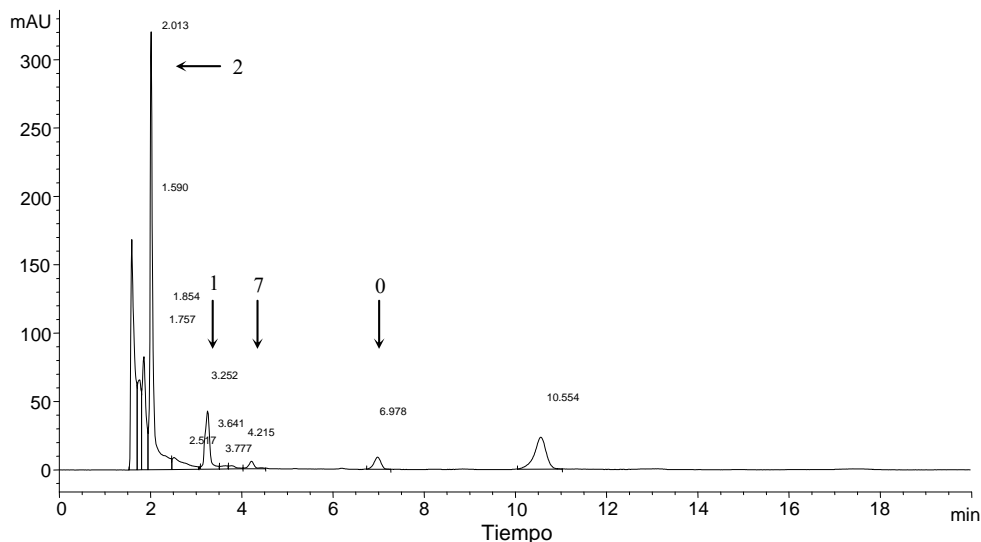


Figura 7.10. Cromatograma de HPLC de la muestra de 60 min: (0) Orange II; (1) 1,2-naftoquinona; (2) 4-hidroxibencenosulfonato; (7) 2-naftol

Los patrones de los compuestos 1-amino-2-naftol y 1,2-naftoquinona presentaron espectros de absorbancia similares e iguales tiempos de retención: sus cromatogramas presentaron dos señales principales (3,23 y 10,88 min) y varias señales más pequeñas, que son debidas a que ambos compuestos son muy inestables y su degradación puede dar lugar a los mismos productos. Además puede estar teniendo lugar un equilibrio quinona/hidroquinona. A pesar de esto, se pudo determinar cuál de los dos compuestos puede aportar un mayor peso a las señales obtenidas en la muestra de degradación: las señales del patrón de 1,2-naftoquinona presentaron mayores áreas que aquellas pertenecientes a 1-amino-2-naftol a las mismas concentraciones. En el cromatograma de la muestra de 60 min de degradación, la señal obtenida tras 3,23 min (Compuesto 1 en Figura 7.10) alcanzó un área que daría lugar a una concentración muy elevada si se tratase del compuesto 1-amino-2-naftol. Por esto, a esta señal se le asignó el compuesto 1,2-naftoquinona, de acuerdo con los datos obtenidos por RMN.

El compuesto relativo a la señal obtenida tras 4,21 min (Compuesto 7 en Figura 7.10) se identificó como 2-naftol, por comparación con el patrón de este compuesto. Este resultado se confirmó al comparar el espectro de absorbancia de la sustancia patrón y de la señal obtenida en el cromatograma de la muestra de degradación (Figura 7.11). La concentración máxima alcanzada por este

compuesto fue menor de $10 \mu\text{M}$, lo que explica por qué no se detectó mediante RMN.

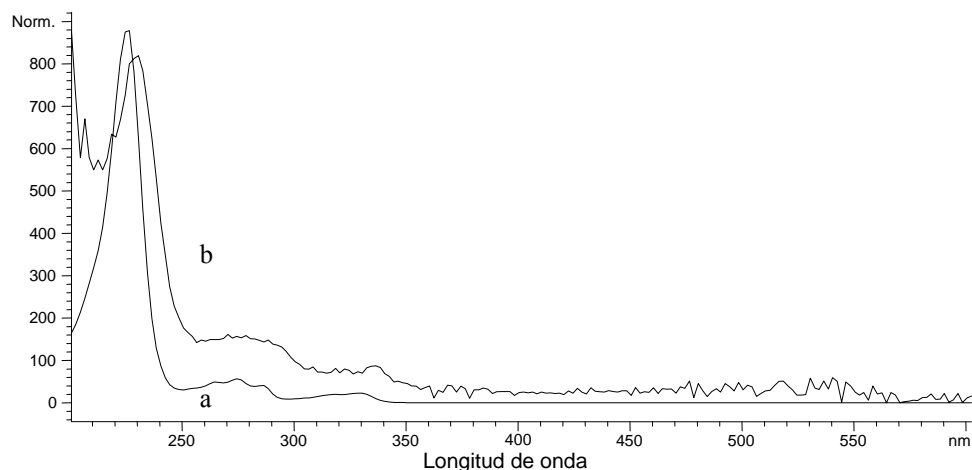


Figura 7.11. Espectros de absorción: (a) patrón de 2-naftol; (b) señal de 4,21 min en una muestra de 1 h de degradación de Orange II

El seguimiento de los productos de degradación mediante HPLC en un ensayo de degradación de Orange II confirmó los resultados obtenidos por RMN: sólo un 30% del Orange II degradado se obtiene como producto, considerando una relación estequiométrica 1:1 con respecto a 1,2-naftoquinona y 4-hidroxibencenosulfonato. Por una parte, este desajuste en el balance puede ser debido a la producción paralela de otros compuestos que se originan por vías de degradación diferentes o bien por la descomposición natural de los intermediarios. Por otra parte, podría deberse a la degradación enzimática de los propios productos de degradación.

3.4. Degradación enzimática de los productos intermedios

Durante el análisis de las muestras de degradación de Orange II mediante RMN se observó la producción de bencenosulfonato y la desaparición de 4-hidroxibencenosulfonato. Esto hizo suponer que estos productos del mecanismo podrían ser degradados a continuación por el sistema enzimático. Se llevaron a cabo ensayos de degradación de sulfanilato, 4-hidroxibencenosulfonato y bencenosulfonato mediante MnP de forma análoga a los realizados con Orange II, y las muestras tomadas se analizaron mediante RMN y HPLC. El

bencenosulfonato no sufrió degradación, pero los otros dos compuestos alcanzaron degradaciones elevadas tras 8 h de ensayo (Tabla 7.2). Se pudieron ver algunas señales resultantes de la degradación mediante RMN, pero su baja intensidad no permitió identificarlas. El análisis por HPLC mostró la aparición de varias señales, pero fue imposible identificarlas por disponer únicamente de su espectro de absorbancia. Se realizaron controles sin enzima, en los que ningún compuesto se degradó.

Tabla 7.2. Cuantificación de la degradación enzimática de 4-hidroxibencenosulfonato y sulfanilato mediante RMN y HPLC

Tiempo (h)	Degradación de 4-hidroxibencenosulfonato (%)		Degradación de sulfanilato (%)	
	RMN	HPLC	RMN	HPLC
1	10,5	7,1	58,2	57,3
8	86,9	70,2	84,1	90,0

3.5. Propuesta de mecanismo

El mecanismo que a continuación se propone se basa en los trabajos realizados anteriormente para la determinación del mecanismo de degradación de tintes azo (Zimmermann *et al.*, 1982; Goszczynski *et al.*, 1994; Spadaro & Renganathan, 1994; Chivukula *et al.*, 1995), en los resultados obtenidos por RMN y HPLC y en los ensayos llevados a cabo por cromatografía de masas (ESI-MS) en colaboración con el grupo de Bernadette Bouchon (INSERM, Université d’Auvergne, Francia) (López *et al.*, 2004). De los resultados se deducen tres mecanismos de degradación: dos de ellos basados en una ruptura asimétrica del enlace azo y uno basado en la ruptura simétrica. Entre las rutas propuestas se incluyen tres nuevos metabolitos (Figura 7.12).

La presencia de sulfanilato en el medio de reacción podría indicar la existencia de una ruta simétrica. Para confirmar esta ruta se intentó hallar otros compuestos que podrían formar parte de la misma, como los compuestos 4-nitrosobencenosulfonato o 1-amino-2-naftol. La síntesis del compuesto nitroso no se pudo completar con éxito, porque en ninguna de las técnicas propuestas se

podía aislar el producto como compuesto puro (Kaur *et al.*, 1981; Porta & Prati, 2000). Sin embargo, este compuesto sí pudo identificarse mediante la técnica de cromatografía de gas asociada a espectrometría de masas. La reducción de los derivados de nitrosobenceno puede ocurrir electroquímicamente o mediante agentes químicos reductores (Zuman & Shah, 1994). Esta reducción tiene lugar en dos etapas: en la primera se forma hidroxilamina y posteriormente da lugar a una amina, en este caso el sulfanilato. Por otra parte, se comprobó que este último se degrada mediante la acción de la enzima MnP. Se observó el mismo fenómeno en estudios de degradación de sulfanilato mediante un cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* (Paszczynski *et al.*, 1992) y mediante ligninasa (Goszczyński *et al.*, 1994). En cuanto al compuesto 1-amino-2-naftol, tanto por RMN como por HPLC las señales se solapan con las de 1,2-naftoquinona, lo cual dificulta su identificación. De todas formas, este compuesto es fácilmente autooxidable, por lo tanto es probable que haya sufrido un proceso de biomineralización y no esté presente en el medio de degradación (Coughlin *et al.*, 2002, 2003).

La formación de 1,2-naftoquinona y 4-diazonio bencenosulfonato es compatible con una ruptura asimétrica de la molécula de Orange II (Figura 7.12). Este derivado de diazonio podría proceder de la oxidación espontánea del ácido fenilhidracinsulfónico (no observado), como sugirieron Goszczyński *et al.* (1994). La hidrólisis de la sal de diazonio produce 4-hidroxibencenosulfonato, y su reducción da lugar a bencenosulfonato, ambos observados por RMN y MS. Chivukula *et al.* (1995) sugirieron que el radical fenil obtenido tras la eliminación de nitrógeno molecular de la sal de diazonio puede reaccionar con oxígeno para dar 4-sulfofenilhidroperóxido. Los resultados del análisis de las muestras de degradación por RMN y ESI-MS indican claramente que tanto el bencenosulfonato como el 4-hidroxibencenosulfonato están presentes desde el comienzo de la reacción; además se identificó el 4-sulfofenilhidroperóxido en las muestras por ESI-MS. De esto se deduce que a partir de bencenosulfonato y 4-hidroxibencenosulfonato y se genera el hidroperóxido correspondiente.

El tercer mecanismo de degradación simultáneo es otra ruta asimétrica, que da lugar a la formación de 4-hidroxibencenosulfonato y 1-diazo-2-naftol, este último derivando en 2-naftol por pérdida de N₂. Los análisis de ESI-MS confirmaron la presencia de 1-diazo-2-naftol, mientras que tanto dicha técnica como la de HPLC verificaron la presencia de 2-naftol en las muestras de degradación de Orange II.

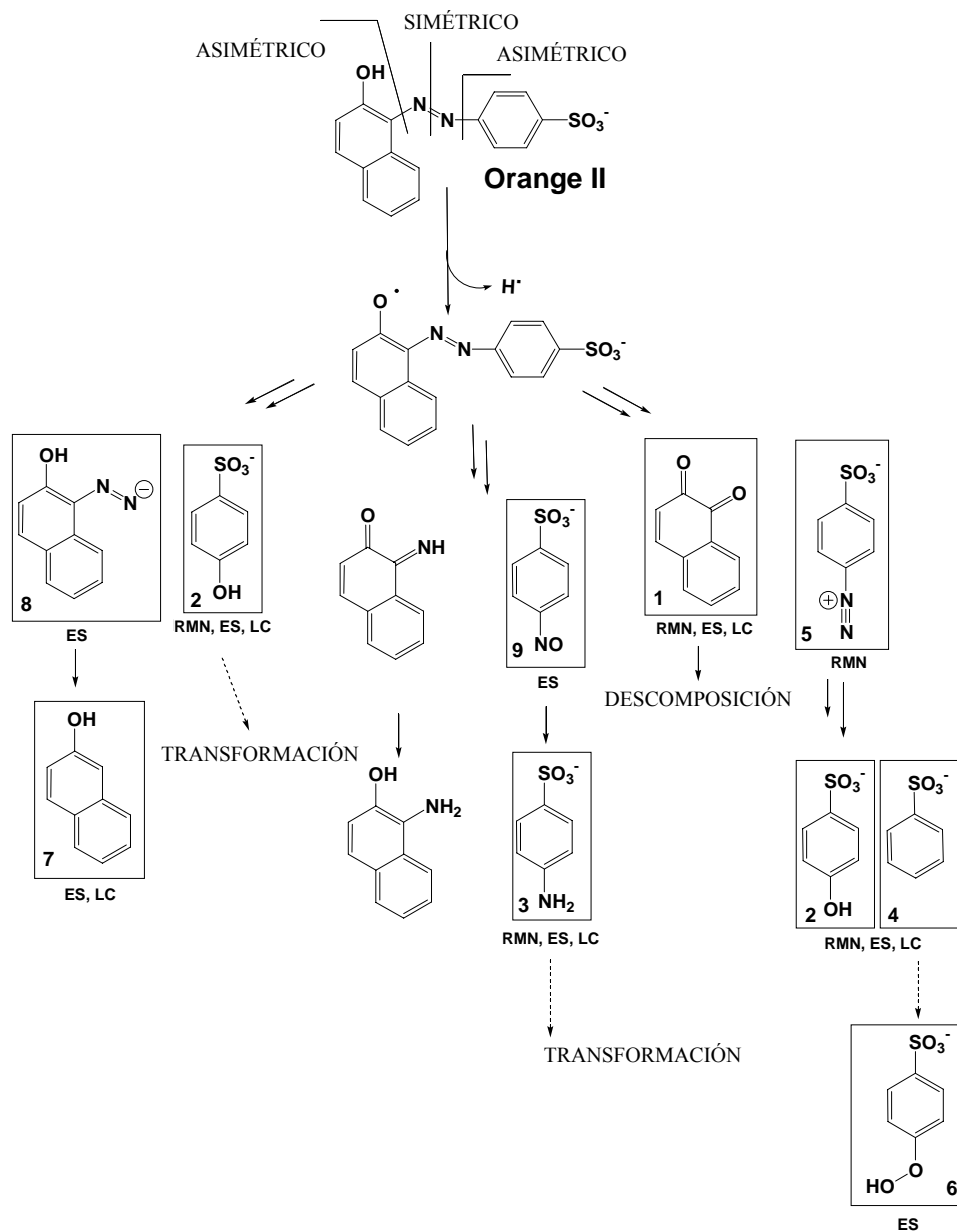


Figura 7.12. Propuesta de mecanismo de degradación de Orange II mediante MnP: (1) 1,2-naftoquinona; (2) 4-hidroxibencenosulfonato; (3) sulfanilato; (4) bencenosulfonato; (5) 4-diazonio bencenosulfonato; (6) 4-sulfofenilhidroperóxido; (7) 2-naftol; (8) 1-diazo-2-naftol; (9) 4-nitrosobencenosulfonato

3.6. Toxicidad

La identificación de los productos que se forman durante el tratamiento de aguas residuales es de interés para explicar su posible toxicidad y, por lo tanto, evaluar modificaciones en el proceso si fuese necesario. La toxicidad de los metabolitos identificados se analizó usando la técnica de Microtox (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Toxicidad mediante el test Microtox

<i>Muestra</i>	<i>EC₅₀ (15)</i> <i>(ppm)</i>	<i>EC₅₀ (15)</i> <i>(equitox/m³)</i>	<i>Toxicidad</i>
Orange II 10 mM	3478	287	No tóxico
Orange II 100 ppm, oxalato 1 mM, Mn ²⁺ 33 μM	40718	25	No tóxico
Efluente degradación enzimática	354882	3	No tóxico
4-hidroxibencenosulfonato 10 mM	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfanilato 10 mM	n.c.	n.c.	n.c.
Bencenosulfonato 10 mM	n.d.	n.d.	n.d.
1,2-naftoquinona 10 mM en acetonitrilo	12	82645	Tóxico
2-naftol 10 mM en acetonitrilo	207	4831	Tóxico
Acetonitrilo	n.c.	n.c.	n.c.
2-naftol 10 mM en 25% acetona	554	1805	Tóxico
25% acetona	94470	10,59	No tóxico

n.d.: no detectable; n.c.: no conclusivo

Nota: La equivalencia entre ppm y equitox/m³ se establece según la definición de la regulación AFNOR T 90-301, anexo B, pág. 8: número de equitox/m³=(1/EC₅₀)*10⁶. Según la orden del 13 de Octubre de 1989 que desarrolla los Métodos de Caracterización de los Residuos Tóxicos y Peligrosos, un residuo es tóxico si EC₅₀ (15 min)≤3000 ppm

Todos los compuestos se estudiaron a la misma concentración de 10 mM, para poder comparar sus valores de EC₅₀. Orange II, 4-hidroxibencenosulfonato y bencenosulfonato no resultaron tóxicos en el rango de concentraciones estudiado. Sin embargo, 1,2-naftoquinona y 2-naftol presentaron toxicidad cuando se disolvieron en acetonitrilo. Podría ser que fuese el disolvente el que aportase toxicidad a la muestra, y no el compuesto en sí, por eso se analizó la toxicidad de dicho disolvente. Dado que los resultados del test para la muestra de acetonitrilo no fueron concluyentes, se procedió a analizar una muestra de 2-naftol en la misma concentración y disuelta en un 25% de acetona. El nuevo disolvente

resultó ser no tóxico, mientras que la muestra de 2-naftol sí lo fue. Dado que la naftoquinona en acetonitrilo presentaba mayor toxicidad que 2-naftol, y se demostró que este es tóxico, se concluye que 1,2-naftoquinona también lo es. Los valores de EC_{50} se deben analizar teniendo en cuenta la concentración de la disolución de partida: así, concentraciones de 2-naftol por encima de 1,85 mM se consideran tóxicas, mientras que sólo concentraciones superiores a 8,63 mM de Orange II presentan toxicidad. La corriente de influente del reactor enzimático no presenta toxicidad, y la corriente de efluente disminuye su valor de EC_{50} en más de 8 veces.

4. Conclusiones

Este trabajo tomó como base algunos mecanismos propuestos con anterioridad acerca de la degradación de tintes azo mediante microorganismos o enzimas *in vitro* (Zimmermann *et al.*, 1982; Goszczyński *et al.*, 1994; Spadaro & Renganathan, 1994; Chivukula *et al.*, 1995). Estos autores emplearon dos técnicas principales para proponer sus mecanismos: extracción de sobrenadante seguido de HPLC y GC-MS (impacto electrónico), o bien análisis por MS (ESI-MS y FAB-MS) y/o HPLC-MS o GC-MS después de extracción y derivatización. Se propusieron dos vías principales de degradación de los tintes: una ruptura simétrica del enlace azo (Zimmermann *et al.*, 1982) y una ruptura asimétrica (Spadaro & Renganathan, 1994; Chivukula *et al.*, 1995). Incluso algunos autores sugirieron la coexistencia de ambos mecanismos tras la identificación de uno o varios productos finales (Goszczyński *et al.*, 1994). A pesar de todo, no se obtuvo una evidencia clara de la mayor implicación de un mecanismo o de otro.

En este estudio, y en colaboración con el Laboratoire de Chimie Analytique de la Université d'Auvergne y el Laboratoire de Synthèse, Electrosynthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique de la Université Blaise Pascal, ambas de Clermont-Ferrand (Francia), se identificaron nueve compuestos en la degradación enzimática de Orange II. Además, se concluyó que en el sistema tienen lugar dos tipos de ruptura de los enlaces de forma simultánea. El método de RMN, al ser no invasivo, permitió identificar un compuesto, 4-diazonio bencenosulfonato, que es clave para determinar la vía de degradación enzimática. Este compuesto se había propuesto con anterioridad, pero no había sido identificado debido a su alta inestabilidad térmica. Fue posible la cuantificación de productos, siempre y cuando las señales correspondientes no se superpusiesen y la concentración fuera

mayor de 10 μM . La colaboración con el Laboratoire de Chimie Analytique permitió aplicar la técnica de ESI-MS para corroborar los datos obtenidos mediante RMN. Todos los compuestos observados por RMN se detectaron por ESI-MS, a excepción de la sal de diazonio. Sin embargo, algunos compuestos que no se detectaron por RMN debido a razones de sensibilidad, sí que se observaron por MS: 1-diazo-2-naftol y 2-naftol. Este último, cuya presencia se confirmó por HPLC, no se había descrito previamente como producto de la degradación de los tintes azo, y es un punto clave en el mecanismo enzimático.

Se analizaron varios productos de degradación presentes en el medio de reacción y se observó que al menos dos de ellos presentan toxicidad (de acuerdo con el test Microtox). Sin embargo, dichos compuestos se generan en pequeñas concentraciones, y durante el proceso de degradación enzimática la toxicidad de la muestra disminuye considerablemente, del orden de 8 veces, por lo tanto el proceso no contribuye al aumento de la toxicidad del efluente.

Como conclusión, se debe resaltar que la contribución de la técnica RMN *ex situ* y la complementariedad entre las técnicas de RMN, MS y HPLC permitieron determinar el mecanismo de degradación de Orange II, y pueden ser útiles y aplicables a otros tintes azo. Además, los espectros de RMN y MS obtenidos se pueden incorporar a la base de datos de dichas técnicas para la realización de otros estudios.

5. Referencias

- Brecker, L. and Ribbons, D. W. (2000) Biotransformations monitored *in situ* by proton magnetic resonance spectroscopy. *Trends in Biotechnology* **18**, 197-202.
- Combourieu, B., Besse, P., Sancelme, M., Godin, J. P., Monteil, A., Veschambre, H. and Delort, A. M. (2000) Common degradation pathways of morpholine, thiomorpholine, and piperidine by *Mycobacterium aurum* MO1: evidence from ^1H -nuclear magnetic resonance and ion spray mass spectrometry performed directly on the incubation medium. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3187-3193.
- Coughlin, M. F., Kinkle, B. K. and Bishop, P. L. (2002) Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm. *Chemosphere* **46**, 11-19.
- Coughlin, M. F., Kinkle, B. K. and Bishop, P. L. (2003) High performance degradation of azo dye Acid Orange 7 and sulfanilic acid in a laboratory scale reactor after seeding with cultured bacterial strains. *Water Research* **37**, 2757-2763.

- Chivukula, M., Spadaro, J. P. and Renganathan, V. (1995) Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* **34**, 7765-7772.
- Delort, A. M. and Combourieu, B. (2000) Microbial degradation of xenobiotics. In: *NMR in Microbiology: Theory and Applications*. Barbotin, J. N. and Portais, J. C. Norfolk, UK, Horizon Scientific: 411-430.
- Fan, T. W. M. (1996) Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry* **28**, 161-219.
- Goszczynski, S., Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M. B., Crawford, R. L. and Crawford, D. L. (1994) New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Journal of Bacteriology* **176**, 1339-1347.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. and Forsythe, S. (2003) The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology* **101**, 49-56.
- Kaur, H., Leung, K. H. W. and Perkins, M. J. (1981) A water soluble, nitrosoaromatic spin-trap. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **3**, 142-143.
- López, C., Valade, A. G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B. and Lema, J. M. (2004) Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by *ex situ* ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **335**, 135-149.
- March, J. (2001) *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. New York, Wiley.
- Mielgo, I. (2002) Degradación de tintes industriales mediante manganeso peroxidasa en sistemas "in vivo" e "in vitro". Universidad de Santiago de Compostela. Tesis Doctoral.
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M. B., Goszczynski, S., Crawford, R. L. and Crawford, D. L. (1992) Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3598-3604.
- Porta, F. and Prati, L. (2000) Catalytic synthesis of C-nitroso compounds by *cis*-Mo(O)₂(acac)₂. *Journal of Molecular Catalysis A* **157**, 123-129.
- Sikharulidze, M. I., Khoshtariya, T. E., Kurkovskaya, L. N., Tret'yakova, L. G., Efimova, T. K. and Suvorov, N. N. (1979) Pyrrolocarbazoles: III. Synthesis and spectral properties of ¹H-pyrrolo[2,3-*a*]carbazole. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii* **10**, 1362-1366.
- Spadaro, J. T. and Renganathan, V. (1994) Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **312**(1), 301-307.
- Zimmermann, T., Kulla, H. G. and Leisinger, T. (1982) Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry* **129**, 197-203.

Zuman, P. and Shah, B. (1994) Addition, reduction, and oxidation reactions of nitrosobenzene. *Chemical Reviews* **94**(6), 1621-1641.

Capítulo 8

Postratamiento bacteriano de Orange II

Resumen

En este capítulo se estudia el postratamiento del efluente obtenido tras la degradación enzimática de Orange II. Dicho efluente está constituido por una cantidad residual de tinte, productos de su oxidación (estando sólo algunos identificados) y el crudo que contiene la enzima MnP. Se estudiaron, como alternativas, tratamientos biológicos anaerobios y aerobios. Mediante un tratamiento anaerobio (realizando análisis de toxicidad y biodegradabilidad y desarrollando un proceso en continuo) se consiguió la eliminación de un 30% de la demanda química de oxígeno (DQO) y el color del efluente, y se eliminó por completo el Orange II, generándose aminas aromáticas con potencial efecto tóxico. Se estudió un tratamiento aerobio (mediante ensayos de biodegradabilidad y mediante un proceso en continuo en un sistema de lodos activos), eliminándose el 25% de la DQO, aunque no se consiguió eliminar el color, ya que el tinte Orange II no se degradó, a pesar de que sí que lo hicieron otros compuestos procedentes de la oxidación enzimática del tinte. Dado que el objetivo prioritario es el de la eliminación de color del efluente, se consideró el tratamiento combinado enzimático-anaerobio como el más adecuado para la degradación del tinte azo Orange II.

Índice

1. Introducción	219
2. Materiales y métodos	222
2.1. Tratamiento anaerobio	222
2.2. Tratamiento aerobio	225
2.3. Técnicas analíticas	229
3. Resultados y discusión	234
3.1. Caracterización del efluente de degradación enzimática de Orange II	234
3.2. Tratamiento anaerobio	235
3.3. Tratamiento aerobio	244
4. Conclusiones	252
5. Referencias	254

1. Introducción

El empleo de microorganismos para la eliminación de tintes de efluentes industriales ofrece una serie de ventajas: el proceso es relativamente económico, los costes de operación son bajos y los productos finales de la mineralización completa no son tóxicos (Forgacs *et al.*, 2004). Sin embargo, tanto los procesos aerobios como los anaerobios presentan una serie de inconvenientes como métodos para el tratamiento de tintes.

Mediante procesos anaerobios se logra una degradación de los tintes (Carliell *et al.*, 1995; Donlon *et al.*, 1997; Méndez-Paz *et al.*, 2005), pero debido a la reducción del enlace azo, se generan aminas aromáticas (Pinheiro *et al.*, 2004). La mayoría de estas aminas, con carácter tóxico, no se degradan en condiciones anaerobias, por lo que el efluente de la degradación anaerobia en ocasiones presenta mayor toxicidad que el tinte de partida (Gottlieb *et al.*, 2003). Se han propuesto varios mecanismos de reducción de los tintes azo por parte de bacterias anaerobias: algunos autores explican la reducción mediante enzimas “azo-reductasas” intracelulares (Russ *et al.*, 2000). Otro mecanismo propuesto para la reducción no específica de los tintes azo se produce a través de la acción de mediadores redox, tales como quinonas, en que la degradación de los tintes tiene lugar por procesos de oxidación-reducción (Keck *et al.*, 1997).

Los tintes azo presentan un alto carácter recalcitrante a los tratamientos aerobios (Pagga & Brown, 1986; Shaul *et al.*, 1991; Ekici *et al.*, 2001). La eliminación de tintes en estos procesos se debe frecuentemente a la adsorción sobre los lodos (Pagga & Brown, 1986). Se ha estudiado la decoloración de tintes azo en condiciones aerobias y en presencia de fuentes adicionales de carbono (Kulla, 1981; Jiang & Bishop, 1994; Sugiura *et al.*, 1999). Coughlin *et al.* (2002, 2003) hallaron dos cepas capaces de degradar tintes en condiciones aerobias: la primera, *Sphingomonas* sp. 1CX, es capaz de reducir tintes azo que contienen la estructura 1-amino-2-naftol en condiciones aerobias; la segunda, SAD4i, degrada el ácido sulfanílico formado a partir de la reducción del tinte. Este sistema se aplicó a la degradación de Acid Orange 7 consiguiendo su mineralización. Otros autores estudiaron el tratamiento aerobio de tintes sin otras fuentes adicionales de carbono y energía (Yatome *et al.*, 1993; Dykes *et al.*, 1994). El mecanismo de degradación aerobio se realiza por medio de enzimas azorreductasas aerobias, que

fueron purificadas y caracterizadas para dos cultivos distintos (Zimmermann *et al.*, 1982). A pesar de todo, pocos son los trabajos en que se demuestra un proceso aerobio: así, en muchas ocasiones, realmente se hacen crecer las bacterias en condiciones aerobias, en presencia de medios complejos, y luego se incuban en presencia de tintes azo sin agitación. Es de suponer que el ambiente se vuelve carente de oxígeno en poco tiempo, de manera que las reacciones observadas en presencia de los tintes son realmente anaerobias (Stolz, 2001).

Generalmente, la degradación de tintes azo mediante procesos bacterianos se lleva a cabo en dos etapas: la primera implica la reducción del enlace azo en condiciones anaerobias, dando lugar a la formación de aminas aromáticas, que no tienen color pero son potencialmente tóxicas; la segunda etapa es la degradación aerobia de dichas aminas (van der Zee & Villaverde, 2005). El tratamiento combinado aporta una eliminación de color, que se produce prácticamente en su totalidad en la etapa anaerobia, y una eliminación de DQO, que tiene lugar principalmente en la etapa aerobia (Supaka *et al.*, 2004). En la Tabla 8.1 se muestran algunas aplicaciones del tratamiento combinado de tintes azo.

Se ha encontrado que una gran variedad de aminas aromáticas son biodegradables. Sin embargo, las aminas aromáticas sulfonadas son de difícil degradación, debido a que el grupo sulfónico presenta naturaleza hidrofílica, que obstruye el transporte a través de la membrana. La biodegradación de este grupo de aminas sólo se ha demostrado para compuestos simples como aminobenceno y aminonaftaleno sulfonados (Tan & Field, 2000). Otro mecanismo que se produce cuando las aminas aromáticas están expuestas a oxígeno es la autooxidación. Se ha encontrado que varias aminas se autooxidan dando lugar a oligómeros y eventualmente a polímeros de color oscuro y de baja solubilidad, que se pueden separar fácilmente de la fase acuosa.

El seguimiento de los productos de degradación tanto en procesos anaerobios como aerobios se realiza comúnmente mediante HPLC. Sin embargo, para aplicar esta técnica es necesario conocer el mecanismo de la degradación y disponer de compuestos patrón. A menudo el seguimiento se realiza por medio de la medida de la toxicidad: un incremento en la toxicidad tras el tratamiento anaerobio de tintes azo se interpreta como una evidencia indirecta de la formación de aminas aromáticas; por el contrario, la disminución de toxicidad entre el efluente de la etapa anaerobia y el efluente de la etapa aerobia es una indicación de la eliminación de las aminas (Gottlieb *et al.*, 2003).

Tabla 8.1. Tratamiento combinado anaerobio-aerobio de tintes azo

<i>Tipo de reactor^a</i>	<i>Eliminación color^b</i> (%)	<i>Eliminación aminas^c</i> (%)	<i>Referencia</i>
I	90-100	100	Rajaguru <i>et al.</i> , 2000
I	64	-	O'Neill <i>et al.</i> , 2000
I	≈100	≈100	Tan & Field, 2000
I	Máx. 100	65	Cruz & Buitrón, 2001
I	80-100	≈50	Sponza & Isik, 2005
II	Máx. 90	-	Lourenco <i>et al.</i> , 2003
II	90-99	-	Albuquerque <i>et al.</i> , 2005
II	86-96	-	Shaw <i>et al.</i> , 2002
III	20-90	-	Jiang & Bishop, 1994
III	84-88	-	Gottlieb <i>et al.</i> , 2003

^a Clase I: Etapas anaerobia y aerobia en reactores separados

Clase II: Reactores SBR basados en etapas secuenciales anaerobia y aerobia

Clase III: Reactores híbridos con zonas aireadas o sistemas microaerobios basados en el principio de difusión de oxígeno limitada en biopelículas microbianas

^b Etapa anaerobia

^c Etapa aerobia

El objetivo de este capítulo es seleccionar un postratamiento bacteriano para el efluente de la degradación enzimática del tinte azo Orange II. Dicho efluente consta de una pequeña concentración de Orange II residual y de distintos compuestos, productos intermedios y finales de la degradación enzimática. Algunos de ellos son compuestos que han sido identificados como productos de degradación anaerobia de Orange II: 1-amino-2-naftol y sulfanilato. Un tratamiento anaerobio de este efluente sería apropiado para la degradación completa del tinte, y por lo tanto, eliminaría color pero probablemente la pérdida de DQO fuese reducida. Un tratamiento aerobio podría eliminar los productos de la degradación enzimática, aunque no eliminaría el color asociado al tinte residual.

2. Materiales y métodos

2.1. Tratamiento anaerobio

Biomasa anaerobia

El lodo granular procede de un reactor piloto híbrido (UASB-UAF) empleado para el tratamiento de aguas residuales de la industria del vino. El reactor fue operado al menos por dos años con una velocidad de carga orgánica de 5 kg DQO/m³·d antes de tomar la muestra de lodos. Estos tenían un diámetro promedio de 1,5 mm, una concentración de biomasa de 60 g SV/L y una actividad metanogénica específica de 0,4 g DQO-CH₄/g SV·d. Los lodos se almacenaron a 4°C y se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar los substratos solubles antes de ser empleados en los ensayos.

Ensayos de toxicidad metanogénica

Se estudió el efecto de Orange II y el efluente de su degradación enzimática sobre las bacterias anaerobias mediante ensayos de toxicidad metanogénica. Para ello se utilizó un sistema basado en el desplazamiento volumétrico que produce el CH₄ generado por las bacterias metanogénicas sobre una disolución alcalina, que absorbe el CO₂.

Los ensayos se realizaron en botellas de 125 mL con 100 mL de medio cuya composición se detalla en la Tabla 8.2. Además de los componentes indicados, el medio se completó con agua, Orange II (25-50-100-200-500 mg/L) o efluente del reactor enzimático (70-80-90%), para observar la toxicidad de cada uno de estos componentes. El sulfuro de sodio se añadió para crear un ambiente reductor y el bicarbonato permitió mantener el pH en el medio entre 7 y 8, valores entre los cuales se fijó en el momento inicial. En cada uno de los frascos se borboteó una mezcla de N₂:CO₂ (85:15 v/v) para desalojar el aire del espacio de cabeza. Las botellas se mantuvieron en un baño termostático para conseguir una temperatura de 30°C.

El volumen de CH₄ producido en cada botella se midió por desplazamiento de una disolución de 25 g/L de NaOH en un sistema que utiliza un frasco de Mariotte invertido. El CO₂ contenido en el biogás se absorbe en la disolución de NaOH y sólo el CH₄ alcanza el espacio libre del recipiente de medición, de forma que desplaza un volumen equivalente de líquido.

Tabla 8.2. Composición del medio empleado en los ensayos de toxicidad metanogénica

<i>Composición del medio</i>			
Lodos anaerobios			5,7 g SSV/L
NaHCO ₃			200 mg/L
AGV (Acético: propiónico:butírico 4:1:1)			2 g DQO/L
Disolución de macronutrientes			1 mL/L
Disolución de micronutrientes			1 mL/L
Na ₂ S·9H ₂ O			100 mg/L
<i>Disolución de macronutrientes</i>			
NH ₄ Cl	170 g/L	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8 g/L
KH ₂ PO ₄	37 g/L	MgSO ₄ ·4H ₂ O	9 g/L
<i>Disolución de micronutrientes</i>			
FeCl ₃ ·4H ₂ O	2 g/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	90 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 g/L	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	100 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5 g/L	NiCl ₂ ·6H ₂ O	50 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg/L	EDTA	1 g/L
ZnCl ₂	50 mg/L	HCl 36%	1 mL/L
H ₃ BO ₃	50 mg/L	Resarzurina	500 mg/L

La actividad metanogénica se define como la velocidad de producción de CH₄, en unidades de DQO, por cantidad de biomasa del sistema (g DQO/g SSV·d) (Soto *et al.*, 1993a).

Ensayos de biodegradabilidad anaerobia

La biodegradabilidad de Orange II y del efluente de degradación enzimática se determinó a partir de la producción de CH₄ derivada de la degradación anaerobia de la muestra. En este caso el único sustrato de las bacterias es la propia muestra, de manera que el CH₄ producido proviene exclusivamente de su degradación. Los ensayos se llevaron a cabo en botellas de 270 mL con 250 mL del medio descrito en la Tabla 8.2, a excepción de AGV, que no fueron añadidos. Se adicionaron Orange II (100 mg/L) o efluente (90%), el pH del medio se ajustó a 7-8 y las botellas se llevaron a una cámara termostatazada a 30°C. Dada la

pequeña producción de CH₄ estimada, los ensayos se realizaron midiendo la sobrepresión en la botella originada por el gas producido, mediante un medidor de presión cuya lectura se tomó en milivoltios. La Ecuación 1 indica el calibrado del medidor de presión.

$$P(\text{atm})=1+(5,43 \cdot M+0,91) \cdot 0,00132 \quad (1)$$

donde M es la lectura del medidor de presión (mV). A partir del valor de la presión se calcularon los moles totales de gas mediante la ecuación de estado de los gases ideales. La composición del gas se analizó por cromatografía de gases.

Reactor anaerobio continuo

El tratamiento anaerobio del efluente de degradación enzimática se llevó a cabo en un reactor UASB de 165 mL de volumen útil. Mediante una pequeña bola en la zona de entrada, se permitió la entrada de la alimentación en flujo ascendente y se evitó la salida de biomasa. El biogás generado en el proceso permitió homogeneizar el reactor. Mediante una campana invertida en la parte superior se logró la separación de las tres fases del sistema: la fase gas, que abandonó el reactor por la parte superior de la campana; la fase sólida, que frenó su movimiento al chocar con las paredes de la campana; y la fase líquida, que abandonó el sistema por la salida lateral situada por encima del nivel al que se situaba la campana (Figura 8.1). La temperatura del reactor se mantuvo a 30°C por medio de un serpentín conectado a un baño termostatzado.

El reactor se alimentó con un medio como el descrito en la Tabla 8.2 (a excepción de la concentración de bicarbonato, que fue de 2 g/L), con AGV como cosustrato con una concentración de 2 g DQO/L y empleando como base el efluente del reactor enzimático. Durante los dos primeros días, el reactor se alimentó con la mitad de DQO para evitar una sobrecarga del sistema mientras no comenzaba la producción de biogás. La operación se mantuvo durante 14 d. Las condiciones de operación se presentan en la Tabla 8.3.

Durante la operación del reactor anaerobio se tomaron muestras diarias a la entrada y la salida del mismo y se analizaron pH, DQO, COT y color.

Tabla 8.3. Condiciones de operación del reactor anaerobio para el tratamiento del efluente de la degradación enzimática de Orange II

<i>Etapa (d)</i>	<i>V (mL)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>SSV (g/L)</i>	<i>VCO (kg/m³·d)</i>	<i>TRH (h)</i>
0-2	165	30	10	1,2	24
2-14	165	30	10	2,4	24

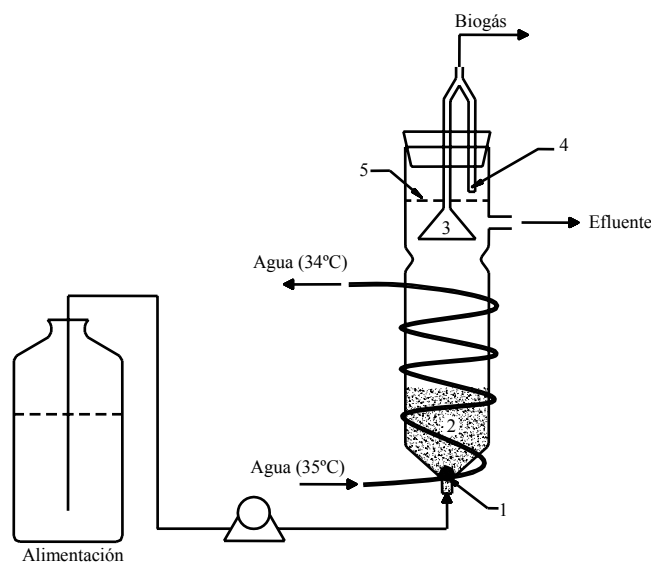


Figura 8.1. Esquema del reactor UASB para el tratamiento anaerobio del efluente de la degradación enzimática de Orange II: (1) bola que impide la salida de biomasa; (2) biomasa; (3) campana invertida; (4) salida de gas; (5) nivel de líquido

2.2. Tratamiento aerobio

Biomasa aerobia

La biomasa aerobia empleada procedió de la E.D.A.R. de Silvouta (Santiago de Compostela). Los lodos se lavaron con tampón fosfato 10 mM pH 7.

Ensayos de biodegradabilidad aerobia

Para analizar la biodegradabilidad del efluente de la degradación enzimática de Orange II en condiciones aerobias se realizó una medida de la demanda

biológica de oxígeno (DBO) tras 5 d de operación. Este ensayo consistió en la medida del consumo de oxígeno de la biomasa aerobia para realizar la oxidación de la materia orgánica.

El ensayo de degradación aerobia se llevó a cabo en botellas provistas de un tapón Oxitop, en una cámara termostatazada. Un sensor eléctrico colocado en el tapón permite la determinación de la variación de la presión parcial existente en la cámara de aire situada en la parte superior de las botellas. El CO₂ que se desprende se absorbe mediante pastillas de sosa colocadas en un depósito de goma situado en el cuello de la botella.

En primer lugar, se estimó el valor de DBO₅ como un 80% del valor de DQO de la muestra de efluente de la degradación enzimática. En función de ese valor, y empleando la Tabla 8.4 se estimó el volumen de muestra necesario para realizar los ensayos, en botellas de 500 mL color ámbar. Se puede emplear el volumen de muestra indicado por la tabla en función del valor estimado de DBO₅ o bien diluir la muestra hasta alcanzar un valor comprendido en el menor rango de medida y emplear el volumen total. Para diluir la muestra se empleó el agua de dilución estándar, que se obtuvo añadiendo 1 mL de cada una de las disoluciones indicadas en la Tabla 8.5 a 1 L de agua destilada; a continuación se agitó durante 15 min para saturarla de aire y se dejó reposar otros 15 min antes de su aplicación.

Tabla 8.4. Volumen de muestra para los ensayos de DBO₅ en función del valor estimado

<i>DBO estimada (mg DBO/L)</i>	<i>Volumen de muestra (mL)</i>	<i>Factor Oxitop</i>
0-40	432	1
0-80	365	2
0-200	250	5
0-400	164	10
0-800	97	20
0-2000	43,5	50
0-4000	22,7	100

Tabla 8.5. Composición del agua de dilución estándar empleada en los ensayos de DBO₅

<i>Disolución</i>	<i>Composición</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
A	KH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	8,5
	NaHPO ₄ ·7H ₂ O	33,4
	K ₂ HPO ₄	21,75
	NH ₄ Cl	1,7
B	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,25
C	CaCl ₂	27,5
D	MgSO ₄ ·7H ₂ O	22,5

Las botellas se prepararon añadiendo el volumen de muestra apropiado y el lodo aerobio necesario para lograr concentraciones de 0,002-0,02-0,2 g SSV/L. Se ajustó el pH entre 6 y 7, se cerraron las botellas y se colocaron en la cámara termostatzada a 20°C. Transcurridos 30 min y una vez las botellas alcanzaron la temperatura del ensayo, se comenzó el registro de medidas durante los 5 d de ensayo, con periodicidad de un registro por día.

Los ensayos se realizaron con agua, efluente de la degradación enzimática y Orange II a 100 mg/L, por duplicado, y se tomaron muestras iniciales y finales en las que se analizó DQO, COT, color y composición mediante HPLC.

Reactor aerobio continuo

El tratamiento aerobio en continuo se llevó a cabo en un reactor de lodos activos de 635 mL durante 42 d (Figura 8.2). La concentración de lodos fue de 2 g SSV/L. Las condiciones de operación se establecieron en 5 etapas diferentes, que se indican en la Tabla 8.6. Durante las 3 primeras etapas no se añadió efluente en la alimentación, con el fin de conseguir una operación estable. El sistema se alimentó únicamente con glucosa, cloruro de amonio y fosfato de potasio como fuentes de C, N y P, en relación 75:10:1. Las dos últimas etapas fueron las correspondientes al tratamiento del efluente enzimático. El reactor operó a temperatura ambiente y la alimentación se mantuvo a 4°C para evitar su degradación.

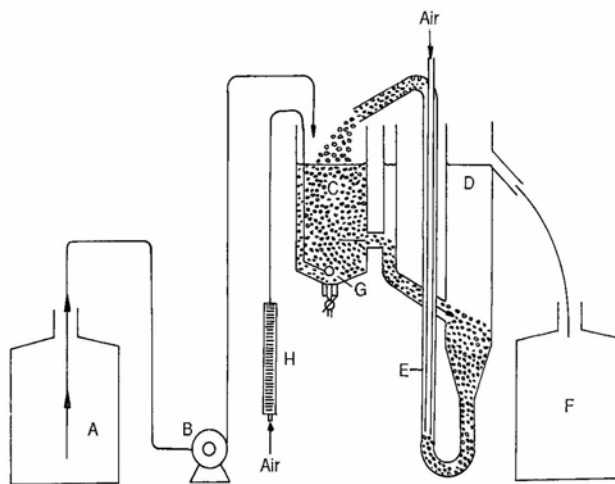


Figura 8.2. Esquema del reactor de lodos activos para el tratamiento aerobio del efluente de degradación enzimática de Orange II: (A) depósito de alimentación; (B) bomba de alimentación; (C) reactor de lodos activos; (D) sedimentador; (E) conducto de recirculación; (F) efluente; (G) difusor de aire

Tabla 8.6. Etapas de operación del reactor de lodos activos

Etapa (d)	TRH (h)	Alimentación					
		$C_6H_{12}O_6$ (mg/L)	NH_4Cl (mg/L)	KH_2PO_4 (mg/L)	$NaHCO_3$ (mg/L)	Efluente (%)	DQO_e (mg/L)
0-5	12	750	150	17	100	0	800
6-10	12	750	150	17	1000	0	800
11-25	12	375	75	8,5	1000	0	400
26-35	12	187,5	75	8,5	1000	100	360
36-42	24	187,5	75	8,5	1000	100	360

Durante el funcionamiento del reactor se realizó el seguimiento diario del pH, oxígeno disuelto, SSV en el reactor y DQO, COT y color en el efluente. Estos mismos análisis se realizaron en la alimentación tras cada cambio para poder establecer la variación entre la entrada y la salida del reactor.

2.3. Técnicas analíticas

Sólidos en suspensión totales (SST) y volátiles (SSV)

Los SST se determinan por filtración de un volumen conocido de muestra a través de filtros de fibra de vidrio Whatman del modelo GF/C de 4,7 cm de diámetro, que se secan durante 2 h a 103-105°C. La diferencia de peso de los filtros antes y después del secado permite calcular la concentración de SST (APHA-AWWA-WEF, 1998). Los SSV se determinan mediante la ignición de un volumen conocido de muestra filtrada a 550°C durante 30 min en una mufla (Selecta). Los SSV son la diferencia entre el peso antes y después de la calcinación (APHA-AWWA-WEF, 1998).

Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO es un parámetro adecuado para la medida de la materia orgánica oxidable por procesos químicos. Se define como la cantidad de oxígeno equivalente (en g/L) que hace falta para oxidar químicamente todos los compuestos oxidables presentes en el agua residual. El equipo necesario para realizar la determinación de DQO consiste en un bloque calefactor Velp científica, modelo ECO 16, un agitador magnético Hanna HI190M y una bureta para llevar a cabo la valoración. Se empleó un método propuesto por Soto *et al.* (1993b), modificado con respecto al método 508 (A-B) del Standard Methods (APHA-AWWA-WEF, 1998).

Para llevar a cabo el test se emplearon las siguientes disoluciones:

- i) Disolución digestora: 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$ y 33 g $HgSO_4$ disueltos en 500 mL de agua, a los que se añadieron 167 mL de H_2SO_4 comercial
- ii) Disolución catalítica: 10,7 g Ag_2SO_4 en 1 L de H_2SO_4 concentrado
- iii) Disolución de ferroína: 1,485 g $C_{18}H_8N_2 \cdot H_2O$ (fenantrolina monohidrato) y 0,695 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ disueltos en 100 mL de agua
- iv) Disolución FAS: 13,72 g $Fe(NH)_4(SO)_2 \cdot 6H_2O$ disueltos en agua destilada, a los que se añadieron 20 mL de H_2SO_4 concentrado y posteriormente diluidos a 1000 mL
- v) Disolución estándar de $K_2Cr_2O_7$ 0,05 N

El rango de medida de las muestras fue de 90 a 900 mg/L de DQO. Se tomaron 2,5 mL de muestra en un tubo Pirex de 10 mL y 16x100 mm, con

taponos de rosca de baquelita. Paralelamente se preparó un control con 2,5 mL de agua destilada. Se añadieron 1,5 mL de disolución digestora y 3,5 mL de disolución catalítica a cada tubo. Esta última se adicionó lentamente, de forma que el líquido cayó por la pared del tubo inclinado y se separaron dos fases. Así la mezcla de ambas disoluciones no se produjo hasta comenzar la digestión en el bloque calefactor.

Se cubrieron los tubos con cinta de teflón para evitar el ataque de la solución oxidante a la baquelita, se homogeneizaron por agitación y se colocaron en el bloque de digestión a 150°C durante 2 h. Al cabo de ese tiempo, los tubos se retiraron y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Su contenido se pasó a matraces Erlenmeyer de 25 mL que se lavaron con 2/3 de agua destilada. Se añadió una gota de ferroína, se valoró con la disolución FAS hasta viraje del color de azul a rojo y se anotó el volumen de disolución FAS consumido. La valoración de la disolución FAS se realizó sobre 5 mL de disolución estándar de $K_2Cr_2O_7$ 0,05 N.

La concentración de DQO se calculó según la Ecuación 2.

$$DQO(mg / L) = \frac{(B - A) \cdot N_{FAS} \cdot 8000}{2,5} \quad (2)$$

donde B y A son los volúmenes de FAS (en mL) de la valoración del blanco y la muestra, respectivamente; 2,5 es el volumen de la muestra en mL; N_{FAS} es la normalidad de la disolución de FAS, que se calcula mediante la Ecuación 3.

$$N_{FAS} = \frac{V_{K_2Cr_2O_7} \cdot N_{K_2Cr_2O_7}}{V_{FAS}} \quad (3)$$

donde el volumen de $K_2Cr_2O_7$ es de 5 mL y la normalidad de $K_2Cr_2O_7$ es de 0,05 N. V_{FAS} es el volumen consumido en la valoración de la disolución de FAS.

La determinación de DQO total se realizó sobre la muestra bruta, mientras que la determinación de DQO soluble se realizó sobre la muestra previamente filtrada con un filtro de 0,45 μm .

Carbono orgánico total (COT)

El COT es una medida directa del contenido de la materia orgánica total en una muestra. El COT se midió con un analizador Shimadzu TOC-5000, y se

calcula como la diferencia entre el carbono total (CT) e inorgánico (CI). Se utilizó aire de alta pureza como gas portador a 150 mL/min. El equipo determina el carbono total a partir del CO₂ que se produce durante la combustión catalítica de la muestra a 680°C, empleando como catalizador de oxidación platino inmovilizado sobre esferas de alúmina. El carbono inorgánico se obtiene a partir del CO₂ que se produce por reacción con H₃PO₄ al 25%. El CO₂ se mide ópticamente, después de haber eliminado la humedad, en un detector de infrarrojo no dispersivo (NDIR).

Ácidos grasos volátiles (AGV)

Los ácidos grasos volátiles: acético, propiónico, i-butírico, n-butírico, i-valérico y n-valérico, son productos intermedios en la digestión anaerobia. La acumulación de estos ácidos refleja un desequilibrio cinético entre los procesos productores y los consumidores de los mismos.

Los AGV se determinaron mediante cromatografía gaseosa empleando un equipo Hewlett Packard 5890A con un detector de ionización de llama (FID), conectado a un inyector automático Hewlett-Packard 7673A. Se utilizó una columna de vidrio rellena con Chromosorb WAW (web 100/120) impregnado con NPGA 25% y H₃PO₄ 2% (300 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno). La temperatura del inyector fue de 260°C y la temperatura de la columna se mantuvo a 105°C. Los AGV, después de ser separados en la columna en función de sus diferentes pesos moleculares, se queman en una llama de H₂-aire y se miden con el FID a 280°C. El rango de medida de concentración es de 50-1500 mg/L.

El gas portador fue nitrógeno saturado con ácido fórmico antes de entrar en el inyector, con un caudal de 24 mL/min. Como gases auxiliares se utilizaron aire e hidrógeno con caudales de 400 y 30 mL/min, respectivamente. Los análisis se realizaron empleando ácido trimetil acético (ácido piválico) como patrón interno.

Medida de biogás

La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un equipo HP 5890 Series II, con un detector de conductividad térmica (TCD). El gas empleado como fase móvil fue helio.

El procedimiento de medida comenzó con la introducción en el bloque de inyección de 1 mL de la muestra de gas a analizar, que se vaporiza a la entrada de

la columna termostaticada. Esta operación se realizó de modo manual, con una jeringa, e iniciando el proceso de medida también de forma manual. A medida que los componentes salen de la columna, por orden de velocidad de migración, entran a la celda del detector, emitiendo una señal que se recoge en un registrador y se traza en una gráfica. Con el calibrado (Ecuaciones 4-6), se calcularon los moles de cada una de las señales y, con esto, el porcentaje en moles de metano.

$$N_2 = A_1/1,324 \quad (4)$$

$$CH_4 = A_2/0,638 \quad (5)$$

$$CO_2 = A_3/1 \quad (6)$$

donde A_1 , A_2 y A_3 son las áreas correspondientes a las señales de N_2 , CH_4 y CO_2 respectivamente. N_2 , CH_4 y CO_2 son los moles de cada uno de estos compuestos en la mezcla de biogás.

Medida de glucosa

Se realizó la determinación de glucosa por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El reactivo se preparó añadiendo 10,6 g de reactivo DNS y 19,8 g de NaOH a 1 L de agua destilada. Tras la disolución completa se adicionaron 306 g de $KNaC_4H_4O_6$, 7,6 mL de fenol líquido y 8,3 g de metabisulfito de sodio. Se completó con agua hasta un volumen de 1.416 mL y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C.

Se realizaron patrones de concentraciones conocidas de glucosa y se analizaron los patrones y las muestras. En un tubo de vidrio se tomaron 1 mL de muestra y 3 mL de disolución de DNS. Se llevó a ebullición durante 5 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 min. Se midió la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A (Shimadzu, Kioto, Japón). La concentración de glucosa se midió mediante la Ecuación 7. El calibrado tiene validez entre 0 y 1 g/L.

$$\text{Glucosa (g/L)} = 1,995 \cdot \text{Abs}_{640 \text{ nm}} \quad R^2 = 0,995 \quad (7)$$

Determinación de concentraciones mediante HPLC

La concentración de compuestos se determinó mediante cromatografía líquida con un HPLC Hewlett Packard ChemStation equipado con un detector de array de diodos 1090 M Serie II. Se empleó una columna LiChrospher 100 RP-18 (4 mm diámetro interno y 250 mm de longitud) que contiene partículas empacadas de 5 µm (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). Se inyectaron 25 µL de muestra y se empleó como fase móvil una disolución de 30% de acetonitrilo y 70% de carbonato de amonio 0,03 M pH 7,9, a un flujo de 0,8 mL/min en condiciones isocráticas y 30°C. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 231 nm. Los tiempos de retención para los distintos compuestos analizados fueron los indicados en la Tabla 8.7.

Tabla 8.7. Tiempos de retención por HPLC de los compuestos resultantes de la degradación de Orange II

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
Sulfanilato	2,00-2,01
4-hidroxibencenosulfonato	2,03-2,04
Bencenosulfonato	2,07-2,08
1-amino-2-naftol	3,2-3,3 y 10,8-10,9
1,2-naftoquinona	3,2-3,3 y 10,8-10,9
2-naftol	4,5-4,6
Orange II	6,8-7,0

Test de toxicidad

La toxicidad de las muestras se determinó mediante el test de toxicidad Microtox (Azur Environmental, Newark, EEUU). Este test emplea una bacteria marina que emite luminiscencia, *Photobacterium phosphoreum*, como organismo para realizar el bioensayo. Se expone esta bacteria a las muestras, diluidas en agua Milli-Q si fuera necesario, y se mide el efecto tóxico en el organismo. La reducción de la emisión de luz generalmente es proporcional a la concentración de los contaminantes presentes. En los ensayos se calcularon dos valores de EC₅₀, tras 5 y 15 min de exposición de la bacteria a las muestras a 15°C. La orden del 13 de Octubre de 1989 acerca de los Métodos de Caracterización de Residuos

Tóxicos y Peligrosos establece que un agua residual es tóxica si presenta un EC_{50} (tras 15 min a 15°C) igual o menor de 3000 ppm.

Otras técnicas analíticas

El color se midió como la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de 480 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

La concentración de oxígeno disuelto se midió mediante un oxímetro Oxi 340 WTW (Alemania).

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización del efluente de degradación enzimática de Orange II

El efluente de la degradación enzimática de Orange II está constituido por la mezcla de los efluentes de los distintos ensayos llevados a cabo en el reactor enzimático de membrana en diferentes condiciones, y el medio del reactor tras la finalización de cada ensayo, conteniendo el crudo enzimático añadido a lo largo del proceso. Debido a que no se conoce la composición exacta del mismo, su degradación se analizó en función de cuatro parámetros básicos: DQO, color, concentración de algunos componentes y toxicidad. La caracterización se presenta en la Tabla 8.8.

Tabla 8.8. Caracterización del efluente de la degradación enzimática de Orange II

<i>DQO (mg/L)</i>	<i>COT (mg/L)</i>	<i>Abs_{461 nm}¹</i>	<i>Orange II (mg/L)</i>	<i>EC₅₀ (ppm)</i>
193	72,9	0,7	15	3,5·10 ⁵

¹ Muestra diluida 2 veces

El efluente presentó una carga orgánica baja, tal como se podría esperar. La absorbancia del efluente a 461 nm, la longitud de onda para la cual la absorbancia es máxima (Figura 8.3), permitió determinar la coloración. La composición de la muestra se analizó mediante HPLC, y se observaron señales correspondientes a varios compuestos, de los cuales sólo algunos fueron identificados (Capítulo 7). En el total del efluente homogeneizado se determinaron unos 15 mg/L de Orange II, mientras que las concentraciones de los productos finales identificados fueron muy pequeñas. Por este motivo se analizó la carga orgánica total mediante DQO y

COT. Por último, los ensayos de toxicidad Microtox indicaron que la muestra no era tóxica, pues sólo se consideran tóxicas aquellas muestras con EC_{50} menor de 3000 ppm.

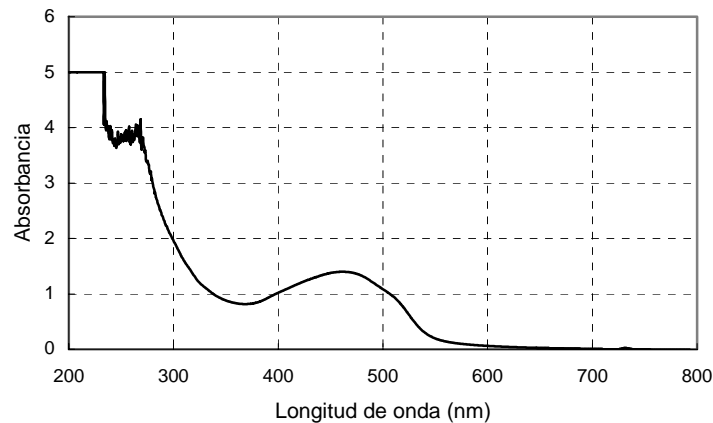


Figura 8.3. Espectro de absorción del efluente de degradación enzimática de Orange II

3.2. Tratamiento anaerobio

Toxicidad metanogénica

Los ensayos de toxicidad metanogénica permiten conocer en qué medida una determinada sustancia puede afectar a la biomasa anaerobia, produciendo un descenso de su actividad metanogénica o incluso una pérdida total de actividad. En el consorcio microbiano, las bacterias metanogénicas son las encargadas de realizar el último paso de la degradación, que consiste en la transformación de los AGV en CO_2 y CH_4 . Esta se considera la etapa limitante del proceso y la que controla su velocidad.

Los ensayos se llevaron a cabo añadiendo diferentes concentraciones de Orange II o efluente en las botellas de degradación anaerobia, empleando AGV como fuente de carbono. Tras 7 d, cuando las bacterias ya consumieron todo el sustrato, se realizó una segunda adición de AGV, con el fin de comprobar de nuevo la actividad metanogénica de los lodos una vez adaptados al posible tóxico. A partir de las curvas de producción de CH_4 con el tiempo, se determinó la DQO consumida por unidad de volumen y tiempo, y a partir de ahí la actividad

metanogénica. Las actividades para las dos adiciones de AGV en los ensayos con Orange II y efluente se muestran en la Figura 8.4.

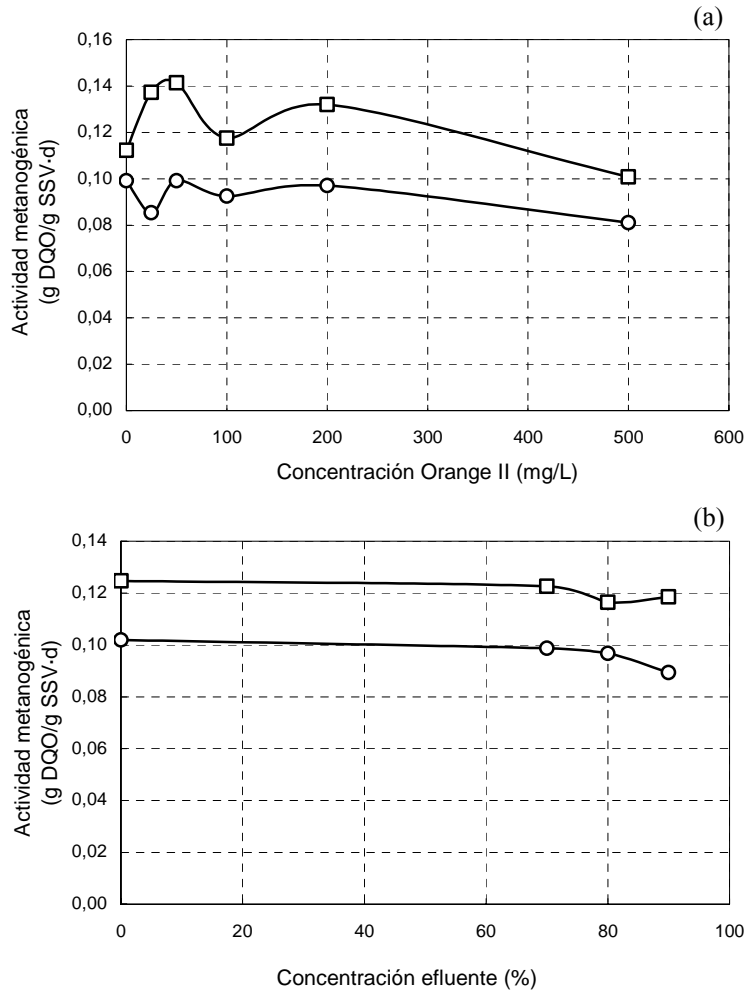


Figura 8.4. Toxicidad metanogénica de (a) Orange II y (b) efluente de la degradación enzimática: (○) primera adición de AGV; (□) segunda adición de AGV

La actividad metanogénica del lodo tras la primera adición de sustrato alcanzó valores de 0,10 g DQO/g SSV·d, mientras que tras la segunda adición de AGV se llegó a 0,12 g DQO/g SSV·d. Dado que en los controles sin tóxico se obtuvo el mismo resultado, se deduce que el aumento de la actividad metanogénica no es debido a la adaptación a la presencia del colorante, sino a su adaptación al medio.

El efecto tóxico del tinte Orange II sólo se observó a concentraciones de 500 mg/L, en que las actividades metanogénicas tras ambas adiciones de AGV disminuyeron alrededor de 0,02 g DQO/g SSV·d. Sin embargo, a valores de 100 mg/L, que fue la concentración empleada en la mayor parte de los ensayos de degradación enzimática, el tinte no resultó tóxico para el lodo. El efluente de la degradación de Orange II no causó la disminución de la actividad metanogénica de la biomasa, con lo que se puede decir que este resulta totalmente inocuo, de forma que es posible plantear un tratamiento anaerobio.

Biodegradabilidad anaerobia

Los ensayos de biodegradabilidad permiten estimar la fracción de DQO biodegradable por vía anaerobia, y por tanto, transformada a metano, y la fracción recalcitrante, que permanece en el efluente. En este caso no se adiciona sustrato, de modo que la única fuente de carbono de la biomasa es la proporcionada por la muestra a degradar.

Se realizaron ensayos de biodegradabilidad anaerobia en presencia de 100 mg/L de Orange II, efluente y controles con agua. Paralelamente se llevaron a cabo controles en presencia de Orange II y efluente, pero sin biomasa, con el objetivo de comprobar si las muestras se degradan por sí mismas. Asimismo, se realizaron controles con biomasa inactivada térmicamente, con el objetivo de comprobar que no se produce adsorción en el lodo. Se realizó un seguimiento de la producción de CH₄, y se observó que el control en ausencia de Orange II o efluente producía unos 50 mL de CH₄ tras 36 d de operación, mientras que en presencia de Orange II y efluente se generaban 22 y 35 mL, respectivamente. El metano producido en el control se debió al metabolismo endógeno de los microorganismos. La menor producción de metano en presencia de Orange II con respecto al producido con el efluente podría indicar la menor biodegradabilidad del tinte frente a este. Sin embargo, de este resultado no se puede deducir qué parte de la producción de metano podría corresponder al metabolismo endógeno, por lo tanto, no puede dar información acerca de la biodegradabilidad de los efluentes.

Los valores de DQO y COT al inicio de los ensayos y su eliminación al cabo de 36 d se muestran en la Tabla 8.9. La DQO presente en el control es la correspondiente a la biomasa; este valor coincide con la diferencia entre cada ensayo y sus correspondientes controles sin biomasa. El sistema con efluente

presenta una DQO mayor que el que solamente contiene Orange II, lo que puede deberse a que el primero está constituido por los productos de degradación de Orange II y por el crudo enzimático, que aporta DQO biodegradable. El control indica que, tras 36 d, se degradaron 22,5 mg DQO/L correspondientes a la biomasa. Considerando que ese valor es similar en los ensayos con fuente de carbono, se deduce que en presencia de Orange II y efluente se degradaron 48,5 y 63,3 mg DQO/L, respectivamente.

Tabla 8.9. Eliminación de DQO y COT tras 36 d en los ensayos de biodegradabilidad anaerobia de Orange II y el efluente de su degradación enzimática. *Control*: sin fuente de carbono; *Control Orange II* y *Control efluente*: sin biomasa

Muestra	DQO		COT	
	DQO ₀ (mg/L)	% eliminación	COT ₀ (mg/L)	% eliminación
Control	49,5	45,5	1,8	100
Orange II	196,0	36,2	43,4	30,9
Control Orange II	137,5	0	67,3	0
Efluente	251,0	34,2	43,4	36,1
Control efluente	206,8	0	68,5	0

La Figura 8.5 permite observar la pérdida de color que tuvo lugar en estos ensayos. El tratamiento anaerobio permite la degradación completa del tinte, si bien permanecen algunos compuestos coloreados del tratamiento enzimático.

El análisis de la composición del medio resultante de la degradación anaerobia comenzó por la determinación de AGV, puesto que la metanogénesis es la etapa más lenta del proceso, y una acumulación de AGV indicaría una degradación incompleta. La concentración de estos compuestos fue nula, lo que indica que la degradación fue completa hasta llegar a metano.

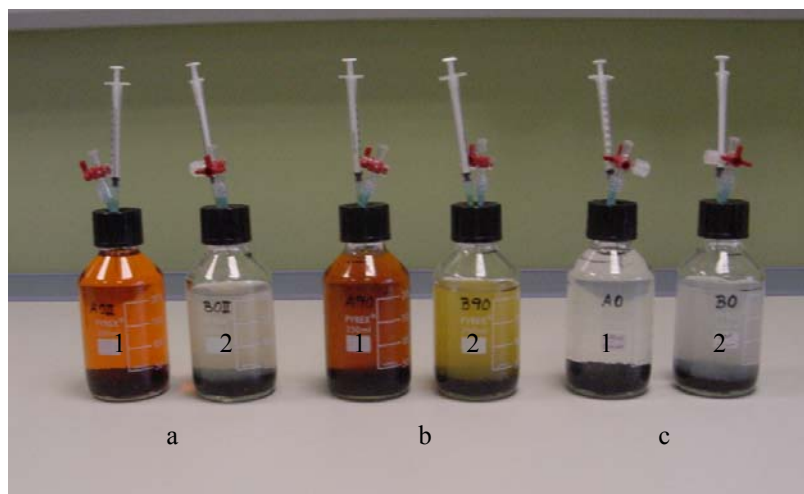


Figura 8.5. Ensayos de biodegradación anaerobia: (a) Orange II; (b) efluente de la degradación enzimática; (c) control sin fuente de carbono; (1) tiempo inicial; (2) tras 36 d

Se analizó la composición de las muestras finales por HPLC. La degradación anaerobia de Orange II dio lugar a la formación de ácido sulfanílico en proporciones estequiométricas, como se reflejó anteriormente en otros trabajos (Méndez-Paz *et al.*, 2005). En cuanto a la degradación del efluente enzimático de Orange II, algunos de los compuestos que forman parte del mismo, tales como 4-hidroxibencenosulfonato, permanecieron invariables. Sin embargo, las señales obtenidas por HPLC indican que el Orange II residual y otros compuestos no identificados sufrieron variaciones, disminuyendo sus concentraciones en mayor o menor medida (Figura 8.6). Teniendo en cuenta esta degradación observada cualitativamente, así como la pérdida de color y la eliminación de más de un 30% de la DQO inicial, el tratamiento anaerobio parece adecuado como postratamiento de la degradación enzimática de Orange II, y parece oportuno el planteamiento de un reactor continuo anaerobio para su degradación.

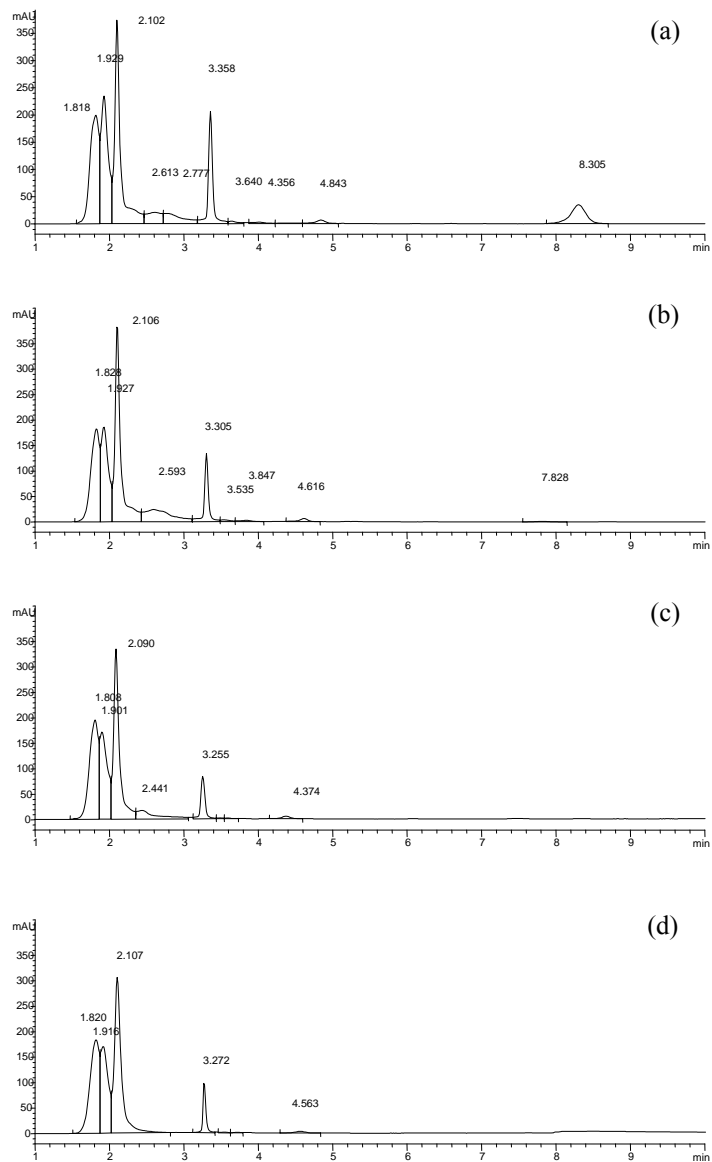


Figura 8.6. Composición de las muestras de degradación anaerobia del efluente del tratamiento enzimático de Orange II por HPLC: (a) tiempo inicial; (b) tras 7 d; (c) tras 21 d; (d) tras 36 d. Tiempos de retención: 4-hidroxibencenosulfonato: 2,1 min; Orange II: 8,3 min

Reactor anaerobio continuo

Se implementó un reactor anaerobio continuo, tipo UASB, para el tratamiento anaerobio del efluente de la degradación enzimática de Orange II, el cual se operó durante 14 d (Figura 8.7). La alimentación del reactor durante los dos primeros días de operación contenía una concentración de AGV tal que proporcionó 1 g DQO/L, para evitar la saturación del sistema. A partir de las 48 h, se duplicó la carga de AGV, de manera que proporcionó aproximadamente 2 g DQO/L a la alimentación. Las condiciones de DQO, COT y color en la alimentación se muestran en la Tabla 8.10 y los porcentajes de eliminación en la Figura 8.8. La decoloración se midió como el porcentaje de disminución de la absorbancia a la longitud de onda para la cual es máxima.



Figura 8.7. Reactores continuos para el tratamiento anaerobio del efluente de la degradación enzimática de Orange II

Tabla 8.10. Características de la alimentación del reactor anaerobio continuo

<i>DQO (g/L)</i>	<i>COT (mg/L)</i>	<i>Abs_{455 nm}¹</i>	<i>pH</i>
2,33	983	0,59	7-7,2

¹ Muestra diluida 2 veces

Los valores de DQO y COT de la alimentación fueron muy elevados en comparación con los que presentaba el efluente de la degradación enzimática. La

mayor aportación a estos valores fue realizada por los AGV adicionados, que actúan como sustrato de la degradación. Las altas eliminaciones de DQO y COT, entorno al 90% (Figura 8.8), fueron debidas al consumo de sustrato realizado por la biomasa anaerobia. Por este motivo se hace difícil determinar cuál fue el consumo de DQO y COT relativos al efluente enzimático en función de estos valores.

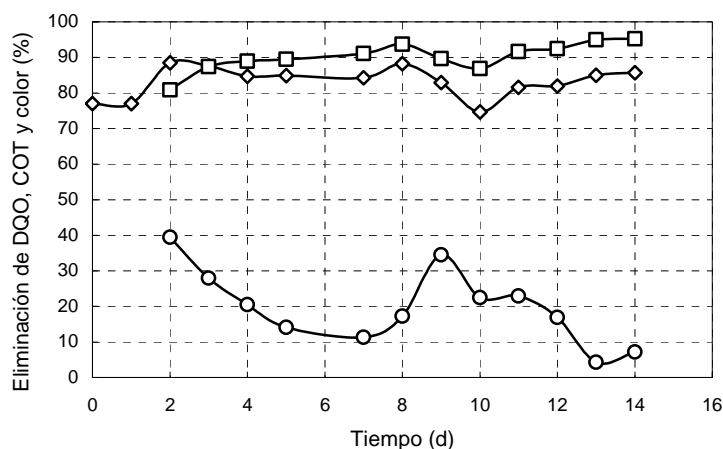


Figura 8.8. Eliminación de (\diamond) DQO, (\square) COT y (\circ) color durante la operación en el reactor anaerobio continuo

La eliminación de color fue baja, sobre un 20-30%, como se observaba en los ensayos de biodegradabilidad anaerobia. La pérdida de color fue debida a la degradación de Orange II, que se encuentra en pequeñas cantidades en el efluente enzimático, mientras que otros componentes coloreados del mismo no se degradaron por vía anaerobia. La comparación entre los espectros de absorbancia del influente y el efluente del reactor refleja un ligero descenso del color a la longitud de onda de máxima absorbancia, así como un desplazamiento del perfil de absorbancias a la salida en relación con la entrada (Figura 8.9). Dicho desplazamiento podría ser debido a la degradación de unos productos y la generación de otros que absorben a longitudes de onda menores.

La composición de las corrientes de entrada y salida se analizó mediante HPLC (Figura 8.10). Se observó la desaparición de Orange II presente en el influente ($t_r=7,1$ min); sin embargo, el compuesto 4-hidroxibencenosulfonato ($t_r=2,2$ min) no fue degradado, tal como sucedía en los ensayos de

biodegradabilidad. Los cromatogramas de HPLC muestran la disminución de algunos otros compuestos presentes en el efluente enzimático.

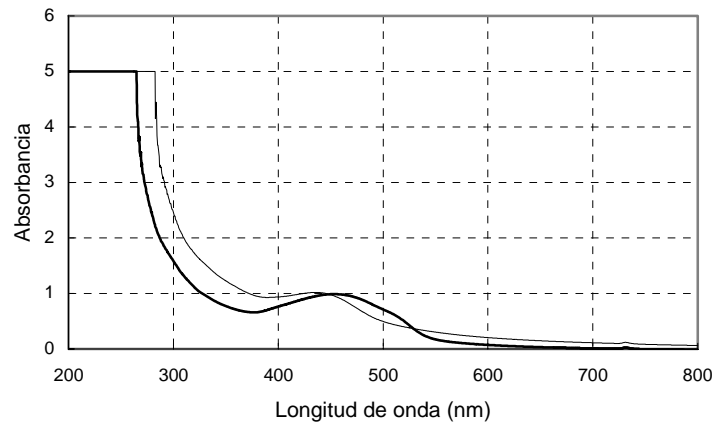


Figura 8.9. Comparación de los espectros de absorción de influente (línea gruesa) y efluente (línea fina) del tratamiento en un reactor anaerobio continuo

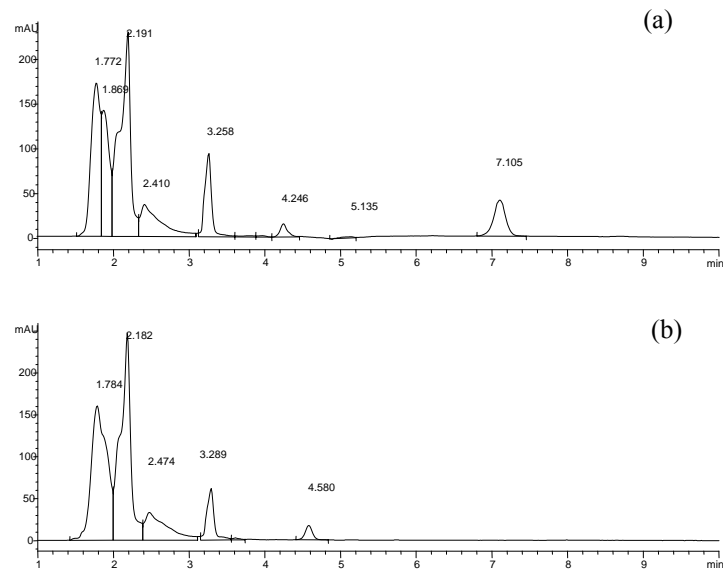


Figura 8.10. Composición de las muestras de (a) influente y (b) efluente del reactor anaerobio continuo. Tiempos de retención: 4-hidroxibencenosulfonato: 2,2 min; Orange II: 7,1 min

El tratamiento anaerobio aumentó la toxicidad de las muestras (Tabla 8.11), aunque los valores de EC_{50} alcanzados tanto para el influente como para el efluente son muy superiores a la concentración de 3000 ppm, por debajo de la cual una muestra se considera tóxica.

Tabla 8.11. Toxicidad del influente y efluente del postratamiento anaerobio en continuo

<i>Muestra</i>	<i>EC₅₀ (ppm)</i>	<i>Toxicidad</i>
Influente reactor anaerobio	$3,5 \cdot 10^5$	No tóxico
Efluente reactor anaerobio	$2,5 \cdot 10^5$	No tóxico

El aumento de toxicidad puede deberse a la generación de aminas aromáticas tras el tratamiento anaerobio del tinte residual (van der Zee & Villaverde, 2005), pero debido a su pequeña concentración, no aportan carácter tóxico al efluente. La eliminación de DQO, COT, color y degradación de varios compuestos que forman parte del efluente enzimático señalan al sistema anaerobio como adecuado para el postratamiento del mismo.

3.3. Tratamiento aerobio

Biodegradabilidad aerobia

Los ensayos de DBO_5 tuvieron dos objetivos principales: *i*) comprobar si el tinte Orange II y el efluente enzimático resultan tóxicos para la biomasa aerobia; *ii*) estudiar la biodegradabilidad de las corrientes analizadas, observando el consumo de oxígeno por las bacterias aerobias.

En primer lugar se realizaron ensayos de tanteo, para determinar la concentración de sólidos tal que permita obtener unos valores de consumo de oxígeno adecuados al rango marcado por el método Oxitop que se aplicó. Para ello se realizaron ensayos control (sin fuente de carbono), con Orange II y con efluente, por duplicado, a tres concentraciones diferentes de biomasa: 0,002-0,02 y 0,2 g SSV/L. Dado que la DQO del efluente enzimático es de 200 mg/L, se consideró la dilución de las muestras por un factor de 5 (Tabla 8.4), de manera que el agua de dilución contribuyó a la aportación de nutrientes al medio. Se realizaron controles con biomasa inactivada y se comprobó que no se produjo adsorción del tinte sobre el lodo.

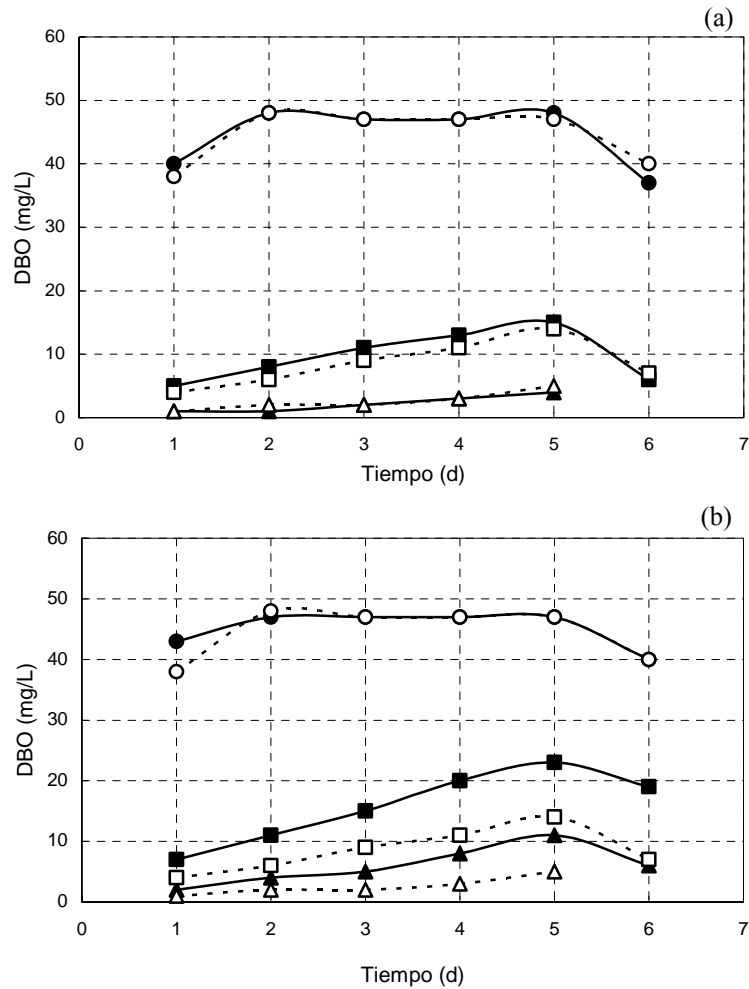


Figura 8.11. Ensayos de DBO₅ de: (a) Orange II; (b) efluente de degradación enzimática; (Δ) 0,002 g SSV/L; (\square) 0,02 g SSV/L; (\circ) 0,2 g SSV/L; símbolos abiertos: control sin fuente de carbono; símbolos cerrados: ensayos con fuente de carbono

Tanto en los controles como en presencia de fuentes de carbono, la concentración de sólidos más elevada implicó un consumo de todo el oxígeno del espacio libre de la botella al cabo de 24 h. La concentración más adecuada de biomasa para que los valores de DBO se sitúen en el rango de medida fue un valor intermedio de 0,02 g SSV/L. Con esta concentración de biomasa, en presencia de Orange II se obtuvieron valores de DBO similares a los obtenidos en los controles sin fuente de carbono. Esto es indicativo de que la biodegradabilidad del tinte es prácticamente nula y de que el tinte no resulta tóxico a la biomasa. El

análisis de las muestras por HPLC confirmó que la concentración de Orange II se mantuvo constante a lo largo de todo el ensayo. En presencia de efluente enzimático, se apreció diferencia en cuanto al consumo de oxígeno con respecto al control. Además los análisis de HPLC mostraron la disminución de algunas señales, como la correspondiente a 4-hidroxibencenosulfonato, que desaparece por completo. Esto indica una cierta biodegradabilidad aerobia del efluente enzimático.

El ensayo de DBO₅ se repitió en presencia de efluente con una concentración de biomasa intermedia, de 0,065 g SSV/L, y diluyendo un factor de 2, de manera que el volumen total de ensayo fue de 250 mL (Tabla 8.4). Los resultados confirmaron la biodegradabilidad del efluente con respecto al control, pues se observó una clara diferencia entre ambos consumos de oxígeno (20% superior en presencia de efluente tras 7 d de ensayo).

La DQO eliminada en el ensayo control fue de 11,8 mg/L, correspondiente a eliminación de biomasa, como único componente que aporta DQO a la muestra (Tabla 8.12). La DQO eliminada en el ensayo con efluente fue de 47,2 mg/L, lo que implica que parte de los componentes del efluente fueron degradados por las bacterias aerobias. Además, la eliminación de un porcentaje de COT implica la mineralización parcial del efluente.

Tabla 8.12. Eliminación de DQO, COT y color tras 7 d en los ensayos de biodegradabilidad aerobia

<i>Muestra</i>	<i>DQO</i>		<i>COT</i>		<i>Color</i>	
	<i>DQO₀</i> (mg/L)	<i>Eliminación</i> (%)	<i>COT₀</i> (mg/L)	<i>Eliminación</i> (%)	<i>Abs_{461 nm}</i>	<i>Eliminación</i> (%)
Control	66,6	8,8	20,8	9	-	-
Efluente	100	23,6	32,6	24,7	0,385	0

Se realizaron análisis de cromatografía para determinar la degradación de los compuestos constituyentes del efluente (Figura 8.12). La concentración del tinte Orange II ($t_r=7,7$ min) permaneció invariable tras 7 d de operación en el sistema aerobio, de manera que el sistema no experimentó decoloración (Tabla 8.12). Sin

embargo, otros compuestos tales como 4-hidroxibencenosulfonato ($t_r=2,0$ min) fueron degradados en condiciones aerobias.

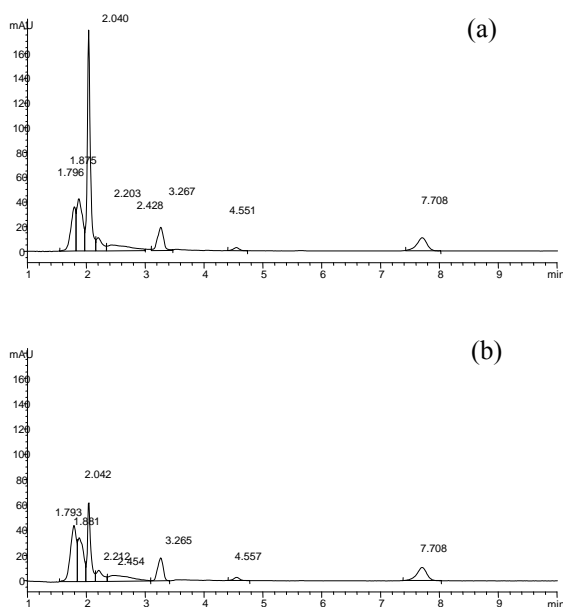


Figura 8.12. Composición de las muestras del ensayo de biodegradabilidad aerobia: (a) tiempo inicial; (b) tras 7 d. Tiempos de retención: 4-hidroxibencenosulfonato: 2,0 min; Orange II: 7,7 min

El tratamiento aerobio no contribuye a la decoloración del efluente de degradación enzimática de Orange II; a pesar de ello, permite la degradación de otros compuestos, que no aportan color, pero pueden aportar toxicidad a las muestras. Por lo tanto, se puede considerar el tratamiento aerobio en continuo como una opción de postratamiento bacteriano de Orange II.

Reactor aerobio continuo

La operación del reactor de lodos activos se mantuvo durante 42 d (Figura 8.13). En función de las condiciones de trabajo, se dividió en 5 etapas (Tabla 8.6): durante las tres primeras, correspondientes a los primeros 25 d, el reactor trabajó sin efluente enzimático, hasta conseguir una operación estable; durante las dos últimas, además de glucosa, se adicionó efluente como fuente de carbono. Durante todo el funcionamiento del reactor, se analizó la concentración de glucosa en el influente y efluente, y se comprobó que el consumo fue del 100%.

La temperatura se mantuvo entre 19 y 23°C, el oxígeno disuelto entre 6 y 8 mg/L y la biomasa se mantuvo entre 1,5 y 2 g SSV/L.



Figura 8.13. Reactor de lodos activos para el tratamiento aerobio del efluente de la degradación enzimática de Orange II

La operación comenzó con una DQO de entrada de 800 mg/L, aportada principalmente por 750 mg/L de glucosa, y una concentración de bicarbonato de 100 mg/L. El pH durante esta primera etapa se mantuvo por valores incluso inferiores a 6, con lo cual en el día 5 se aumentó la concentración de bicarbonato hasta 1 g/L. Esta segunda etapa estuvo marcada por la flotación de los lodos en el sedimentador, a consecuencia de lo cual se produjeron pérdidas de biomasa por la salida del reactor, lo que dificultó una operación estable en cuanto a concentración de SSV. Una de las causas comunes de flotación de los lodos es la generación de bacterias filamentosas que se producen cuando la relación F/M (alimentación/microorganismos), tiene un valor elevado, superior a 0,6 g DQO/g SSV·d (Ramalho, 1996). La relación F/M en la etapa 2 del arranque del reactor fue de 0,8 g DQO/g SSV·d. Para evitar este problema, este valor se disminuyó a la mitad en una tercera etapa, disminuyendo la concentración de glucosa a la mitad, y en consecuencia las fuentes de N y P. En estas condiciones, se mantuvo una operación estable durante 14 d, con una concentración de biomasa del orden de 1,5 g SSV/L y un pH de 7,5.

Con el reactor operando en condiciones estables, se comenzó a alimentar el efluente de la degradación enzimática de Orange II, en el que se añadió la concentración de glucosa necesaria para obtener una DQO igual a la de la etapa 3. Para ello, teniendo en cuenta que la DQO del efluente es de 193 mg/L, se redujo la glucosa a la mitad y se mantuvieron las concentraciones de fuentes de N y P. Durante las etapas 4 y 5 las condiciones de la alimentación fueron las indicadas en la Tabla 8.13.

Tabla 8.13. Características de la alimentación del reactor aerobio continuo

DQO (mg/L)	COT (mg/L)	Abs _{455 nm} ¹	pH
360	128	0,612	7-7,2

¹ Muestra diluida 2 veces

Durante el tratamiento del efluente enzimático, se realizó el seguimiento de pH y oxígeno disuelto en el reactor, que se mantuvieron estables. Solamente durante los últimos días de operación el pH aumentó a 9 y la concentración de biomasa decreció, debido a nuevas pérdidas por flotación de los lodos. Se midió también la concentración de glucosa a la salida del reactor, observándose que toda la glucosa añadida en la alimentación se consumió en el proceso aerobio.

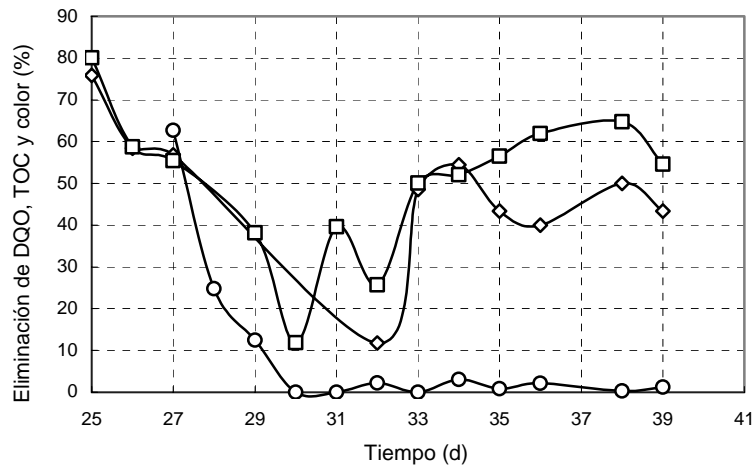


Figura 8.14. Eliminación de (◇) DQO, (□) COT y (○) color durante la operación en el reactor aerobio continuo

Los valores de eliminación de DQO, TOC y color se muestran en la Figura 8.14. Durante los 3-4 primeros días, los porcentajes de eliminación fueron elevados, aunque esto fue debido al efecto de dilución que se produce al cambiar la alimentación desde la fase de arranque del reactor al efluente de la degradación enzimática. A partir de los 30 d de operación, se obtuvo una disminución de DQO y COT de un 50%, que fue debida al consumo de glucosa que se empleó como cosustrato. A partir del día 36 se modificó el TRH del reactor de 12 a 24 h, sin embargo los resultados de eliminación de DQO y TOC no presentaron una mejoría significativa, debido a que la concentración de sólidos en el reactor a partir del día 35 fue menor de 1 g SSV/L.

La decoloración prácticamente fue nula a lo largo de todo el proceso, lo que corroboró la teoría de que el compuesto que da color, que es principalmente la cantidad residual de tinte, no se degrada por vía aerobia. Los espectros de absorbancia (Figura 8.15) muestran que disminuyó ligeramente el color, aunque el perfil del espectro no se modificó tras el tratamiento aerobio.

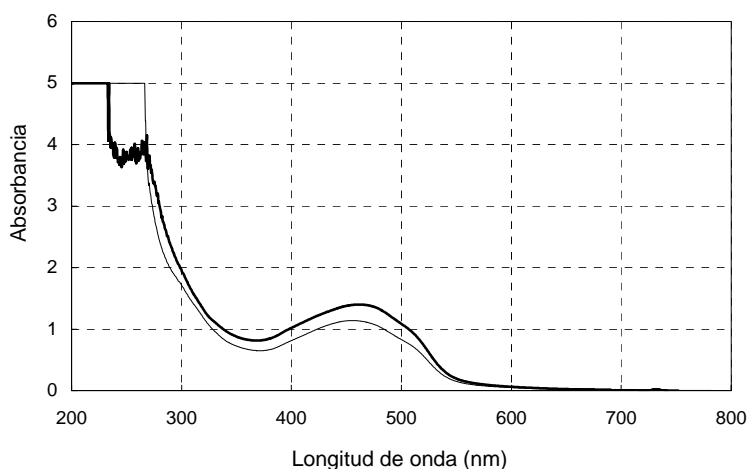


Figura 8.15. Comparación de los espectros de absorción de influente (línea gruesa) y efluente (línea fina) del tratamiento en un reactor aerobio continuo

Para comparar la composición de las muestras de influente y efluente del reactor de lodos activos, se realizaron análisis por HPLC (Figura 8.16). Aparentemente apenas se produjo eliminación o disminución de las señales. La señal correspondiente a Orange II ($t_r=7,0$ min) apenas sufrió modificación en cuanto a su área, aunque sí en cuanto a su tiempo de retención. Sin embargo, a la

vista de los espectros de absorbancia de las señales de influente y efluente, se observó que la señal correspondiente a 2,032 min en el cromatograma de la alimentación corresponde a un compuesto diferente al que se obtuvo a los 2,058 min en el cromatograma de efluente. Si los espectros de absorbancia de ambas señales se comparan con compuestos patrón, se puede afirmar que el compuesto constituyente del influente del reactor, 4-hidroxibencenosulfonato, fue degradado durante el tratamiento aerobio, y paralelamente se generó el compuesto bencenosulfonato.

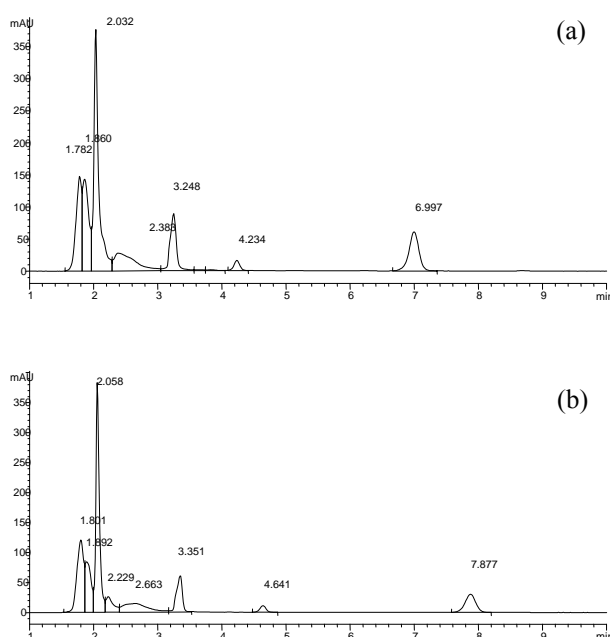


Figura 8.16. Composición de las muestras de (a) influente y (b) efluente del reactor aerobio continuo. Tiempos de retención: 4-hidroxibencenosulfonato: 2,0 min; bencenosulfonato, 2,1 min; Orange II: 7,0 min

Por último, se analizó la toxicidad de las muestras antes y después del tratamiento aerobio (Tabla 8.14). El efluente de la degradación aerobia presentó prácticamente el mismo valor de EC_{50} que el influente, con lo cual se puede afirmar que el proceso aerobio no contribuye a aumentar la toxicidad, aunque tampoco ayuda a disminuirla, si bien la corriente procedente de la degradación enzimática del tinte no tenía carácter tóxico.

Tabla 8.14. Toxicidad del influente y efluente del postratamiento anaerobio en continuo

<i>Muestra</i>	<i>EC₅₀ (ppm)</i>	<i>Toxicidad</i>
Influente reactor aerobio	3,5·10 ⁵	No tóxico
Efluente reactor aerobio	3,5·10 ⁵	No tóxico

4. Conclusiones

Debido a la complejidad del efluente de degradación enzimática de Orange II, es difícil realizar un seguimiento de su postratamiento. Uno de los factores que se puede considerar es la concentración de los compuestos identificados, pero son muchos los compuestos que no han sido determinados en el efluente. Por ello, fueron necesarios otros parámetros, tales como la DQO y COT, color y toxicidad.

El estudio de la toxicidad metanogénica del tinte Orange II y del efluente de su degradación enzimática permitió establecer las concentraciones a partir de las cuales ambas corrientes resultan tóxicas para las bacterias anaerobias. Mientras que el tinte resultó ligeramente tóxico a concentraciones de 500 mg/L, el efluente de la degradación enzimática de 100 mg/L de tinte no presentó toxicidad apreciable. Los estudios de biodegradabilidad de ambas corrientes permitieron determinar la posibilidad de ser degradadas en un proceso anaerobio convencional, por comparación con controles, tanto sin biomasa, como con biomasa en ausencia de fuente de carbono. Ambas corrientes resultaron biodegradables, si bien el tinte Orange II dio lugar a la generación de sulfanilato en proporciones estequiométricas; dicho compuesto resulta tóxico por ser una amina aromática. Por otra parte, los ensayos de biodegradabilidad son los más apropiados para determinar la eliminación de compuestos oxidables, en forma de DQO, pues la única fuente de carbono es el propio compuesto cuya biodegradabilidad se pretende estudiar. Sin embargo, tanto en los ensayos de toxicidad como en los procesos de degradación anaerobia en continuo, el alto aporte porcentual de DQO mediante los AGV empleados como cosustrato de las bacterias anaerobias hace difícil determinar la fracción de la DQO eliminada que corresponde a la degradación de la muestra.

Mediante el tratamiento anaerobio del efluente enzimático se obtuvo una eliminación de un 30% de DQO y COT y un 20-30% de color, que por el

contrario, se eliminó por completo mediante tratamiento anaerobio de Orange II. La composición del efluente resultante indica que el Orange II constituyente del efluente enzimático se degradó por completo, dando lugar a sulfanilato, mientras que el 4-hidroxibencenosulfonato no se eliminó. Este compuesto y otros que procedan de la oxidación enzimática de Orange II podrían ser los causantes del color residual. Por último, la toxicidad del efluente aumentó probablemente como consecuencia de la generación de aminas aromáticas, si bien a un nivel muy lejano del considerado como tóxico.

El tratamiento aerobio se llevó a cabo mediante ensayos en discontinuo de DBO₅ y mediante la operación de un reactor de lodos activos. Los ensayos de DBO₅ confirmaron la biodegradabilidad aerobia del efluente enzimático, en comparación con el tinte Orange II que no resultó biodegradable; además, estos ensayos permitieron determinar la eliminación de DQO del efluente, pues la única fuente de carbono es el propio efluente.

Mediante el postratamiento aerobio del efluente de degradación enzimática se obtuvo una eliminación de DQO y COT de 25%. No se obtuvo decoloración y la concentración de Orange II no disminuyó. Por el contrario, el compuesto 4-hidroxibencenosulfonato, resultante de la oxidación enzimática de Orange II, se degradó a bencenosulfonato. La toxicidad del efluente del tratamiento aerobio fue similar a la del influente, ambos en valores muy alejados de los considerados tóxicos.

Como conclusión, teniendo en cuenta que la prioridad en el tratamiento de corrientes coloreadas es la eliminación del color, la combinación de un tratamiento enzimático y un tratamiento anaerobio resultaría la más adecuada. El tratamiento enzimático oxidativo degrada el tinte en extensiones superiores al 90% generando compuestos no tóxicos, y el tratamiento anaerobio es capaz de degradar el tinte residual, contribuyendo así a la eliminación del color del efluente.

5. Referencias

- Albuquerque, M. G. E., Lopes, A. T., Serralheiro, M. L., Novais, J. M. and Pinheiro, H. M. (2005) Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Enzyme and Microbial Technology* **36**(5-6), 790-799.
- APHA-AWWA-WEF (1998) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington.
- Carliell, C. M., Barclay, S. J., Naidoo, N., Buckley, C. A., Mulholland, D. A. and Senior, E. (1995) Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. *Water SA* **21**(61-69).
- Coughlin, M. F., Kinkle, B. K. and Bishop, P. L. (2002) Degradation of Acid Orange 7 in an aerobic biofilm. *Chemosphere* **46**, 11-19.
- Coughlin, M. F., Kinkle, B. K. and Bishop, P. L. (2003) High performance degradation of azo dye Acid Orange 7 and sulfanilic acid in a laboratory scale reactor after seeding with cultured bacterial strains. *Water Research* **37**, 2757-2763.
- Cruz, A. and Buitrón, G. (2001) Biodegradation of Disperse Blue 79 using sequenced anaerobic/aerobic biofilters. *Water Science and Technology* **44**(4), 159-166.
- Donlon, B., Razo-Flores, E., Luijten, M., Swarts, H., Lettinga, G. and Field, J. (1997) Detoxification and partial mineralization of the azo dye Mordant Orange I in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 83-90.
- Dykes, G. A., Timm, R. G. and von Holy, A. (1994) Azoreductase activity in bacteria associated with the greening of industrial chocolate puddings. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3027-3029.
- Ekici, P., Leupold, G. and Parlar, H. (2001) Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems. *Chemosphere* **44**, 721-728.
- Forgacs, E., Cserhádi, T. and Oros, G. (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International* **30**, 953-971.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. and Forsythe, S. (2003) The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology* **101**, 49-56.
- Jiang, M. and Bishop, P. L. (1994) Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science and Technology* **29**, 525-530.
- Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H. J. and Mattes, R. (1997) Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3684-3690.

- Kulla, M. G. (1981) Aerobic bacterial degradation of azo dyes. Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. FEMS Symposium, London, Academic Press **12**, 387-399.
- Lourenco, N. D., Novais, J. M. and Pinheiro, H. M. (2003) Analysis of secondary metabolite fate during anaerobic-aerobic azo dye biodegradation in a sequential batch reactor. *Environmental Technology* **24**(6), 679-686.
- Méndez-Paz, D., Omil, F. and Lema, J. M. (2005) Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **36**, 264-272.
- O'Neill, C., López, A., Esteves, S., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L. and Wilcox, S. (2000) Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**(2), 249-254.
- Pagga, U. and Brown, D. (1986) The degradation of dyestuffs: part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* **15**(4), 479-491.
- Pinheiro, H. M., Touraud, E. and Thomas, O. (2004) Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments* **61**(2), 121-139.
- Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. and Subburam, V. (2000) Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 268-273.
- Ramallo, R. S. (1996) *Tratamiento de aguas residuales*. Barcelona, Editorial Reverté.
- Russ, R., Rau, R. and Stolz, A. (2000) The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1429-1434.
- Shaul, G. M., Holdsworth, T. J., Dempsey, C. R. and Dostal, K. A. (1991) Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere* **22**(1-2), 107-119.
- Shaw, C. B., Carliell, C. M. and Wheatley, A. D. (2002) Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. *Water Research* **36**(8), 1993-2001.
- Soto, M., Méndez, R. and Lema, J. M. (1993a) Methanogenic and non-methanogenic activity tests: Theoretical basis and experimental set up. *Water Research* **27**, 1361-1376.
- Soto, M., Méndez, R. and Lema, J. M. (1993b) Operación y control de digestores anaerobios (I). *Ingeniería Química* **25**(294), 467-474.
- Sponza, D. T. and Isik, M. (2005) Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic/aerobic sequential. *Process in Biochemistry* **40**(1), 35-44.
- Stolz, A. (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 69-80.

Sugiura, W., Miyashita, T., Yokoyama, T. and Arai, M. (1999) Isolation of azo dye degrading microorganisms and their application to white discharge printing of fabric. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**, 577-581.

Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M. L. and Strehaiano, P. (2004) Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chemical Engineering Journal* **99**, 169-176.

Tan, N. C. G. and Field, J. A. (2000) Biodegradation of sulfonated aromatic compounds. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution. Principles and Engineering*. Lens, P. and Hulshoff-Pol, L. W. London, IWA Publishing: 377-392.

van der Zee, F. P. and Villaverde, S. (2005) Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes-A short review of bioreactor studies. *Water Research* **39**, 1425-1440.

Yatome, C., Mastufuru, H., Taguchi, T. and Ogawa, T. (1993) Degradation of 4'-dimethylaminoazobenzene-2-carboxylic acid by *Pseudomonas stutzeri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**, 778-781.

Zimmermann, T., Kulla, H. G. and Leisinger, T. (1982) Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry* **129**, 197-203.

Capítulo 9

Estudio por voltametría cíclica de la estabilización de Mn³⁺ por ácidos quelantes

Resumen

En este capítulo se estudia el efecto de diferentes ácidos orgánicos y del propio Orange II como estabilizantes del catión Mn³⁺ producido en el ciclo catalítico de MnP. En ensayos de decoloración de Orange II se observó que diferentes ácidos orgánicos pueden substituir al malónico proporcionando velocidades de decoloración similares. Posteriormente, aplicando la técnica de voltametría cíclica, se determinó que el Mn³⁺ forma complejos con los ácidos orgánicos dicarboxílicos, con una capacidad de estabilización en el orden: malonato > lactato ≈ tartrato > citrato. Por último, por medio de la misma técnica se obtuvieron resultados que corroboraron la posibilidad de que el Orange II pueda actuar como quelante, pues se observó que su presencia en el medio tiene el mismo efecto sobre el par redox Mn²⁺/Mn³⁺ que la presencia de compuestos con carácter quelante probado.

Índice

1. Introducción	259
2. Materiales y métodos	262
2.1. Compuestos químicos	262
2.2. Ensayos de decoloración	262
2.3. Voltametría cíclica	262
3. Resultados y discusión	263
3.1. Decoloración de Orange II en presencia de ácidos quelantes	263
3.2. Determinación de las energías relativas de quelación de ácidos carboxílicos	264
3.3. Capacidad quelante de Orange II	269
4. Conclusiones	272
5. Referencias	273

1. Introducción

La capacidad de la enzima MnP para realizar la oxidación de compuestos es debida, en último término, a la generación de la forma Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} , que tiene lugar mediante la reducción de la forma oxidada de la enzima, MnP I, a su forma nativa (Wariishi *et al.*, 1989). Dicha transformación ocurre en dos etapas de oxidación-reducción, de manera que por cada ciclo de la enzima se generan dos iones Mn^{3+} . Este compuesto es un oxidante fuerte (1,5 V) y de pequeño tamaño, por lo tanto tiene acceso a un gran número de compuestos que la enzima por sí misma no podría alcanzar. Sin embargo, Mn^{3+} es inestable en disolución acuosa, produciéndose reacciones de dismutación que dan lugar a las formas Mn^{2+} y Mn^{4+} , precipitando esta última como MnO_2 (Pérez & Jeffries, 1993). Por tanto, para que el Mn^{3+} pueda actuar adecuadamente necesita formar un complejo que le confiera estabilidad. El ligando ideal debería cumplir tres funciones: *i*) facilitar la disociación de Mn^{3+} de la enzima; *ii*) estabilizar la forma Mn^{3+} ; *iii*) no tener capacidad de quelación con la forma Mn^{2+} , o que esta sea pequeña, de manera que se permita su acceso a la enzima (Wariishi *et al.*, 1992). Algunos ácidos carboxílicos cumplen estas funciones (Wariishi *et al.*, 1989).

Para que un ácido carboxílico tenga acción quelante debería tener más de un grupo capaz de interaccionar con el ion Mn^{3+} , de forma que se genere una red de uniones que dan lugar a la estabilización del ion. Los ácidos di o tricarboxílicos, como malonato, oxalato, tartrato o citrato, tienen potencialmente esa capacidad de quelación (Glenn *et al.*, 1986; Wariishi *et al.*, 1988). Algunos ácidos monocarboxílicos también son capaces de formar complejos debido a que en su estructura cuentan con otro grupo que puede interaccionar con el Mn^{3+} , como es el caso del grupo alcohol que forma parte del lactato (Wariishi *et al.*, 1992). Sin embargo, compuestos monocarboxílicos como el acetato no tienen capacidad quelante (Glenn & Gold, 1985).

Diversos autores analizaron el efecto de distintos ácidos carboxílicos en la medida de la actividad enzimática de MnP por oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenz-tiazolin-6-sulfónico (ABTS). En todos los casos, en ausencia de ácido orgánico no se cuantificó actividad enzimática (Glenn & Gold, 1985; Wariishi *et al.*, 1992). A la vista de estos resultados, como parte de nuestra investigación se analizó la decoloración de Orange II en procesos en discontinuo en ausencia de ácidos carboxílicos quelantes. Se empleó enzima

MnP purificada y dializada frente a agua, asegurando así la actuación de dicha enzima en el proceso y la ausencia de cualquier ácido o compuesto con capacidad quelante que pudiera proceder del crudo enzimático. Se realizaron ensayos en presencia de acetato y en ausencia de ácido carboxílico y los resultados se compararon con los obtenidos en presencia de malonato, pues es conocida su fuerte capacidad de quelación. La decoloración alcanzada tras 1 h de ensayo en ausencia de compuestos quelantes fue la misma que la obtenida en presencia de malonato, y la velocidad de decoloración fue prácticamente igual en los tres casos, así como la pérdida de actividad enzimática (Figura 9.1).

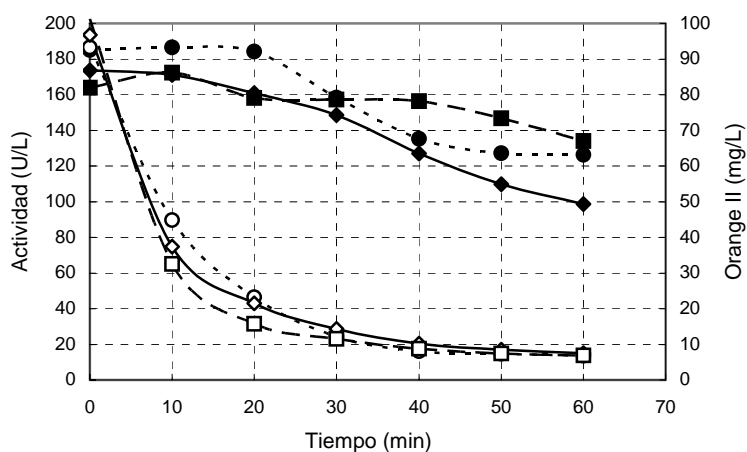


Figura 9.1. Actividad (símbolos cerrados) y concentración de Orange II (símbolos abiertos) de ensayos de decoloración con MnP purificada y dializada: (□) malonato 1 mM; (◇) acetato 1 mM; (○) ausencia de ácido; adición de H₂O₂ 15 μmol/L·min, pH 4,5 y temperatura ambiente

A la vista de los resultados, se plantearon una serie de cuestiones:

- i) En primer lugar, el hecho de que la decoloración también tenga lugar, y prácticamente en la misma extensión, en ausencia de malonato, hace plantear la posibilidad de que otros ácidos puedan realizar una acción quelante similar. Diversos autores estudiaron la quelación de Mn³⁺ con diferentes ácidos carboxílicos y establecieron un orden de capacidad de quelación en función de las velocidades iniciales de oxidación de compuestos (Glenn & Gold, 1985; Cui & Dolphin, 1990; Wariishi *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta la aplicación de la enzima MnP a la degradación en continuo de compuestos recalcitrantes, se considera importante el factor cinético en presencia de esos

ácidos, si bien es de especial relevancia la capacidad de estabilización del Mn^{3+} que presenta cada uno de ellos. Por ello se intentará establecer la energía de formación relativa de quelatos para diferentes ácidos y el ion Mn^{3+} .

- ii) En segundo lugar, de la Figura 9.1 se deduce que en presencia de ácidos monocarboxílicos sin poder quelante, como el acetato, o incluso en ausencia de ácidos, la decoloración presenta prácticamente la misma cinética. Esto hace plantear la posibilidad de que algún compuesto presente en el medio de degradación pueda tener cierta capacidad quelante. El tinte Orange II, mediante sus grupos ácido sulfónico e hidroxilo, podría ayudar a formar un complejo con Mn^{3+} .

En función de estos puntos de partida, en este capítulo se pretende establecer cualitativamente la capacidad que presentan una serie de ácidos para quelar el ion Mn^{3+} . En segundo lugar, se estudia la posibilidad de que el tinte Orange II pueda, asimismo, estabilizar el Mn^{3+} mediante quelación.

Para determinar la concentración de complejos de Mn^{3+} se aplicó la técnica de espectrofotometría (Wariishi *et al.*, 1992), que da una medida directa de la concentración de complejo formado. Desgraciadamente, en este caso, el tinte también absorbe a la longitud de onda a la que absorben los complejos de Mn^{3+} , en el rango de 270-300 nm, resultando la señal enmascarada por la del propio colorante.

Por ello, se ha ensayado el uso de la voltametría cíclica como técnica muy útil para estudiar especies activas electroquímicamente. Su efectividad reside en su capacidad para observar el comportamiento redox de un compuesto en un intervalo amplio de potenciales (Kissinger & Heineman, 1983; van Benschoten *et al.*, 1983). La técnica ofrece una buena sensibilidad y versatilidad, aunque se debe tener en cuenta que es una técnica de diagnóstico, que permite solamente una información cualitativa. Para una determinación cuantitativa de velocidades o concentraciones, se recomienda emplear otras técnicas de voltametría, tales como la voltametría de pulsos o de pasos. En este capítulo se empleó la técnica de voltametría cíclica para determinar la formación de complejos de Mn^{3+} en presencia de compuestos con posible capacidad quelante, tales como ácidos carboxílicos y el tinte azo Orange II.

2. Materiales y métodos

2.1. Compuestos químicos

Los ácidos malónico, oxálico, láctico, tartárico y cítrico fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Alemania). Sus estructuras se presentan en la Figura 9.2.

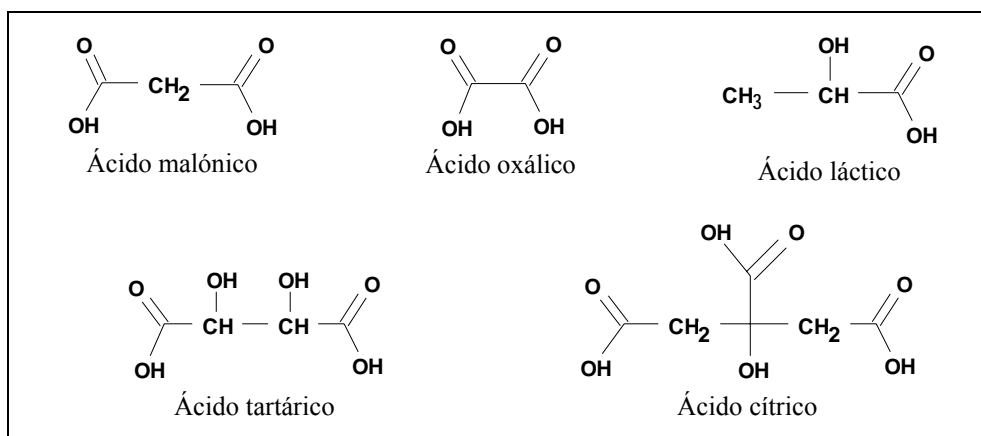


Figura 9.2. Estructuras de diversos ácidos carboxílicos

2.2. Ensayos de decoloración

Se realizaron ensayos de decoloración en discontinuo, en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de medio conteniendo MnSO_4 33 μM , ácido orgánico 1 mM, MnP 200 U/L y Orange II 100 mg/L, a pH 4,5. Se adicionó H_2O_2 a una velocidad de 50 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. Se trabajó con diferentes ácidos: malónico, oxálico, láctico, tartárico y cítrico. Se tomaron muestras cada 2 min durante 20 min y se analizó la concentración de Orange II por medio de espectrofotometría, como se indica en el Capítulo 2 de Materiales y métodos.

2.3. Voltametría cíclica

La voltametría abarca un grupo de métodos electroanalíticos en que se aplica una señal de excitación, que es un potencial variable, a un analito contenido en una celda electroquímica. Esta señal de excitación provoca la respuesta de intensidad de corriente característica del analito. En voltametría cíclica, el potencial varía entre dos valores, de manera que primero aumenta linealmente

hasta un máximo y después disminuye linealmente con la misma pendiente hasta su valor original.

Los ensayos de voltametría cíclica se llevaron a cabo en una celda de 100 mL de capacidad, empleándose un electrodo de disco de grafito como electrodo de trabajo, un electrodo de calomelanos saturado como electrodo de referencia y un hilo de platino como electrodo auxiliar. El equipo utilizado ha sido un Potentiostat-Galvanostat EG&G (Priceton Applied Research) modelo 273 con un Software Modelo 270/250 v. 4.10 (Gaithersburg, MD, EEUU). Se trabajó a velocidades de barrido de potencial de 0,02 y 0,2 V/s con potenciales entre 0 y 1,2 V. El volumen de trabajo fue de 40 mL, se empleó $NaNO_3$ 100 mM como electrolito soporte y la fuente de Mn^{2+} se obtuvo a partir de $MnCl_2$ 1 mM.

3. Resultados y discusión

3.1. Decoloración de Orange II en presencia de ácidos quelantes

Tras observar que la decoloración de Orange II tiene lugar en la misma extensión en presencia de otros ácidos, se planteó la posibilidad de estudiar otras alternativas al malonato, que permitan mantener una alta capacidad de decoloración del tinte mediante la enzima MnP. Para ello se realizaron ensayos con malonato, oxalato, lactato, tartrato y citrato (Figura 9.3).

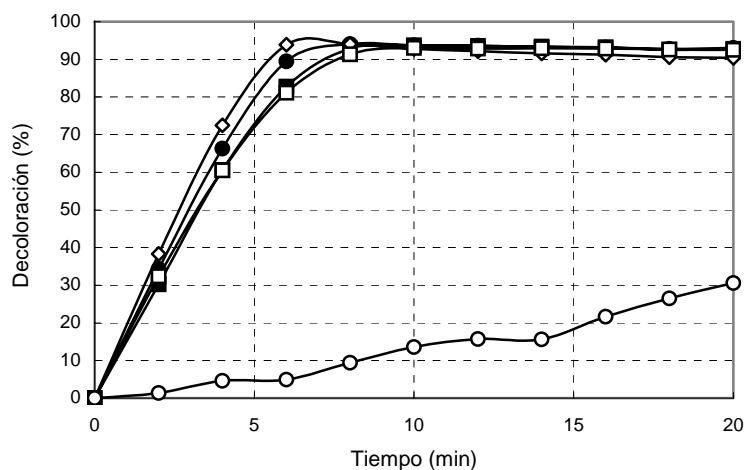


Figura 9.3. Ensayos de degradación enzimática de Orange II: (■) malonato; (●) oxalato; (◇) lactato; (□) tartrato y (○) citrato

A partir de la velocidad de decoloración en presencia de los ácidos carboxílicos empleados, se puede afirmar que todos presentaron una cinética similar, a excepción del cítrico, que dio lugar a una decoloración considerablemente más lenta. Esto podría ser debido a la menor fuerza de quelación del citrato con respecto a los demás ácidos empleados, que repercutiría en una menor energía de disociación entre el Mn^{3+} y la enzima, que podría dominar la cinética del proceso.

3.2. Determinación de las energías relativas de quelación de ácidos carboxílicos

Para determinar la energía de quelación de cada uno de los ácidos propuestos se aplicó la técnica de voltametría cíclica, que permite conocer el estado de oxidación de un analito en una disolución y, en base a un análisis comparativo, establecer cualitativamente el orden de quelación de compuestos.

En primer lugar se realizó un voltamograma a una disolución de $MnCl_2$ 1 mM con $NaNO_3$ 100 mM como electrolito soporte y con un barrido de potenciales entre 0 y 1,2 V (Figura 9.4).

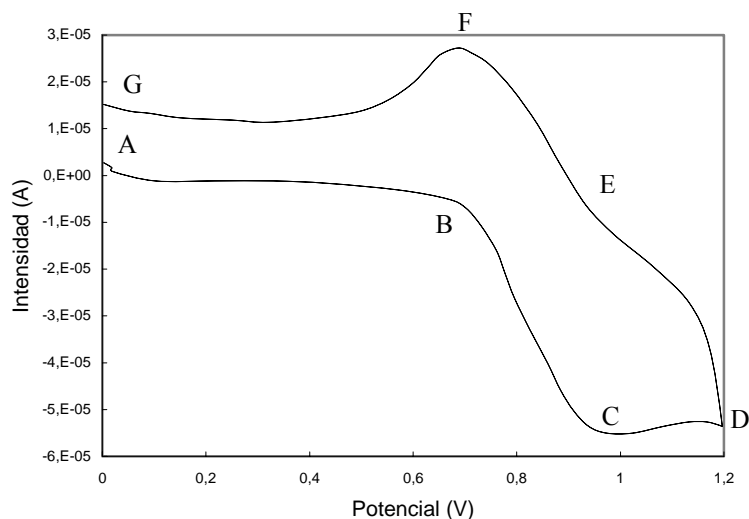


Figura 9.4. Voltamograma de una disolución de Mn^{2+} 1 mM

La disolución en el momento inicial sólo contiene Mn^{2+} . A valores inferiores al potencial de oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , se encuentra presente solamente la

forma reducida, de manera que no hay corriente de electrones debida a la oxidación, siendo por tanto nula la intensidad de corriente (zona A-B). Una vez que la diferencia de potencial entre los electrodos de la celda alcanza el punto B, comienza a producirse la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , de manera que comienza la corriente de electrones entre los electrodos. La intensidad de corriente viene dada por la Ecuación 1.

$$i = \frac{k(C_A - C_A^0)}{\delta} \quad (1)$$

donde i es la intensidad de corriente; k es una constante de proporcionalidad; C_A es la concentración del analito en el seno de la disolución; C_A^0 es la concentración del analito en la superficie del electrodo de medida y δ es el espesor de la capa que se forma en la superficie del electrodo, donde la concentración del analito presenta un gradiente entre la concentración en la superficie y la del seno de la disolución.

En cuanto se alcanza el potencial del par redox Mn^{2+}/Mn^{3+} , la concentración de Mn^{2+} en la superficie del electrodo se anula, aumentando la intensidad hasta un valor límite (i_l) (punto C). Si la disolución está perfectamente agitada, la concentración en el electrodo seguirá siendo nula, de manera que se mantiene el valor de i_l . Si la agitación no es completa, la capa de difusión alcanzará un mayor espesor, de manera que la intensidad disminuirá tendiendo de nuevo a 0. Por convenio, la intensidad de la oxidación se toma como negativa y la de la reducción como positiva.

Cuando se alcanza el potencial de 1,2 V (punto D) se revierte el barrido, aunque las intensidades siguen siendo negativas mientras el potencial sea suficientemente alto como para que se siga produciendo la oxidación. Al llegar al punto E, el Mn^{3+} generado en el proceso directo comienza a reducirse, de manera que la concentración de Mn^{2+} en la superficie del electrodo es superior a la del seno del líquido, produciéndose un paso de corriente en sentido contrario al anterior. Tras un valor máximo (punto F), se agota el Mn^{3+} en la superficie del electrodo, deteniéndose por tanto el paso de corriente.

El potencial del par redox observado en la Figura 9.4 se alejó del potencial normal dado para el par Mn^{2+}/Mn^{3+} (1,54 V), debido a no se operó en condiciones

normales. La relación entre potencial de trabajo y el potencial normal de oxidación viene dada por la ecuación de Nernst (Ecuación 2).

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} = E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (2)$$

donde E es el potencial de trabajo, E^0 es el potencial normal del par, R es la constante de los gases ideales (8,31 J/K mol); T es la temperatura en condiciones normales (298 K); n es el número de electrones transferidos; F es la constante de Faraday (96406 J/V mol); $[Ox]$ es la concentración de la especie oxidada y $[Red]$ es la concentración de la especie reducida (Skoog *et al.*, 2001). Debido a esa desviación de las condiciones normales, la oxidación tiene lugar a un potencial de 0,693 V. Cuando el rango de potencial se amplió a 1,5 V, el voltamograma mostró dos señales de oxidación, correspondientes al paso de Mn^{2+} a Mn^{3+} y de Mn^{3+} a Mn^{4+} . Dado que esta última especie precipita en forma de MnO_2 , cuando el barrido de potencial se revirtió no se observó ninguna señal de reducción (datos no mostrados).

La diferencia entre los potenciales de las señales de oxidación y reducción (puntos C y F) indica el carácter del proceso. En un proceso reversible la reacción redox es muy rápida y no limita la cinética del proceso, siendo la diferencia entre ambos potenciales de $0,059/n$ (V). En un proceso irreversible la reacción redox es más lenta que la velocidad de barrido de potencial, de manera que la disminución de la velocidad de barrido hace que se retrasen los potenciales de oxidación y reducción. En la Figura 9.4 se observa una diferencia de 0,254 V entre ambos potenciales para una velocidad de barrido de 0,2 V/s. Por otro lado, en un proceso con una velocidad de barrido de 0,02 V/s la diferencia entre ambos potenciales aumentó hasta 0,345 V, lo cual corroboró la irreversibilidad del proceso redox.

La incorporación de un electrolito inerte en el medio de reacción tiene como función evitar la influencia del efecto de la migración de analito debida al campo eléctrico, siendo necesario que la concentración de electrolito sea muy superior a la concentración de analito. Por este motivo, se seleccionó $NaNO_3$ a una concentración de 100 mM como electrolito soporte. La decisión de adicionar el analito Mn^{2+} en forma de $MnCl_2$ se tomó considerando una sal que no tuviese influencia en la modificación de las señales. La concentración de Mn^{2+} se aumentó con respecto a la empleada en los ensayos de decoloración (de 33 μM a 1 mM) debido al efecto que presenta en la intensidad y potencial de aparición de

las señales: una concentración muy baja dio lugar a intensidades de corriente poco significativas (Ecuación 1), mientras que una concentración más elevada dio lugar a una mayor desviación del potencial redox con respecto al potencial normal (Ecuación 2).

La presencia de un compuesto quelante de Mn^{3+} en el medio se detecta cuando la forma oxidada es más estable, y por tanto cuando resulta más favorable su formación que la forma reducida. De ser así, se produciría una desviación de la señal de oxidación hacia valores de potencial menores, y de la misma forma se observaría a potenciales más bajos la señal de reducción. Así, en la Figura 9.5 se observa la desviación de los potenciales de oxidación y reducción en presencia de una concentración de 20 mM de malonato, en comparación con los potenciales obtenidos en ausencia de compuesto quelante (Figura 9.4). Se observó un mayor efecto en la señal de reducción. La concentración de compuesto quelante debe tener un valor como mínimo 10 veces superior a la concentración del analito.

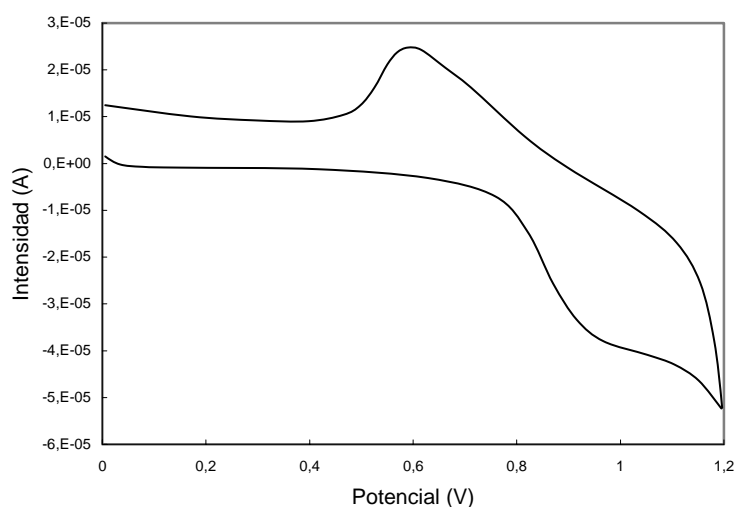


Figura 9.5. Voltamograma de una disolución de Mn^{2+} 1 mM y malonato 20 mM

A medida que aumenta la concentración de compuesto quelante con respecto a la del analito, la capacidad de quelación debería ser mayor, de manera que el desplazamiento de las señales debería aumentar. Para determinar la fuerza relativa de quelación de los distintos ácidos, se realizaron voltamogramas a diferentes disoluciones formadas por 1 mM de $MnCl_2$ y concentraciones de 20-25-30-35-40-45-50-60-70-80 mM de los diferentes ácidos: malónico, oxálico, láctico, tartárico

y cítrico. Se trabajó a dos velocidades de barrido de potencial: 0,02 y 0,2 V/s. La Figura 9.6 muestra los potenciales a los que tiene lugar la reducción de cada uno de los ácidos a las diferentes concentraciones estudiadas, indicativos de la energía de formación del quelato correspondiente.

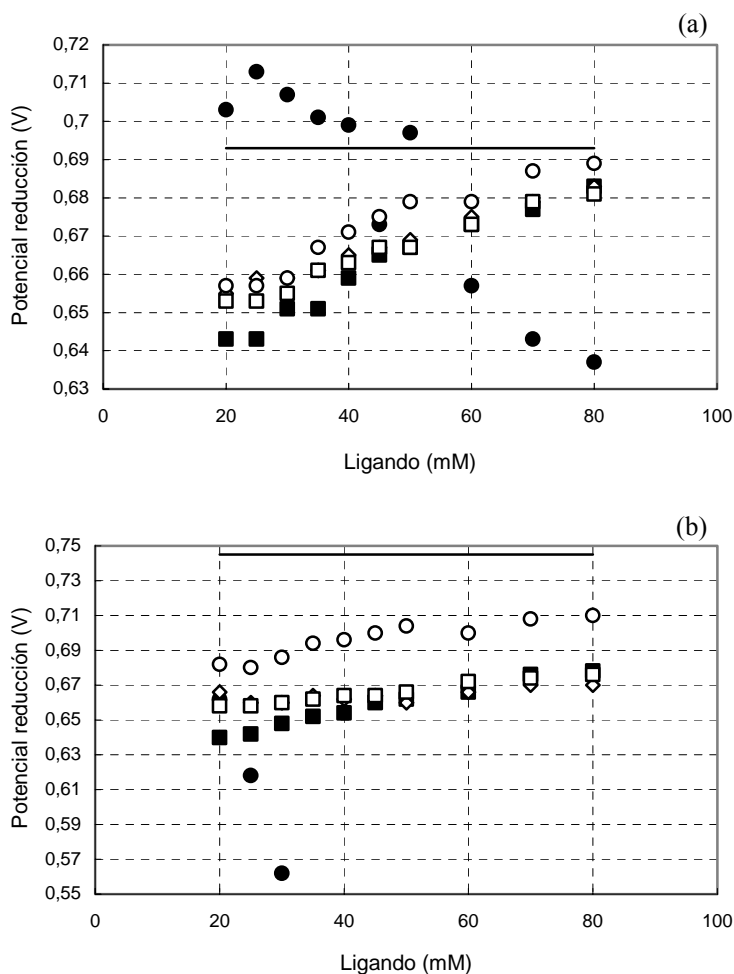


Figura 9.6. Potenciales de reducción de Mn³⁺ obtenidos a (a) 0,2 V/s y (b) 0,02 V/s. (—) ausencia de ligando; (■) malonato; (●) oxalato; (◇) lactato; (□) tartrato y (○) citrato

La forma de los voltamogramas obtenidos indica un cierto comportamiento anómalo, que queda de manifiesto en la forma particularmente afilada del pico catódico. Esto podría ser debido a una cierta adsorción de la forma oxidada del

complejo sobre la superficie del electrodo. Este efecto se observó en el caso de malonato, lactato, tartrato y citrato sólo a elevadas concentraciones de ligando y a bajas velocidades de variación de potencial, pero podría ser el causante de que, al contrario de lo que suele ocurrir, a medida que aumenta la concentración de ligando el potencial de las señales se acerca al potencial obtenido en ausencia de ligando (Figura 9.6). En presencia de oxalato, tanto la reacción de oxidación como su inversa sufren una fuerte inhibición, dando lugar a voltamogramas en los que resulta difícil medir los correspondientes potenciales de las señales. Debido a esto, no se consideró el oxalato en el análisis comparativo de las fuerzas quelantes.

Debido a las razones indicadas, no ha sido posible efectuar un cálculo adecuado de las constantes termodinámicas de estabilidad de los complejos de Mn³⁺ formados con los ligandos estudiados. Sin embargo, sí se pueden determinar comparativamente las fuerzas de quelación, principalmente operando a bajas velocidades de variación de potencial, para aproximarse a las condiciones de equilibrio y evitar en lo posible la influencia de factores cinéticos. Del mismo modo, debido al efecto que provoca el aumento de la concentración de ligando, se consideraron las concentraciones más bajas para realizar ese análisis comparativo. Teniendo en cuenta estas consideraciones, la estabilidad de los correspondientes complejos de Mn³⁺ sería: malonato > lactato ≈ tartrato > citrato.

3.3. Capacidad quelante de Orange II

A partir del ensayo de decoloración con MnP purificada en ausencia de ácidos (Figura 9.1) se planteó la posibilidad de que el tinte Orange II pudiera estabilizar el catión Mn³⁺ debido a una posible capacidad de quelación. Este tinte no se consideró en el análisis de las fuerzas relativas de quelación de los distintos ácidos analizados debido a la limitación de su solubilidad, que impide obtener disoluciones de tinte de concentración similar a las ensayadas. Aun así, puede determinarse cualitativamente, mediante voltametría cíclica, la capacidad de quelación del tinte.

La primera evidencia de la posibilidad de formación de complejo con el ion Mn³⁺ se observó al realizar el voltamograma de una disolución de MnCl₂ 1 mM con Orange II 100 mg/L (Figura 9.7). El potencial de la señal de reducción se desplazó desde 0,693 V en ausencia de tinte a 0,647 V en presencia de Orange II.

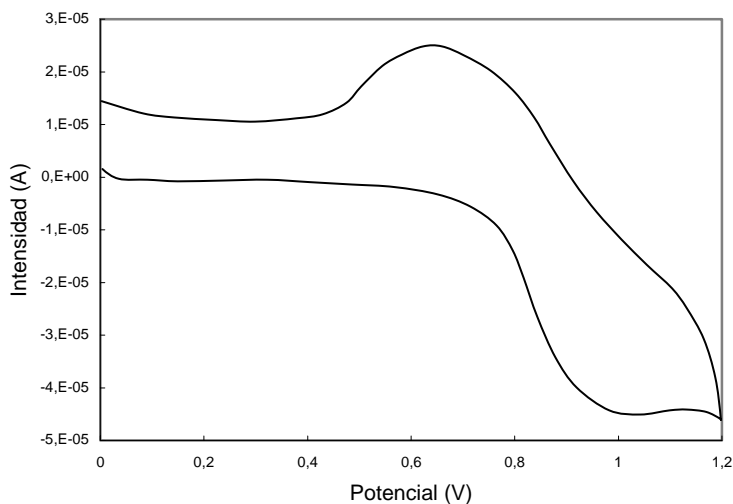


Figura 9.7. Voltamograma de una disolución de Mn^{2+} 1 mM y Orange II 100 mg/L

La segunda evidencia de la formación de un complejo entre la forma Mn^{3+} y Orange II se obtuvo cuando se aumentó la concentración de tinte hasta 1000 mg/L. La realización de la voltametría en presencia de una concentración más elevada de Orange II provocó un fuerte aumento en la intensidad de la señal anódica, mientras que la señal catódica se mantuvo (Figura 9.8). Ese aumento de señal, conocido como “pico autocatalítico”, se produce debido a la doble fuente de Mn^{2+} que alcanza la superficie del electrodo: por una parte, se produce una reducción electroquímica y por la otra una reducción de Mn^{3+} mediante el Orange II, que actúa como sustrato.

Para corroborar esta explicación, se trazó un voltamograma a una disolución de un sustrato sin capacidad quelante, seleccionando el fenol. Se realizaron voltamogramas en ausencia y en presencia de malonato, observándose que en su ausencia no se generaba el pico autocatalítico; sin embargo, en su presencia sí se obtenía una doble fuente de Mn^{2+} (Figura 9.9) similar a la observada en la Figura 9.8.

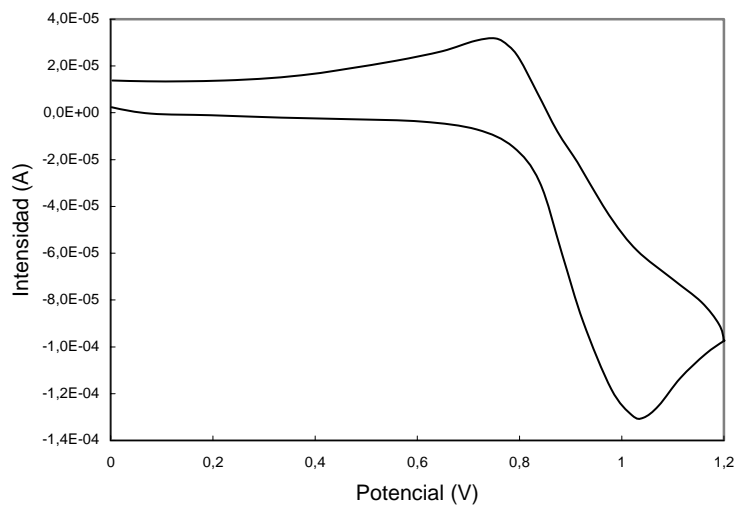


Figura 9.8. Voltamograma de una disolución de Mn^{2+} 1 mM y Orange II 1000 mg/L

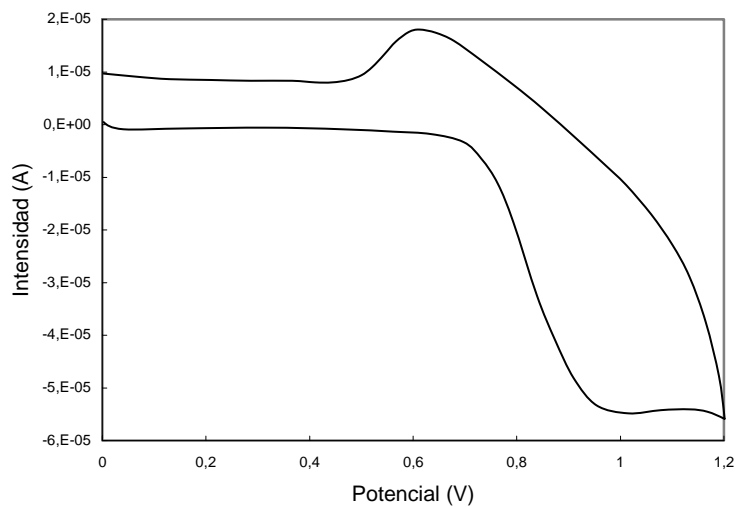


Figura 9.9. Voltamograma de una disolución de Mn^{2+} 1 mM, malonato 10 mM y fenol 100 mg/L

El análisis voltamométrico de las disoluciones de Mn^{2+} y Orange II corrobora la hipótesis de que el tinte juega un doble papel como estabilizador de Mn^{3+} y como sustrato de la degradación.

4. Conclusiones

La función de un agente quelante en el ciclo catalítico de la enzima MnP es un tema ampliamente estudiado (Glenn & Gold, 1985; Cui & Dolphin, 1990; Wariishi *et al.*, 1992). Tradicionalmente se consideró que los ácidos con capacidad quelante son aquellos que presentan al menos dos grupos carboxílicos, de manera que puedan formar, mediante interacciones con Mn^{3+} , la matriz del complejo. Sin embargo, los ensayos de decoloración realizados permitieron observar la capacidad de la enzima MnP para degradar el tinte Orange II en presencia de ácidos monocarboxílicos e incluso en ausencia de ácidos.

En primer lugar, los ensayos de decoloración permitieron obtener distintas alternativas al uso de malonato en la degradación de Orange II. Se ha observado que resulta factible utilizar otros ácidos, tales como oxalato, lactato o tartrato, con una buena eficacia, ya que cumplen la doble tarea de quelación (estabilización de Mn^{3+}) y de sistema tampón de pH.

En segundo lugar, los ensayos de voltametría cíclica permitieron determinar la capacidad de quelación de varios ácidos y establecer un orden de fuerza quelante. Otros autores determinaron dichos órdenes de quelación. Glenn & Gold (1985) establecieron un orden de fuerza quelante en función de la cinética de oxidación de ABTS: malato > tartrato > citrato \approx lactato. Cui & Dolphin (1990) estudiaron los quelantes mediante voltametría cíclica y obtuvieron la siguiente relación a una velocidad de barrido de potenciales de 0,05 V/s: malonato > citrato \approx tartrato > piruvato > malato > lactato. Wariishi *et al.* (1992) hallaron un orden en función de la cinética de degradación de 2,6-DMP: malonato > malato > tartrato > lactato > oxalato. Los resultados de este trabajo se obtuvieron mediante voltametría cíclica, de manera que no se tuvieron en cuenta aspectos cinéticos sino la fuerza de quelación propiamente dicha. El orden hallado fue: malonato > lactato \approx tartrato > citrato.

Aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo y los hallados en estudios previos no son completamente coincidentes, todos los autores parecen estar de acuerdo en que el malonato es uno de los ácidos con mayor fuerza quelante. El lactato y el tartrato suelen tomar valores intermedios en el orden establecido. Finalmente, la posición en último lugar del citrato se corroboró con los resultados obtenidos en los ensayos de decoloración, en que la velocidad de degradación disminuía en presencia de este ácido.

Por último, se comprobó que Orange II actúa como quelante además de como sustrato de la reacción enzimática. De esta forma, la adición de un ácido orgánico a los procesos de decoloración no sería necesaria para llevar a cabo la degradación, si bien la presencia de un ácido, incluso monocarboxílico como el acético, puede favorecer el proceso al actuar como tampón de pH.

5. Referencias

Cui, F. and Dolphin, D. (1990) The role of manganese in model systems related to lignin biodegradation. *Holzforschung* **44**(4), 279-283.

Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1985) Purification and properties of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **242**, 329-341.

Glenn, J. K., Akileswaran, L. and Gold, M. H. (1986) Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **251**, 688-696.

Kissinger, P. T. and Heineman, W. R. (1983) Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* **60**(9), 702-706.

Pérez, J. and Jeffries, T. W. (1993) Role of organic acid chelators in manganese regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **39/40**, 227-238.

Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (2001) *Principios de Análisis Fundamental*. Madrid.

van Benschoten, J. J., Lewis, J. Y., Heineman, W. R., Roston, D. A. and Kissinger, P. T. (1983) Cyclic voltammetry experiment. *Journal of Chemical Education* **60**(9), 772-776.

Wariishi, H., Akaleswaran, L. and Gold, M. H. (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* **27**, 5365-5370.

Wariishi, H., Dunford, H. B., MacDonald, I. D. and Gold, M. H. (1989) Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **264**(6), 3335-3340.

Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 23688-23695.

Anexo

Estudio económico del proceso de degradación enzimática

Resumen

Para que un proceso sea factible a nivel industrial, es necesario que sea económicamente viable con respecto a otras alternativas. En este anexo se realizó una estimación de los costes que implica el tratamiento enzimático de compuestos recalcitrantes, en procesos discontinuos y continuos con enzima en estado libre e inmovilizado. Se encontró que la producción de enzima es el factor más relevante económicamente de los procesos con enzima libre, mientras que el soporte de inmovilización es el factor más caro de los procesos con enzima inmovilizada, lo cual implica un aumento en el coste en un factor de 100.

El tratamiento en un reactor enzimático de membrana puede resultar económicamente viable y competitivo en comparación con procesos de oxidación avanzada, necesitando para ello una disminución de los costes de producción de MnP, mediante un escalado del proceso.

Índice

1. Introducción	277
2. Materiales y métodos	277
2.1. Ensayos de degradación	277
2.2. Técnicas analíticas	278
3. Resultados	279
3.1. Ensayos de degradación en discontinuo con MnP libre	279
3.2. Ensayos de degradación en continuo con MnP libre	280
3.3. Ensayos de degradación en discontinuo con MnP inmovilizada	281
3.4. Ensayos de degradación en continuo con MnP inmovilizada	281
3.5. Estimación del coste de producción de MnP	282
3.6. Estimación de los costes de inmovilización	284
3.7. Estimación de los costes del proceso	285
3.8. Comparación económica del proceso enzimático con procesos de oxidación avanzada	285
4. Conclusiones	286
5. Referencias	287

1. Introducción

La aplicación de un tratamiento enzimático a la degradación de compuestos recalcitrantes es una alternativa interesante debido a diferentes ventajas: los costes de mantenimiento son bajos, la operación es sencilla, se generan efluentes limpios y no se producen lodos. Sin embargo, para que esta opción sea competitiva frente a otras alternativas de tratamiento, es necesario que sea económicamente viable. Se han realizado estudios económicos de la degradación de compuestos mediante distintos procesos de oxidación avanzada, tales como tratamiento con ozono, luz ultravioleta, reactivo de Fenton o distintas combinaciones de los mismos (Esplugas *et al.*, 2002).

El objetivo de este anexo es la estimación de los costes económicos que supone la degradación enzimática en cada uno de los sistemas estudiados: sistema con enzima libre y con enzima inmovilizada, en operación discontinua y continua. El estudio económico tomó como base de cálculo la cantidad de fenol degradado (1 kg) para cada uno de los procesos.

2. Materiales y métodos

2.1. Ensayos de degradación

Ensayos de degradación con MnP libre

Se realizó un ensayo en discontinuo de degradación de fenol con MnP soluble en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio consistente en: MnP 200 U/L, oxalato de sodio 1 mM, MnSO₄ 33 μM, fenol 100 mg/L y una adición de H₂O₂ en continuo a una velocidad de 15 μmol/L·min. El pH del medio se ajustó a 4,5 y se trabajó a temperatura ambiente. Se tomaron muestras cada 15 min durante 3 h y se analizó la actividad enzimática y la concentración de fenol.

Se llevó a cabo la degradación en continuo de fenol con MnP soluble en un reactor enzimático asociado a una membrana de ultrafiltración. El volumen de reacción fue de 250 mL. La alimentación consistió en una disolución de oxalato 1 mM, MnSO₄ 33 μM y fenol 100 mg/L, que se adicionó mediante una bomba para mantener un tiempo de residencia (TRH) de 2 h. Se bombeó MnP, a una velocidad tal que la actividad en el reactor se mantuvo a 200 U/L, y H₂O₂, con una velocidad de 15 μmol/L·min. Se tomaron muestras durante 39 h de ensayo y

se midió la actividad enzimática y la concentración de fenol en el reactor y en el efluente del sistema.

Ensayos de degradación con MnP inmovilizada

La inmovilización de MnP sobre un soporte de agarosa previamente activado con grupos glutaraldehído se realizó mediante el procedimiento indicado en el Capítulo 5.

El ensayo de degradación en discontinuo de fenol mediante MnP inmovilizada se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de medio: MnP 200 U/L, oxalato de sodio 1 mM, MnSO₄ 33 μM, fenol 100 mg/L y una adición de H₂O₂ en continuo a una velocidad de 15 μmol/L·min. Cada 15 min se tomaron muestras de sobrenadante para analizar la concentración de fenol y muestras de suspensión para determinar la actividad enzimática.

El ensayo de degradación en continuo con MnP inmovilizada tuvo lugar en un reactor de mezcla completa con 100 mL de medio, en que la enzima inmovilizada se retuvo en el reactor por medio de un pequeño filtro. Se adicionó alimentación consistente en oxalato 1 mM, MnSO₄ 33 μM y fenol 100 mg/L, con una velocidad tal que permitiese un TRH de 3 h. Se adicionó H₂O₂ en continuo mediante una bomba a 15 μmol/L·min. Se realizó un seguimiento de la concentración de fenol en el efluente, así como de la actividad enzimática en el reactor, aunque no se realizó adición en continuo de MnP inmovilizada para reponer la enzima consumida en el proceso, para igualar las condiciones en que se llevaron a cabo los ensayos de decoloración de Orange II.

2.2. Técnicas analíticas

La medida de actividad enzimática de MnP libre se llevó a cabo mediante el proceso indicado en el Capítulo 2 de Materiales y métodos. La actividad de MnP inmovilizada se midió espectrofotométricamente con agitación en la celda de medida, tal como se describió en el Capítulo 5 de Inmovilización de MnP.

La concentración de fenol se determinó mediante cromatografía líquida con un equipo Hewlett Packard ChemStation equipado con un detector de array de diodos 1090 M Serie II. Se empleó una columna Spherisorb ODS2 (0,46 cm diámetro interno y 20 cm de longitud) que contiene partículas empacadas de 5 μm (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). Se inyectaron 10 μL de muestra y se

empleó como fase móvil una disolución de 50% de acetonitrilo y 50% de agua, a un flujo de 0,4 mL/min en condiciones isocráticas y 30°C. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 270 nm. El tiempo de retención para el fenol fue de 8,1-8,2 min.

3. Resultados

3.1. Ensayo de degradación en discontinuo con MnP libre

La Figura A.1 muestra los perfiles de degradación de fenol y de actividad enzimática en el ensayo llevado a cabo en un proceso en discontinuo con adición en continuo de H₂O₂ y con enzima libre. Las condiciones empleadas fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos de decoloración, sin optimización previa para la degradación de fenol. De los perfiles se calcularon los parámetros cinéticos dados en la Tabla A.1. La constante cinética se obtuvo considerando los valores de degradación iniciales, y una cinética de primer orden con respecto al fenol. El valor de $t_{1/2}$ indica el tiempo para el cual la degradación de la concentración inicial de fenol alcanza el 50% y se obtuvo a partir del valor de la constante cinética.

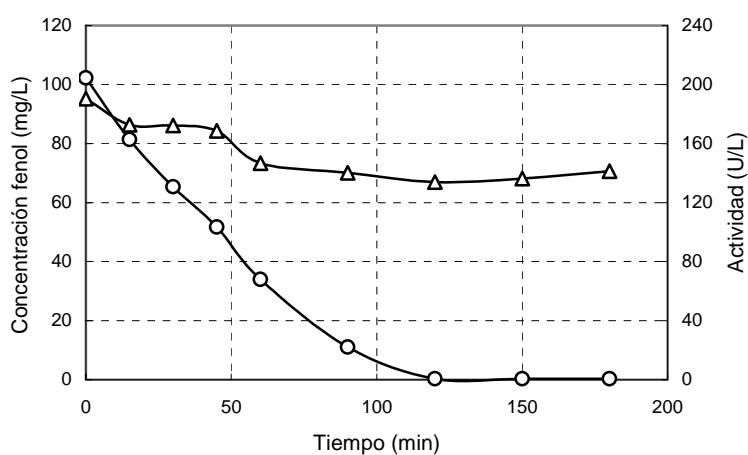


Figura A.1. Degradación en discontinuo de fenol con MnP libre: (○) concentración de fenol; (Δ) actividad enzimática

Tabla A.1. Parámetros de la degradación en discontinuo de fenol con MnP libre

k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Consumo enzima ($U/L \cdot h$)	Consumo enzima a $t_{1/2}$ (U)
0,906	0,765	16,4	1,25

3.2. Ensayo de degradación en continuo con MnP libre

La selección del TRH para la degradación de fenol en el reactor enzimático de membrana se llevó a cabo en función de los datos obtenidos en el ensayo en discontinuo. Dado que se degradó todo el fenol en 2 h, se consideró este tiempo como TRH. Los perfiles se muestran en la Figura A.2.

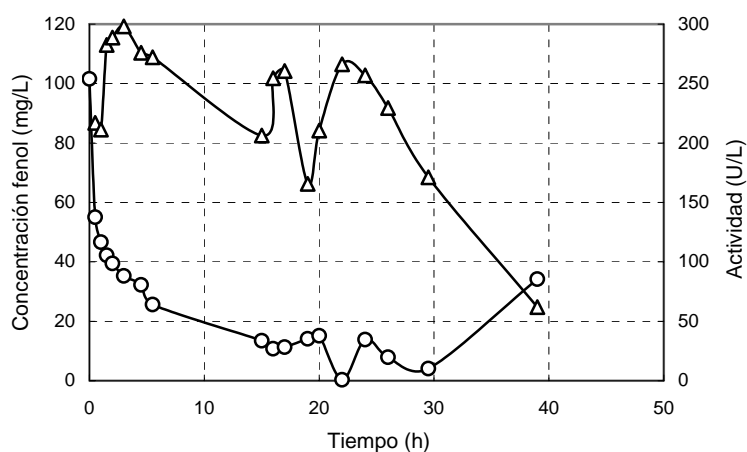


Figura A.2. Degradación en continuo de fenol en un reactor enzimático de membrana con MnP libre: (○) concentración de fenol; (Δ) actividad enzimática

Tabla A.2. Parámetros de la degradación en continuo de fenol con MnP libre

k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Consumo enzima ($U/L \cdot h$)	Consumo enzima a $t_{1/2}$ (U)
3,67	0,189	11,3	0,53

La Tabla A.2 muestra los parámetros obtenidos a partir de los perfiles de degradación y consumo de enzima. La constante cinética se calculó mediante un

balance al reactor enzimático, considerando una reacción de primer orden con respecto al sustrato.

3.3. Ensayo de degradación en discontinuo con MnP inmovilizada

El ensayo de degradación de fenol en discontinuo con enzima inmovilizada sobre agarosa-glutaraldehido se muestra en la Figura A.3. Considerando una cinética de primer orden, se obtuvieron los parámetros cinéticos y de consumo de enzima dados en la Tabla A.3.

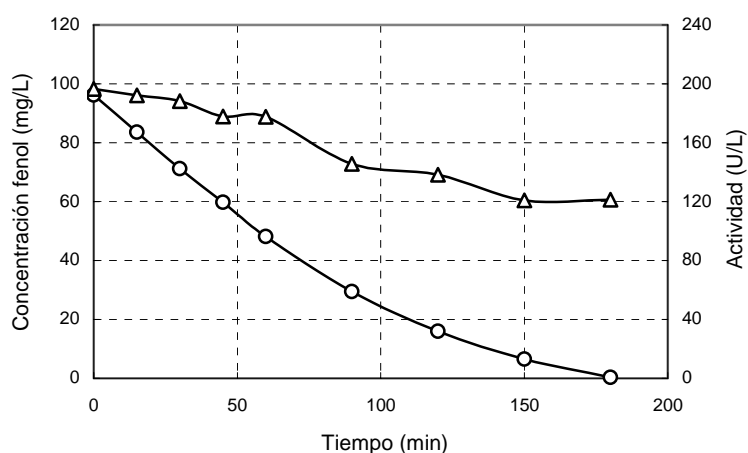


Figura A.3. Degradación en discontinuo de fenol con MnP inmovilizada: (○) concentración de fenol; (Δ) actividad enzimática

Tabla A.3. Parámetros de la degradación en discontinuo de fenol con MnP inmovilizada

k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Consumo enzima (U/L·h)	Consumo enzima a $t_{1/2}$ (U)
0,636	1,09	25,11	2,74

3.4. Ensayo de degradación en continuo con MnP inmovilizada

A partir de los perfiles de degradación de fenol en discontinuo con MnP inmovilizada se consideró un TRH de 3 h para la degradación en continuo en un reactor de tanque agitado. Los perfiles de degradación de fenol y consumo de MnP se muestran en la Figura A.4.

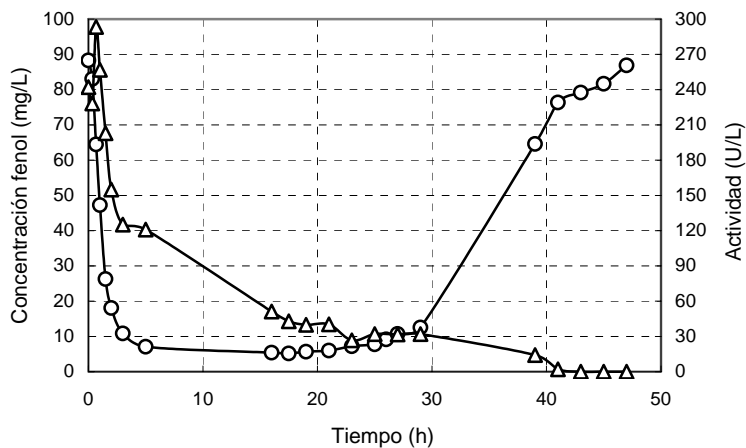


Figura A.4. Degradación en continuo de fenol en un reactor continuo de tanque agitado con MnP inmovilizada: (○) concentración de fenol; (Δ) actividad enzimática

La Tabla A.4 muestra los parámetros cinéticos y de consumo de enzima.

Tabla A.4. Parámetros de la degradación en continuo de fenol con MnP inmovilizada

k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Consumo enzima (U/L·h)	Consumo enzima a $t_{1/2}$ (U)
3,00	0,231	8	0,185

3.5. Estimación del coste de producción de MnP

Los principales factores que contribuyen al coste que conlleva la producción de la enzima MnP a partir de suero de leche son los reactivos del medio de fermentación, el consumo energético y las membranas de ultrafiltración del crudo enzimático obtenido.

Se consideraron los reactivos empleados en el medio de conservación del hongo en tubos inclinados, así como el medio de mantenimiento en placas, el medio de cultivo en matraces Fernsbach y el medio de producción en matraces Erlenmeyer. Dado que los volúmenes de medio empleados son mucho menores que el volumen del medio de producción en el fermentador (se consideran fermentaciones de 100 L), estos reactivos constituyen un porcentaje muy pequeño

de los costes aportados por los reactivos, de manera que no fueron considerados en la estimación de costes de reactivos mostrada en la Tabla A.5.

Tabla A.5. Estimación del coste de los reactivos empleados en la producción de MnP

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad (g)</i>	<i>Precio (€/g)</i>	<i>Precio total (€)</i>
Suero de leche	2500	$2,6 \cdot 10^{-4}$	0,65
Tiamina	0,225	0,45	0,10
MnSO ₄	42,5	0,0099	0,42
Peptona	230	0,075	17,2
TOTAL			18,4 €

La estimación de los costes energéticos se realizó teniendo en cuenta que las fermentaciones tienen una duración media de 60 h (Tabla A.6). El precio del kWh se tomó de la referencia con la que se comparan los costes (Esplugas *et al.*, 2002) y fue de 0,0632 €/kWh. Se empleó un factor de cambio de dólares americanos a euros de 1,210 \$/€ (01-07-05).

Tabla A.6. Estimación del coste energético en la producción de MnP

<i>Fuente</i>	<i>Potencia (kW)</i>	<i>Tiempo consumo (h)</i>	<i>Energía (kWh)</i>	<i>Precio total (€)</i>
Esteriliz. fermentador	4,4	1	4,4	0,28
Consumo fermentador	2,5	60	150	9,48
Compresor	5,5	3	16,5	1,04
Agitador	0,7	60	42	2,65
Autoclave	4,5	6	27	1,71
TOTAL				15,2 €

Por último, se consideró el coste de amortización de las membranas del proceso de ultrafiltración y concentración del crudo enzimático obtenido en cada fermentación. El resumen de dicho coste se muestra en la Tabla A.7.

Tabla A.7. Estimación del coste del consumo de membranas de ultrafiltración empleadas en la producción de MnP

<i>Coste membrana (€)</i>	<i>Duración membrana (L)</i>	<i>Precio por fermentación (€)</i>
1200	43200	2,78
TOTAL		2,78 €

La Tabla A.8 muestra los costes de una fermentación, así como las unidades de enzima producidas y el coste de cada unidad enzimática.

Tabla A.8. Estimación del coste de producción de una unidad de MnP

<i>Coste fermentación (€)</i>	<i>Producción (U/L)</i>	<i>Volumen de crudo (L)</i>	<i>Precio unidad MnP (€/U)</i>
36,4	1000	75	4,85·10⁻⁴ €U

3.6. Estimación de los costes de inmovilización

Al coste de la producción de enzima hay que sumarle, en el caso de la aplicación de la enzima en forma inmovilizada, el coste que supone el proceso de inmovilización. Dado que la agarosa es un soporte caro, no se consideraron los demás reactivos empleados en la activación de la misma, pues suponen un porcentaje poco significativo del coste total. Para el cálculo se consideró que en el proceso de inmovilización se pierde el 50% de la actividad enzimática, con lo cual 1 U efectiva inmovilizada implica el coste de producción de 2 U (Tabla A.9).

Tabla A.9. Estimación del coste de producción de una unidad de MnP inmovilizada

<i>Capacidad inmovilización (U/g)</i>	<i>Coste agarosa (€/kg)</i>	<i>Precio unidad MnP inmov. (€/U)</i>
10,4	500	0,049 €U inmovilizada

3.7. Estimación de los costes del proceso

Se consideraron los consumos de enzima obtenidos en cada uno de los cuatro ensayos y, en función de la forma libre o inmovilizada de la enzima, se calculó el coste del proceso por kg de fenol degradado, teniendo en cuenta que, para el tiempo $t_{1/2}$ considerado, esa cantidad de fenol fue la mitad de la inicial. Los resultados se muestran en la Tabla A.10.

Tabla A.10. Estimación de los costes del proceso de degradación enzimática de fenol

<i>Proceso</i>	<i>Consumo MnP a $t_{1/2}$ (U)</i>	<i>Coste total MnP (€)</i>	<i>Coste proceso (€/kg fenol)</i>
Discontinuo MnP libre	1,25	$6,06 \cdot 10^{-4}$	121,2
Continuo MnP libre	0,53	$2,57 \cdot 10^{-4}$	20,6
Discontinuo MnP inmov	2,74	0,134	26800
Continuo MnP inmov	0,185	$9,06 \cdot 10^{-3}$	1812

Los procesos en continuo permitieron reducir considerablemente los costes con respecto a los procesos en discontinuo, debido al mejor aprovechamiento de la actividad enzimática. A pesar de que el consumo de enzima en el proceso en continuo con MnP inmovilizada fue muy bajo, los costes que conlleva la inmovilización son lo suficientemente elevados como para encarecer significativamente el proceso de degradación.

3.8. Comparación económica del proceso enzimático con procesos de oxidación avanzada

Se consideró la estimación del coste de diferentes procesos de oxidación avanzada de fenol mediante el cálculo de los parámetros cinéticos y la obtención de $t_{1/2}$ (Esplugas *et al.*, 2002). Los resultados se compararon con los obtenidos en los procesos enzimáticos (Tabla A.11). Los procesos en que se emplea enzima libre se encuentran dentro del rango de costes de los procesos de oxidación avanzada propuestos.

Tabla A.11. Comparación de los costes del proceso de degradación enzimática de fenol con otros procesos de oxidación avanzada (Esplugas *et al.*, 2002)

<i>Proceso</i>	<i>k (h⁻¹)</i>	<i>t_{1/2} (h)</i>	<i>Coste (€/kg fenol)</i>
UV	0,528	1,31	142,3
O ₃ / H ₂ O ₂	2,13	0,325	2,24
O ₃ /UV	3,14	0,221	7,67
O ₃ /UV/ H ₂ O ₂	4,17	0,166	5,88
O ₃	4,42	0,157	0,67
UV/ H ₂ O ₂	6,26	0,111	10,8
Fenton	22,2	0,0312	3,24
Discontinuo MnP libre	0,906	0,765	121,2
Continuo MnP libre	3,67	0,189	20,6
Discontinuo MnP inmovilizada	0,636	1,09	26800
Continuo MnP inmovilizada	3,00	0,231	1812

4. Conclusiones

La comparación entre los costes del tratamiento enzimático de fenol y los de los procesos de oxidación avanzada indicó que el proceso enzimático sólo es competitivo cuando se emplea enzima libre, y es más económico cuando el proceso se realiza en continuo en un reactor enzimático de membrana. Sin embargo, para el análisis detallado de los resultados obtenidos se debe tener en cuenta:

- i)* Las condiciones de operación no fueron optimizadas para el caso del tratamiento enzimático de fenol, sino para la decoloración de Orange II. La modificación de factores tales como el TRH o la carga de fenol en la alimentación pueden alterar significativamente la eficacia del proceso.
- ii)* Los ensayos se llevaron a cabo a escala de laboratorio en volúmenes de entre 100 y 250 mL. Ensayos a escala piloto podrían dar lugar a resultados más favorables.
- iii)* Para analizar los costes del proceso de fermentación se tomó como base un fermentador de 100 L. Un aumento del volumen supondría una disminución considerable de los costes, pues el consumo energético apenas se ve afectado

por el cambio de volumen, mientras que la producción se podría multiplicar considerablemente.

- iv) El proceso de degradación con enzima inmovilizada sobre agarosa presenta como desventaja que la mayor parte del coste es debida al precio del soporte. Una demanda del mismo a gran escala podría repercutir en la disminución de su coste. Para su aplicación, podría considerarse asimismo la reutilización del soporte, aunque conllevaría nuevos procesos de desorción de substrato y enzima desactivada.

Con todo ello, se deduce que el proceso de degradación enzimática con enzima libre en un reactor de membrana podría llegar a ser económicamente muy competitiva. Esto, unido a las ventajas que conlleva el tratamiento enzimático, daría lugar a una alternativa a tener en cuenta en la degradación de compuestos recalcitrantes.

5. Referencias

Esplugas, S., Giménez, J., Contreras, S., Pascual, E. and Rodríguez, M. (2002) Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. *Water Research* **36**, 1034-1042.

Conclusiones

La degradación de compuestos recalcitrantes cobra especial relevancia a medida que las leyes medioambientales se hacen más severas. En el presente trabajo se estudió el desarrollo de alternativas de tratamiento para la degradación de este tipo de compuestos, basadas en procesos de oxidación en continuo mediante la enzima ligninolítica MnP. A continuación se presentan los logros alcanzados y las conclusiones obtenidas tras la realización de esta tesis:

- i) El estudio cinético de la degradación enzimática de Orange II empleando MnP indicó que el tinte resulta inhibitorio sólo a concentraciones superiores a 750 mg/L. La cinética sigue un modelo de Michaelis-Menten con respecto al tinte y sigue una función lineal de primer orden con respecto a la velocidad de adición de H_2O_2 . La velocidad de degradación es más alta en presencia de oxálico que de acético, para concentraciones de tinte por debajo de 500 mg/L.
- ii) Se optimizó la operación de un reactor enzimático de membrana para la degradación en continuo de Orange II. La eficacia depende tanto de la estequiometría como de la cinética del proceso. El estudio de la estequiometría permitió determinar las concentraciones más adecuadas: una relación equimolar entre H_2O_2 y Orange II y una actividad enzimática de 200 U/L en el reactor enzimático. La cinética del proceso se mejoró modificando parámetros tales como la velocidad de adición de H_2O_2 , el tipo de ácido orgánico o el TRH. Se alcanzó una eficacia máxima de 42 mg/U con una decoloración superior al 90%.
- iii) El oxígeno disuelto es un buen parámetro para el control del proceso: un aumento en su concentración indica una dosificación excesiva de H_2O_2 , que implicaría una mayor velocidad de desactivación enzimática; por el contrario, una disminución en la concentración de oxígeno disuelto sería indicativa de una sobrecarga de tinte, fallos de adición de H_2O_2 o una disminución de la actividad enzimática.

Conclusiones

- iv)* El reactor enzimático de membrana operó durante 18 d consecutivos sin cambio o limpieza de la membrana. El proceso presenta una operación simple, gran estabilidad y es aplicable a la degradación de otros compuestos.
- v)* El modelo cinético propuesto a partir de los ensayos en discontinuo ajustó adecuadamente los datos experimentales obtenidos en el proceso en continuo, de manera que se confirma su validez para la simulación y optimización del proceso.
- vi)* La inmovilización de MnP mediante enlace covalente con un soporte de agarosa-glutaraldehído es un proceso relativamente simple, que permitió una retención enzimática del 100% y confirió estabilidad a la enzima. Como contrapartida, dado que las condiciones de pH son severas, en el proceso de inmovilización se pierde un 50% de la actividad enzimática.
- vii)* El tratamiento en continuo en un reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada permitió obtener un valor elevado de la eficacia del proceso, mediante la minimización del consumo de soporte y enzima. La minimización del consumo de agarosa implicó además una menor adsorción del tinte Orange II sobre el soporte.
- viii)* El modelo cinético obtenido a partir de ensayos en discontinuo con enzima libre se adaptó a la cinética más lenta con enzima inmovilizada. La ecuación resultante simuló adecuadamente los datos experimentales.
- ix)* El reactor continuo de tanque agitado con enzima inmovilizada tiene una operación sencilla, no presenta problemas de aumento de presión por ensuciamiento y requiere menos bombas para su operación. Sin embargo, tiene como desventajas importantes la pérdida de actividad enzimática durante el proceso de inmovilización, la cinética más lenta, el control más complejo de la actividad enzimática presente, la dificultad de un sistema para reemplazar la enzima desactivada y la generación de residuos.
- x)* El estudio del mecanismo de degradación enzimática de Orange II permitió identificar 9 compuestos intermedios y finales, dos de los cuales no habían sido identificados con anterioridad: 4-diazonio bencenosulfonato y 2-naftol. Se cuantificaron dichos productos, que corresponden a un 30% de la concentración inicial de Orange II, lo que indica que, o bien existen otras rutas de degradación, o bien los productos generados continúan su degradación hacia otros productos finales.

- xi)* El postratamiento bacteriano del efluente de degradación enzimática de Orange II se llevó a cabo en condiciones tanto aerobias como anaerobias. El efluente no resultó tóxico para ninguna de las dos cepas bacterianas, se degradó un 25-30% de la DQO y se generaron efluentes no tóxicos. Sin embargo, el proceso anaerobio eliminó un 30% del color, mientras que el proceso aerobio fue capaz de decolorar el efluente. Debido a esto, se consideró el postratamiento anaerobio como el más adecuado para tratar el efluente de la degradación enzimática de Orange II.
- xii)* El tinte Orange II ejerce cierto efecto de quelación sobre el catión Mn^{3+} , responsable de la oxidación enzimática. Así, no es necesaria la presencia de ácidos orgánicos para que la reacción enzimática tenga lugar, aunque se emplean igualmente como estabilizadores de pH.
- xiii)* La evaluación de los costes de los procesos de degradación enzimática indicó que los costes de inmovilización harían inviable un proceso basado en el uso de enzima inmovilizada, aplicando la metodología estudiada. Sin embargo, el tratamiento en un reactor enzimático de membrana presenta un coste en el rango de otros procesos de oxidación avanzada.

En resumen, el tratamiento enzimático del tinte azo Orange II es una alternativa adecuada, ya que su cinética es mucho más rápida que la de los procesos biológicos convencionales, alcanzando una decoloración superior al 90% y disminuyéndose en más de 9 veces la toxicidad del efluente.

Para su aplicación a nivel industrial sería conveniente separar del vertido general una corriente concentrada de tinte, por ejemplo mediante membranas. Se debe disponer de dos unidades de ultrafiltración en paralelo, para emplear la segunda durante los períodos de limpieza de la primera. La corriente concentrada sufriría un tratamiento específico de degradación mediante un reactor enzimático de membrana, tras el cual podría añadirse un postratamiento anaerobio. El efluente generado se podría unir al efluente procedente del resto de los procesos de la planta para ser tratado mediante un sistema biológico convencional en una E.D.A.R. (Figura C.1).

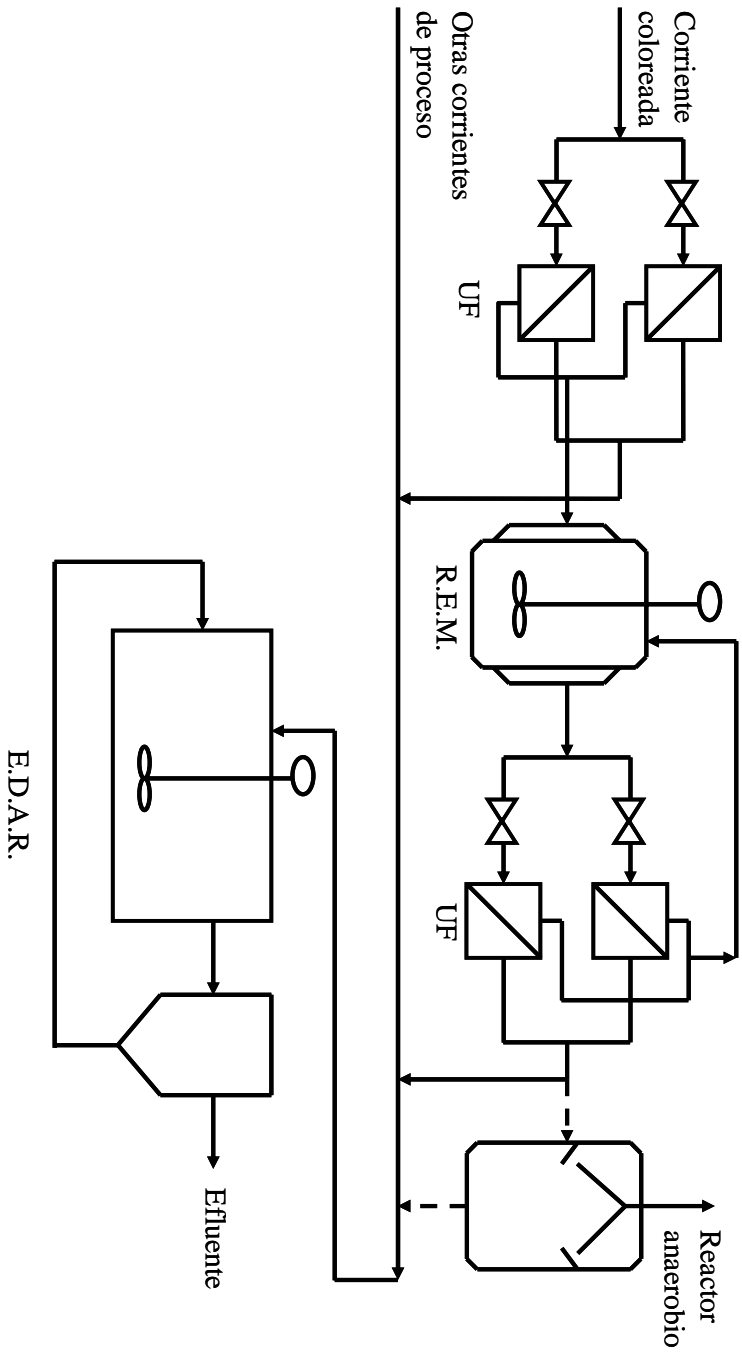


Figura C.1. Esquema del tratamiento de un efluente coloreado mediante un proceso combinado enzimático-bacteriano. UF: membrana de ultrafiltración; R.E.M.: reactor enzimático de membrana; E.D.A.R.: estación depuradora de aguas residuales

Conclusións

A degradación de compostos recalcitrantes cobra especial relevancia a medida que as leis medioambientais fanse máis severas. No presente traballo estúdiouse o desenvolvemento de alternativas de tratamento para a degradación deste tipo de compostos, baseadas en procesos de oxidación en continuo mediante a encima ligninolítica MnP. A continuación preséntanse os logros alcanzados e as conclusións obtidas tras a realización desta tese:

- i) O estudo cinético da degradación encimática de Orange II empregando MnP indicou que a tinguidura resulta inhibitoria só a concentracións superiores a 750 mg/L. A cinética segue un modelo de Michaelis-Menten con respecto á tinguidura e segue unha función lineal de primeiro orde con respecto á velocidade de adición de H_2O_2 . A velocidade de degradación é máis alta en presenza de oxálico que de acético, para concentracións de tinguidura por debaixo de 500 mg/L.
- ii) Optimizouse a operación dun reactor encimático de membrana para a degradación en continuo de Orange II. A eficacia depende tanto da estequiometría como da cinética do proceso. O estudo da estequiometría permitiu determinar as concentracións máis adecuadas: unha relación equimolar entre H_2O_2 e Orange II e unha actividade encimática de 200 U/L no reactor encimático. A cinética do proceso mellorou modificando parámetros tales como a velocidade de adición de H_2O_2 , o tipo de ácido orgánico ou o TRH. Alcanzouse unha eficacia máxima de 42 mg/U cunha eliminación de cor superior ó 90%.
- iii) O osíxeno disolto é un bo parámetro para o control do proceso: un aumento na súa concentración indica unha dosificación excesiva de H_2O_2 , que implicaría unha maior velocidade de desactivación encimática; pola contra, unha diminución na concentración de osíxeno disolto sería indicativa dunha sobrecarga de tinguidura, fallos de adición de H_2O_2 ou unha diminución da actividade encimática.

Conclusiones

- iv)* O reactor encimático de membrana operou durante 18 d consecutivos sen cambio ou limpeza da membrana. O proceso presenta unha operación simple, gran estabilidade e é aplicable á degradación doutros compostos.
- v)* O modelo cinético proposto a partir dos ensaios en descontinuo axustou axeitadamente os datos experimentais obtidos no proceso en continuo, de maneira que se confirma a súa validez para a simulación e optimización do proceso.
- vi)* A inmovilización de MnP mediante enlace covalente cun soporte de agarosa-glutaraldehído é un proceso relativamente simple, que permitiu unha retención encimática do 100% e conferiu estabilidade á encima. Como contrapartida, dado que as condicións de pH son severas, no proceso de inmovilización pérdese un 50% da actividade encimática.
- vii)* O tratamento en continuo nun reactor de tanque axitado con encima inmovilizada permitiu obter un valor elevado da eficacia do proceso, mediante a minimización do consumo de soporte e encima. A minimización do consumo de agarosa implicou ademais unha menor adsorción da tinguadura Orange II sobre o soporte.
- viii)* O modelo cinético obtido a partir de ensaios en descontinuo con encima libre adaptouse á cinética máis lenta con encima inmovilizada. A ecuación resultante simulou axeitadamente os datos experimentais.
- ix)* O reactor continuo de tanque axitado con encima inmovilizada ten unha operación sinxela, non presenta problemas de aumento de presión por ensuciamento e require menos bombas para a súa operación. Sen embargo, ten como desvantaxes importantes a perda de actividade encimática durante o proceso de inmovilización, a cinética máis lenta, o control máis complexo da actividade encimática presente, a dificultade dun sistema para substituír a encima desactivada e a xeración de residuos.
- x)* O estudo do mecanismo de degradación encimática de Orange II permitiu identificar 9 compostos intermedios e finais, dous dos cales non foran identificados con anterioridade: 4-diazonio bencenosulfonato e 2-naftol. Cuantificáronse os produtos, que corresponden a un 30% da concentración inicial de Orange II, o que indica que, ou ben existen outras rutas de degradación, ou ben os produtos xerados continúan a súa degradación de cara a outros produtos finais.

- xi)* O postratamento bacteriano do efluente de degradación encimática de Orange II levouse a cabo en condicións tanto aerobias como anaerobias. O efluente non resultou tóxico para ningunha das dúas cepas bacterianas, degradouse un 25-30% da DQO e xeráronse efluentes non tóxicos. Sen embargo, o proceso anaerobio eliminou un 30% da cor, mentres que o proceso aerobio non foi capaz de decolorar o efluente. Debido a isto, considerouse o postratamento anaerobio como o máis axeitado para tratar o efluente da degradación encimática de Orange II.
- xii)* A tinguidura Orange II exerce certo efecto de quelación sobre o catión Mn^{3+} , responsable da oxidación encimática. Así, non é necesaria a presenza de ácidos orgánicos para que a reacción encimática teña lugar, aínda que se empregan igualmente como estabilizadores de pH.
- xiii)* A avaliación dos custes dos procesos de degradación encimática indicou que os custes de inmovilización farían inviable un proceso baseado no emprego de encima inmovilizada, aplicando a metodoloxía estudada. Sen embargo, o tratamento nun reactor encimático de membrana presenta un custe no rango dos doutros procesos de oxidación avanzada.

En resumo, o tratamento encimático da tinguidura azo Orange II é unha alternativa axeitada, xa que a súa cinética é moito máis rápida que a dos procesos biolóxicos convencionais, alcanzando unha eliminación de cor superior ó 90% e diminuíndose en máis de 9 veces a toxicidade do efluente.

Para a súa aplicación a nivel industrial sería conveniente separar do vertido xeral unha corrente concentrada de tinguidura, por exemplo mediante membranas. Débese dispor de dúas unidades de ultrafiltración en paralelo, para empregar a segunda durante os períodos de limpeza da primeira. A devandita corrente sufriría un tratamento específico de degradación mediante un reactor encimático de membrana; tras este, poderíase engadir un postratamento anaerobio. O efluente xerado poderíase unir ó efluente procedente do resto dos procesos da planta para ser tratado mediante un sistema biolóxico convencional nunha E.D.A.R. (Figura C.2).

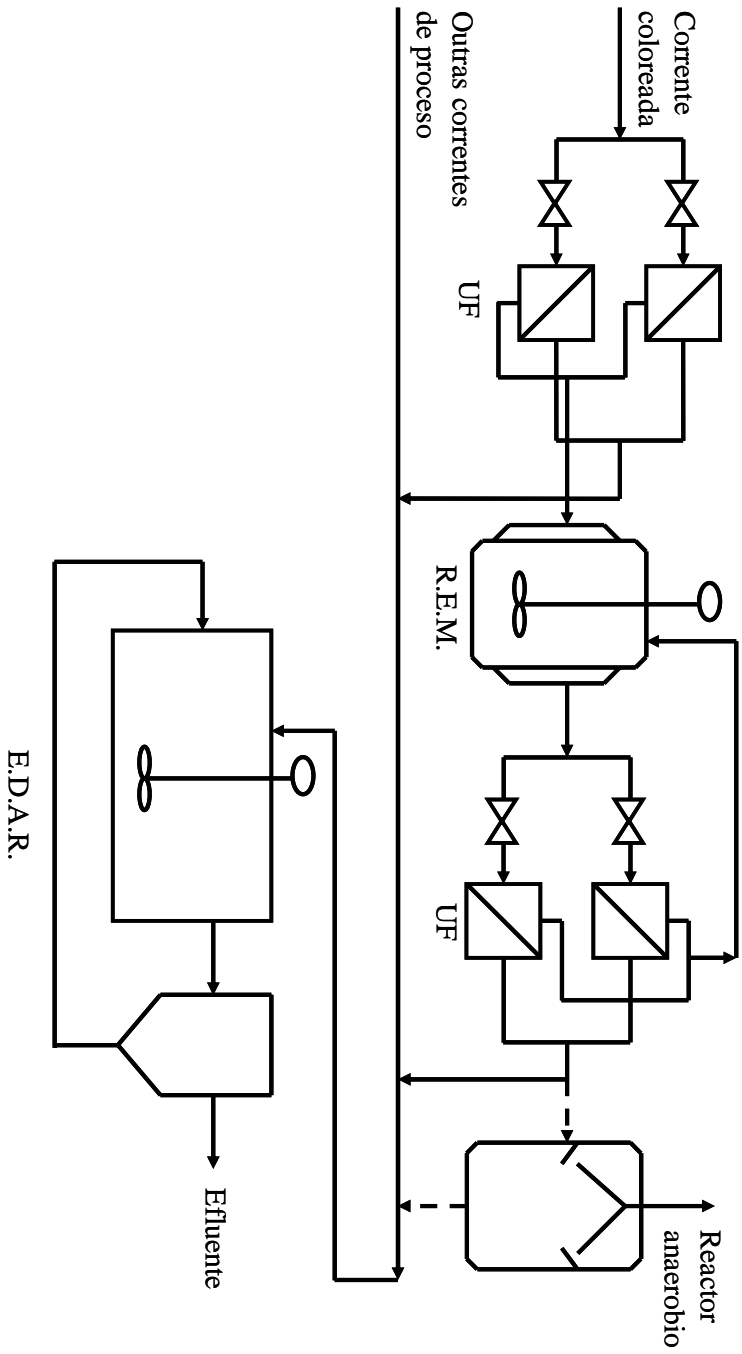


Figura C.2. Esquema do tratamento dun efluente coloreado mediante un proceso combinado encimático-bacteriano. UF: membrana de ultrafiltración; R.E.M.: reactor encimático de membrana; E.D.A.R.: estación depuradora de augas residuais

Conclusions

The degradation of recalcitrant compounds is more and more relevant since the environmental laws are getting stricter and stricter. In this work, some alternatives for the degradation of this kind of compounds, based on continuous oxidation processes by the ligninolytic enzyme MnP, were studied. The aims reached and the conclusions obtained are described below:

- i)* The kinetic study of the enzymatic degradation of Orange II by MnP pointed out that the dye just caused inhibition when the concentration was higher than 750 mg/L. The kinetics followed a Michaelis-Menten model related to Orange II and a first order linear function related to the H₂O₂ addition rate. The degradation rate in a medium containing oxalic acid was higher than that obtained in a medium containing acetic acid, for concentrations lower than 500 mg/L.
- ii)* The operation of an enzymatic membrane reactor was optimized for the continuous degradation of Orange II. The efficiency depended on both the stoichiometry and kinetics of the process. The stoichiometric study allowed to determine the more suitable concentrations: an equimolar ratio between H₂O₂ and Orange II and an enzymatic activity of 200 U/L. The kinetics was improved by the modification of parameters such as H₂O₂ addition rate, the sort of organic acid or the HRT. The maximum efficiency reached 42 mg/U and the decolorization was higher than 90%.
- iii)* The dissolved oxygen is a good parameter for the control of the process: a concentration increase means an excessive dosage of H₂O₂, which implies a higher enzymatic deactivation rate; otherwise, a concentration decrease indicates a dye overload, failures in H₂O₂ addition or a decrease of the enzymatic activity.
- iv)* The enzymatic membrane reactor operated for 18 d without changing or cleaning the membrane. The process has a simple operation, high stability and it can be applied to the degradation of other compounds.

Conclusions

- v) The kinetic model that had been proposed from the discontinuous assays, adjusted the experimental data obtained in the continuous operation. This fact verifies its suitability for the process simulation and optimization.
- vi) The MnP immobilization by covalent binding with a support of agarose-glutaraldehyde is a relatively simple process. It reached an enzymatic retention of 100% and contributed to the enzymatic stability. In contrast, during the immobilization process there was a loss of 50% of the enzymatic activity, as the pH conditions were very strong.
- vii) The treatment in a continuous stirred tank reactor with immobilized enzyme reached a high efficiency, by means of the minimization of the support and enzyme consumption. The minimization of the agarose consumption involved, furthermore, a lower adsorption of the dye into the support.
- viii) The kinetic model obtained from the discontinuous operation with free enzyme was adapted to the slower kinetics with immobilized enzyme. The resulting equation simulated the experimental data adequately.
- ix) The continuous stirred tank reactor with immobilized enzyme has a simple operation, with no problems of fouling and requires a less number of pumps for its operation. However, it has some important disadvantages, such as the enzymatic activity loss during the immobilization process, the slower kinetics, the more complex control of the enzymatic activity, the problem to find a system to replace the deactivated enzyme and the production of waste.
- x) The study of the enzymatic degradation mechanism of Orange II allowed to identify nine intermediate and final compounds. Two of them had been never identified: 4-diazonium benzenesulfonate and 2-naphtol. These products were quantified and they correspond to 30% of the initial dye concentration. This fact points out that there are some other degradation pathways or the degradation of the generated products goes on to other final compounds.
- xi) The bacterial posttreatment of the Orange II enzymatic degradation effluent was performed in both aerobic and anaerobic conditions. The effluent was not toxic for the bacterial strains, the COD degradation reached 25-30% and the generated effluents were not toxic. However, the anaerobic treatment implied a color removal of 30%, whereas the aerobic process was not able to remove the color of the effluent. Due to this reason, the anaerobic

posttreatment was considered as the most suitable one to treat the Orange II enzymatic degradation effluent.

- xii)* The dye Orange II is able to chelate the cation Mn^{3+} , which is the responsible of the enzymatic oxidation. Therefore, the enzymatic reaction does not require the presence of organic acids, although these acids are used as pH stabilizers.
- xiii)* The economical evaluation of the enzymatic degradation processes points out that the immobilization costs would make unviable a process based on the immobilized enzyme, by applying the established technology. However, the cost of the continuous treatment in an enzymatic membrane reactor is within the costs of other advanced oxidation processes.

As a summary, the enzymatic treatment of the azo dye Orange II is a suitable alternative, as the kinetics is much more rapid than that of the conventional biological processes, reaching a decolorization higher than 90% and reducing the toxicity of the effluent more than 9-fold.

For the industrial application of this system, it would be convenient to remove a concentrated stream from the main one, for example, by ultrafiltration membranes. Two ultrafiltration units should be in parallel, in order to use the second one when the first one is being cleaned. This stream would be treated specifically by means of an enzymatic membrane reactor, which could be followed by an anaerobic posttreatment. The generated effluent could be flowed into the general effluent coming from the rest of the processes in the factory, and the resulting effluent could be treated by a conventional biological treatment process in a W.W.T. P. (Figure C.3).

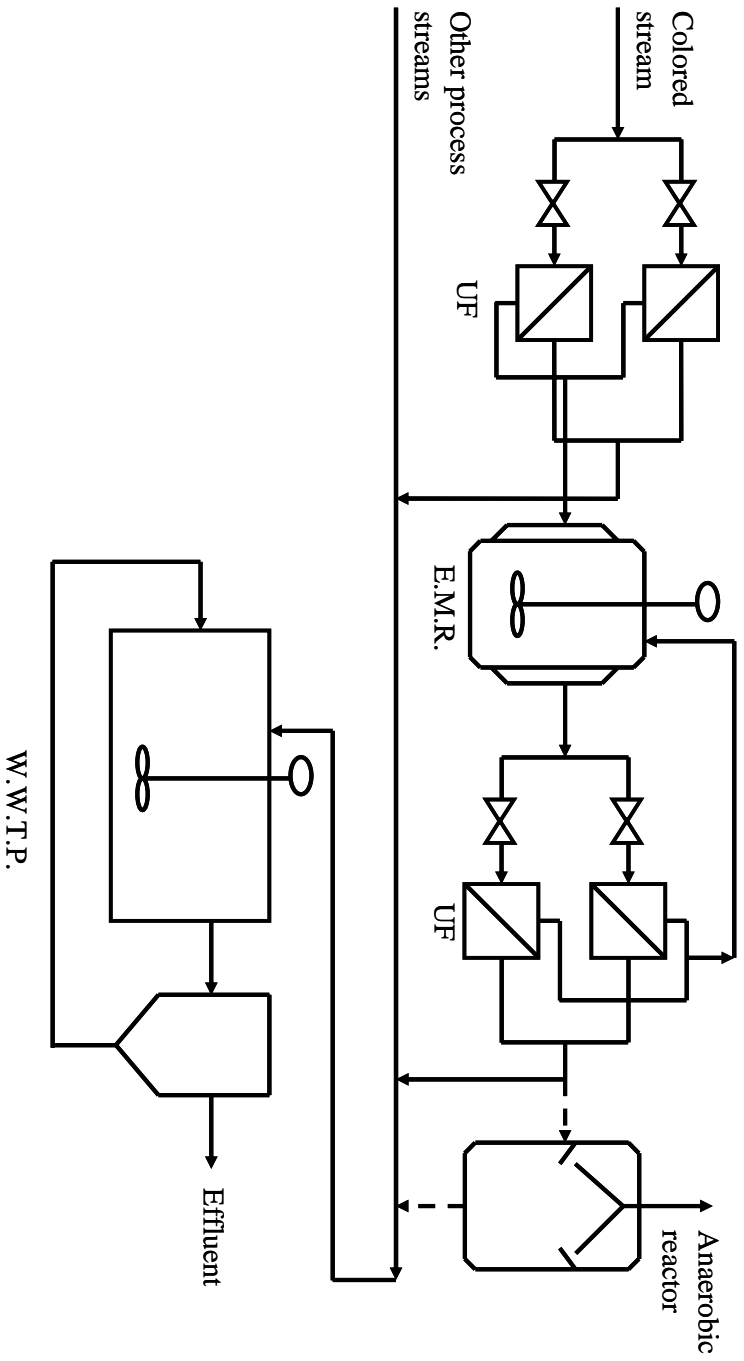


Figure C.3. Diagram for the treatment of a colored effluent by a combined enzymatic-bacterial process. UF: ultrafiltration membrane; E.M.R.: enzymatic membrane reactor; W.W.T.P.: wastewater treatment plant

