



**Tractament de  
lleixius negres amb  
*Trametes versicolor*.  
Monitoratge del procés.**



**Tractament de  
lleixius negres amb  
*Trametes versicolor*.  
Monitoratge del procés.**

Memòria presentada per:

Xavier Font i Segura

Per optar al grau de Doctor per la  
Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, maig de 1997.

**Títol:** Tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Monitoratge del procés.

**Realitzat per:** Xavier Font i Segura.

**Dirigit per:** M. Teresa Vicent i Huguet i Glòria Caminal i Saperas.  
Amb la col·laboració del Grup de Biotecnologia Ambiental EQ-UAB.

Departament d'Enginyeria Química.  
Programa de Biotecnologia.  
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 1997.

Aquest treball ha estat subvencionat per la CICYT amb els projectes Bio 0916-90 i AMB 94-0286 i pel Centre de Referència en Biotecnologia (CERBA)

M. TERESA VICENT i HUGUET  
PROFESSORA TITULAR DEL DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA  
DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

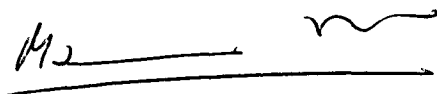
I

GLÒRIA CAMINAL i SAPERAS  
COL·LABORADORA CIENTÍFICA DEL CSIC  
DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

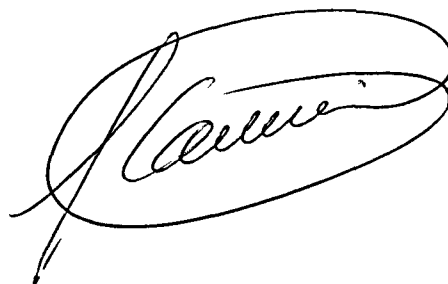
**CERTIFIQUEN:** Que el llicenciat Xavier Font i Segura ha realitzat sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol **Tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Monitoratge del procés** es presenta en aquesta memòria i constitueix la seva Tesi, dins el programa de Doctorat de Biotecnologia, per optar al grau de Doctor en Ciències, secció Químiques.

I perquè en prengeu coneixement i tingui el efectes que correspongui, presenten i apadrinen davant la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona aquesta Tesi, signant aquesta certificació a Bellaterra, 7 de maig de 1997.

M. TERESA VICENT i HUGUET



GLORIA CAMINAL i SAPERAS



## ÍNDIX

---

1.- INTRODUCCIÓ .....	1
❶ RESUM .....	1
❶ LA FUSTA: MATÈRIA PRIMERA .....	1
❷ EL PAPER .....	6
❸ PRODUCCIÓ DE PASTA I DE PAPER .....	7
❹ LA PRODUCCIÓ DE PAPER I EL MEDI AMBIENT .....	12
❺ EL PAPER DE LA BIOTECNOLOGIA .....	13
❻ DEGRADACIÓ DE LA LIGNINA .....	14
2.- TRACTAMENT DELS LLEIXUS NEGRES .....	19
❶ RESUM .....	19
❶ INTRODUCCIÓ .....	19
EL SISTEMA LIGNINOLÍTIC .....	20
LACASA .....	21
LIGNINA PEROXIDASA .....	22
MANGANÈS PEROXIDASA .....	22
EL FONG <i>Trametes versicolor</i> .....	23
ELS LLEIXUS NEGRES .....	24
❷ MATERIALS I MÈTODES .....	27
MICROORGANISME .....	27
EFLUENT .....	27
COMPOSICIÓ DEL MEDI .....	29
DETERMINACIÓ DE LA DQO (DEMANDA QUÍMICA D'OXIGEN) .....	29
DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT EN GLUCOSA .....	30
DETERMINACIÓ DEL COLOR .....	30
DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT EN COMPOSTOS AROMÀTICS .....	30
DISTRIBUCIÓ DE TAMANYS MOLECULARS .....	30
DETERMINACIÓ DE LA TOXICITAT .....	31
ASSAIG DE BIODEGRADABILITA ANAEROBIA .....	31
DETERMINACIÓ DE LA BIOMASSA .....	32
DETERMINACIÓ DE LES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES .....	32
Activitat lacasa .....	32

---

Activitat manganès peroxidasa .....	33
OBTENCIÓ DE LA SUSPENSÍO DE MICELI .....	33
OBTENCIÓ DE LA SUSPENSÍO DE <i>PELLETS</i> .....	34
IMMOBILITZACÍO .....	34
REACTORS UTILITZATS .....	34
③ ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS DE TRACTAMENT .....	36
TEMPERATURA/AGITACÍO .....	36
CONCENTRACÍO INICIAL DE GLUCOSA .....	37
EXPERIMENT AMB EL BIOSTAT Q .....	38
Efecte de l'aeració per oxigen o aire .....	38
Efecte de la conservació de l'inòcul .....	39
Efecte de l'alcohol veratrílic .....	40
Efecte de l'agitació .....	40
Conclusions .....	40
④ EXPERIMENTS AMB <i>AIR-LIFT</i> .....	41
⑤ EXPERIMENTS AMB LLIT FLUÏDITZAT .....	43
LLIT FLUÏDITZAT LIF1 .....	43
LLIT FLUÏDITZAT LIF2 .....	44
LLIT FLUÏDITZAT LIF3 .....	45
Efecte de l'antiescumant .....	46
LLIT FLUÏDITZAT LIF4 .....	50
Efecte del creixement previ amb lleixius negres .....	50
⑥ IMMOBILITZACÍO .....	53
ASSAIGS AMB ERLLENMEYER .....	53
EXPERIMENTS AMB LLIT FIX .....	55
Estudi dels canvis en la distribució de grandàries moleculars .....	55
Efecte de l'ABTS .....	56
Efecte de l'alcohol veratrílic .....	56
Efecte de la glucosa .....	57
EXPERIMENTS AMB LLIT FIX POLSANT .....	59
Experiment amb manteniment de glucosa .....	59
Experiment de 15 dies .....	61
Immobilització amb escuma de poliuretà .....	63
⑦ REACTOR POLSANT AMB <i>PELLETS</i> .....	64
⑧ DISCUSÍO GLOBAL DELS RESULTATS OBTINGUTS .....	65
COMPARACÍO DELS MILLORS EXPERIMENTS .....	65
DISCUSÍO DE LES RELACIONS OBSERVADES .....	67
3.- MONITORATGE .....	71
① RESUM .....	71
① INTRODUCCIÓ .....	71
FONAMENTS TÈORICS DE CINÈTICA ENZIMÀTICA .....	74
FONAMENTS TÈORICS DEL FIA .....	75
Dilució electrònica .....	78
Interrupció del flux .....	79
Combinació de zones .....	82
② MESURA DEL pH i EL pO <sub>2</sub> .....	83
Materials i mètodes .....	83
Programari .....	83
Maquinari .....	84
③ ANÀLISI AUTOMATITZADA DE L'ACTIVITAT LACASA .....	86
MATERIALS I MÈTODES .....	86
Components del sistema FIA .....	86
Maquinari i programari .....	86

Mesura del volum d'injecció .....	86
ANÀLISI DEL MÈTODE CONVENCIONAL .....	87
FIA AMB LACASA COMERCIAL .....	88
FIA AMB LACASA DE <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> .....	89
Disseny del FIA .....	89
Influència de les interferències.....	90
Obtenció de la correlació entre les dues metodologies .....	91
④ FIA DE COLOR I COMPOSTOS AROMÀTICS .....	95
MESURA DEL COLOR.....	95
MESURA DELS COMPOSTOS AROMÀTICS .....	96
FIA COMBINAT PER A LA MESURA DEL COLOR I ELS COMPOSTOS AROMÀTICS.....	97
⑤ INTEGRACIÓ DEL FIA DE LACASA AMB EL DE COLOR I AROMÀTICS .....	100
⑥ SISTEMA FIA PER MESURAR LIGNINA PEROXIDASA .....	105
MATERIALS I MÈTODES.....	105
Mesura de la LiP .....	105
Obtenció de la LiP .....	105
Maquinari i programari.....	107
ANÀLISI DEL MÈTODE CONVENCIONAL .....	107
DISSENY DEL SISTEMA FIA.....	108
OPTIMITZACIÓ DE LES CONCENTRACIONS DE REACTIUS .....	108
OBTENCIÓ DE LA RECTA DE CALIBRATGE PER AL FIA DE LiP.....	111
⑦ IMPLEMENTACIÓ DEL FIA DE LiP .....	114
MATERIALS I MÈTODES.....	115
Mesura de la LiP .....	115
Obtenció de la LiP.....	116
Maquinari i programari.....	116
ESTUDI DE LA LiP I LA LIGNINA.....	116
<b>4.- APÈNDIX.....</b>	<b>123</b>
① PROGRAMES .....	123
MENÚ PRINCIPAL DEL PROCÉS DE TRACTAMENT .....	123
PROGRAMA D'ADQUISICIÓ DE DADES .....	127
PROGRAMA DE GESTIÓ DEL FIA EN LÍNIA .....	135
PROGRAMA PER MESURAR L'ACTIVITAT LACASA .....	139
PROGRAMA DE MESURA DE COLOR I COMPOSTOS AROMÀTICS .....	148
② CONNEXIONS DE LES ENTRADES ANALÒGIQUES .....	157
③ CONNEXIONS DE LA VÀLVULA D'INJECCIÓ .....	158
④ CONNEXIONS A LA PLACA PCLD-885 .....	159
⑤ CONNEXIONS FIA A LES VÀLVULES DE TRES VIES .....	160
⑥ CIRCUIT ELECTRÒNIC DEL SISTEMA DE VÀLVULES .....	161
⑦ ESQUEMA I CONNEXIONS PER AL FIA DE LiP .....	162
<b>5.- CONCLUSIONS .....</b>	<b>163</b>
<b>6.- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>167</b>





# **1.- INTRODUCCIÓ**

---

## **① RESUM**

La composició de les aigües residuals de la indústria paperera, depèn tant de la composició del material lignocel·lulòsic com del procés utilitzat. En aquest primer capítol es fa un repassada general a la composició i funció dels materials lignocel·lulòsics i als diferents processos de producció de pasta de cel·lulosa i del paper.

Es mostra que els punts febles, des del punt de vista ambiental, de la producció del paper són principalment les etapes de cocció i blanqueig, a causa de la generació d'efluents altament tòxics. Aquest efluents, sobretot els provinents de les etapes de cocció, contenen la major part dels components no cel·lulòsics del vegetal com són: lignines altament modificades, reïnes, hemicel·lulosa, ... Cada un dels components d'aquests efluents té la seva problemàtica, però ben segur que la lignina és el component que més problemes presenta a l'hora de la seva depuració.

## **① LA FUSTA: MATÈRIA PRIMERA**

La fusta és la font de carboni renovable més gran de la biosfera. Es calcula que un 70% del carboni orgànic de la biosfera el constitueixen la cel·lulosa i la lignina (figura 1.1.1) (Martínez, 1994) que són, juntament amb l'hemicel·lulosa, els principals constituents de la fusta (figura 1.1.2).

Actualment es calcula que hi ha al planeta uns 300.000 milions de m<sup>3</sup> de fusta. Les taules a escala mundial representen aproximadament l'1% del total de fusta. La fusta talada es destina a diferents finalitats: un 55% es destina a combustible, un 15% per produir paper i cartró i un 30% per fusta de serradora (Fundació Terra 1995).

---

Els problemes ambientals derivats de les diverses formes d'utilització de la fusta són diferents en cada cas, però, probablement, els derivats de la conversió de fusta en paper i cartró són els més greus.

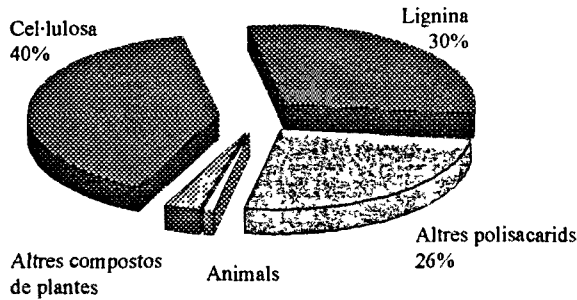


Figura 1.1.1: Distribució del carboni en la biosfera.

La indústria de pasta i paper d'arreu, conscient d'aquesta problemàtica i de l'impacte que cada cop més els temes de medi ambient generen en la societat, està realitzant esforços per reduir les seves emissions. Els canvis duts a terme es centren en canvis en el procés i millores en el tractament dels efluents.

Per poder entendre el com i el perquè de la producció del paper (procés, tipus de paper, ...) és necessari conèixer breument quina és la funció i la distribució dels diferents components de la fusta.

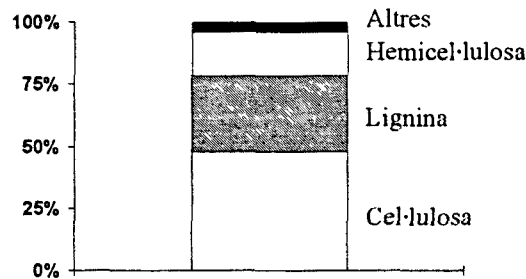
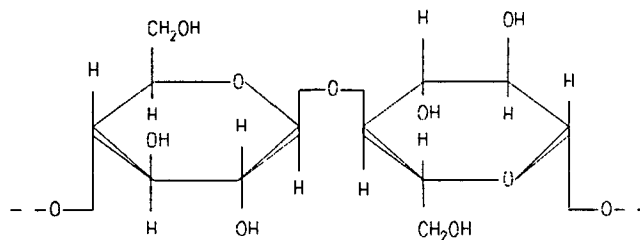


Figura 1.1.2: Composició de la fusta.

Hem vist que en la fusta hi tenim tres components principals, la cel·lulosa, la lignina i la hemicel·lulosa. A més a més hi ha una quarta fracció, de menys volum, que és constituïda per reïnes, greixos, ceres i tanins.

Mentre que les cèl·lules animals, per terme general, no tenen cap protecció del medi extern, la cèl·lula vegetal típica té el que s'anomena paret cel·lular, formada principalment per cel·lulosa. La cel·lulosa és un polisacàrid macromolecular constituït per unitats de glucosa; la seva fórmula es presenta en la figura 1.1.3.



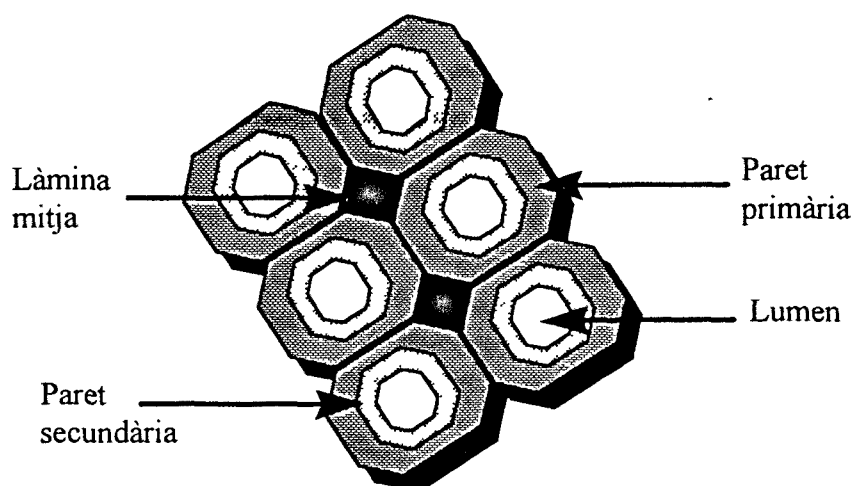
*Figura 1.1.3: Fòrmula de la cel·lulosa.*

Moltes cèl·lules vegetals disposen de dos tipus de parets cel·lulars: la paret primària i la paret secundària (figura 1.1.4). La primària es forma durant el creixement de la cèl·lula i s'estira a mesura que es va desenvolupant, tot i que es manté un gruix estàndard, és a dir, es va dipositant nou material a la paret al llarg del creixement. La paret cel·lular primària és integrada per cel·lulosa, hemicel·lulosa i substàncies pèctiques. La cel·lulosa i l'hemicel·lulosa tenen una funció estructural, mentre que les substàncies pèctiques, en forma de pectinat de calci, actuen com a cimentadores formant una estructura anomenada làmina mitja, que té també un elevat contingut en lignina.

La paret secundària es diposita un cop la cèl·lula ha deixat de créixer i és constituïda essencialment de cel·lulosa, amb un contingut mínim d'hemicel·lulosa i nul de pectina. Moltes cèl·lules amb paret secundària, que realitzen una funció estructural, són mortes. En aquests casos la part central de la cèl·lula, que havia constituït el protoplast, s'anomena lumen.

L'hemicel·lulosa pot ser de diferents tipus. Consisteix en barreges de cadenes ramificades, amorfes, de polisacàrids fàcilment hidrolitzables, d'uns pocs centenars de residus. Els sucres que les formen són generalment pentoses (xilosa i arabinosa) i, en menys proporció, hexoses (glucosa) i àcids úrics. La seva hidròlisi dona principalment xilosa i arabinosa en els vegetals de fulla caduca i xilosa i manosa en les coníferes.

A més de cel·lulosa, hemicel·lulosa i pectina les parets cel·lulars contenen altres compostos com són la cutina, la suberina i la lignina. La cutina i la suberina són compostos greixosos de cadena llarga que es troben principalment a la superfície externa de la planta evitant-ne la deshidratació.

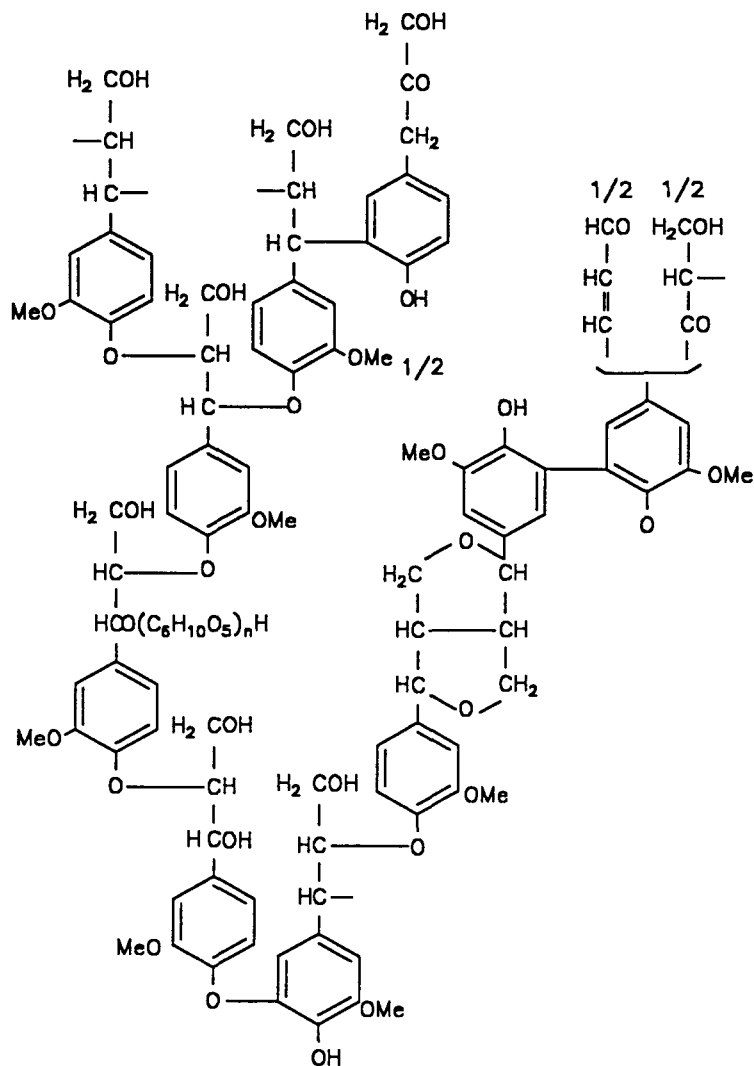


*Figura 1.1.4: Estructura cel·lular dels vegetals.*

La lignina (figura 1.1.5), del llatí *lignum* (fusta), és el component de naturalesa no polisacàrida més abundant en les parets vegetals. És un polímer tridimensional i complex, constituït per unitats de fenilpropanoïds. Es forma per deshidrogenació enzimàtica dels alcohols cumarilic, coniferilic i sinapilic (figura 1.1.6) seguida per una polimerització. La deshidrogenació dels alcohols sinamilics és realitzada per l'acció de feniloxidases, formant-se radicals lliures que formen espontàniament i irreversible di-, tri- i oligolignols, que de nou reaccionen amb els monòmers inicials. Aquesta polimerització no és controlada enzimàticament, per tant, els radicals lliures poden reaccionar els uns amb els altres en una gran varietat de formes, és per aquest motiu que la lignina no té una estructura única, formant-se un polímer globular, insoluble en aigua i amb un pes molecular elevat.

A més, depenent de l'origen filogenètic, les proporcions de cada alcohol són diferents (Crawford 1981). En les coníferes la lignina es forma per polimerització de l'alcohol coniferilic, mentre que en les plantes de fulla caduca es forma per polimerització dels alcohols coniferilic i sinapilic.

El primer punt de formació de lignina es situa a la paret primària, a partir d'aquest punt s'extén cap a la paret secundària, formant una substància rígida i hidròfoba que queda unida covalentment a la matriu de polisacàrids, resultant-ne una estructura molt forta, resistent a la degradació i als atacs microbians.



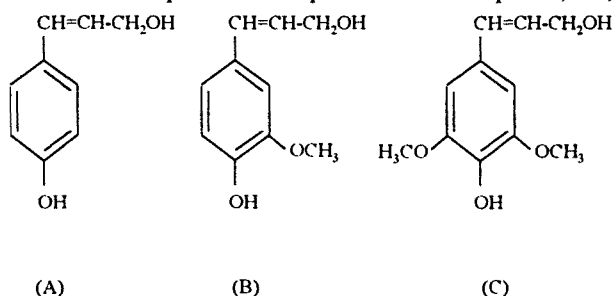
*Figura 1.1.5: Possible fórmula de la lignina (Barceló i col. 1990).*

La lignina és sempre estretament associada a la cel·lulosa, i enllaçada als polisacàrids, especialment a l'hemicel·lulosa. Aproximadament 1 unitat de cada 30 unitats de fenilpropà és enllaçada al carbohidrat.

La màxima concentració de cel·lulosa es troba en les fibres del cotó amb un 91%. En aquest cas les fibres són totes independents entre elles i d'uns quants centímetres de longitud. Més curtes i entrelaçades són les fibres del rami, del lli i del cànem, aptes per utilitzar en la indústria tèxtil i en la producció de paper, tot i que cal extreure'n certes substàncies que acompanyen la cel·lulosa. La complexitat més elevada la tenim a les fibres llenyoses, ja que la cel·lulosa és acompanyada de lignina i altres substàncies com hemicel·lulosa, reïnes, ceres, colorants, sals minerals, olis, àcids grassos, tanins, midó, sucres, ...

## 2 EL PAPER

La concepció de full de paper ha anat variant al llarg de la història. La idea de formar un full lli per escriure, format a partir de fibres vegetals adherides les unes amb les altres, fou proposada per Ts'ai Lun, ministre d'Agricultura de la Xina, l'any 105. Les primeres plantes utilitzades per a aquest fi foren la fusta de morera, bambú i rami. Anteriorment a aquesta data s'havien emprat altres materials per a l'escriptura com ara pedra, os, papirs, pergamins i



**Figura 1.1.6:** Fórmules dels alcohols precursors de la lignina: (A) Alcohol cumarílic, (B) alcohol coniferílic, (C) alcohol sinapílic.

teixits.

La utilització de paper restà limitada a la Xina fins que, al començament del segle VII, fou introduïda al Japó. L'expansió cap a Occident fou obra dels àrabs per mitjà de presoners xinesos conduïts a Samarcanda el 751. El 794 es varen crear les primeres fàbriques a Bagdad i Damasc. El primer paper europeu fou fet a Xàtiva, sota dominació musulmana, el 1150. Varen seguir França el 1189, Alemanya el 1320 i Anglaterra el 1494, però a Europa no es va desenvolupar completament la fabricació de paper fins a la invenció de la impremta per Gutenberg a mitjan segle XV.

Després de la invenció de la impremta i la substitució progressiva del pergami pel paper es varen succeir les innovacions en el camp de la producció del paper. Una de les més importants fou la realitzada pels paperers holandesos a la darrerria del segle XVII. Consistia en l'elaboració de matèria fibrosa mitjançant una màquina constituïda per un cilindre provist d'un ganivet metàl·lic, que substituï la trituració amb masses. Les màquines d'aquest tipus, anomenades *holandeses*, es varen difondre per tots els països, i encara avui en dia són utilitzades amb algunes modificacions.

Fins al XVIII la producció de paper es feia triturant draps de lli i canem i aglutinant les fibres per formar fulles. Fou el 1719 quan R.A. Ferchault de Réamur va proposar que el paper podia ser extret de la fusta. El 1765 es varen publicar els primers resultats d'extracció de pasta de paper de fusta d'abet i de pollancre.

La invenció de les màquines contínues per a la producció de paper va ser a la fi del segle XVIII. La importància d'aquesta innovació es va notar ràpidament ja que va disminuir considerablement el temps de producció.

Fins a mitjan segle XIX, el paper era format per una barreja dels diferents components de la fusta. El 1857 s'obté la cel·lulosa de la fusta i el 1863 Tilghman utilitzà

bisulfit càlcic en coure la fusta, amb la finalitat d'obtenir cel·lulosa. Amb la introducció de la màquina contínua i l'obtenció de la pasta de paper a partir de fusta, el preu del paper va baixar permetent-ne una difusió i utilització cada cop més gran.

Actualment el paper és una matèria enfeltrada, constituïda per l'encadenament de fibres de cel·lulosa prèviament suspeses en aigua. Aquestes fibres constitueixen l'armadura interna i li donen les característiques mecàniques pròpies del paper. Uns elements de reble (pigments i càrregues sòlides com ara caolí, talc o guix) omplen els forats que queden a l'interior de l'estructura fibrosa i modifiquen les característiques físico-mecàniques, la densitat, l'opacitat i la porositat. A més, s'hi poden afegir additius per modificar certes característiques com l'afinitat amb l'aigua o per canviar la tonalitat del paper o donar una major sensació de blanc.

Així doncs, avui en dia el paper el podríem definir com un concentrat de cel·lulosa. La matèria primera per obtenir la fibra cel·lulòsica s'obté majoritàriament de la fusta dels arbres, tot i que hi ha altres fonts suplementàries com són principalment:

- El paper usat, representa per terme general una entrada directa de cel·lulosa, que pot arribar a reutilitzar-se de 4 a 5 vegades.
- Materials lignocel·lulòsics: compostos per biomassa, els components majoritaris de la qual són la cel·lulosa i la lignina, que provenen de productes de rebuig de la indústria agrícola y de la fusta o bé de vegetals no llenyosos com el lli (*Linum usitatissimum*), el cànem (*Cannabis sativa*) o el kenaf (*Hibiscus cannabinus*).

La qualitat del paper que es vol produir dependrà en bona part del tipus de fusta que s'utilitzi. La grandària de la fibra de cel·lulosa és diferent segons quin sigui el seu origen. Es distingeixen dos tipus de fibra:

- Fibres llargues de la fusta de les coníferes (pi, avet, ...) de 3 a 4.4 mm de longitud i de 0.02 a 0.05 mm de diàmetre.
- Fibres curtes de fusta de caducifolis (bedoll, pollancre, eucaliptus, ...) de 0.8 a 1.5 mm de longitud i de 0.021 a 0.02 mm de diàmetre.

La majoria dels papers actuals estan constituïts per una barreja de fibres llargues i curtes que li confereixen diferents propietats. Les fibres curtes de caducifolis no tenen gran resistència, per tant, els papers més resistents contindran un percentatge més elevat de fibres llargues de coníferes. La proporció de fibres curtes conferirà característiques com ara la llisor, bon tacte, opacitat, homogeneïtat ...

### ③ PRODUCCIÓ DE PASTA I DE PAPER

El procés actual de producció de paper inclou un producte intermedi anomenat pasta de cel·lulosa, aquest fet permet dividir les indústries del ram de la pasta i el paper en diferents grups:

---

- **Fàbriques de pasta de cel·lulosa:** la matèria primera és el vegetal i el producte acabat la cel·lulosa.
- **Fàbriques de paper:** la matèria primera és la pasta de cel·lulosa i el producte final és el paper.
- **Fàbriques mixtes:** la matèria primera és el vegetal i altres pastes i el producte acabat és el paper.

Existeixen en el mercat diferents tipus de pasta de cel·lulosa. Segons sigui la seva qualitat es destinaran a un tipus de paper o a un altre (paper de premsa, impremta, moneda, cartró, ...). En general, els processos de producció de pasta segueixen un camí similar i és en el moment de separació de la cel·lulosa de la resta de components on trobem les diferents variants.

El procés s'inicia amb la preparació de la matèria primera (figura 1.3.1). Cal eliminar l'escorça en el cas dels arbres i netejar la fusta obtinguda. Segueix un procés de trituració que facilitarà la posterior extracció de la cel·lulosa. L'extracció de la cel·lulosa és necessària per a la producció de pasta destinada a paper de qualitat. Si no és realitza aquesta separació la lignina s'oxida conferint una tonalitat groguenca al paper (paper premsa).

Un cop preparada la matèria primera, cal extreure'n la cel·lulosa. En aquest pas (anomenat polpeig) es distingeixen diferents variants bàsiques i s'obtenen diferents tipus de pasta:

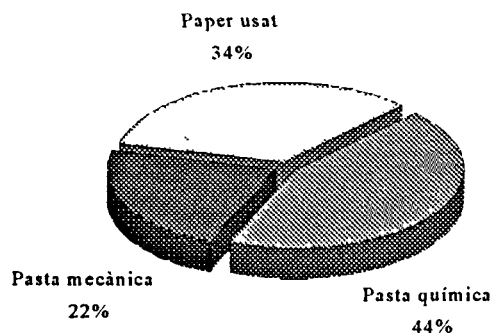
- **Pasta mecànica:** correspon al procés més antic. No hi ha extracció de la cel·lulosa i, senzillament, s'estova la fusta amb aigua i es tritura (desfibril·lació) per obtenir directament la pasta. En alguns casos el procés de desfibril·lació es fa acompanyat de vapor d'aigua, parlarem aleshores de pasta termomecànica. La pasta obtinguda és feble. Degut al seu elevat contingut en lignina, la pasta obtinguda es destina principalment a paper premsa, afegint-hi un 10% de pasta química que dona prou resistència al paper per tal de suportar la força de les rotatives. El rendiment d'aquest procés és molt elevat, proper al 95%. Si partim de 4 m<sup>3</sup> de fusta fresca, es transformen en 2 TM de fusta seca que, després del polpeig mecànic corresponen aproximadament a 2 TM de pasta mecànica, de les quals s'obtenen unes 2 TM de paper de diari.
  - **El paper usat:** l'increment en la recollida del paper usat ha fet que el paper vell passi de ser un producte de rebuig a una matèria primera. Actualment 1/3 de la fibra utilitzada per fabricar paper procedeix del paper reciclat (El Papel 1996). Per reutilitzar-lo únicament cal ressuspènre'l amb aigua i eliminar-ne les tintes.
  - **Pasta química:** és la més utilitzada. En aquest cas es persegueix obtenir una pasta rica en cel·lulosa. Els diferents processos de polpeig químic es basen en un atac químic (àcid o alcali) amb pressió i temperatura, en el qual s'extrau, ja sigui en forma soluble o col·loïdal, el 95% de material no cel·lulòsic. Hi ha també una fracció gasosa que es recupera per fer aiguarràs. El rendiment final d'aquest procés és del 50%, que correspon aproximadament al contingut amb cel·lulosa de les
-



matèries primeres utilitzades (figura 1.1.2). El paper obtingut amb aquesta pasta es destina als usos més diversos, papers de qualitat, cartró, ... El rendiment en el procés de pasta química és el següent: A partir de 4 m<sup>3</sup> de fusta fresca s'obtenen 2 TM de fusta seca, que donaran 1 TM de pasta química, de la qual es poden fer, per exemple, uns 200000 fulls de paper A4 per a fotocopiadora.

En l'etapa de cocció de la fusta es poden utilitzar diferents agents químics, segons això es pot classificar el procés de polpeig químic en:

- **Procés a la sosa:** el lleixiu utilitzat en la cocció és una dissolució de sosa càustica al 8-10%. Durant la cocció es formen lignosulfonats sòdics, que són el principal constituent dels anomenats lleixius negres, juntament amb productes de la degradació de la lignina, la cel·lulosa, sals sòdiques d'àcids orgànics complexos i l'excés de sosa.
- **Procés al sulfat:** o *kraft* (que amb alemany vol dir força o potència) és realment un procés a la sosa, però amb la diferència que en aquest cas l'atac es produeix de forma més controlada, ja que per la composició dels lleixius utilitzats (solució de NaOH, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a mesura que es consumeixen els OH<sup>-</sup> en l'atac del vegetal se'n generen més en hidrolitzar-se el Na<sub>2</sub>S (format per reducció del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- **Procés al bisulfit:** en aquest cas el lleixiu utilitzat és una solució de bisulfit amb excés de SO<sub>2</sub> lliure. Per acció del SO<sub>2</sub> es formen àcids lignosulfònics, que hidrolitzen les hemicel·luloses per donar sucres. Aquesta acidificació del medi podria donar reaccions secundàries, per aquest motiu el lleixiu de cocció porta cations, formant-se lignosulfonats que actuen regulant el pH de la solució.



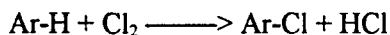
*Figura 1.3.1: Distribució de les fibres per fer paper.*

La pasta obtinguda amb els processos mecànic, semiquímic i químic (quan es destina a producció de cartró) es renten i s'assequen a l'espera de ser transformada en producte acabat.

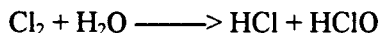
El cas de la fracció de pasta química que es destina a papers de qualitat és diferent. Les restes de lignina que puguin quedar adherides a la cel·lulosa reduïrien les qualitats del paper acabat. És necessari, doncs, eliminar aquesta fracció, mitjançant un procés anomenat blanqueig. Aquest pas és un dels més controvertits en la fabricació de la pasta per la toxicitat

dels efluents que es generen. En aquesta etapa s'aconsegueix fonamentalment extreure les restes de lignina no eliminades durant la cocció, que donen un aspecte marronós a la pasta a causa de la formació de quinones i altres compostos colorats (en el cas del polpeig alcalí). La naturalesa aromàtica de la lignina contrasta amb el caràcter alifàtic dels polisacàrids; aquest fet permet utilitzar selectivament reaccions de substitució aromàtica electrofílica (cloració, nitració) facilitant la seva extracció.

El mètode de blanqueig tradicional es basa en fer reaccionar la pasta en suspensió amb  $\text{Cl}_2$  gasós, que reacciona amb la lignina per substitució d'un hidrogen, segons la reacció:



on Ar-H és el radical lignínic. Al mateix temps el clor pot reaccionar segons:



S'obté d'aquesta forma una aigua àcida, la pasta es neteja i s'elimina l'HCl, però no els derivats de clorlignina formats que són insolubles en medi àcid i confereixen a la pasta un color ataronjat. Per eliminar-los cal fer un rentat amb una solució calenta de sosa diluïda, formant-se clorligninat sòdic, de color negre, que sí que és soluble. Les aigües són doncs similars als lleixius negres però menys concentrades, amb la problemàtica de tenir compostos orgànics halogenats.

---

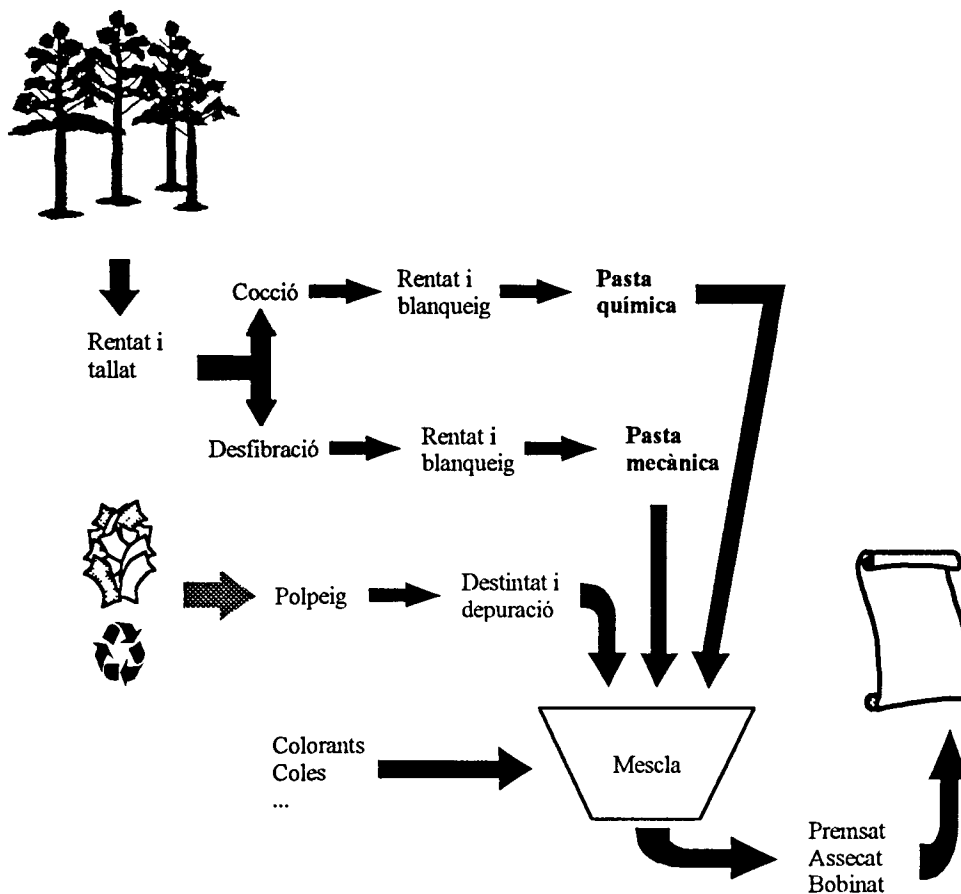


Figura 1.3.2: Esquema de la producció de paper.

Després d'aquesta extracció alcalina, s'acaben d'oxidar les últimes restes de lignina, amb tractaments a base d'hipoclorit sòdic i diòxid de clor, amb rentats intermedis, i s'obtenen unes aigües blanques, lleugerament àcides però amb quantitats poc apreciables de lignina.

Aquest seria el blanqueig tradicional, però la toxicitat dels efluents que s'obtenen ha forçat les indústries papereres a utilitzar processos menys contaminants; així han destacat dues alternatives:

- **Blanqueig ECF:** Procés lliure de clor elemental (*Elemental Chlorine Free*), la deslignificació es fa amb diòxid de clor i oxigen.
- **Blanqueig TCF:** Procés sense clor (*Total Chlorine Free*), en aquest cas s'utilitza oxigen i aigua oxigenada, per tal d'eliminar les restes de lignina, tot i que per a cel·luloses de fibres llargues pot ser necessari utilitzar ozó. Amb aquest procés s'elimina la presència de compostos organoclorats en els efluents de blanqueig. Malauradament, es tracta d'una tecnologia cara i, en alguns casos, s'obté un paper amb menor resistència.

Un cop obtingudes les pastes cal transformar-les en paper. El procés consisteix a

repartir uniformement les fibres suspeses en aigua sobre una tela filtrant. Primer cal ressuspendre la pasta en aigua. En aquesta operació d'homogeneització s'utilitza una gran quantitat d'aigua: un 99.9% contra un 0.1% de fibra. La suspensió obtinguda es filtra sobre una tela filtrant on s'eliminarà un 95% de l'aigua. La resta de l'aigua s'extreu en premses cilíndriques i un sistema d'assecat.

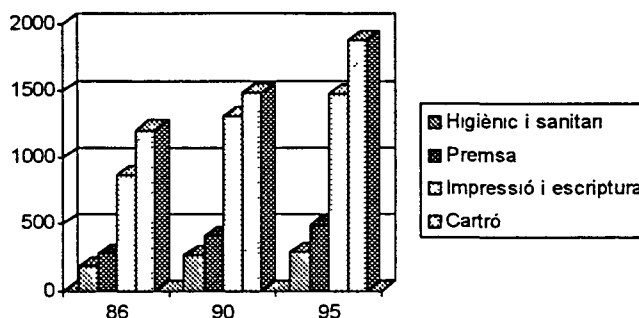


Figura 1.3.3: Consum de diferents tipus de paper.

Tot i que el pas final de producció de paper sembli un procés senzill (de fet continua sent el de fa dos segles), el creixent consum de paper -en la figura 1.3.3 es presenten les dades corresponents a Espanya (El Papel 1996)- ha convertit les màquines de paper en uns enginys de 150 m de longitud. Posar en marxa una màquina nova requereix un mínim de 2 anys de treball i una inversió d'uns 10.000 milions de pessetes (Fundació Terra 1995).

#### 4 LA PRODUCCIÓ DE PAPER I EL MEDI AMBIENT

La producció de paper afecta el medi ambient en diversos punts. El primer efecte el trobem a l'hora d'obtenir la matèria primera, en aquells casos en què l'explotació dels boscos no respecta la capacitat de regeneració que té el mateix bosc. En general la possibilitat de reciclar el paper usat juntament amb una millor gestió del bosc han permès minimitzar lleugerament l'efecte de la indústria paperera sobre els boscos.

Un cop obtenim la matèria primera, el procés total de fabricació de paper requereix una gran quantitat d'energia i aigua. Comença per l'escorçament, on es generen una gran quantitat de residus que, ben aprofitats poden, utilitzar-se per produir energia. Segueix, com hem vist, una etapa de cocció, on es generen emissions a l'aire i aigües residuals amb una càrrega orgànica i toxicitat elevades (Field 1991). Finalment, abans d'obtenir la pasta trobem l'anteriorment esmentada etapa de blanqueig, en què també es generen uns efluent especialment tòxics (Kringstad i col. 1981; Vidal 1994). Durant la transformació de la pasta en paper es produeix també una gran despesa d'aigua i energia que cal minimitzar.

La pressió de la societat, cada cop més conscienciada en els efectes sobre el medi ambient, ha fet que les indústries papereres comencin a fer modificacions en els processos de fabricació i en el tractament dels residus generats per tal de reduir l'impacte que la producció de paper té sobre el medi ambient.

## 5 EL PAPER DE LA BIOTECNOLOGIA

La biotecnologia es pot definir com l'aplicació dels principis de la ciència i de l'enginyeria al processament de materials mitjançant agents biològics per tal d'obtenir béns i serveis. Conscient o no del terme, l'espècie humana ha estat utilitzant la biotecnologia des de fa molts anys. La indústria paperera ha cercat entre d'altres camps també en el camp de la biotecnologia la solució per al seus problemes. Com a conseqüència, avui en dia s'estudia l'aplicació de la biotecnologia a diferents etapes de la producció del paper, des del mateix procés fins al tractament de les aigües residuals generades.

Alguns exemples d'aquestes investigacions (algunes de les quals són ja aplicades a nivell industrial) són:

- Aplicació de l'enginyeria genètica per a l'obtenció de matèria primera vegetal. Creació de vegetals transgènics amb un contingut menor de lignina o bé amb lignina modificada. Utilitzant aquesta matèria primera hi hauria un estalvi de reactius i energia, ja que la lignina s'extrauria de forma més fàcil o es trobaria en menor quantitat (Chabbert i col. 1995, Halpin i col. 1995).
  - Facilitar l'escorçament de la fusta mitjançant tractaments amb pectinases, reduint-se la utilització de reactius (Martínez 1994).
  - Biopolpeig (*biopulping*): Consisteix en una deslignificació directa de la fibra amb microorganismes o enzims. La deslignificació total de la fusta seria un procés massa llarg. És per això que el que es persegueix és una deslignificació parcial que permeti un estovament de la fusta. Aquesta etapa prèvia a la desfibril·lació estalvia reactius i energia, al mateix temps que redueix el contingut en compostos tòxics dels lleixius de rebuig. Un dels microorganismes més estudiats per aquest procés és un mutant cel·lulasa(-) de *Phanerochaete chrysosporium* (Eriksson 1990), tot i que també s'han realitzat treballs amb la soca salvatge (Leatham i col. 1989).
  - Bioblanqueig (*biobleaching*): en aquest cas s'intenta eliminar l'etapa de blanqueig químic, substituint-la per una etapa on s'utilitzarien enzims o microorganismes. S'obtidria un estalvi en reactius i unes aigües residuals molt menys contaminades, sense la presència de compostos organoclorats. L'eliminació de la lignina caldria fer-la amb ligninases. Atès que l'acció d'aquests enzims encara no és ben coneguda, actualment el que es fa és un tractament amb xilanases, que destrueixen les restes d'hemicel·luloses, sense afectar la cel·lulosa (Jurasek 1996). Eliminant les hemicel·luloses, la lignina residual esdevé més accessible i, per tant, es necessiten menys quantitats d'agents oxidants (clor, diòxid de clor, oxigen, ...) per eliminar-la.
  - Durant la manufacturació del paper es poden utilitzar cel·lulases per millorar les fibres i la drenabilitat de la pasta (Martínez 1994).
  - Utilització de lipases per al destintat del paper usat (Martínez 1994).
-

- En l'apartat d'analítica també hi ha innovacions relacionades amb la biotecnologia, com per exemple la utilització de biosensors i enzims per a l'anàlisi de les fibres de la pasta de cel·lulosa o la utilització d'anticossos per determinar el contingut en lignina de la pasta (Eriksson 1990).
- La utilització de lleixius de rebuig de la pasta de sulfit per a l'obtenció d'etanol fou el primer procés biotecnològic desenvolupat (Eriksson 1990). Actualment, en haver tancat moltes de les indústries de polpeig amb sulfit, aquest procés ja no s'utilitza. Durant la crisi del petroli, es varen iniciar investigacions per obtenir etanol a partir de material lignocel·lulòsic, però en acabar la crisi la manca de mitjans va fer que moltes d'aquestes investigacions s'aturessin.
- Tancament del circuit d'aigües blanques en la producció de pastes mecàniques. Durant la producció de la pasta mecànica, hi ha una quantitat de matèria orgànica que es dissol en l'aigua. És composta per sucres, lignines de pes molecular baix, reïnes, ... Aquests sucres són un bon substrat per a determinats fongs. S'han realitzat estudis amb el fong *S.pulverulentum* (Ek i col. 1980).
- Depuració biològica dels efluents generats en les diferents etapes del procés. Mitjançant tractaments anaerobis (Zuxuan i col 1983; Field 1991; Habets i col 1991) es pot reduir la DBO (demanda biològica d'oxigen); en els tractaments d'eliminació de toxicitat i color es poden utilitzar fongs ligninolítics com ara *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, ... (Eaton i col. 1980; Bergbauer i col. 1992; Font i col. 1993; Mehna i col. 1995).

## ⑥ DEGRADACIÓ DE LA LIGNINA

Hem vist que les funcions de la lignina en els vegetals són de tipus estructural i de defensa. Tot i que la seva complexa estructura la fa de difícil degradació, és evident que en la natura no hi ha una acumulació d'aquest polímer i que, per tant, d'una manera o una altra es degrada i metabolitza, completant així el cicle del carboni en la biosfera.

Es creu que la degradació de la lignina en el medi natural la duen a terme, en acció combinada, els fongs i els bacteris.

La fusta ofereix diverses desavantatges que dificulten la seva degradació: Conté poques substàncies nutritives i solubles, la manca d'oxigen i un contingut elevat en anhidrid carbònic, produït pel creixement del microorganisme, així com la falta d'aigua en el medi fan que només determinades espècies de fongs puguin colonitzar-la. La majoria dels que ho poden fer pertanyen als Basidiomicets, i uns pocs als Ascomicets (confereixen una coloració blavosa a la fusta, *Chaetomium globosum*).

Generalment arriben al tronc central a través de ferides a l'escorça i provoquen la floridura del tronc viu (Agaricals o Basidiomicets). D'altres espècies colonitzen la fusta tallada provocant-ne la floridura (floridura de la fusta tallada) (Agaricals o Basidiomicets) fins i tot, en fusta ja utilitzada en edificacions, causant la floridura vermella (*Serpula lacrymans*).

---

En la degradació selectiva de la cel·lulosa romanen les parts de lignina de la paret cel·lular poc alterades, la fusta es desfà en cubs i adopta una forta coloració terrosa (podriment vermell o destructiu). Si la lignina es degrada, generalment al mateix temps que la cel·lulosa, la fusta adquireix un aspecte pàl·lid (podriment blanc o corrosiu).

Així els fongs ligninolítics poden classificar-se segons la seva acció sobre la fusta:

- **Fongs de la floridura blanca (*white-rot*):** Pertanyen a l'espècie dels Basidiomicets. Ataquen la lignina, causant el trencament dels enllaços interlignol o trencant els anells aromàtics.
- **Fongs de la floridura vermella (*brown-rot*):** Pertanyen als Basidiomicets. Produeixen canvis limitats a la lignina com desmetilacions o hidroxilacions dels anells aromàtics. No trenquen els anells aromàtics amb eficiència i, si els obren, no fan una descomposició significativa dels fragments resultants, deixant un residu modificat de color marró obscur.
- **Coloració policroma de la fusta (*soft-rot*):** Són Ascomicets. Degraden la lignina lenta i incompletament i ataquen la fusta sota condicions humides.

La capacitat d'aquests fongs per degradar la lignina està essent estudiada des de ja fa anys, amb la finalitat de disposar d'un tractament biològic eficaç per degradar la lignina.

---





## **2.- TRACTAMENT DELS LLEIXIUS NEGRES**

---

### **❶ RESUM**

En aquest capítol s'exposen els diferents experiments duts a terme per al tractament de lleixius negres, amb el fong *Trametes versicolor*, des dels primers treballs realitzats en Erlenmeyer fins a arribar a treballar en petits reactors de 700 ml.

Els resultats presentats en aquest capítol es poden dividir en els següents apartats:

- Obtenció de les condicions ambientals (temperatura, agitació i concentració de glucosa), que s'han realitzat amb Erlenmeyer i treballant amb el fong en forma de *pellet*.
- Utilització de diferents tipus de reactors per millora els resultats obtinguts amb els treballs realitzats amb Erlenmeyer i treballant amb el fong en forma de *pellet*.
- Immobilització del fong i obtenció de les condicions de treball (concentració de la font de carboni), realitzats en Erlenmeyer.
- Utilització de diferents tipus de reactors per millora els resultats obtinguts amb els treballs realitzats amb Erlenmeyer i el fong immobilitzat.

### **❷ INTRODUCCIÓ**

La degradació biològica de la lignina és una de les reaccions més importants dels cicles de carboni i oxigen de la biosfera. La major part de la lignina biosintetitzada per les

---

plantes, és mineralitzada i retornada com a CO<sub>2</sub> per alguns dels microorganismes que intervenen en la degradació de la fusta. Per tant, tot i ser un polímer difícil de degradar, després de la mort del vegetal, la lignina és finalment degradada a humus, aigua i CO<sub>2</sub>. Els nous coneixements adquirits sobre la degradació de la lignina poden tenir una aplicació immediata, ja que la lignina és una font renovable de matèries primeres que poden ser convertides mitjançant processos químics o biotecnològics en productes útils (Crawford i col. 1980).

En finalitzar el capítol anterior s'assenyalava la importància que està prenent la investigació sobre els fongs ligninolítics i la seva acció sobre la lignina i altres compostos contaminants. Efectivament, en els últims anys la possibilitat d'utilitzar fongs en estratègies de biodepuració i tecnologies netes ha centrat l'interès de nombrosos laboratoris.

Inicialment els treballs es centraven en el fong *Phanerochaete chrysosporium*, i és sobre aquest fong que es pot trobar més bibliografia, últimament, però, la recerca es més general, i es comença a estudiar altres fongs. Es el cas de *Trametes versicolor*, *Bjerkandera*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, per citar-ne alguns.

Els esforços realitzats pels diferents laboratoris implicats en aquesta recerca, fa que s'aïllin i identifiquin nous enzims que poden jugar un paper important en la degradació de la lignina (Fletcher 1993). Tot i això, hi ha encara aspectes poc coneguts, com per exemple, el paper de determinats metabòlits (Evans 1993) o com es produeix l'atac inicial a la lignina per part del fong. A la complexitat del sistema ligninolític, cal afegir la dificultat de treballar amb un polímer natural, d'estructura complexa i variable, fet que ha portat a molts centres d'investigació a treballar amb models sintètics de la lignina (Leisloa i col. 1988; Higuchi 1993).

El fet és que cada cop apareixen nous treballs d'investigació, tant de recerca bàsica (mecanismes enzimàtics, nous fongs amb activitats ligninolítiques, estudi de vies metabòliques) (Lundell i col. 1994, Wahleithner i col. 1996) com de recerca aplicada, principalment en el camp de la descontaminació i el bioblanqueig (Armenant i col. 1992; Sublette i col. 1992; Font i col. 1993, Field i col. 1993; Reid i col. 1994; Manzanares i col. 1995).

## EL SISTEMA LIGNINOLITIC

La necessitat d'haver de degradar la lignina per accedir a la cel·lulosa fa que aquests fongs tinguin un sistema enzimàtic (sistema ligninolític) variat i poc específic. Variat per que per dur a terme la oxidació de la lignina són necessaris diversos enzims, des d'enzims productors d'aigua oxigenada a peroxidases, oxidases o reductases. Poc específic, per que la complexitat de la molècula de lignina, el fet que sigui un polímer tridimensional amb una estructura poc repetitiva, fa necessari enzims amb poca especificitat.

Aquest últim fet ha estat aprofitat en diversos treballs, utilitzant-se fongs ligninolítics per degradar els compostos més diversos, així, s'ha estudiat la degradació d'hidrocarburs policíclics aromàtics (PHAs) (Field i col. 1992, Hammel i col. 1992, Sanglard i col. 1986), fenols clorats (Lin i col. 1990, Lin i col. 1991, Valli i col. 1991), bifenils policlorats (PCBs)

---

(Eaton i col. 1985, Bumpus i col. 1985), pesticides (Bumpus i col. 1985, Valli i col. 1992), trinitrotolué (TNT) (Spiker i col. 1992, Aust 1990) i alguns colorants industrials (Cripps i col. 1990, Renganathan i col. 1993, Spadaro i col. 1992, Wong i col. 1993).

Ens trobem, doncs, davant un grup de fongs, capaços de degradar un ampli ventall de compostos. Però, quins són els enzims que participen en aquesta degradació? Els més estudiats fins ara són la lignina peroxidasa (LiP), la manganès peroxidasa (MnP) i la lacasa i, és a aquests tres enzims als que se'ls hi atribueix un major efecte sobre la degradació de la lignina. Tots tres són enzims amb un alt poder oxidant, sent les reaccions que catalitzen força similars. La lacasa i les diferents peroxidases, incloent la LiP i la MnP, poden oxidar compostos fenòlics, creant els corresponents radicals. Tots els compostos fenòlics poden ser oxidats per les fenol oxidases, mentre que pels compostos no fenòlics cada enzim té un rang diferent de substrats (Jong 1993).

## LACASA

La lacasa (EC 1.10.3.2.) és un enzim que conté coure, té com a nom sistemàtic Benzèdiol:oxigen oxidoreductasa. Altres sinònims d'aquest enzim són: *p*-difenol oxidasa, urishiol oxidasa o urushiol oxidasa.

Catalitza una reacció d'oxidació-reducció del benzèdiol en presència d'oxigen, donant com a producte la benzèsemiquinona i aigua. Per realitzar aquesta reacció no requereix la presència de cofactors o grups prostètics. A més presenta especificitat per altres substrats de tipus natural com l'àcid ferúlic, el catecol, la dopa, l'1-naftol, etc. (Enzyme Handbook 1994).

En la natura podem trobar la lacasa en diversitat de fongs (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* -Orellanes de pollancre- o *Neurospora crassa*), i plantes (*Acer pseudoplatanus* -sicòmor-, *Prunus persica* -presseguer- o *Aesculus ps.* -castanyer-). En el cas dels fongs la lacasa és present en els generes Ascomicets, alguns Deuteromicets i principalment en els Basidiomicets. S'ha localitzat tant en el líquid extracel·lular, com en l'intracel·lular, així com en el citoplasma d'algunes plantes.

La lacasa és un enzim que s'ha utilitzat en diferents aplicacions, ja sigui en forma purificada o en presència de l'organisme productor. Alguns exemples poden ser el biBlanqueig (Reid i col. 1994) o el tractament d'efluents d'origen lignocel·lulòsic (Mehna i col. 1995; Roy-Arcand i col. 1991; Christine 1985), ha estat també assajat com a biosensor per a la detecció de compostos fenòlics (Zouari i col. 1994; Ghindilis i col. 1992), en reaccions de transformació de fenols (Shuttleworth i col. 1986), o en la producció d'antibiòtics (Agematu i col. 1993). La lacasa ha estat també un enzim estudiat des del punt de vista de la biologia molecular, així, s'ha localitzat el seu gen i s'ha clonat en diversos organismes (Coll i col. 1993; German i col. 1985).

Els estudis que s'han realitzat en el camp de la indústria paperera, estan enfocats principalment al camp del biBlanqueig, arribant a definir el blanqueig amb lacasa com "possiblement la tecnologia de polpeig més important dels anys 90" (McCubbin 1994).

*In vivo*, sembla clar que és un enzim implicat en la biodegradació de la lignina, tot i que *in vitro*, tant la pot polimeritzar com despolimeritzar. La lacasa és un enzim amb capacitat per degradar tant subestructures fenòliques com no fenòliques de la lignina (Reid i col. 1994). La seva

---

acció la du a terme per extracció d'un electró, formant-se radicals, que tant poden tornar a polimeritzar o bé despolimeritzar la lignina (Bourbonnais i col. 1992). Així mateix la lacasa intervé en la desmetilació de la lignina (Bourbonnais i col. 1992), un important pas previ a la descomposició del biopolímer, en la subseqüent descomposició de la macromolècula, en el trencament de l'enllaç  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  de la subestructura fenòlica i també en el tractament de l'anell aromàtic (Rogalski i col. 1991; Kawai i col. 1988).

Sembla que l'acció de la lacasa vindria acompanyada per la de l'enzim Celobiosa:Quinona oxidoreductasa (CBQasa), un enzim que reduiria els radicals fenòxi, evitant la polimerització i afavorint la despolimerització de la lignina (Jurasek i col. 1996)

## LIGNINA PEROXIDASA

La lignina peroxidasa (EC 1.11.1.7) és una hemoproteïna amb un elevat potencial redox. Fou aïllada per primer cop en cultius de *Phanerochaete chrysosporium* el 1983 (Yang i col. 1980; Glen i col. 1983; Tien i col. 1983). És un enzim que podem trobar en molts basidiomicets com *Bjerkandera* sp. BOS55 (Kaal i col. 1993), *Trametes versicolor* (Loborzewski 1990; Jönsson i col. 1994b) i altres (Jong 1993).

La reacció catalitzada per la LiP s'inicia per l'extracció d'un electró d'una cadena no fenòlica de la molècula de lignina, formant-se el corresponent radical, que inicia una reacció oxidativa a l'atzar, que finalment desemboca en la oxigenació i despolimerització de la lignina.

En ser una peroxidasa la LiP, necessita aigua oxigenada per poder catalitzar qualsevol reacció. Són importants per aquest fet, els enzims productors d'aigua oxigenada, com la glioxal oxidasa o les aril alcohol oxidases (AAO).

L'alcohol veratrílic, és un metabòlit secundari, produït per una gran varietat d'espècies de la floridura blanca. El seu paper exacte encara no és ben conegut, i es proposen dues hipòtesis. Harvey i col. (Harvey i col. 1986) proposen que l'alcohol veratrílic actua com un compost intermedi en la reacció catalitzada per la LiP. Així, la LiP oxidaria l'alcohol veratrílic formant-se el corresponent radical, que per la seva petita dimensió, es podria difondre dins la molècula de lignina iniciant la reacció d'oxidació.

Per altra banda, altres estudis (Gold i col. 1993; Cancel i col 1993; Valli i col. 1990) , atribueixen a l'alcohol veratrílic un paper estabilitzador de la LiP davant la presència d'aigua oxigenada.

## MANGANÈS PEROXIDASA

A més de la LiP, una bona quantitat de fongs de la floridura blanca produeixen una altra peroxidasa, la manganès peroxidasa (EC 1.11.1.13). Rep el nom sistemàtic de Mn(II):peroxid-d'hidrogen oxidoreductasa. Catalitza la reacció d'oxidació del Mn(II) a Mn(III) en presència d'aigua oxigenada.

---

És de fet el Mn(III), el responsable de la oxidació de la lignina. El Mn(III) pot difondre dins l'estructura de la lignina, oxidant estructures internes de la paret cel·lular, a les quals l'enzim no pot accedir. El Mn(III) és estabilitzat per agents quelants, principalment per malonat, que és produït pel fong sota condicions ligninolítiques (Enzyme Handbook 1994).

La MnP fou descrita per primer cop el 1984 (Kuwahara i col. 1984), però molt abans, es poden trobar treballs sobre la oxidació del Mn(II) per certs extractes d'arrels, en presència d'aigua oxigenada (Kenten i col. 1950). És produïda per diferents fongs, entre ells *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara i col. 1984) i *Trametes versicolor* (Johansson i col. 1987; Paice i col. 1993).

En aquest cas, la CBQasa, sembla que també té un paper, al reduir l'òxid de manganès present en la fusta a Mn(II), convertint-lo en utilitzable per la MnP (Roy i col. 1994).

## EL FONG *Trametes versicolor*

El fong escollit en aquest treball és el Basidiomicet *Trametes versicolor*, responsable del podriment blanc. Es coneix també com a “bolet de soca de colors”, o “bolet de soca zonat”, se'l pot trobar en alzinars i suredes, colonitzant freqüentment la fusta morta, o actuant com a paràsit de debilitat.

*Trametes versicolor* ha estat menys estudiat que *Phanerochaete chrysosporium*, i un dels fets que el diferencia d'aquest últim és la producció de lacasa. Les referències que es poden trobar d'aquest fong a la bibliografia corresponen generalment a uns pocs grups d'investigació, comparats amb els estudis realitzats amb *Phanerochaete chrysosporium*. En la taula 2.1.1, es mostren alguns dels camps d'investigació en els que s'utilitza *Trametes versicolor* i algunes referències de cada un d'ells.

Jurasek i col. (Jurasek i col. 1996) resumeixen les avantatges de *Trametes versicolor* amb els següents punts:

- El fong degrada la lignina al mateix temps que creix vigorosament.
  - La capacitat de blanquejar la pasta no depèn de limitacions de nitrogen o carboni.
  - Pot produir una bona quantitat d'enzims amb capacitat redox, incloent la lacasa.
  - En cultius submergits pot agitar-se sense efectes negatius en la producció enzimàtica.
-

Camp d'investigació	Referències	País
Blanqueig biològic	Jurasek i col. 1990	Canadà
	Ziomek i col. 1991	Canadà
	Archibald 1992	Canadà
	Reid i col. 1994	Canadà
Tractament d'efluents de la Indústria Paperera	Livermoche i col. 1983	Canadà
	Royer i col. 1985	Canadà
	Roy-Arcand i col. 1991	Canadà
	Bergbauer i col. 1992	Alemanya
	Bajpai i col. 1993	Índia
	Terrón i col. 1993	Espanya
	Martín i col. 1994	Espanya
	Mehna i col. 1995	Índia
Degradació de compostos tòxics (PHA, PCB, ...)	Field i col. 1992	Holanda
	Vyas i col. 1994a	Rep.
	Vyas i col. 1994b	Txeca
		Rep. Txeca
Degradació de palla	Valmaseda i col. 1991	Espanya
	Barrasa i col. 1995	Espanya
Biologia molecular	Jönsson i col. 1994a	Suècia
	Jönsson i col. 1994b	Suècia

Taula 2.1.1: Treballs publicats de recerca amb *Trametes versicolor*.

*Trametes versicolor* pot produir lacasa de forma induïda o constitutiva, tenint en ambdós casos una activitat catalítica similar (Sariaslani 1989). Altres autors proposen la inducció de peroxidases de *Trametes versicolor* amb àcid vanílic (Lobarzewski i col. 1982) i Archibald (Archibald 1992a) produeix LiP de *Trametes versicolor* en un medi limitat en nitrogen. Estudis realitzats amb medis on s'ha limitat la font de nitrogen, mostren una forta estimulació del seu sistema ligninolític (Leatham i col. 1983). *Trametes versicolor* també produeix l'enzim MnP (Paice i col. 1993). Generalment els treballs amb cultius submergits es realitzen amb el fong en forma de *pellet* (Royer i col. 1985; Bergbauer i col. 1992; Bajpai i col. 1993), tot i que hi ha alguna referència d'immobilització (Livermoche i col. 1983; Royer i col. 1983).

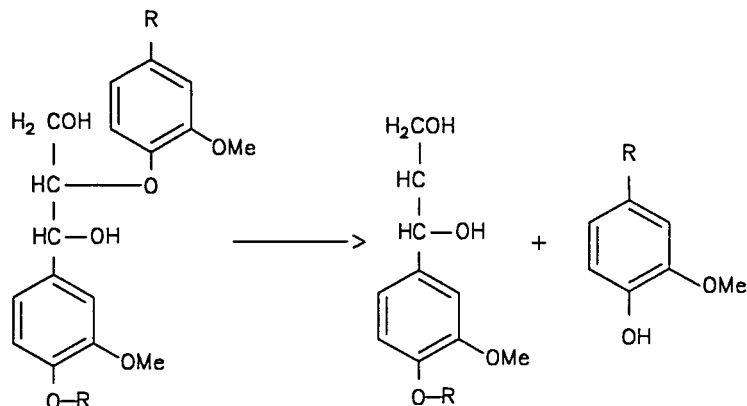
Sembla doncs que el fong *Trametes versicolor* pot produir el sistema enzimàtic necessari per degradar la lignina.

## ELS LLEIXIUS NEGRES

S'ha vist en el Capítol I les diferents operacions que es duen a terme per arribar a obtenir cel·lulosa a partir del material original, ja sigui fusta o altres vegetals més fibrosos. Una de les operacions en les que s'elimina un elevat contingut d'impureses (lignina, reïnes, ...) és durant la cocció. En els processos que utilitzen sosa per realitzar aquesta extracció, es

genera un efluent de rebuig, anomenat lleixius negres. Tot i que el polpeig amb sosa, ha estat progressivament substituït pel polpeig *kraft*, és encara un procés utilitzat en la producció de pasta de paper a partir de matèria primera no llenyosa.

La cocció en condicions alcalines dissol la major part del material no cel·lulòsic de la matèria primera (lignina, hemicel·lulosa, reïnes, etc.). El procés es basa en una despolimerització dels fenilalquil-èters. El trencament dels enllaços éter (figura 2.1.1) contribueix essencialment a disminuir la grandària de les molècules de lignina i al mateix temps es generen ions fenòxid, fent que la lignina sigui més soluble en medi alcalí. Com les reïnes i els àcids grassos són solubles en medi alcalí, s'extreuen també durant la cocció.



**Figura 2.1.1:** Trencament de l'enllaç  $\beta$ -aril éter de les unitats de lignina durant el procés de polpeig alcalí.

A diferència dels efluents de blanqueig, els lleixius negres no contenen compostos organoclorats, que són altament tòxics (Rogers 1973; Royer i col. 1991; Kringstat 1981), però el seu contingut en lignines altament modificades els fa igualment contaminants, tòxics i difícils de biodegradar (Rogers 1973; Field 1991; Sierra i col. 1991). El seu contingut en sòlids varia entre el 14 i 18%. El pH és elevat, entre 9 i 14 i la DQO (Demanda Química d'Oxigen) entre 25 i 120 g/l. Tenen un color marró fosc degut al contingut en fragments de lignina d'alt pes molecular.

A aquestes característiques cal afegir la toxicitat de determinats compostos (derivats lignínics de baix pes molecular, reïnes i greixos) i la poca biodegradabilitat dels derivats lignínics d'alt pes molecular.

Una dificultat addicional que presenten els efluents de la indústria de pasta i paper, en general i, per tant, aplicable als lleixius negres, és que les característiques de les aigües residuals depenen de diferents factors, que poden resumir-se en (de Lora i col. 1978):

- El procés utilitzat.
- La matèria primera, eucaliptus (fusta frondosa), pi (fusta reïnosa), palla, cànem o bagàs (plantes anuals).

- La història de la matèria primera: una mateixa fusta tallada en diferents èpoques de l'any, desescorçada a la muntanya o a la fàbrica, emmagatzemada en troncs o en estelles, presentarà després diferents comportaments durant el procés.
- Les condicions del sòl en les que ha crescut el vegetal: donarà lloc a que aquest tingui més o menys contingut en sílice i faci que l'eficàcia dels rentats sigui diferent i, per tant, el grau de recuperació dels lleixius.
- Del grau de reutilització de l'aigua dins la fàbrica, com més gran sigui la reutilització, menor serà el consum d'aigua i, per tant, menor el cabal de vessat.

Per tant, és difícil dissenyar un tractament típic, adequat a les aigües residuals de la indústria de pasta i paper.

Pel que fa als lleixius negres s'han provat i proposat diferents processos pel tractament d'aquests efluent. En general es poden englobar dins els següents grups:

- **Tractaments de precipitació:** Són efectius per eliminar els compostos reïnosos, que són les principals substàncies amb característiques inhibidores dels lleixius negres. La precipitació es pot fer mitjançant:
  - Àcids.
  - Sals di o trivalents i polielectrolits.

Per precipitació àcida (HCl) s'aconsegueix la completa eliminació de la toxicitat metanogènica dels lleixius negres de pi (Sierra 1990). La major part de la toxicitat dels lleixius negres es troba en la fracció sòlida.

Així mateix per addició de  $\text{CaCl}_2$  s'aconsegueix també la destoxicació completa de lleixius negres de pi (Field 1991). A més, l'addició de cations provoca una disminució en la coloració de l'efluent per precipitació dels derivats lignínics.

El tractament per precipitació, però, té l'inconvenient d'haver de disposar del sòlid i la seva eliminació suposa un cost afegit al tractament.

- **Incineració:** S'aconsegueix eliminar el problema de la contaminació dels efluent amb els lleixius negres, es recuperen part dels reactius utilitzats durant el procés i s'obté energia. Consisteix en una etapa d'evaporació seguida d'una incineració.

L'alt cost de la incineració limita la seva utilització a empreses amb elevat volum de producció, fent impossible la seva aplicació a les petites empreses.

- **Tractaments oxidatius:** Poden dividir-se en oxidacions que polimeritzen els compostos aromàtics i oxidacions que destrueixen l'estructura aromàtica. Tractaments amb  $\text{O}_3$  o
-



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poden utilitzar-se per destruir l'estructura aromàtica de compostos aromàtics recalcitrants convertint-los en àcids carboxílics simples. Així, en estudis realitzats amb aquests oxidants s'elimina parcialment el color d'aigües residuals amb lignina (Gilbert 1988; Prat i col. 1988).

Per altra banda els tractaments oxidatius que causen polimerització poden convertir els tanins, per exemple, en compostos húmics d'alt pes molecular, que tot i ser recalcitrants a causa del seu elevat pes molecular, no són tòxics (Temink i col. 1989).

Malauradament l'elevat cost dels oxidants químics fa que aquest procés no pugui ser aplicat a escala industrial d'una manera econòmicament viable.

- **Tractaments biològics:** Els lleixius negres no es poden tractar directament mitjançant tractaments biològics degut a la presència de compostos tòxics (tant pels bacteris anaerobis com pels aerobis) com reïnes, greixos o tanins. Cal doncs diluir el lleixiu negre fins a concentracions subtòxiques amb altres efluent poc contaminants del procés, o bé diluir-lo amb l'efluent d'un altre tractament biològic.

L'alt contingut en lignina fa que la biodegradabilitat anaeròbia dels lleixius negres sigui baixa. La propietat recalcitrant dels compostos de lignina d'alt pes molecular en ambients anaerobis ha estat estudiada en diverses ocasions (Odièr i col. 1983; Sierra 1990)

Per augmentar la biodegradabilitat anaeròbia dels lleixius negres pot fer-se un tractament previ a la digestió anaeròbia. L'oxidació dels compostos aromàtics i xenobiòtics per fongs ligninolítics sembla una alternativa viable als processos de pretractament com oxidació i precipitació.

## ❷ MATERIALS I MÈTODES

### MICROORGANISME

La soca de fong utilitzada fou *Trametes versicolor* (ATCC# 42530). Els cultius es conserven a 23°C en plaques de Petri amb medi agar/extracte de malta (2%) i es resembren periòdicament.

### EFLUENT

L'efluent utilitzat és un lleixiu negre de cànem (*Cannabis sativa*), obtingut d'una indústria de pasta de paper (Celesa, Tortosa), que utilitza per a la producció de la pasta el procés a la sosa.

---

Com la pasta de paper obtinguda es destina a la producció de papers d'alta qualitat (paper de seguretat, paper moneda, ...), com a matèria primera s'utilitzen vegetals fibrosos com el cànem.

El punt de presa de mostra per realitzar aquest estudi, és just després de la cocció i abans del rentat de la pasta (figura 2.2.1). Per aquest motiu el lleixiu negre utilitzat no és diluït amb altres aigües del procés i les seves característiques són més extremes que les de la bibliografia.

Les característiques principals d'aquest efluent es presenten en la taula 2.2.1.

Paràmetre		Paràmetre	
Tanins i lignina	29 g/l	COT	51507 ppm
DQO	180 g/l	Fenols	1.34 ppm
Color	65.1	Comp. Aromàtics	927.8
pH	12.76	Toxicitat (EC <sub>50</sub> )	13%
Manganès	1.85 ppm	Zenc	2.53 ppm
Coure	0.72 ppm	Ferro	4.3 ppm

Taula 2.2.1: Característiques principals de l'efluent utilitzat.

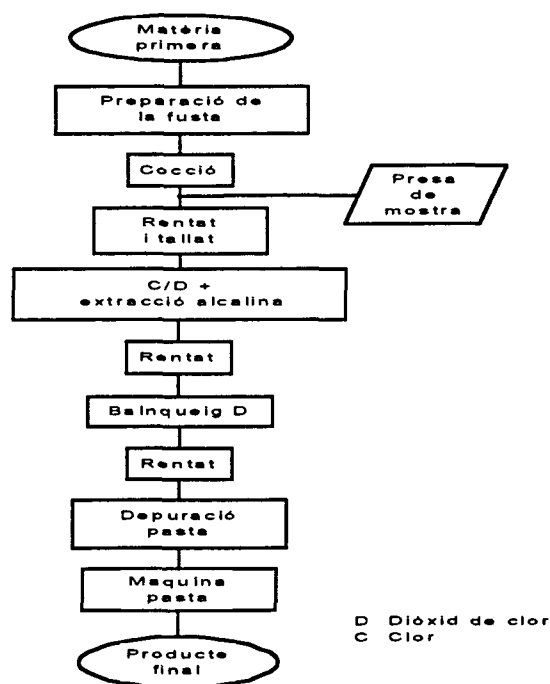


Figura 2.2.1: Diagrama de flux del procés de producció de pasta de paper a Celesa i punt de presa de mostra

## COMPOSICIÓ DEL MEDI

Atès l'alt contingut en lignina i compostos derivats dels lleixius negres i la toxicitat d'aquest efluent (Sierra i col. 1991), en aquest estudi els lleixius negres són utilitzats a una concentració del 5.6%. A més donada la seva composició, no poden utilitzar-se com a única font de carboni i energia i, per tant, cal afegir-hi nutrients en la següent proporció (per l):

- 100 ml de tampó 2,2-Dimetilsuccinic (80 mM).
- 10 ml de macronutrients.
- 1 ml de micronutrients.
- 10 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  19 g/100 ml.
- Glucosa (segons l'experiment).

S'ajusta el pH a 4.5 amb HCl i s'enrassa a 1000 ml amb aigua destil·lada, seguidament s'esterilitza a 120°C durant 20 minuts.

Les composicions de les solucions de micronutrients i macronutrients es mostren en la taula 2.2.2.

Micronutrients	Concentració (g/l)	Macronutrients	Concentració (g/l)
Nitrilacetat	1.5	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	20
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	3.0	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.5	$\text{CaCl}_2$	1
NaCl	1.0		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.1		
$\text{CoSO}_4$	0.1		
$\text{ZnSO}_4$	0.1		
$\text{CaCl}_2$	0.082		
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.01		
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	0.01		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.01		
$\text{NaMoO}_4$	0.01		

Taula 2.2.2: Composició de les solucions de micronutrients i macronutrients.

## DETERMINACIÓ DE LA DQO (DEMANDA QUÍMICA D'OXÍGEN)

Es segueix el micromètode indicat al Standard Methods (APHA 1985).

A partir de la recta patró:

$$\text{DQO (mg/l)} = - 47.298 + 3310.623 * \text{Abs}_{660}$$

es calculen les concentracions de DQO en mg/l. S'utilitza un espectrofotòmetre UV/Visible Cary3 de Varian.

Els valors de reducció de DQO al llarg del treball es refereixen a la DQO de la mostra restant-li la DQO corresponent al contingut en glucosa.

### DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT EN GLUCOSA

La glucosa fou mesurada amb un analitzador de glucosa i lactat model 2700 de YSI. La mostra es filtra prèviament a través d'una membrana de 0.45 µm de Millipore.

### DETERMINACIÓ DEL COLOR

El color de la mostra es mesura per absorbància a 440 nm en una cubeta de vidre d'1 cm de pas de llum en un espectrofotòmetre UV/Visible Cary3 de Varian. La mostra, prèviament filtrada (filtre Whatman GF/C), es dilueix 21 vegades amb tampó tetraborat sòdic (0.02M, pH=9.2) i es llegeix l'absorbància a 440 nm (Eaton i col. 1980).

### DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT EN COMPOSTOS AROMÀTICS

El contingut en compostos aromàtics de la mostra es mesura per absorbància a l'UV (280 nm) en una cubeta de quars d'1 cm de pas de llum en un espectrofotòmetre UV/Visible Cary3 de Varian. La mostra, prèviament filtrada (filtre Whatman GF/C), es dilueix 66.7 vegades amb tampó tetraborat sòdic (0.02M, pH=9.2) i es llegeix l'absorbància a 280 nm (Field 1991).

Tant el càlcul de la reducció del contingut en compostos aromàtics, com el de la reducció de color es realitzen de la següent forma:

$$\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \quad \text{on:} \quad \begin{array}{l} M_i: \text{mesura inicial} \\ M_f: \text{mesura final} \end{array}$$

### DISTRIBUCIÓ DE TAMANYS MOLECULARS

La distribució de grandàries moleculars s'ha seguit per cromatografia de gel filtració, amb un FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) de Pharmacia LKB, equipat amb el programari FPLC director, amb un detector UV a 280 nm. Les columnes utilitzades han estat una columna Superdex 75 HR 10/30 (G75) que diferencia pesos moleculars entre 3 i 75 kDa, i una Superdex 30 HR 10/30 (G30) que diferencia pesos moleculars de fins a 10 kDa.

S'injecten 50 µl de mostra (filtrada prèviament amb una membrana Millipore de 0.2 µm) i s'elueixen a un cabal de 0.7 ml/min amb una solució de formamida al 20% a pH=9 (Brown i col. 1967).

---

## DETERMINACIÓ DE LA TOXICITAT

Aquest assaig es basa en la pèrdua d'intensitat lluminosa d'un bacteri bioluminiscent (*Photobacterium phosphoreum*) deguda a l'efecte inhibidor de la mostra. El valor  $EC_{50}$  (t,T) correspon a la concentració efectiva de la mostra que causa un 50% de disminució en la lluminositat sota unes condicions determinades de temps i temperatura. En el cas d'aquest treball el temps d'assaig són 5 minuts i la temperatura 15°C.

Reactius:

- *Photobacterium phosphoreum* liofilitzat, que es conserva a -20°C i es resuspèn en el moment de fer l'assaig.
- Solució osmòtica MOAS (NaCl 22%).
- Solució de diluent (NaCl 2%).
- Solució de reconstitució.

Segons la definició de toxicitat anterior, com més elevat sigui el valor calculat de  $EC_{50}$  menys tòxica serà la mostra. Al llarg del treball el càlcul de la reducció de la de la toxicitat es fa de la següent forma:

$$\% = \frac{Mf - Mi}{Mi} \quad \text{on:} \quad \begin{array}{l} Mi: \text{mesura inicial} \\ Mf: \text{mesura final} \end{array}$$

Al realitzar el protocol per dur a terme el test de toxicitat, es parteix d'una mostra inicial amb una concentració màxima del 45%, ja que cal condicionar la mostra inicial a les condicions ambientals del *Photobacterium phosphoreum*, afegint una solució de NaCl. Per aquest motiu, seguint aquest protocol, no es poden calcular valors de toxicitat superiors al 45% (a no ser que es fes per extrapolació).

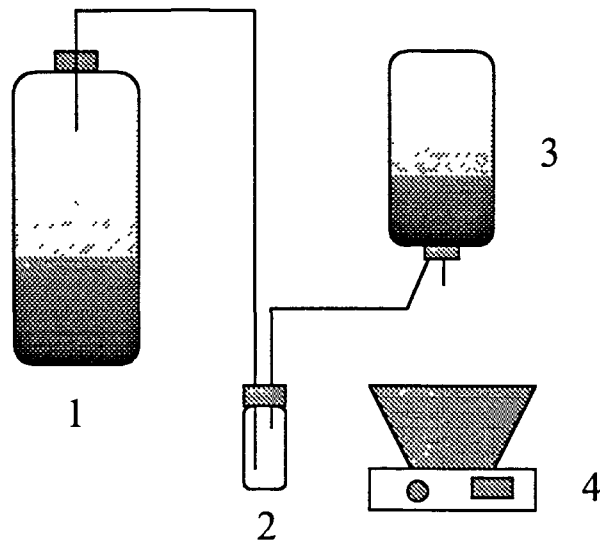
## ASSAIG DE BIODEGRADABILITA ANAEROBIA

La determinació de la fracció biodegradable anaerobicament es realitza en flascons de 250 ml amb una concentració de 8.75 g SSV/l, a una temperatura de 35 °C. La mostra a analitzar s'enriqueix amb 1 ml/l d'una solució de nutrients (taula 2.2.3).

Producte	Concentració	Producte	Concentració
NH <sub>4</sub> Cl	170 g/l	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	37 g/l	MgSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9 g/l
FeCl <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2 g/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.09 g/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2 g/l	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1 g/l
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5 g/l	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05 g/l
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.03 g/l	EDTA	1 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	0.05 g/l	HCl 36%	1 ml/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05 g/l	Resazurin	0.5 g/l

Taula 2.2.3: Composició de la solució de nutrients utilitzada en els assaigs de biodegradabilitat anaeròbia

El biogas produït és fa bombollegar en una solució de NaOH, de manera que s'elimina el CO<sub>2</sub>. Es considerarà que la resta de biogas que no s'elimina correspon a metà. Aquest es mesura finalment per desplaçament de la solució de NaOH. El metà produït es converteix a DQO d'acord amb els factors de conversió obtinguts de Field i col. 1988.



*Figura 2.2.2: Muntatge experimental per a l'assaig de biodegradabilitat anaeròbia.*

En la figura 2.2.2 es mostra el muntatge utilitzat per a realitzar aquest assaig. El reactor (1) conté la mostra i l'inòcul, el biogas produït es fa bombollegar en una ampolla invertida (3) amb NaOH 1.5%. La sosa desplaçada es recull i es mesura per pes (4), a partir de la densitat del líquid es calcula el volum de metà produït. S'utilitza un flascó (2) entre el reactor i la botella de sosa per evitar retorns de sosa cap al reactor.

## DETERMINACIÓ DE LA BIOMASSA

Es filtra la mostra amb filtres de fibra de vidre Whatman GF/C prèviament assecats a 85°C i tarats. Els filtres que contenen la mostra filtrada es deixen a l'estufa a 85°C fins a pes constant.

## DETERMINACIÓ DE LES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

### Activitat lacasa

L'activitat lacasa s'ha obtingut per oxidació del 2,6-dimetoxifenol (DMP). El mètode utilitzat és una modificació del mètode proposat per Paszczyński (Paszczyński i col. 1988) per a la determinació de la manganès peroxidasa.

La mescla de reacció estava composta per: 200 µl de malonat sòdic 250 mM a pH 4.5, 50 µl de DMP 20 mM i fins a 500 µl de mostra, en un volum total de 750 µl. Es seguia

l'evolució de l'absorbància a 468 nm a 30 °C durant 2 minuts en un espectrofotòmetre UV/Visible Cary3 de Varian. Basant-se en el coeficient d'extinció molar de 10000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> pel DMP, una unitat d'activitat (UA) es definia com la quantitat de micromols de DMP oxidats per litre i per minut (µmols/l·min)

### Activitat manganès peroxidasa

L'activitat manganès peroxidasa es mesurà seguint dues metodologies:

- Segons el mètode proposat per Paszczynski (Paszczynski i col. 1988), basat en la oxidació del DMP per l'enzim manganès peroxidasa (MnP), en presència de Mn<sup>2+</sup> i aigua oxigenada. Tenint en compte que ens trobem en un medi complex i que no tenim l'enzim purificat, cal restar al valor obtingut de l'activitat MnP els de les activitats que poden interferir, com són la lacasa o altres peroxidases no dependents de Mn. Els medi de reacció conté: 200 µl de malonat sòdic 250 mM a pH 4.5, 50 µl de DMP 20 mM, 50 µl de MnSO<sub>4</sub> 20 mM, 100 µl d'aigua oxigenada 4 mM i fins a 500 µl de mostra en un volum total de 1000 µl. Per mesurar l'efecte de les peroxidases es repeteix l'assaig, substituint el MnSO<sub>4</sub> per 100 µl de EDTA 10 mM. L'efecte de les fenoloxidases es mesura realitzant l'assaig dos cops més, un sense aigua oxigenada i l'altre sense aigua oxigenada ni Mn (activitat lacasa).

Així el valor final de l'activitat MnP s'obté segons:

$$(Activitat\ amb\ Mn\ i\ H_2O_2 - Activitat\ Mn) - (Activitat\ H_2O_2 - Activitat\ lacasa)$$

- Segons el mètode proposat per Castillo (Castillo i col. 1993), basat en l'acoblament oxidatiu del hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) amb l'àcid 3-dimetilamino benzoic (DMAB). La reacció del MBTH amb el DMAB en presència de peroxidases i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dona un color porpra que absorbeix a 590 nm. La mescla de reacció conté 0.07 mM de MBTH, 0.99 mM de DMAB, 0.3 mM de MnSO<sub>4</sub>, 0.05 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 100 mM de tampó làctic-succínic a pH 4.5. El volum de reacció era d'1 ml amb 0.5 ml de mostra. La reacció d'acoblament tant pot ser duta a terme per la MnP com per altres peroxidases. És necessari doncs, realitzar una assaig amb EDTA (concentració final 2.5 mM) per determinar el contingut en peroxidases no dependents de Mn.

### OBTENCIÓ DE LA SUSPENSIO DE MICELI

La suspensió de miceli s'obté per inoculació de quatre cubs d'agar d'un cm de costat, extrets de la zona de creixement del fong d'una placa de Petri, en 150 ml de medi d'extracte de malta al 2% en un Erlenmeyer de 500 ml, a 23°C i agitació orbital (135 rpm, r=25 mm).

Després de 4 o 5 dies s'ha format una densa capa de miceli, que es separa del medi i es tritura. A la suspensió resultant s'afegeix igual volum de NaCl 0.8% estèril i es guarda a 4°C.

## OBTENCIÓ DE LA SUSPENSÍO DE PELLETS

Els *pellets* s'obtingueren a partir de la suspensió de miceli, afegint 1 ml d'aquesta suspensió a un Erlenmeyer de 500 ml amb 150 ml de medi extracte de malta 20 g/l. El cultiu es manté durant 5-6 dies a 23°C i amb agitació orbital (135 rpm, r=25 mm), obtenint-se una suspensió de *pellets* de 4-6 mm, que es guarda a 4°C amb solució de NaCl 0.8% estèril.

Es determinà que la relació pes sec/pes humit pels *pellets* de *Trametes versicolor* era de 0.021 g pes sec/g pes humit.

## IMMOBILITZACIÓ

La immobilització de *Trametes versicolor* es va dur a terme amb tres suports diferents: alginat sòdic, escuma de poliuretà i niló (Scoch Brite, 3M).

La immobilització amb alginat es realitzà de la següent forma: es prepararen 100 ml d'alginat sòdic 10/60 al 3%, afegint lentament l'alginat sobre l'aigua amb agitació. Un cop dissolt l'alginat s'esterilitzà la solució durant dos minuts a 120°C. Un cop refredada la solució s'afegiren 100 ml de solució de miceli i amb agitació, s'afegí gota a gota la solució sobre una solució de clorur càlcic 50 mM també en agitació. Seguidament es deixaren les partícules esfèriques amb la solució de clorur càlcic durant 1 o 2 hores a la nevera.

En el cas del niló i l'escuma de poliuretà, el suport s'utilitzava en forma de cubs d'1 cm d'aresta. Inicialment els cubs es tallaven i rentaven amb aigua. A continuació s'esterilitzaven a 120°C durant 20 min per eliminar components no polimeritzats i colorants. Un cop esterilitzats es rentaven de nou amb aigua destil·lada i es preparava el medi d'immobilització. Aquest medi contenia els mateixos components i en les mateixes proporcions que el medi utilitzat per fer els tractaments amb una concentració de glucosa de 5 g/l, excepte que en lloc de lleixiu negre s'utilitzava aigua destil·lada. La immobilització es duia a terme en Erlenmeyer d'1 l, cada un contenia uns 100 cubs en 500 ml de medi. Per inocular s'utilitzaven 3 ml de suspensió de miceli. Els Erlenmeyer, un cop inoculats, es mantenien en agitació durant 4 dies a 23°C.

A partir de les dades obtingudes per Jeffries (Jeffries i col 1981) per *Phanerochaete chrysosporium* (0.45 g biomassa/g carbohidrat) es pot estimar que s'immobilitzen 0.005 g de biomassa (pes sec)/cub.

## REACTORS UTILITZATS

Al llarg del treball s'han utilitzat diferents tipus de reactors, a continuació s'en fa una breu descripció:

*Air-lift* (Braun Biotech): S'utilitzà un reactor tipus *air-lift* que, constava d'un vas termostatitzat de 2 l i disposava de mesuradors i controladors de pH i oxigen dissolt.

---

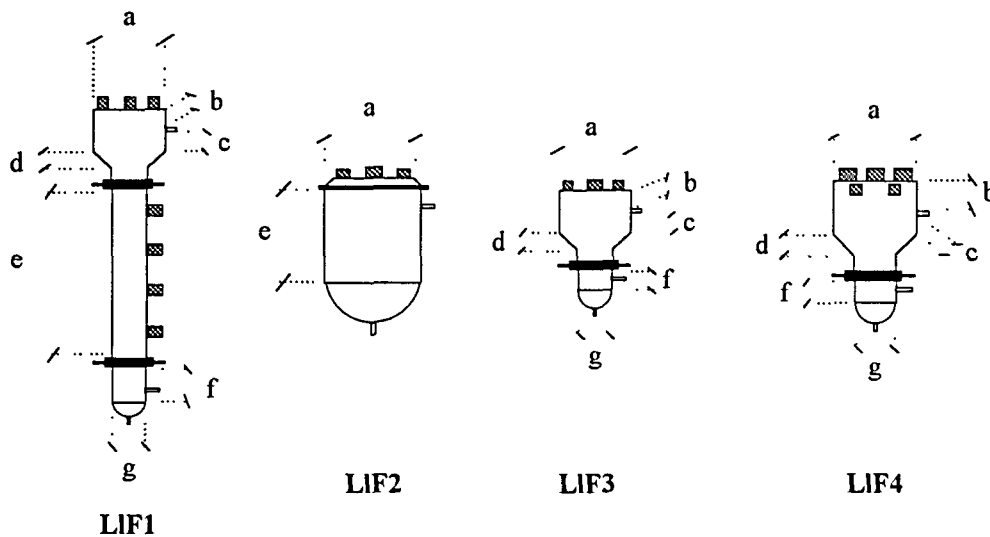


**Biostat Q (Braun Biotech):** Bioreactor múltiple, amb 4 vasos de 330 ml de volum útil. Permet el mesura de pH i oxigen, control del pH, de les revolucions de l'agitador magnètic i de la temperatura del vas. El disseny del sistema permet treballar amb cada un dels bioreactors per separat, podent-se ajustar cada una de les variables de forma independent.

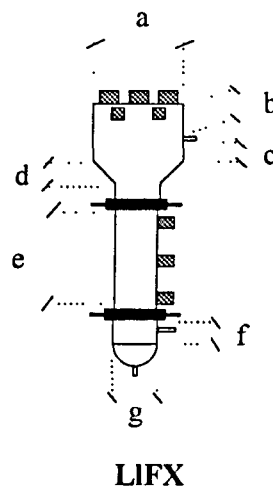
**Biostat L (Braun Biotech):** Bioreactor amb un vas de 1500 ml de volum útil, que incorpora mesura d'oxigen i mesura i control de pH. Permet la regulació de l'agitació i de la temperatura del vas amb una camisa d'aigua.

**Llits fluïditzats (LIF1, LIF2, LIF3, LIF4):** S'ha utilitzat tres dissenys diferents de llit fluïditzats, les característiques de cada un d'ells i el nom amb el que s'en farà referència en el text es mostren en la taula 2.2.4 i en la figura 2.2.3.

**Llit fix (LIFX):** Els experiments realitzats amb el fong immobilitzat es realitzaren amb un reactor tipus llit fix, les característiques del qual es mostren en la taula 2.2.4 i en la figura 2.2.3.



*Figura 2.2.3: Característiques dels reactors de llit fluïditzat i llit fix utilitzats.*



	LIF1	LIF2	LIF3	LIF4	LIFX
a	10	10	10	10.5	10.5
b	1.5	-	1.5	4	4
c	2.5	-	3	2.5	2.5
d	5	-	3	4	4
e	50	23	3	-	15
f	7	-	5	4	4
g	2.8	-	5	5	5
Vol.	500	720	450	500	450

Taula 2.2.4: Característiques dels reactors de llit fluiditzat i llit fix utilitzats. El volum fa referència al volum útil.

### ③ ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS DE TRACTAMENT

En iniciar el treball es coneixien poques coses sobre les condicions de creixement de *Trametes versicolor*. Per això es varen iniciar els experiments amb treballs amb Erlenmeyer. Primer es va començar per trobar les condicions per obtenir *pellets*, ja que es va considerar que el creixement del fong en forma de miceli dificultaria els treballs amb reactors. Les condicions d'obtenció dels *pellets* ja han quedat exposades a l'apartat de *Materials i Mètodes*. Amb els *pellets*, a més s'obté una forma d'inòcul que permet mesurar la biomassa inicial utilitzada com a inòcul, i comprovar al final d'un experiment si hi ha hagut o no creixement.

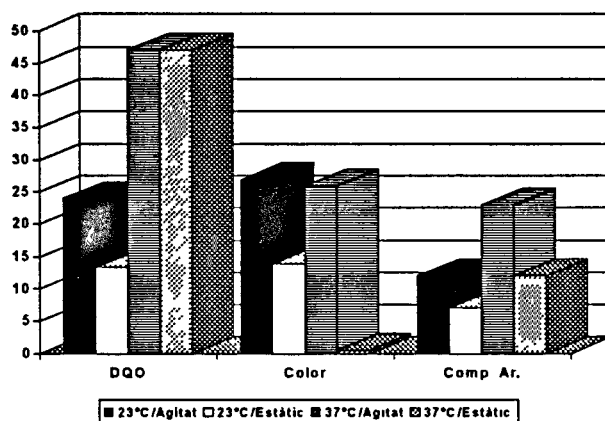
Els següents experiments es realitzaren amb Erlenmeyer de 500 ml amb 50 ml de medi i 1.7 g/l d'inòcul (pes sec). Es realitzaren en una cambra termostatitzada a 23°C o 37°C amb agitació orbital quan era necessària

#### TEMPERATURA/AGITACIÓ

Un cop obtinguts els *pellets*, es passà a estudiar els efectes que tenia sobre la reducció de la DQO, el color i els compostos aromàtics, la temperatura i l'agitació. Es varen provar dues temperatures, 23°C i 37°C (les més habituals de la bibliografia) i cultius amb i sense agitació. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 2.3.1 Els experiment es varen realitzar en Erlenmeyer de 500 ml amb 50 ml de medi i una concentració de glucosa de 2.5 g/l. Pels experiment realitzats amb agitació s'utilitzava un agitador orbital (r=25 mm) a 135 rpm.

Els resultats (figura 2.3.1) mostren diferent comportament pels tres paràmetres avaluats. El millor comportament s'obté a 37°C i amb agitació, sobretot pel que fa a reducció de la DQO, seguit de 23°C amb agitació amb una bona reducció de color. Sembla clar doncs que l'agitació intervé de forma positiva en la reducció dels paràmetres estudiats. Pel que fa a la temperatura, el fet de treballar a 37°C comporta una sèrie de desavantatges, com són el fet de haver d'escalfar el cultiu bastants graus per sobre de la temperatura ambient, a més d'un important augment en la evaporació del medi, sobretot quan es treballi amb reactors amb agitació i aeració. Aquests fets i els resultats obtinguts de la bibliografia en els que es treballa

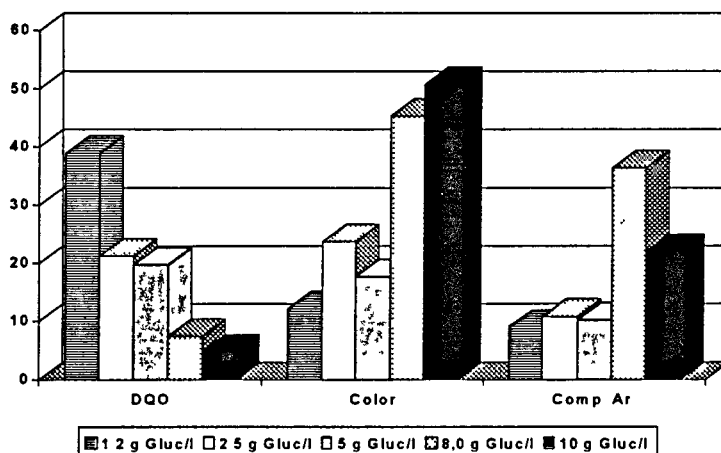
amb aquest fong a temperatures pròximes als 25°C (Archibald i col. 1990, Bergbauer i col. 1991) fan optar per les condicions de temperatura a 23°C i cultius amb agitació.



*Figura 2.3.1: Reduccions de DQO, color i compostos aromàtics a diferents condicions de temperatura i agitació*

### CONCENTRACIÓ INICIAL DE GLUCOSA

Un cop trobades les condicions de temperatura i agitació, es va procedir a determinar l'efecte de la concentració inicial de glucosa. Es varen assajar 5 condicions diferents: 1.2, 2.5, 5, 8 i 10 g/l. Els experiments es van realitzar en Erlenmeyer de 500 ml amb 50 ml de medi, a 23°C amb agitació orbital ( $r=25$  mm) a 135 rpm. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 2.3.2.



*Figura 2.3.2: Reduccions de DQO, color i compostos aromàtics obtingudes per diferents concentracions de glucosa*

Pot observar-se com, l'augment en les reduccions de color i compostos aromàtics, és prou significatiu, quan es passa de 5 a 8 g/l de glucosa inicial. Contràriament les reduccions en la DQO són menors en augmentar la concentració de glucosa inicial.

Com que el tractament amb fongs es planteja com una etapa anterior a un tractament de reducció de DQO, es considera més important reduir el color o el contingut en compostos aromàtics, que la DQO. Així, comparant els diferents resultats obtinguts, es conclou que la millor concentració inicial de glucosa és la de 8 g/l

## EXPERIMENT AMB EL BIOSTAT Q

Un cop determinades les condicions amb Erlenmeyer, es decidí realitzar experiments amb bioreactors. Inicialment s'escullí el Biostat Q, sistema de reactors (tanc agitat) que permet treballar amb 4 bioreactors al mateix temps, operant independentment sobre cada un d'ells. Amb aquest sistema es varen assajar diferents condicions del medi, com són:

1. Reactor sense *pellets*, aerant amb oxigen: Aquest experiment es va realitzar per comprovar els efectes d'una aeració prolongada amb oxigen sobre els lleixius negres sense inocular, amb una agitació de 200 rpm.
2. Reactor amb *pellets* aerant amb oxigen i una agitació de 200 rpm.
3. Reactor amb *pellets* aeració amb aire a 200 rpm d'agitació.
4. Reactor amb *pellets* de la nevera amb 200 rpm d'agitació: Quan es va trobar la forma de produir *pellets*, i poder-los guardar a 4°C fins al moment d'utilitzar-los, es decidí comprovar que el fet de mantenir-los a 4°C no variava les seves propietats.
5. Reactor amb *pellets*, aire, alcohol veratrílic i 200 rpm d'agitació: Amb aquest experiment es volia comprovar els efectes que l'alcohol veratrílic tenia sobre el sistema ligninolític de *Trametes versicolor*.
6. Reactor amb *pellets*, aire a 100 rpm: Amb aquest experiment i el següent, es volia determinar el efectes de l'agitació sobre la degradació dels lleixius negres.
7. Reactor amb *pellets*, aire a 500 rpm.

En la taula 2.3.1 es resumeixen els resultats dels experiments anteriors.

### Efecte de l'aeració per oxigen o aire

Primerament es pot observar un clar efecte de reducció de tots els paràmetres avaluats pel sol fet d'aerar amb oxigen. Comparant els dos experiments inoculats es pot observar que les reduccions finals són similars tant si s'utilitza aire com oxigen, obtenint-se una reducció al voltant del 60-70% pel color, un 40% de reducció de compostos aromàtics i un 35-40% de reducció de la DQO. En canvi en la reducció de toxicitat hi ha un clar efecte beneficiós de l'oxigen, obtenint-se una reducció de 5 front a 1.1 de l'experiment realitzat amb aire.

---

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Variables</b>	O <sub>2</sub> sense inocular	O <sub>2</sub>	Aire	Aire pellets nevera	Aire VOH	Aire	Aire
Agitació	200	200	200	200	200	100	500
Inòcul g/l (per sec)	0	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Glucosa (g/l)	0	8	8	8	8	8	8
Red. Color (%)	32	61	70	55	10	-7	28
Red. Aromàtics (%)	37	32	44	42	-12	-34.5	2
Red. DQO (%)	-	42	34	27	-	-	-
Red. BC <sub>50</sub>	1.8	5	1.1	1.1	0.4	1.6	2.2

Taula 2.3.1: Reduccions dels paràmetres més significatius obtingudes en els diferents experiments amb el Biostat Q.

L'oxigen té també un efecte activador, consumint-se més ràpidament la glucosa i detectant-se abans l'activitat lacasa (figura 2.3.3), en el cas en el que s'utilitza oxigen que quan s'utilitza aire, tot i que al final, la producció més elevada de lacasa s'obté al utilitzar aire.

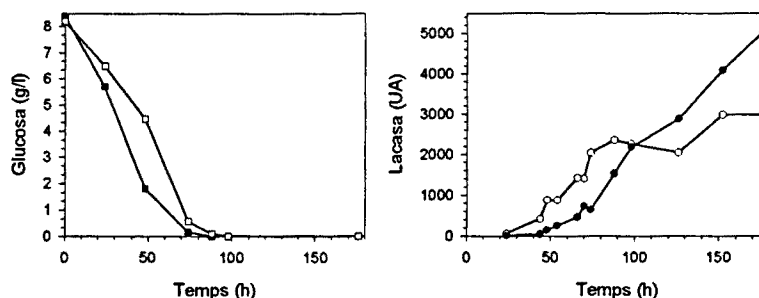
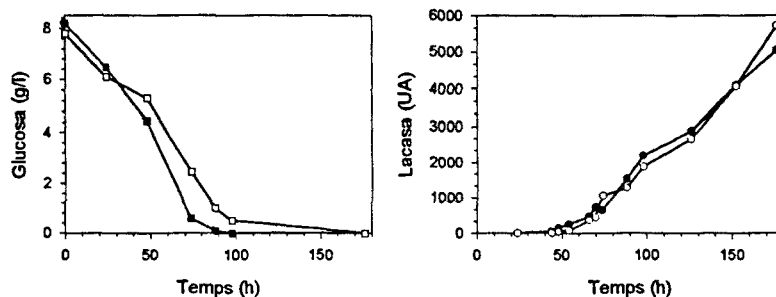


Figura 2.3.3: Evolució del consum de glucosa i de la producció de lacasa per l'experiment realitzat amb oxigen (símbols blancs) i l'experiment amb aire (símbols negres).

### Efecte de la conservació de l'inòcul

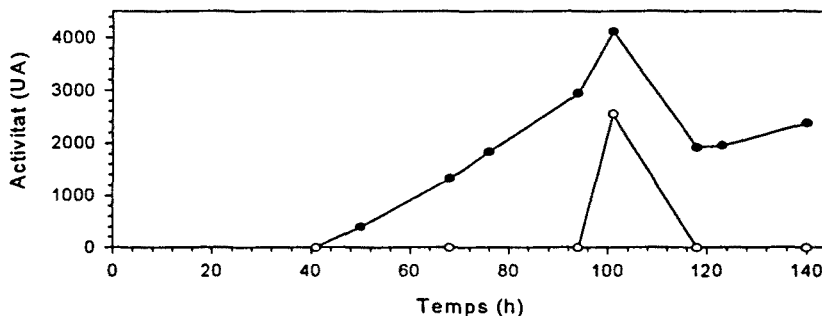
Un cop es va trobar la manera de produir el *pellets*, es va pensar en produir-los en quantitats elevada, i guardar-los a la nevera (4°C). Per comprovar si hi havia algun efecte negatiu, es va realitzar un experiment amb *pellets* que havien estat guardats a 4°C durant 1 mes. Els resultats mostren reduccions semblants per la toxicitat (1.1) i el contingut de compostos aromàtics (44 i 42%), i lleugerament inferiors per les reduccions de DQO (34 i 27%) i color (70 i 55%). La quantitat de lacasa obtinguda és similar en ambdós casos i el consum de glucosa és una mica més lent en el cas dels *pellets* conservats a 4°C (figura 2.3.4).



**Figura 2.3.4:** Evolució del consum de glucosa i de la producció de lacasa per l'experiment realitzat amb pellets normals (símbols blancs) i l'experiment amb pellets conservats a 4°C (símbols negres).

**Efecte de l'alcohol veratrílic**

S'estudià també l'efecte del l'alcohol veratrílic, per comprovar si actuava com un activador del sistema ligninolític del fong. Els resultats mostren que quan s'utilitza alcohol veratrílic, a la concentració assajada (2 mM), les reduccions obtingudes en tots els paràmetres avaluats són bastant més baixes que les obtingudes sota les mateixes condicions però sense alcohol veratrílic (taula 2.3.1). Tot i això, en l'experiment amb alcohol veratrílic es va detectar un pic de MnP (test Paszczyński) (figura 2.3.5).



**Figura 2.3.5:** Evolució de l'activitat lacasa (●) i MnP(O) en presència d'alcohol veratrílic 2 mM.

**Efecte de l'agitació**

Es varen estudiar tres velocitats d'agitació: 100, 200 i 500 rpm (taula 2.3.1). Els resultats obtinguts indiquen que, en termes generals, les agitacions elevades (500 rpm) no són beneficioses per la reducció dels paràmetres avaluats. Igualment amb una agitació baixa (100 rpm) tampoc es milloren els resultats obtinguts a 200 rpm (agitació intermèdia). Aquest últim fet és comparable als resultats obtinguts amb Erlenmeyer (figura 2.3.1), on s'observava que l'agitació afavoria les reduccions de color i compostos aromàtics.

**Conclusions**

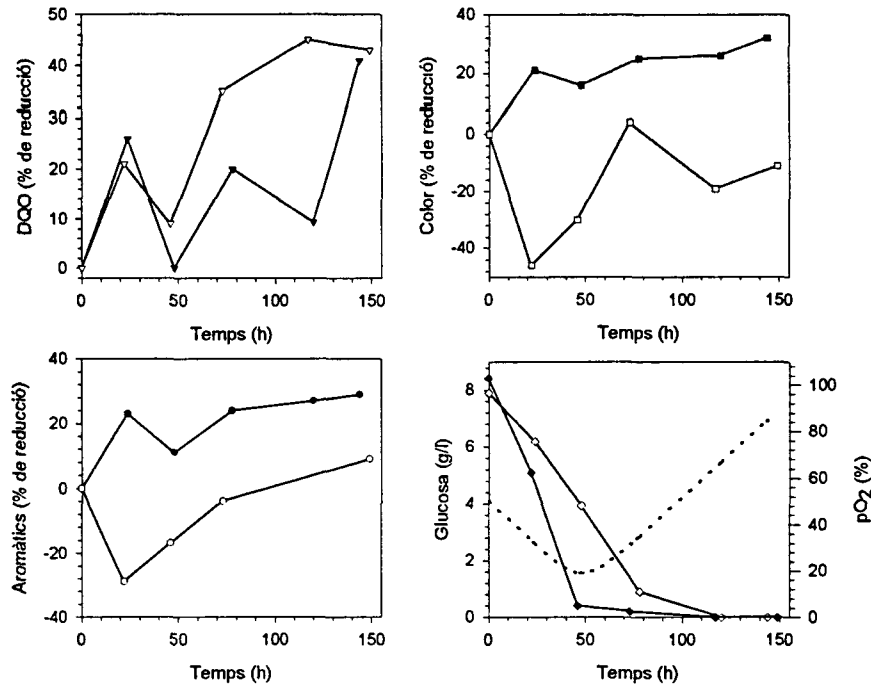
Dels resultats obtinguts en els experiments anteriors s'en varen poden extreure les següents conclusions:

- L'oxigen té un efecte positiu sobre la reducció de la toxicitat al comparar-lo amb l'aire. Pel que fa a les reduccions de color, compostos aromàtics i DQO les reduccions són similars. Es decidí fer nous assaigs per determinar si aerar amb oxigen era més beneficiós que aerar amb aire.
- L'emmagatzemen del *pellets* a la nevera no afecta de forma negativa a les reduccions obtingudes. Es decidí realitzar els següents experiments utilitzant *pellets* conservats a 4°C.
- L'addició d'alcohol veratrílic durant el tractament, sembla que estimula la producció de MnP, però no es reflexa amb un augment de les reduccions. En principi es decidí no afegir-lo al medi.
- Pel que fa a l'agitació els millors resultats s'obtenen amb una agitació de 200 rpm (agitació moderada) mentre que a 100 rpm (agitació baixa) i a 500 rpm (agitació elevada) s'obtenen reduccions menors. Es decidí passar a treballar amb reactors de tipus fluiditzat, amb la finalitat de poder seguir treballant amb *pellets* amb cultius agitats sense els inconvenients d'una agitació mecànica.

#### ④ EXPERIMENTS AMB AIR-LIFT

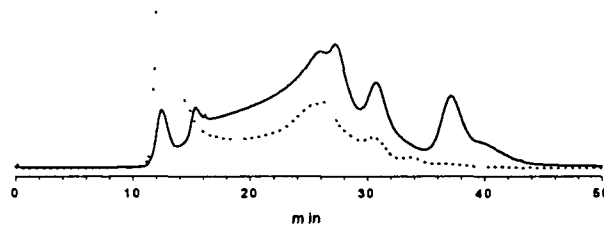
Un cop determinades les condicions de treball amb el fong en forma de *pellets*, es passà a realitzar diferents experiments amb reactors de tipus llit fluiditzat per aire. Inicialment es realitzaren experiments amb un *air-lift* de Braun Biotech, amb un volum 2 l i possibilitat de control de pH,  $pO_2$  i temperatura del reactor. El reactor s'inoculà amb una concentració de *pellets* de 1.7 g/l (pes sec).

Amb aquest reactor es van realitzar dos experiments: en un cas s'utilitzà aire i en l'altre aire i oxigen per a l'aeració. Mentre que en l'experiment amb aire no es va prefixar el  $pO_2$  mínim, en el cas de l'aire i l'oxigen es va prefixar en un 90%, fixant el cabal d'aire (1 ml/min) i deixant variable el d'oxigen per tal de mantenir el 90% de  $pO_2$ . Els resultats obtinguts en cada un dels experiments (figura 2.4.1) mostren millors reduccions quan s'utilitza aire tant en el contingut en compostos aromàtics com en la reducció del color i similars pel que fa a la DQO.



*Figura 2.4.1: Evolució de la DQO el color i els compostos aromàtics pels experiments realitzats amb l'air lift. Amb símbols negres l'experiment amb aire i amb símbols blancs l'experiment amb aire/oxigen (□). Amb línia discontinua es presenta l'evolució de l'oxigen dissolt per l'experiment amb aire.*

En el cromatograma de gel filtració de l'experiment amb aire i oxigen, obtingut amb la columna G75 es pot apreciar una polimerització cap a compostos de pes molecular elevat (figura 2.4.2) amb una reducció de l'àrea del cromatograma del 28%.



*Figura 2.4.2: Distribució de grandàries moleculars per l'experiment realitzat amb aire i oxigen. Mostra inicial (—) i mostra final (- - -)*

Els resultats obtinguts són prou bons, i mostren un bon comportament del fong en reactors de tipus fluïditzat. Aquest reactor però, presenta diversos inconvenients:



- Es disposa d'un equip amb un volum de treball massa elevat.
- Sembla en principi un reactor força sofisticat per al tractament d'aigües.
- Es forma escuma.

Es decidí realitzar els següents experiments amb reactors de volum menor i de tipus llit fluïditzat. La fluïdització es realitzaria per aire, ja que les reduccions obtingudes amb el reactor *air lift* amb oxigen són o bé força semblants o pitjors que amb aire.

## 5 EXPERIMENTS AMB LLIT FLUÏDITZAT

Es varen utilitzar diferents models de llit fluïditzat anomenats LIF1, LIF2, LIF3 i LIF4, les característiques dels quals queden exposades en l'apartat de *Materials i Mètodes*.

### LLIT FLUÏDITZAT LIF1

El primer experiment es realitzà amb el LIF1. L'experiment es va dur a terme a un pH inicial de 4.5 unitats i un inòcul de 1.68 g pes sec/l, a 23°C i no es disposava de mesura ni control de pH i pO<sub>2</sub>.

Des del començament es varen presentar problemes fluido-dinàmics al intentar mantenir el *pellets* en fluïdització. Com que un augment del d'aire cabal comportava la formació de més escuma, es recirculà el medi per intentar millorar la fluïdització, però tampoc així s'aconseguien bons resultats.

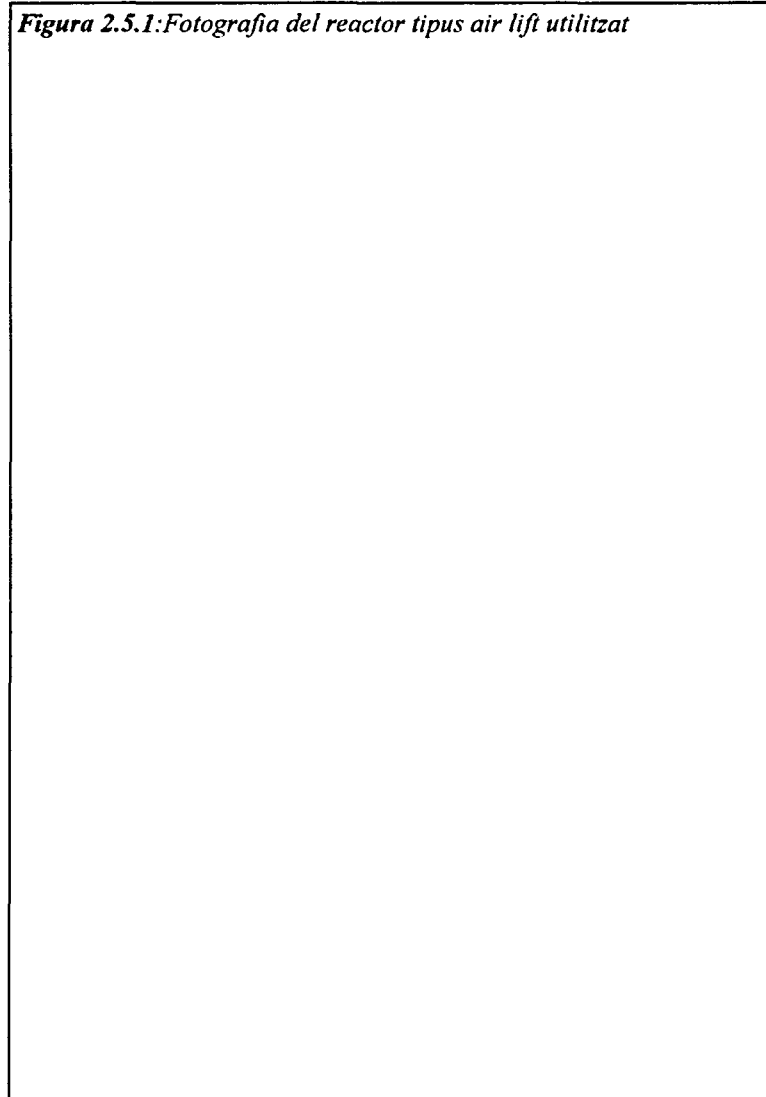
Dia	Glucosa (g/l)	Red. DQO (%)	Red. Color (%)	Red. Comp. Ar. (%)
1	8.82	-	-	
2	6.61	-63	8	13
3	5.07	-88	17	9
4	2.60	-93	10	10
5	0.07	-98	13	19
8	0.02	-97	-4	-7

Taula 2.5.1: Reduccions dels paràmetres avaluats amb el LIF1

Observant els resultats (taula 2.5.1) veiem que el consum de glucosa és molt més lent que en els experiments realitzats amb el Biostat Q, en el qual el fong consumia 8 g/l de glucosa en 3-4 dies, mentre que amb l'*air lift* es va tenir el mateix consum de glucosa amb 5 dies. Aquest fet podria ser degut a que la fluïdització no era prou bona (els *pellets* queden empaquets a la part inferior del reactor) dificultant la transferència de matèria.

En acabar l'experiment s'observà que, encara que tot i el creixement del fong, pràcticament no hi varen haver canvis en els paràmetres estudiats.

*Figura 2.5.1: Fotografia del reactor tipus air lift utilitzat*



## LLIT FLUÏDITZAT LIF2

Per intentar millorar la fluidització dels *pellets*, es va provar un altre reactor de llit fluïditzat (LIF2) amb una relació diàmetre/alçada més gran. L'experiment es va dur a terme a temperatura ambient, sense mesura ni control de pH i  $pO_2$ , la concentració inicial de *pellets* era de 1.7 g pes sec/l. S'utilitza un volum de medi de 1100 ml, quedant el volum restant de reactor per retenir l'escuma que es pugés formar durant el procés.

Inicialment es va formar poca escuma, però els *pellets* continuen sense fluiditzar bé, en aquest cas quedaven acumulats a la part superior del reactor. Per afavorir la fluidització i trencar

---

l'escuma que finalment s'acaba formant, s'introduí un agitador, de forma que la pala quedava submergida únicament 0.5 cm per sota del nivell superior de medi. S'aconseguí una bona agitació del medi i es va evitar la formació d'escuma. Amb els canvis introduïts, però, el reactor ja no es podia considerar un llit fluïditzat, assemblant-se més a un tanc agitat, amb el perill que l'agitació mecànica trenqués els *pellets*..

Dia	Glucosa (g/l)	Red. DQO (%)	Red. Color (%)	Red. Comp. Ar. (%)	pH	Red. EC <sub>50</sub>
1	9.8	-	-	-	4.69	-
2	7.9	-49	14	20	-	-
3	5.6	-47	13	13	-	-
4	0.54	-	-	-	5.1	-
8	0.03	31	4	15	-	2.78

Taula 2.5.2: Reduccions obtingudes amb el LIF2.

En la taula 2.5.2, es poden observar les reduccions obtingudes amb el LIF2. Les reduccions en color i compostos aromàtics, tot i ser molt petites milloren els resultats anteriors obtinguts amb el LIF1. La DQO mostra un augment igual que amb el LIF1.

En els cromatogrames de distribució de grandàries moleculars (figura 2.5.2), es veu un clar augment de les fraccions de pes molecular elevat i una disminució dels pics de pes molecular més baix, cosa que fa pensar en una polimerització dels compostos de pes molecular baix. La reducció de toxicitat és de 2.7.

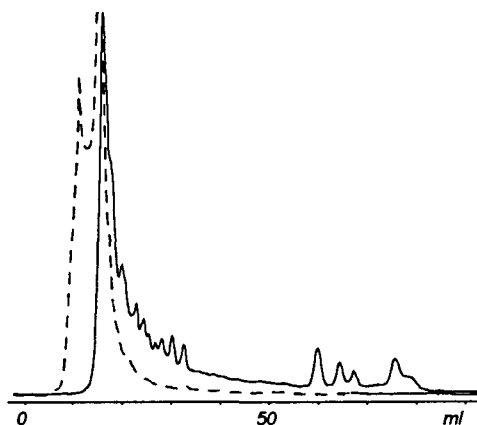
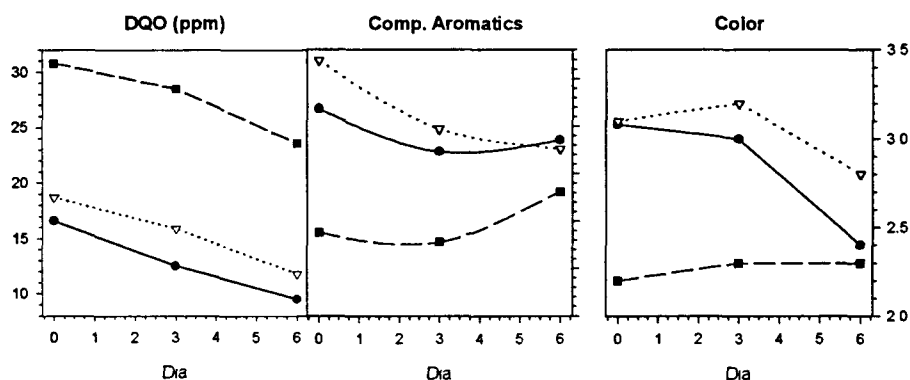


Figura 2.5.2: Cromatogrames inicial (—) i final (- -) obtinguts amb la columna G75)

### LLIT FLUÏDITZAT LIF3

Per millorar aquests experiments es decidí utilitzar el reactor LIF3, amb el qual, en proves preliminars es varen obtenir bons resultats de fluïdització dels *pellets*, tot i que continuaven els problemes amb l'escuma. Els experiments amb el LIF3, es van realitzar en

una cambra termostatitzada a 23°C. És amb aquest reactor amb el que s'inicia la implementació del sistema de monitoratge explicat en el Capítol 3.



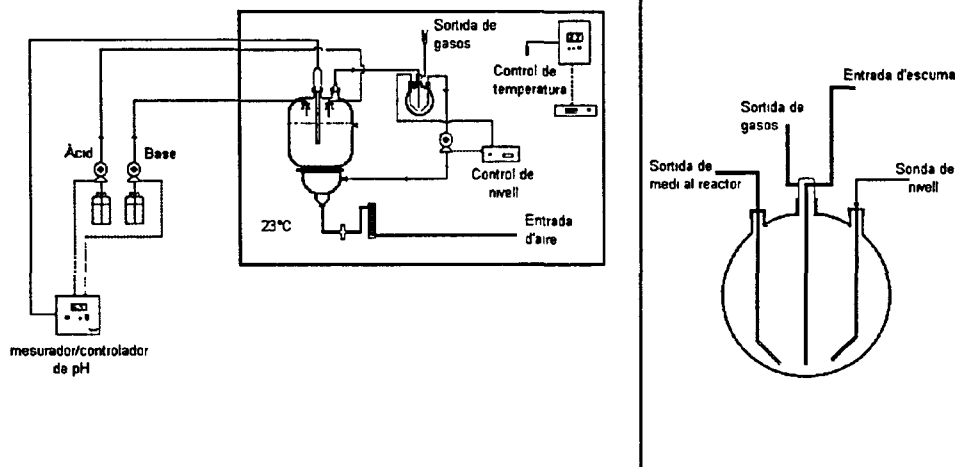
**Figura 2.5.3:** Efecte de l'antiescumant sobre els paràmetres seguits. (■) 7.2 ml/l d'antiescumant, (▽) 0.5 ml/l d'antiescumant i (●) sense antiescumant

### Efecte de l'antiescumant

Vist que seria necessari utilitzar antiescumant per controlar l'escuma produïda principalment durant els dos primers dies d'experiment, es realitzà un experiment per mesurar el possible efecte de l'antiescumant sobre l'acció del fong en els lleixius negres. En aquest experiment es preparen diferents Erlenmeyer inoculats amb fong als que s'afegeix antiescumant en diferents quantitats. Les quantitats d'antiescumant utilitzades corresponen a aproximadament la quantitat afegida en experiments anteriors (7.2 ml/l), la quantitat que s'afegeix en el medi abans de l'esterilització (0.5 ml/l) i a un assaig sense antiescumant. Els resultats obtinguts (figura 2.5.3) mostren tant canvis en els paràmetres inicials del medi com en els resultats finals obtinguts:

- Hi ha augment en la DQO inicial coincidint amb l'augment de la quantitat d'antiescumant.
- Al treballar amb concentracions elevades d'antiescumant apareix un precipitat, fet que provoca una disminució en els valors del color i dels compostos aromàtics inicials.
- En l'experiment amb una concentració més elevada d'antiescumant, les reduccions en el color i els compostos aromàtics són més petites.

Vist que hi havia un efecte de l'antiescumant sobre el medi inicial i que el resultat final de l'experiment també depenia de la quantitat d'antiescumant utilitzada, es decidí realitzar diferents assaigs amb el reactor LIF3 per trobar estratègies d'operació i disseny d'equips suplementaris al reactor que reduïssin la quantitat d'antiescumant a utilitzar.

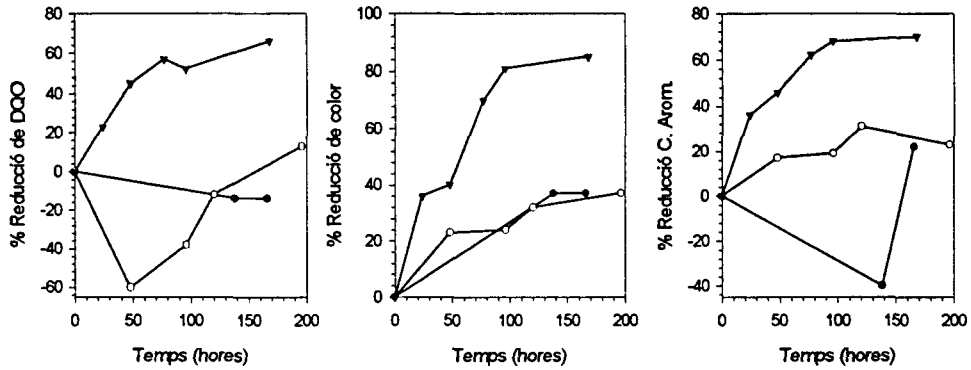


**Figura 2.5.4:** Muntatge experimental destinat a controlar l'escuma produïda durant el tractament dels lleixius negres.

Es realitzà un primer experiment a un cabal d'aire fix (9.7 l/h) afegint antiescumant sempre que fes falta. En un segon experiment es va disminuir la quantitat d'antiescumant afegida controlant (manualment) el cabal d'aeració. Pel tercer experiment es dissenyà un sistema de recollida i retorn de l'escuma al reactor, disminuint considerablement la quantitat d'antiescumant afegit i que permetia treballar a un cabal d'aire fix com en el primer experiment. Tots tres assaigs es realitzen amb una concentració de biomassa inicial en pes sec de 1.7 g/l i amb mesura i control del pH.

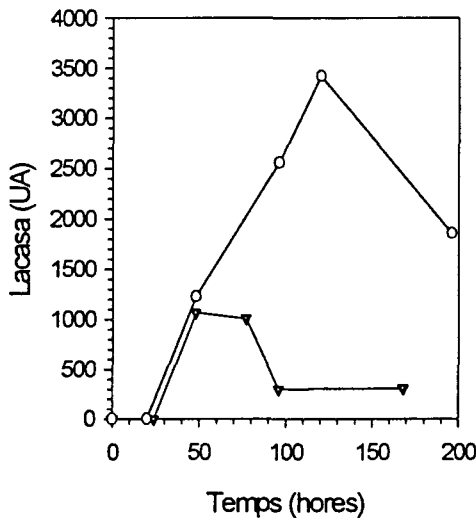
El sistema de recollida d'escuma consisteix en un matrau situat entre la sortida d'aire del reactor i el filtre de sortida de gasos, de manera que l'escuma es liqua en aquest matrau i es retorna al reactor. La presència d'escuma en el vas fa engegar automàticament una bomba per retornar-la al reactor (figura 2.5.4).

En la figura 2.5.5 es poden seguir les tendències per a cada un dels paràmetres avaluat. En el cas de l'experiment en el que es va utilitzar més antiescumant, al ser el primer que es realitzava i degut a les dificultats operacionals, es tenen pocs punts experimentals i tampoc es va poder realitzar el seguiment enzimàtic, tot i això es pot seguir la tendència dels diferents paràmetres. Es pot observar com en augmentar la quantitat d'antiescumant afegida disminueixen les reduccions finals obtingudes, seguint la mateixa tendència observada en els anteriors experiments amb Erlenmeyer (figura 2.5.3).



**Figura 2.5.5:** Evolució de les reduccions de DQO, color i compostos aromàtics pels experiments amb més antiescumant (●), amb una quantitat moderada d'antiescumant (○) i amb una quantitat mínima d'antiescumant (▼).

Pel que fa a la producció d'enzims en cap dels casos es va detectar MnP, si en canvi es va detectar lacasa (figura 2.5.6).



**Figura 2.5.6:** Evolució de la producció de lacasa pels experiment una quantitat moderada d'antiescumant (○) i amb una quantitat mínima d'antiescumant (▼).

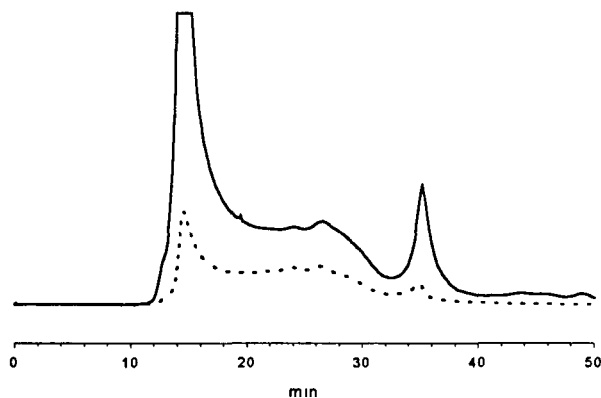
Els resultats obtinguts mostren una major producció de lacasa en l'experiment en el que es va afegir una quantitat moderada d'antiescumant, en el que s'obtenen unes reduccions finals dels paràmetres estudiats (figura 2.5.5) menors a les obtingudes amb l'experiment en el que l'antiescumant era mínim. Sembla doncs, en principi, que no hi hagi una relació entre la producció de lacasa i les reduccions dels paràmetres seguits en aquests experiments realitzats amb diferents quantitats d'antiescumant.

En la fotografia 2.5.7 es mostra la reducció de color obtinguda al final de l'experiment en què es va utilitzar menys antiescumant comparada amb la mostra inicial del mateix experiment. Es pot observar una reducció de color significativa.

**Figura 2.5.7:** Mostra inicial (esquerra) i final (dreta) de l'experiment amb menys antiescumant



Amb els cromatogrames obtinguts per gel filtració amb la G75 (figura 2.5.8), s'aprecia una clara reducció de l'àrea total, que indica una despolimerització de la lignina i un trencament dels anells aromàtics, ja que no es detectà la presència de nous pics a volums d'elució alts.



**Figura 2.5.8:** Cromatogrames de distribució de grandàries moleculars (columna G30) per l'experiment amb menys antiescumant. Mostra inicial amb línia contínua i mostra final amb línia discontinua.

### LLIT FLUÏDITZAT LIF4

Es va dissenyar un nou reactor per millorar el sistema. El LIF4 era de les mateixes característiques que el LIF3, però més ample per augmentar-ne el volum, més alt per tal de poder retenir més escuma i amb més entrades a la part superior per tal de poder utilitzar una sonda de pH amb addició d'acid i base, una sonda d'oxigen, addició d'antiescumant, sortida de gasos i presa de mostra. A més per millorar el seguïment del procés es va implementar un sistema d'adquisició de dades (vegeu Capítol 3).

#### Efecte del creixement previ amb lleixius negres

Per comprovar l'efecte de l'adsorció del color i altres paràmetres en el fong es van realitzar tres experiments en els que abans d'inocular el reactor, el fong es feia créixer durant tres dies en Erlenmeyer amb medi lleixius negres, de manera que el fong s'inoculava teòricament saturat de medi. Amb aquest experiments es pretenia comprovar si la reducció de color i compostos aromàtics era proporcional al creixement de la biomassa.

Condicions	Control			
Glucosa Erlenmeyer (g/l)	8	8	8	-
Biomassa inicial Erlenmeyer (g pes sec)	0.51	0.51	0.51	-
Glucosa reactor (g/l)	8	5	0.5	8
Biomassa final reactor (g pes sec)	3.21	2.60	1.69	2.38

Taula 2.5.3: Característiques dels experiments. El càlcul de la biomassa final en el reactor s'ha calculat a partir del consum de glucosa.

Els tres experiments s'inicien de la mateixa forma: fent créixer inicialment els *pellets* en Erlenmeyer d'1l amb 300 ml de medi amb lleixius negres i 1.7 g/l de biomassa en pes sec, a 23°C amb agitació i una concentració de glucosa de 8 g/l. La biomassa final obtinguda després de 3 dies varia entre 60 i 70 g de *pellets* humits (2.1-2.4 g/l en pes sec). El total del

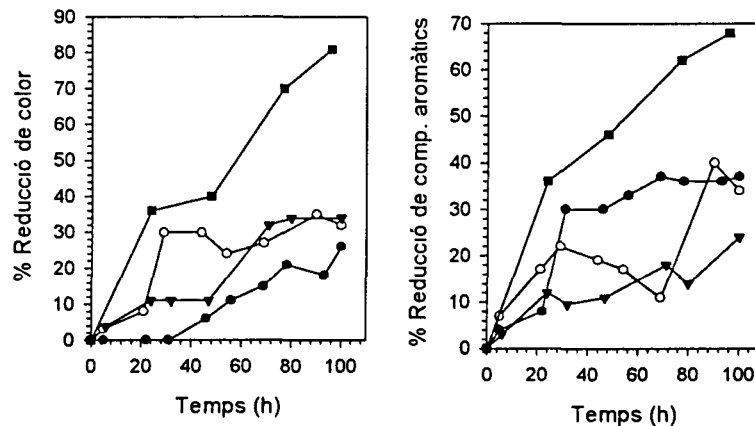
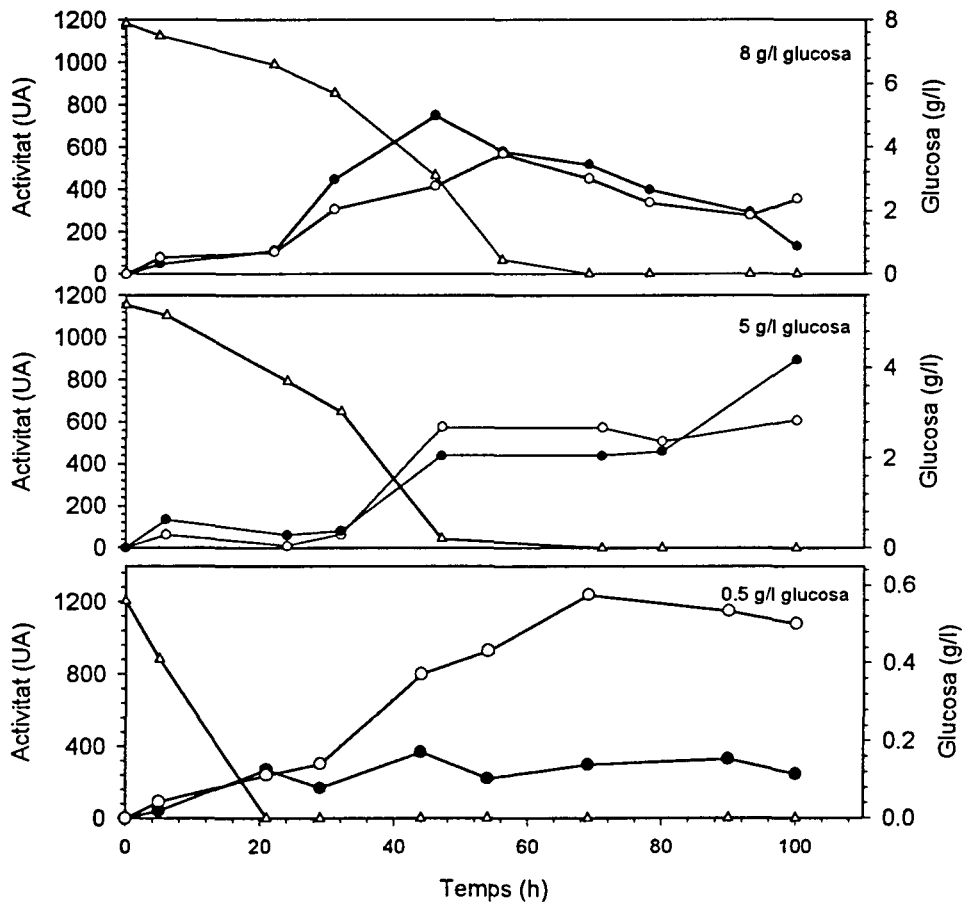


Figura 2.5.9: Evolució de la reducció del color i els compostos aromàtics pels Experiments amb 8 g/l (●) 5 g/l (▼) i 0.5 g/l de glucosa (○), i per l'experiment (control) realitzat sense creixement previ amb lleixius negres (■)



fong obtingut s'inocula en el reactor amb un medi nou amb lleixius negres, però ara variant la concentració de glucosa (8 g/l, 5 g/l i 0.5 g/l). Els resultats obtinguts es comparen amb un experiment (control) realitzat sense el creixement previ del *pellets* amb medi lleixius negres realitzat amb el reactor LIF3.

Les reduccions finals obtingudes (figura 2.5.9) tant en color com en compostos aromàtics estan al voltant del 30 - 40%, pels experiment amb creixement previ amb lleixius negres. Fins i tot en el cas en el que la glucosa era de 0.5 g/l i, per tant, no hi ha hagut creixement del fong si no al contrari (la biomassa final fou menor que la inicial) hem tingut reduccions comparables a les obtingudes en presència de glucosa.



**Figura 2.5.10:** Evolució de les activitats enzimàtiques lacasa (●) i MnP (test Castillo) (○) i de la glucosa (Δ). Del gràfic superior a l'inferior: experiment control, 0.5 g/l de glucosa, 5 g/l de glucosa i 8 g/l de glucosa

En els tres experiments en els que es va realitzar un creixement previ amb lleixius negres es va detectar la presència de peroxidases amb el test proposat per Castillo (figura 2.5.10) i la lacasa es va detectar en tots quatre experiments. Pot observar-se com en acabar la glucosa hi ha un manteniment o una lenta disminució de l'activitat lacasa. En relació a la MnP, la màxima producció es va obtenir en l'experiment amb 0.5 g/l de glucosa.

	Lacasa (UA*h)	Perox. (UA*h)	Red. Toxicitat
8 g/l	35400	28700	0.43
5 g/l	81000	85800	0.71
0.5 g/l	26600	76300	0.10

Taula 2.5.4: Producció total de i reduccions de toxicitat obtingudes obtingudes en els diferents experiments

En la figura 2.5.11, es presenten les reduccions de toxicitat en front de la producció total de lacasa (taula 2.5.4), que es va calcular com l'àrea sota la corba. Pot observar-se com en augmentar la producció total de lacasa augmenta la reducció de toxicitat.

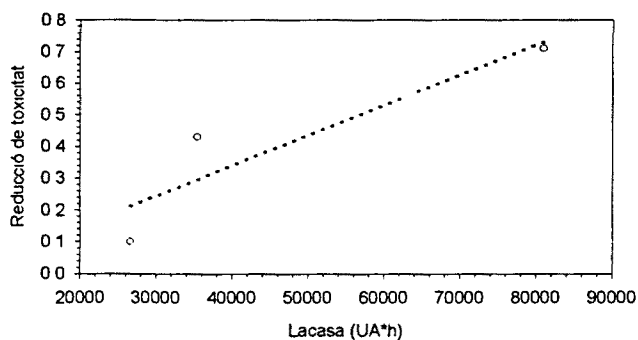


Figura 2.5.11: tendències observades entre la producció de lacasa i la reducció de toxicitat

La distribució de grandàries moleculars, representades en la figura 2.5.12, mostra un polimerització de compostos de pes molecular baix cap a compostos de pes més elevat, amb una reducció de l'àrea d'un 40% per l'experiment amb 5 g/l de glucosa i un 23% en el cas de l'experiment amb 0.5 g/l de glucosa. Aquesta tendència s'observa en els dos experiments tot i que els cromatogrames inicials tenen una aparença diferent.

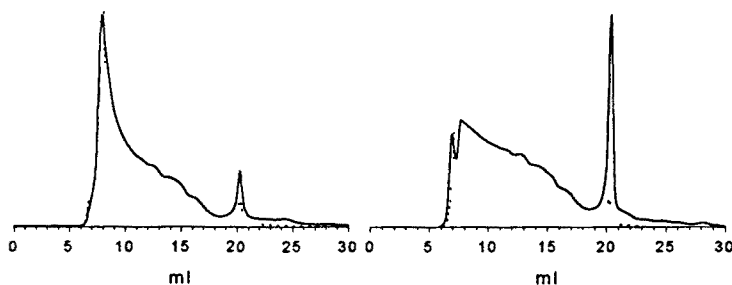


Figura 2.5.12: Distribució de grandàries moleculars pels experiments amb 5 g/l de glucosa (esquerra) i 0.5 g/l de glucosa (dreta) (—) mostra inicial i (----) mostra final

Tot i les reduccions obtingudes en toxicitat, color i compostos aromàtics, operacionalment el reactor no acaba de funcionar bé, ja que el fong creix sobre la superfície de la placa porosa del fons del reactor, fet que fa reduir l'eficàcia de la fluidització de manera que a les 80 - 90 hores els *pellets* comencen a quedar retinguts al fons del reactor. Per aquest motiu es va decidir assajar la immobilització del fong i utilitzar un reactor de llit fix.

## 6 IMMOBILITZACIÓ

Una de les formes de treballar amb fongs utilitzades en diferents treballs, es la immobilització (Linko 1988; Livernoche i col. 1983; Feijoo i col. 1995). Es decidí assajar la immobilització de *Trametes versicolor* amb alginat càlcic, cubs de niló (Scotch Brite, 3M) i escuma de poliuretà.

Inicialment, es va començar immobilitzant el fong amb alginat càlcic, ja que hi havia precedents en la bibliografia d'immobilització de *Trametes versicolor* en aquest suport (Livernoche i col. 1983; Royer i col. 1983). Es va realitzar un experiment amb un reactor de llit fluiditzat (LIF3) i es va comprovar que al cap d'uns 3 dies es hi havia en el reactor fong no immobilitzat que creixia adherit a la part inferior del reactor. En acabar l'experiment la meitat de les partícules esfèriques d'alginat es trobaven adherides a la part inferior del reactor. Es decidí no utilitzar més aquest tipus de suport. Es va canviar el suport d'immobilització i es varen realitzar experiments amb el fong immobilitzat en niló, suport del qual també s'en tenien referències, aquest cop però amb *Phanerochaete chrysosporium* (Linko 1988; Gabarrell 1995). També es va assajar la immobilització amb escuma de poliuretà (Feijoo i col. 1995 ; Gabarrell 1995).

## ASSAIGS AMB ERLLENMEYER

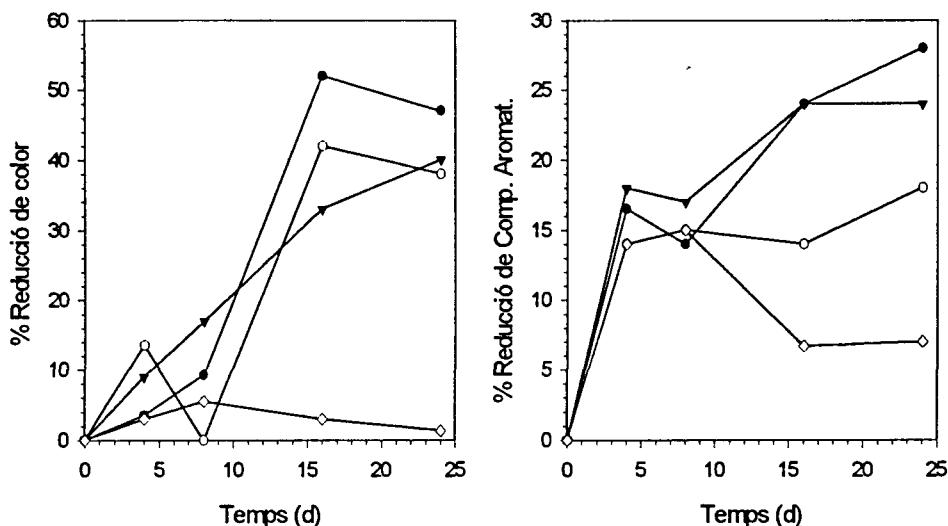
Com s'ha dit anteriorment, les referències que es tenien d'immobilització de fongs amb suport de niló, eren del fong *Phanerochaete chrysosporium*, en les quals la immobilització es duia a terme a partir d'espores del fong. Com que amb *Trametes versicolor* calí treballar a partir de suspensió de miceli, primer va ser necessari fer els assaigs previs d'immobilització per determinar el temps d'immobilització i la concentració de glucosa (Font 1993) arribant-se a la metodologia explicada en l'apartat de *Materials i Mètodes*.

Un cop determinat que *Trametes versicolor* també s'immobilitzava sobre cubs de niló, es realitzà un primer experiment, per a determinar l'efecte de la concentració de glucosa i del nombre de cubs. Es preparen Erlenmeyer d'1l amb medi amb lleixius negres i es realitzà el següent esquema experimental:

- Erlenmeyer control: 50 cubs, 0 g glucosa/l, 500 ml de medi.
  - Erlenmeyer amb 50 cubs, 9 g glucosa/l, 500 ml de medi.
  - Erlenmeyer amb 25 cubs, 9 g glucosa/l, 500 ml de medi.
  - Erlenmeyer amb 50 cubs, 5 g glucosa/l, 500 ml de medi.
-

Es volia comprovar per una banda l'efecte de la biomassa inicial, mantenint la glucosa constant, i per altre banda l'efecte de la glucosa inicial, mantenint la biomassa inicial.

Es va realitzar un experiment de 24 dies, traient-se mostra als 4, 8, 16 i 24 dies, cada mostra correspon a un Erlenmeyer. L'Erlenmeyer control, no estava inoculat, però si que s'hi varen afegir cubs de niló, per comprovar si hi havia algun del efecte suport sobre el medi.



**Figura 2.6.1:** Evolució del color, els compostos aromàtics pels assaigs amb 50 cubs 9 g/l de glucosa (●), 25 cubs 9 g/l de glucosa (○) i 50 cubs 5 g/l de glucosa (▼) i sense inocular (◇).

En la figura 2.6.1 es pot comprovar-se com, pel que fa a la biomassa inicial, s'obtenen millors reduccions de color i compostos aromàtics al treballar amb 50 cubs, respecte a l'assaig amb 25 cubs. Respecte a la glucosa, al augmentar la glucosa inicial, les reduccions finals obtingudes són més elevades, sobre tot per la reducció de compostos aromàtics. Es pot observar però, com a curt termini (5 dies) l'experiment amb 5 g/l de glucosa presenta reduccions lleugerament superiors a les de l'experiment amb 9 g/l de glucosa. L'increment de biomassa (teòric calculat a partir del consum de glucosa) no correspon amb la diferència en les reduccions obtingudes, entre els experiments a 9 g/l i a 5 g/l. Mentre que l'augment de biomassa és de quasi el doble (1.8) la diferència en la reducció de color i compostos aromàtics és d'un 10% més aproximadament.

En la figura 2.6.1, es pot observar també l'efecte dels cubs de niló no inoculats sobre el medi. Al final, després de 24 dies, les reduccions de color i compostos aromàtics són del 2 i el 7% respectivament, devent-se aquestes reduccions principalment a efectes de l'agitació i evaporació de compostos volàtils que no d'absorció per part dels cubs.

Tot i que les diferències entre les reduccions obtingudes no són molt grans, es decidí realitzar experiments amb reactors amb el fong immobilitzat, treballant amb 5 g/l de glucosa en el cas d'experiments de 5 dies de durada, i amb 9 g/l de glucosa quan els experiments fossin més

llargs. La quantitat d'inòcul a utilitzar seria la màxima quantitat de biomassa que ens permetés el volum del reactor.

## EXPERIMENTS AMB LLIT FIX

Es construí un reactor de llit fix a partir del reactor de llit fluiditzat LIF4, afegint un cos cilíndric on es posava el suport amb el fong immobilitzat. El medi cobreix tot el fong immobilitzat, i es realitza una recirculació entre la part central del cos cilíndric i la part inferior del reactor. La línia de recirculació s'utilitza per mesurar i controlar el pH.

Els estudis que s'han realitzat amb aquest reactor són:

Estudi dels canvis en la distribució de grandàries moleculars.

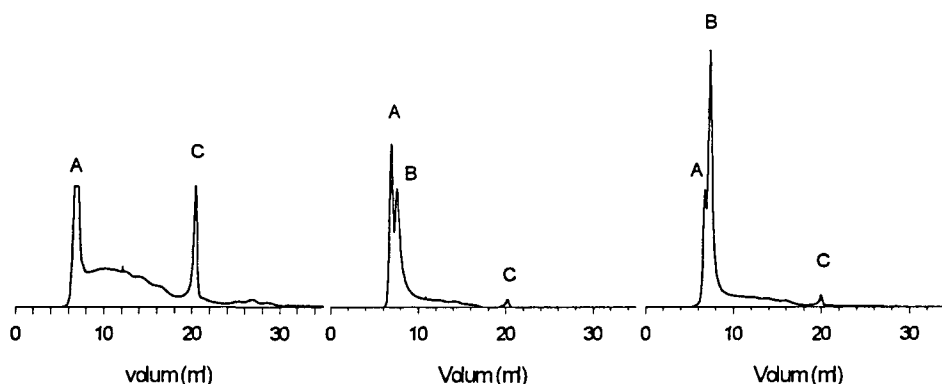
Influència del ABTS.

Influència de l'alcohol veratrílic.

Influència de la glucosa

### Estudi dels canvis en la distribució de grandàries moleculars

L'evolució de la distribució de les grandàries moleculars, ens dona una perspectiva dels canvis que es produeixen en el medi. Es va realitzar un experiment per determinar si els canvis en la distribució de grandàries moleculars es produïen al llarg del tractament o bé només tenien lloc al principi o al final del tractament. En un primer experiment es va trobar que els canvis més importants tenien lloc a les primeres 30 hores (figura 2.6.2), obtenint-se un cromatograma a les 200 h similar a l'obtingut a les 27 h.



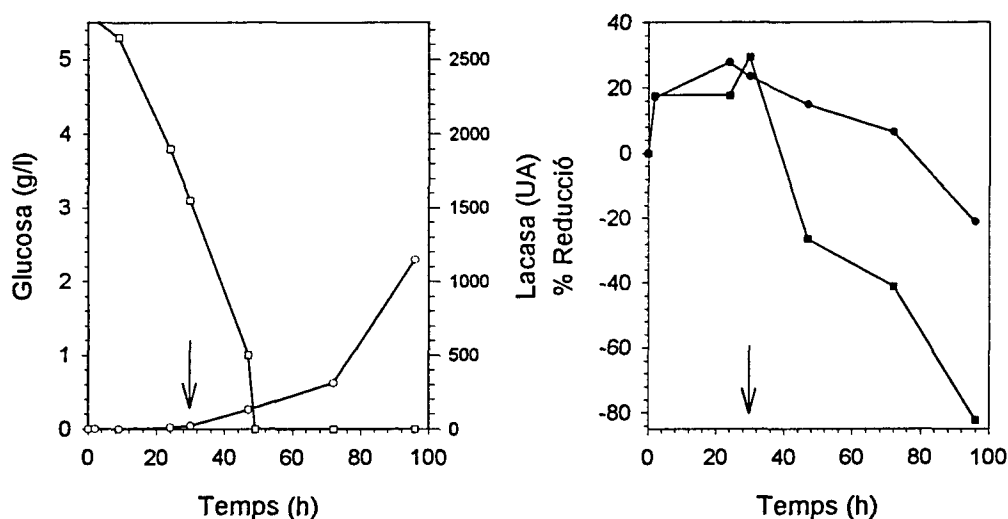
*Figura 2.6.2: Cromatogrames de distribució de grandàries moleculars. D'esquerra a dreta: mostra inicial, mostra a les 27h i mostra final.*

Pot observar-se (figura 2.6.2) com al llarg del procés hi ha una despolimerització del pic A (que és tallat en el cromatograma inicial) i al mateix temps hi ha una reducció dels pics finals i intermedis del cromatograma. Aquestes despolimeritzacions van acompanyades de l'aparició d'un nou pic B, que va augmentant d'àrea al llarg del procés.

### Efecte de l'ABTS

Estudis realitzats per Bourbonnais (Bourbonnais i col 1992) assenyalen que en assaigs realitzats amb lacasa i pasta *kraft* l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat)) afavoreix la deslignificació i desmetilació. Així mateix, en presència d'aquest reactiu, la lacasa també pot oxidar estructures no fenòliques del polímer lignina (Bourbonnais i col. 1990). La oxidació de l'ABTS per la lacasa produeix un radical catiónic i estable (ABTS<sup>•+</sup>), la presència del radical i l'enzim afavoreixen la oxidació de compostos no fenòlics. Tot i que els treballs realitzats amb aquest reactiu feien referència al blanqueig de pasta de paper, es decidí provar l'eficàcia de l'ABTS en el tractament dels lleixius negres.

S'afegí ABTS (concentració final 1mM) a les 30 hores, moment en el qual començava a incrementar l'activitat lacasa. En el moment en el que s'afegeix l'ABTS el medi es torna de color verd, degut a l'oxidació del reactiu, aquest efecte es pot observar clarament en la figura 2.6.3 (evolució del color). La toxicitat al final de l'experiment es va reduir en 1.3.



**Figura 2.6.3:** Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○) i concentració de glucosa (□). La fletxa mostra el temps en el que es va afegir l'ABTS.

Sembla doncs, que si bé l'ABTS pot ser útil per al blanqueig de pasta de paper, no seria indicat per al tractament de lleixius negres, ja que aporta color al medi i no provoca un gran disminució en la toxicitat.

### Efecte de l'alcohol veratrílic

L'alcohol veratrílic (3,4-dimetoxibenzol) és un metabòlit secundari, produït per diversos fongs de la floridura blanca. S'ha demostrat que afegir alcohol veratrílic a cultius de fongs ligninolítics fa augmentar l'activitat enzimàtica de la LiP, lacasa i MnP (Gold i col.1993; Nerud i col. 1991). A més l'alcohol veratrílic podria actuar com a intermedi en la degradació de la lignina per la LiP (Harvey i col. 1986) o bé protegint l'enzim front l'aigua oxigenada (Gold i col. 1993, Cancel i col. 1993).

Es realitzà un experiment per comprovar els efectes de l'alcohol veratrílic sobre el tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 2.6.4.

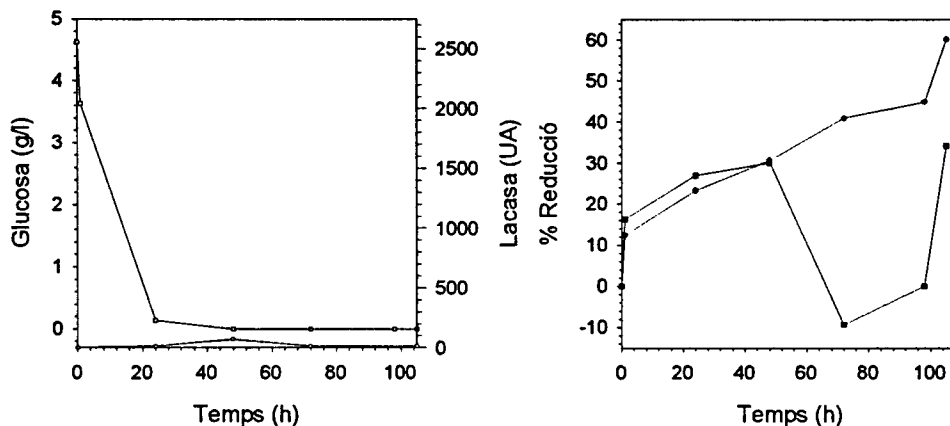


Figura 2.6.4: Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○) i concentració de glucosa (□).

L'alcohol veratrílic s'afegí a les 24 h amb una concentració final de 2 mM. Els resultats mostren bones reduccions de color i compostos aromàtics, tot i que l'activitat lacasa al llarg de l'experiment fou estranyament baixa, sembla doncs que l'addició d'alcohol veratrílic no afavoreix la producció de lacasa. No es va detectar activitat MnP, però si es van detectar peroxidases.

#### Efecte de la glucosa

En aquest cas es comparen dos experiments. Un en el que s'afegeixen 5 g/l de glucosa i es deixa que es consumeixin, i l'altre en el que es realitzà un manteniment de la glucosa per sobre de 2 g/l.

Com es pot observar en la figura 2.6.5, les reduccions obtingudes de color i compostos aromàtics són similars en ambdós casos, tot i que lleugerament superiors per l'experiment amb manteniment de la glucosa. En el cas de l'experiment amb esgotament de la glucosa, es pot observar com un cop esgotada la glucosa (80 h), hi ha un augment en el contingut de compostos aromàtics i color, mentre que quan es manté la glucosa, al arribar a les 80 h, el contingut en compostos aromàtics continua disminuint i es manté la reducció del color. La producció total de lacasa és més elevada al treballar amb mantenint la glucosa (58496 UA\*h) front a les 33780 UA\*h produïdes al treballar amb esgotament de glucosa.

En el cas de la toxicitat trobem una diferència més gran, en el cas de l'experiment amb esgotament de la glucosa s'aconsegueix una reducció de toxicitat de 0.32, mentre que quan es manté un nivell, de glucosa la toxicitat final obtinguda és superior al 45%, extrapolant s'obté un valor de  $EC_{50}$  de 85%, obtenint-se una reducció de 3.15.

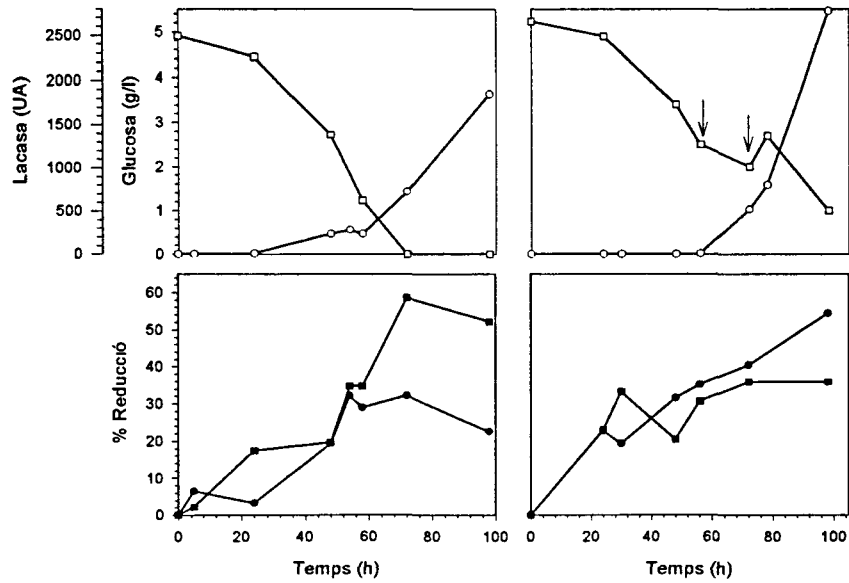


Figura 2.6.5: Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○) i concentració de glucosa (□) A l'esquerra les gràfiques corresponents a l'experiment amb esgotament de glucosa i a la dreta les corresponents a l'experiment amb manteniment de glucosa

L'estudi de la distribució de grandàries moleculars (figura 2.6.6) mostra per l'experiment amb manteniment de la glucosa una polimerització dels components lignítics.

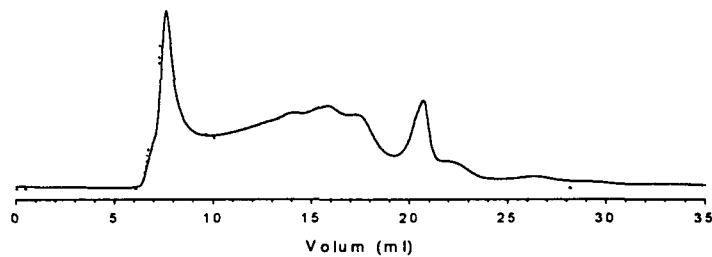
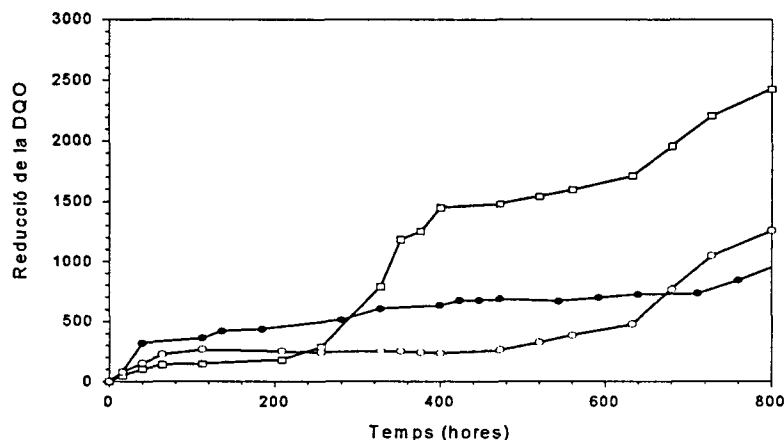


Figura 2.6.6: Evolució de la distribució de grandàries moleculars de l'experiment amb manteniment de la glucosa per la mostra inicial (línia contínua) i la mostra final (línia discontinua).

Arribat a aquest punt del treball es decidí començar a mesurar la biodegradabilitat dels lleixius negres abans i després del tractament, per tal de tenir un nou paràmetre per a determinar l'eficàcia del tractament. L'estudi de la biodegradabilitat anaeròbia del medi



final, mostra una millor adaptabilitat per part dels microorganismes i una biodegradabilitat més elevada en el cas de l'experiment amb manteniment de la glucosa. En la figura 2.6.7 pot observar-se com inicialment la reducció de DQO (producció de biogas) es inferior en ambdós casos a la mostra inicial (medi abans de tractar), mentre que cap a les 300 h de tractament l'assaig que correspon a l'experiment amb manteniment de la glucosa ja supera la producció de biogas de l'inicial, l'assaig corresponent a l'experiment amb esgotament de la glucosa no ho fa fins a les 650 h. Al final la reducció de DQO és més elevada en l'assaig corresponent a l'experiment amb manteniment de la glucosa que al corresponent experiment amb esgotament de la glucosa.



**Figura 2.6.7:** Biodegradabilitat anaeròbia de les mostres corresponents als experiment amb esgotament de glucosa (○), amb manteniment de glucosa (□) i d'una mostra inicial (●).

Es conclou doncs que mantenir un nivell de glucosa superior als 2 g/l durant tot l'experiment és beneficiós principalment per la reducció de toxicitat, fet que queda reflectit en una millora de la biodegradabilitat anaeròbia.

## EXPERIMENTS AMB LLIT FIX POLSANT

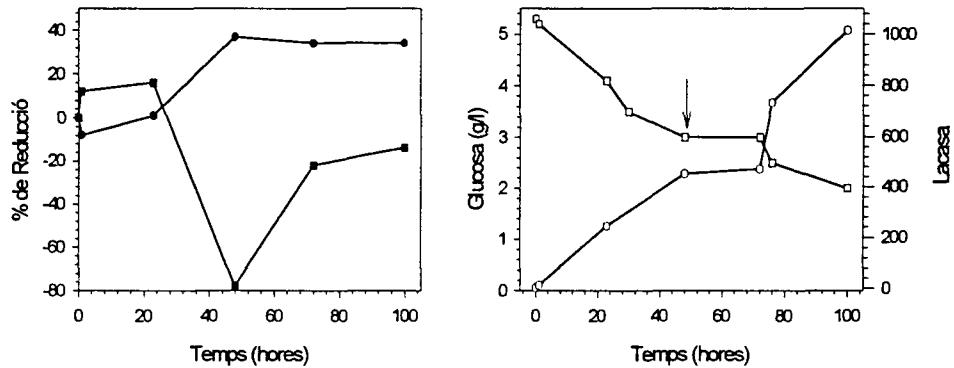
Tot i millorar en els aspectes operatius al treballar amb el fong immobilitzat en un reactor de llit fix, ja que no es produeix tanta escuma, al cap d'una setmana de procés, el creixement del fong impedeix una bona aeració de tot el reactor (igual que passava al treballar amb *pellets*). Un dels mètodes proposats per controlar el creixement de la biomassa es treballar amb reactors polsants, en els que en lloc de mantenir una aeració continuada, aquesta es fa per polsos d'aire. Es va acoblar al sistema una electrovàlvula, que controlada des d'un temporitzador, permetia realitzar polsos d'aire a freqüències variables. La freqüència escollida fou: 5s vàlvula tancada-1s vàlvula oberta, a un cabal d'aire de 8.2 l/h.

### Experiment amb manteniment de glucosa

Inicialment es va realitzar un experiment amb manteniment de glucosa, per comparar els resultats obtinguts entre polsant i no polsant. Els resultats obtinguts (figura 2.6.8) no milloren els obtinguts amb el reactor amb aeració continuada. A més, degut als polsos d'aire hi ha biomassa amb forma lliure, fet que fa necessària la filtració de la mostra abans

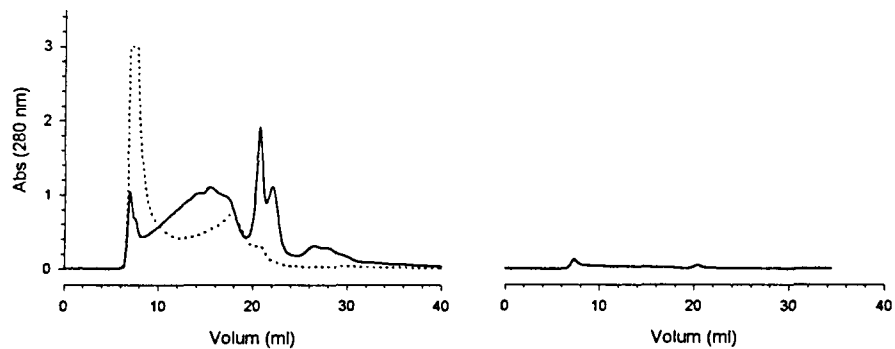
d'analitzar el color i els compostos aromàtics amb el FIA. Tot i la presència de biomassa no immobilitzada, aquesta no quedava adherida en zones en les que podia impedir la circulació de l'aire.

Un altre inconvenient de treballar amb polsos es l'increment de pèrdues de medi per evaporació, tot i que l'aire d'entrada estava humidificat. Mentre el volum inicial de medi era de 450 ml, en acabar l'experiment el volum era de 350 ml. Tenint en compte l'evaporació de medi i obtenint els valors de color i de compostos aromàtics de mostres filtrades s'obté una reducció en el color del 28% i en compostos aromàtics del 31%. En la figura 2.6.8 es mostren els valors obtinguts en línia, és a dir sense filtrar les mostres, obtenint-se valors d'increment de color, que de fet eren deguts a la terbolesa del medi.



**Figura 2.6.8:** Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○) i concentració de glucosa (□). Les dades corresponen a mostres no filtrades i sense tenir en compte l'evaporació de medi.

Amb aquest experiment es va realitzar una extracció del medi que queda adsorbit en el fong. L'extracció es va realitzar per agitació dels cubs en una solució de tetraborat sòdic (0.02M, pH=9.2). La quantitat de tetraborat utilitzada era de 450 ml, igual que la quantitat de



**Figura 2.6.9:** Distribució de grandàries moleculars (columna G30). A l'esquerra la mostra inicial (línia contínua) la mostra final (línia discontinua). A la dreta la procedent de l'extracció del fong amb tetraborat sòdic.

medi inicial. El color de la solució d'extracció filtrada era de 0.02 (5.4% del valor inicial) i el contingut en compostos aromàtics era de 0.025 (4%).

La distribució de grandàries moleculars (figura 2.6.9) mostra polimerització de compostos de baix pes molecular cap a compostos de pes més elevat, amb una reducció de l'àrea del 28%. La fracció extreta correspon principalment a fraccions de pes molecular elevat i a fraccions de pes molecular mitjà.

En la figura 2.6.10, es compara la biodegradabilitat de la mostra inicial i la mostra final. Pot observar-se, com la mostra obtinguda després de 100 h de tractament amb *Trametes versicolor*, és clarament més biodegradable que la mostra inicial. Sobre tot al principi de l'assaig, la DQO de la mostra final es redueix més ràpidament que la DQO de la mostra inicial. Pel que fa a la toxicitat s'obté una reducció de 2.1.

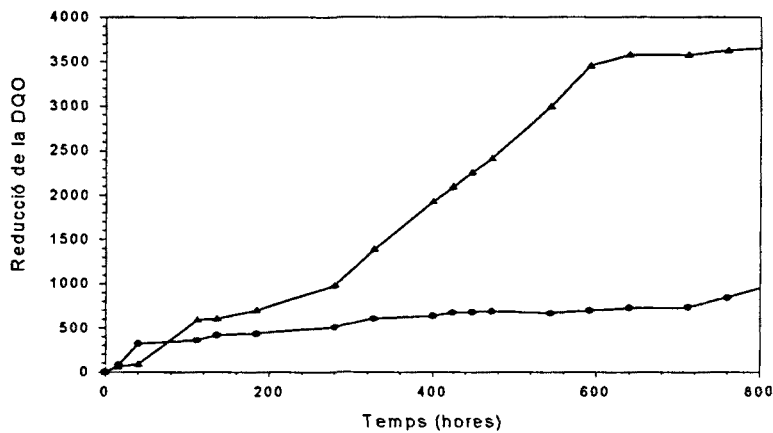


Figura 2.6.10: Biodegradabilitat anaeròbia de les mostres corresponents a la mostra inicial (●) i a la mostra final (▲).

### Experiment de 15 dies

Per comprovar l'eficàcia del reactor polsant, es va realitzar un experiment de 15 dies, per determinar que si es podia controlar la biomassa, i no s'obturava el pas de l'aire. La

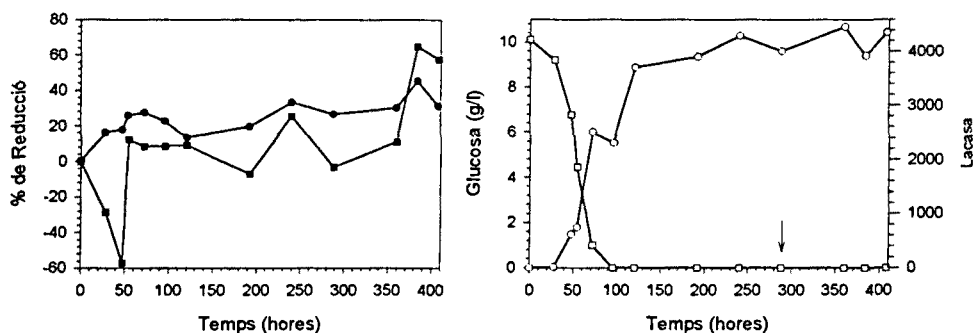
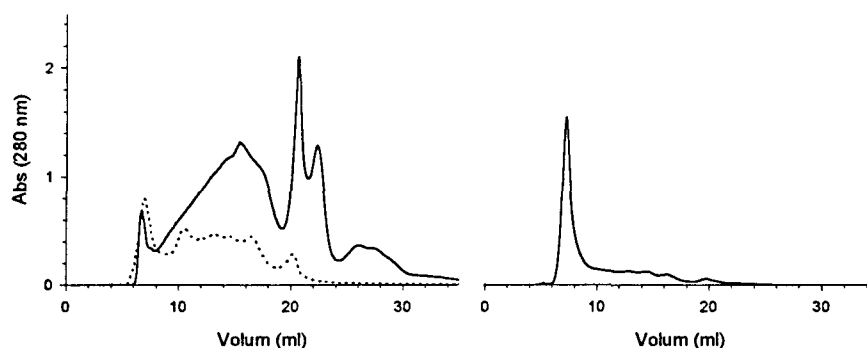


Figura 2.6.11: Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○) i concentració de glucosa (□). La fletxa indica l'aparició de precipitat.

glucosa inicial era de 10 g/l, atès que en els experiments realitzats amb Erlenmeyer es va comprovar que en experiments de llarga durada s'obtenien millors resultats en augmentar la glucosa inicial. Al llarg de l'experiment es varen detectar dos problemes. Primer l'aparició d'un precipitat, que probablement corresponia a l'acció del fong ja que el pH es va mantenir constant llarg de l'experiment entre 4.3 i 4.8. El següent fet observat fou la coloració verda del medi, deguda a la pèrdua de qualitats del suport de niló.

Els resultats obtinguts (figura 2.6.11) mostren reduccions de color i compostos aromàtics, que augmenten considerablement en les últimes 100 hores l'experiment degut a la formació de precipitat.

Pel que fa a la distribució de grandàries moleculars (figura 2.6.12), entre la mostra final i la inicial hi ha una clara reducció en l'àrea del cromatograma amb la desaparició del pic de pes molecular més elevat. Això es degut a la precipitació de la fracció de pes molecular elevat, que com pot comprovar-se en la figura 2.6.12, és la fracció que ha precipitat.

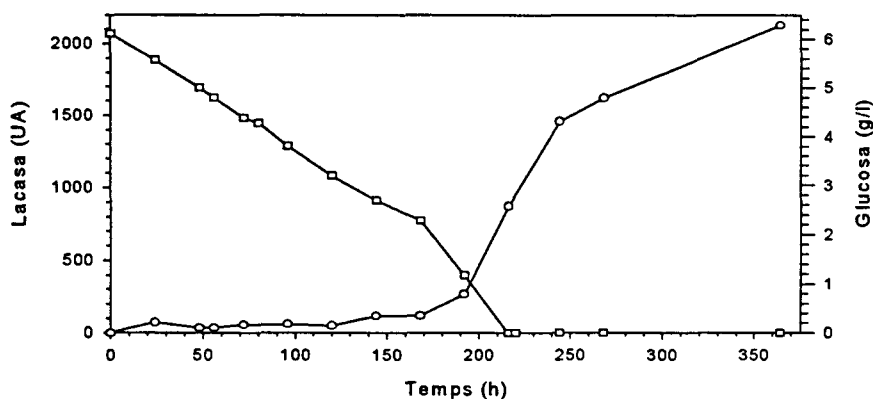


**Figura 2.6.12:** Distribució de grandàries moleculars (columna G30). A la esquerra la mostra inicial (línia continua) i la final (línia discontinua). A la dreta la mostra corresponent al precipitat.

En aquest experiment, i degut probablement a la descomposició del suport, el medi final és més tòxic que el medi inicial, passant-se d'un valor del 13.4% a una  $EC_{50}$  del 5.2%.

Per comprovar que la coloració verdosa provenia del suport es realitzà un nou experiment amb medi sintètic (sense lleixius negres). L'experiment es realitzà a pH controlat a 4.5 unitats. Per tal d'intentar obtenir LiP, es va treballar amb condicions de limitació de nitrogen (6 g/l de glucosa i 75 ppm de N).

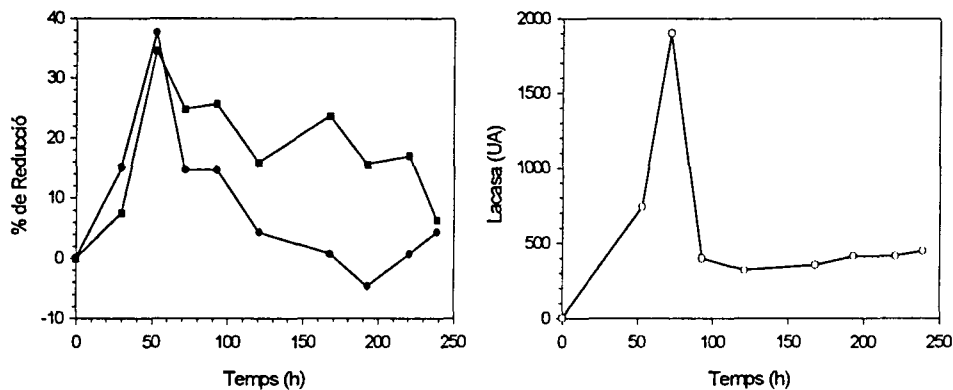
Es va comprovar com a les 120 h el medi comença a prendre un coloració verdosa, que va augmentant amb el pas del temps. El consum de glucosa fou més lent que quan es treballa amb el medi amb lleixius negres. L'enzim lacasa es va produir en poca quantitat fins que la glucosa fou inferior a 1 g/l, moment en el que es començà a incrementar la seva producció (figura 2.6.13), no es va detectar activitat LiP.



**Figura 2.6.13:** Evolució de la reducció de glucosa (□) i de la producció de lacasa (○).

### Immobilització amb escuma de poliuretà

Després dels problemes detectats amb els cubs de niló, es decidí provar un nou suport, cubs d'escuma de poliuretà. L'assaig es realitzà en les mateixes condicions que l'anterior (10 g/l de glucosa), tot i que en aquest cas no es va poder realitzar el seguiment de la glucosa. En la figura 2.6.14 pot apreciar-se com les reduccions a llarg termini són més baixes que en casos anteriors. A més també pot observar-se un brusc descens de l'activitat lacasa a partir de les 100 h.



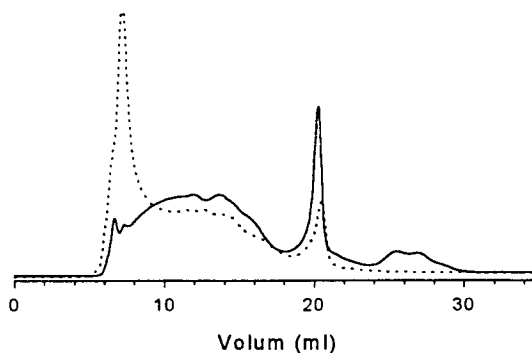
**Figura 2.6.14:** Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○).

Després de l'observació dels cubs abans i després de l'experiment, s'intueixen dues causes per la poca reducció de color i els compostos aromàtics i pel descens de l'activitat lacasa:

- La quantitat de fong immobilitzada és menor que en el cas d'immobilització amb cubs de niló.

- El descens de l'activitat lacasa podria ser degut a una mala fixació del fong, que amb els polsos d'aire acaba desenganxant-se del suport. Ja que en acabar l'experiment la quantitat de fong immobilitzada és molt petita.

Tot i les baixes reduccions en color i compostos aromàtics la toxicitat final és superior al 45%, valor que extrapolant ens donaria una reducció de toxicitat de 5.7.



*Figura 2.6.15: Distribució de grandàries moleculars (columna G30). La mostra inicial representada amb línia contínua i la final amb línia discontinua*

La distribució de grandàries moleculars (figura 2.6.15), mostra una polimerització dels compostos de pes molecular baix cap a compostos de pes molecular més elevat, encara que no s'aprecia la reducció total dels pics de pes molecular més baix, com en els casos en els que es treballava amb suport de niló.

## 7 REACTOR POLSANT AMB PELLETS

Per intentar millorar les dificultats creades per l'adhesió del fong a la part inferior del reactor de llit fluiditzat, es tornà a realitzar un experiment amb el LIF4, però aquest cop treballant amb el sistema de polsos d'aire. Operacionalment s'obtenen uns resultats satisfactoris, aconseguint-se mantenir els *pellets* fluiditzats fins al final de l'experiment (9 dies), mentre que quan es treballava amb aeració continuada als 4 dies ja hi havia problemes d'adhesió del fong.

Els resultats (figura 2.7.1) mostren que s'obtenen bones reduccions, sense superar les obtingudes amb aeració continuada, però evitant els problemes operacionals. Cal destacar d'aquest experiment l'elevada activitat lacasa que es va obtenir, amb una producció total de 1515000 UA\*h i un pic màxim de 14000 UA i, també, el fet que s'aconseguí mantenir els *pellets* en fluidització fins al final de l'experiment.

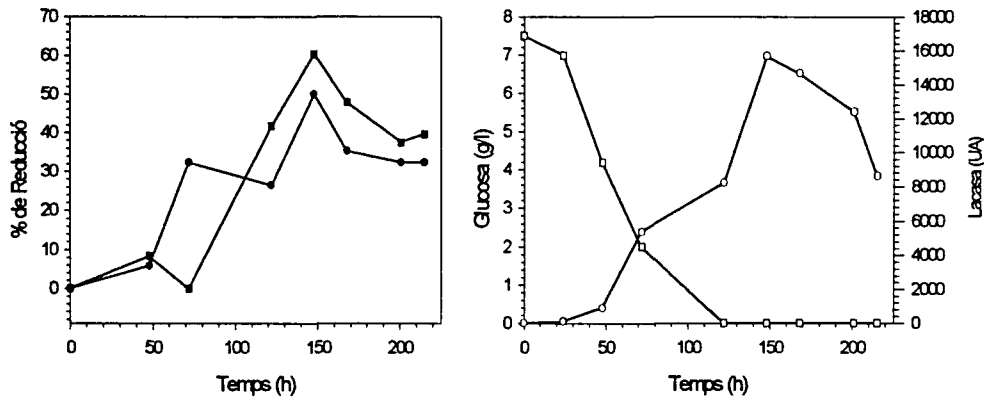


Figura 2.7.1: Evolució del color (■), compostos aromàtics (●), activitat lacasa (○) i concentració de glucosa (□).

Al final de l'experiment s'obté un valor de la toxicitat superior al 45%, que extrapolant correspondria a una reducció de toxicitat de 6.3. La distribució de grandàries moleculars mostra un polimerització cap a compostos de pes molecular elevat, tot i que com pot observar-se en la figura 2.7.2 els canvis més importants ja van tenir lloc durant les primeres 48 h de tractament.

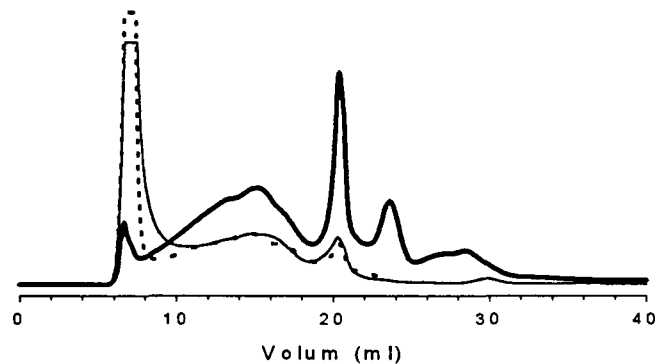


Figura 2.7.2: Distribució de grandàries moleculars (columna G30). La mostra inicial representada amb línia contínua (gruixuda), a les 48 h amb línia contínua i la final amb línia discontinua.

## 8 DISCUSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS OBTINGUTS

### COMPARACIÓ DELS MILLORS EXPERIMENTS

A continuació es comparen els experiments amb millors resultats obtinguts amb els reactors de llit fluiditzat, i llit fix.

Reactor	Suport	Aeració	Red Color (%)	Red Arom. (%)	Red Toxic.	Red. FPLC (%)	Màx. Lacasa (UA)	Prod. Lacasa
LIF3	Pellets	Continua	84.8	70.2			1066	124000
LIFX	Niló	Continua	36	54.4	3.15	16.04	2776	58496
LIFX	Niló	Polsant	28	31	2.11	28.09	1013	50650
LIF4	Pellets	Polsant	39.5	32	6.28	12.09	15681	1515000
LIFX	Poliuretá	Polsant	6	4	5.7	2.71	1900	100100

*Taula 2.8.1: Resum dels millors resultats obtinguts amb els diferents reactors.*

Clarament els millors resultats en quan a reducció de color i compostos aromàtics s'obtenen al treballar amb *pellets* amb un reactor de tipus llit fluiditzat. Aquest reactor presenta però, problemes de tipus operacionals, ja que la producció d'escuma al llarg del tractament es bastant elevada. Cal doncs controlar l'escuma evitant al màxim afegir antiescumant.

Si el que es vol es obtenir el màxim de reducció de toxicitat, l'experiment realitzat amb el fong en forma de *pellets* en un reactor amb aeració pulsant és amb el que s'obtenen millors resultats (a falta del valor de la reducció de toxicitat de l'experiment amb el LIF3). També es va obtenir una bona reducció de toxicitat al treballar amb el fong immobilitzat en escuma de poliuretá. Malauradament amb aquest suport el fong no s'immobilitza amb l'eficàcia que ho fa en el suport de niló, obtenint-se unes reduccions dels altres paràmetres avaluats molt baixes.

Amb els reactors amb el fong immobilitzat en niló s'obtenen reduccions de toxicitat, color i compostos aromàtics intermedies, igual que la producció de lacasa. Si comparem entre aeració polsant o aeració continua, s'obtenen millors reduccions al treballar amb aeració continua, excepte en el cas de la biodegradabilitat anaeròbia i la reducció de l'àrea del cromatograma de FPLC, on s'obté una reducció de DQO (producció de biogas) més gran en el cas de treballar amb aeració polsant (figures 2.6.7 i 2.6.10).

L'assaig corresponent al fong en forma de *pellets*, amb un reactor de llit fluiditzat amb aeració amb polsos, destaca també per la elevada producció de lacasa. En aquest cas les reduccions de color i compostos són similar a les obtinguts amb el fong immobilitzat amb niló i aeració constant.

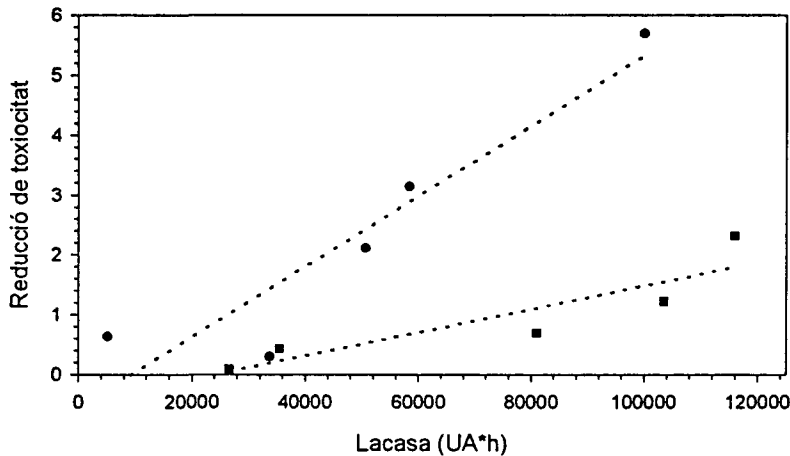
Pel que fa als problemes operacionals, els reactors tipus llit fluiditzat, com s'ha comentat anteriorment, presenten el problema de formació d'escuma, aquesta però, va poder ser controlada amb el sistema mostrat en la figura 2.5.4. Els reactors amb aeració constant presenten problemes de fluidització dels *pellets*, a partir dels 3-4 dies, formant-se una capa de fong a la part inferior del reactor i presentant creixement per fora dels cubs quan es treballa amb el fong immobilitzat, aquest fet limita a uns 5 dies el temps del procés. Treballant amb polsos s'aconsegueix evitar el creixement a la part inferior del reactor al treballar amb *pellets*, i per fora dels cubs al treballar amb el fong immobilitzat.



## DISCUSIÓ DE LES RELACIONS OBSERVADES

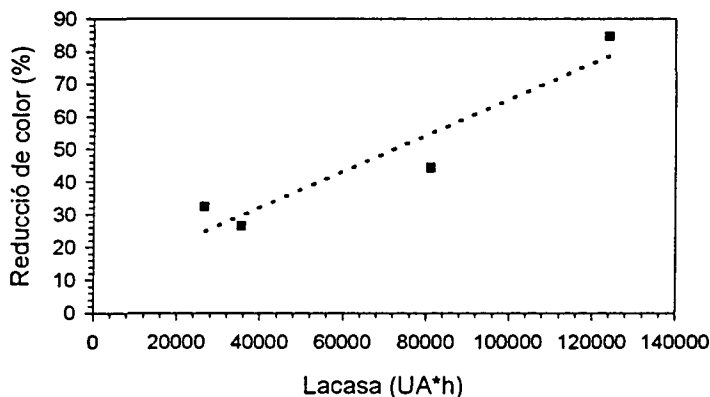
En referència als paràmetres estudiats s'han pogut determinar les següents tendències:

- Tant al treballar amb el fong immobilitzat com en forma de *pellets*, hi ha una tendència a augmentar la reducció de toxicitat al augmentar la producció de lacasa. Tot i que en els experiments realitzats amb *pellets* per la mateixa quantitat de lacasa la reducció de toxicitat obtinguda és inferior a la obtinguda al treballar amb el fong immobilitzat (figura 2.8.1).



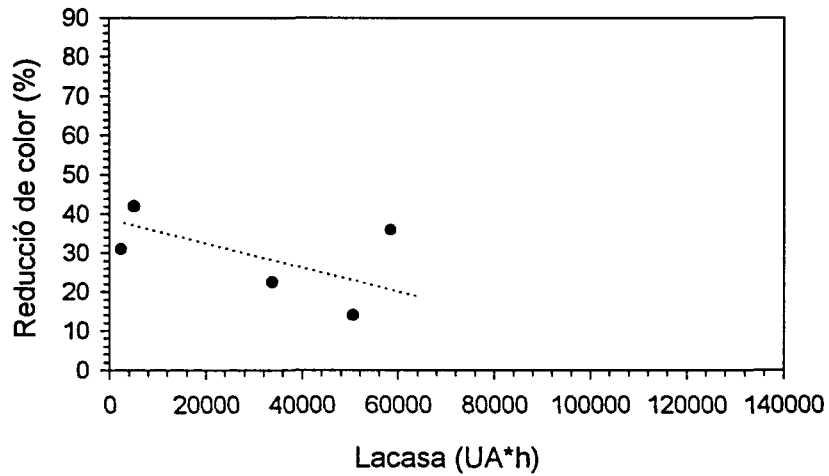
**Figura 2.8.1:** Tendències observades entre la producció de lacasa i la reducció de la toxicitat. (●) reactors amb el fong immobilitzat i (■) reactors amb el fong en forma de pellets.

- En treballar amb *pellets* s'obtenen reduccions de color més elevades que en els assaigs amb el fong immobilitzat. En els experiments amb *pellets* a major producció de lacasa major



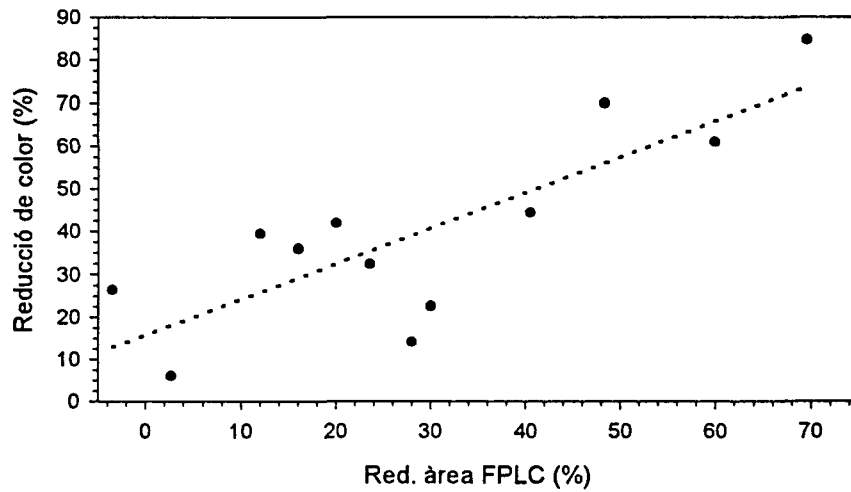
**Figura 2.8.2:** Tendències observades entre la producció de lacasa i la reducció del color en els reactors amb el fong en forma de pellets

reducció de color, en canvi amb els assaigs amb immobilitzat les reduccions obtingudes són sempre similars, independentment de la lacasa produïda (figura 2.8.2).



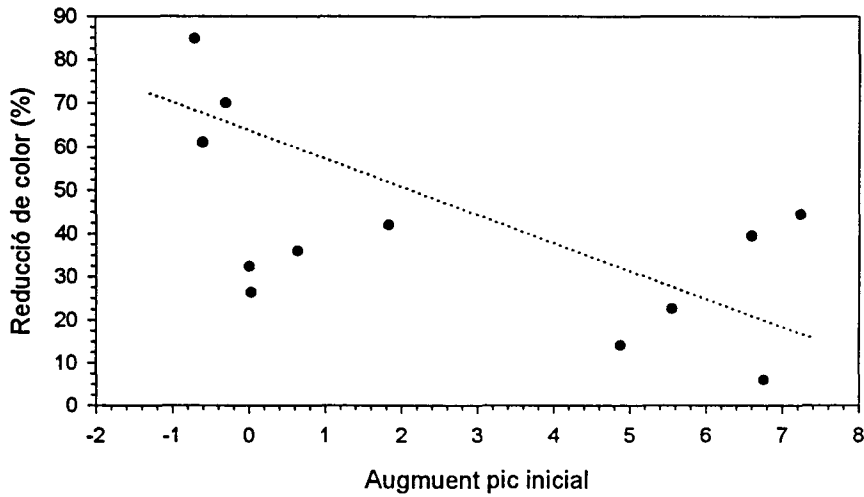
*Figura 2.8.2: Tendències observades entre la producció de lacasa i la reducció del color en els reactors amb el fong immobilitzat.*

- L'augment en la reducció de l'àrea total dels cromatogrames de FPLC coincideix amb l'augment en la reducció del color (figura 2.8.3).



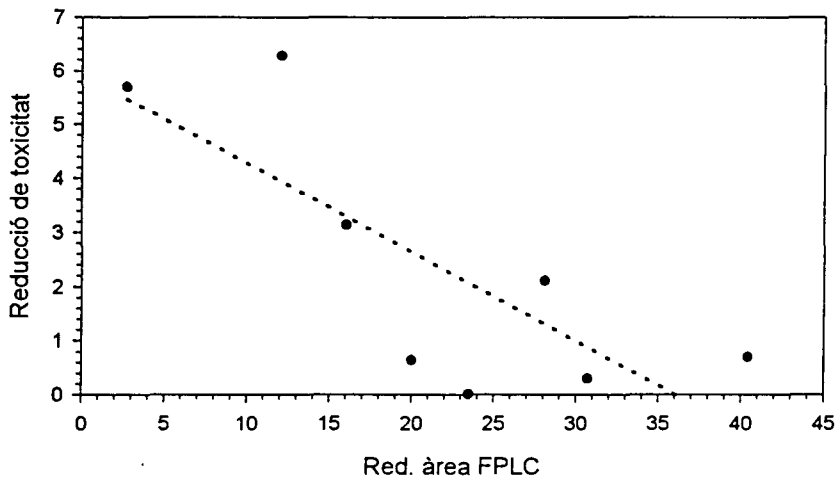
*Figura 2.8.3: Tendència observada entre la reducció de l'àrea dels cromatogrames de FPLC i la reducció del color.*

- La polimerització de compostos de pes molecular baix cap a compostos de pes molecular elevat ve reflectit per un augment del pic inicial en els cromatogrames de FPLC. Com menor és la reducció de color, major és l'increment de l'àrea del primer pic (figura 2.8.4). Per tant, els compostos de pes molecular elevat aporten coloració al medi.



*Figura 2.8.4: Tendència observada entre l'augment de l'àrea del pic inicial dels cromatogrames de FPLC i la reducció del color.*

- L'increment en la reducció de l'àrea total dels cromatogrames de FPLC coincideix amb una menor reducció de la toxicitat (figura 2.8.5). Aquesta menor reducció de toxicitat observada podria ser deguda a la formació de compostos de despolimerització que no absorbeixen a 280 nm (longitud d'ona de detecció del FPLC) i que donen toxicitat.



*Figura 3.8.5: Tendència observada entre la reducció de l'àrea total dels cromatogrames de FPLC i la reducció de toxicitat.*

- En els experiments realitzats amb el fong immobilitzat no s'aconsegueix reduir totalment els pics finals dels cromatogrames de FPLC.



## 3.- MONITORATGE

---

### ❶ RESUM

El tractament biològic de depuració d'aigües, igual que en altres processos biotecnològics, ha d'utilitzar sistemes de monitoratge i control per tal d'aconseguir un màxim rendiment quan s'implementa a escala industrial. En aquest capítol s'inicia amb una introducció dels conceptes més generals de les diferents tècniques utilitzades i seguidament s'exposen les diferents actuacions que s'han dut a terme per millorar el monitoratge del sistema. Primer es va implementar un sistema de mesura de pH i oxigen dissolt, utilitzant mesuradors i controladors comercials connectats a un ordinador. Després, sobre aquest muntatge es varen connectar sistemes de mesura de paràmetres analítics, com són l'activitat enzimàtica, el color i els compostos aromàtics, mitjançant un FIA (*Flow Injection Analysis*). En el cas de l'anàlisi de l'activitat enzimàtica s'utilitza la tècnica de l'aturada de flux, pel color i els compostos aromàtics s'aconsegueix la mesura dels dos paràmetres amb una sola anàlisi.

### ❷ INTRODUCCIÓ

Per tal de fer els processos microbiològics més efectius, és necessari determinar de forma contínua diferents paràmetres que defineixen el sistema. Paràmetres de tipus físic com l'agitació, la temperatura, el cabal d'aeració, o d'altres més químics com el pH o l'oxigen dissolt són actualment accessibles de mesurar i controlar de forma contínua. Però, a més a més, hi ha altres paràmetres d'interès en un sistema microbiològic que pot ser necessari mesurar en continu, com poden ser la mesura de la biomassa (Sarrà i col. 1996), la concentració de substrats o productes (Valero i col. 1990) i la mesura d'activitats enzimàtiques (Worsfold, i col. 1990).

En els cultius amb fongs per al tractament d'aigües residuals de la indústria de pasta i paper els paràmetres de més interès que intervenen en el procés i sobre els quals es vol actuar d'una manera o una altra són:

---

- L'activitat enzimàtica.
- El color
- El contingut en compostos aromàtics
- La toxicitat.

Cal doncs trobar una tècnica d'anàlisi senzilla i flexible, que permeti tant fer una mesura cinètica (activitat enzimàtica) com fer una mesura de concentració (color o compostos aromàtics). L'assaig de toxicitat, en principi, no es pot automatitzar, tampoc és una variable que es segueixi dia a dia, sinó que es mesura l'inici i al final dels experiments.

La mesura d'una concentració del tipus del color o dels compostos aromàtics pot realitzar-se en línia de forma senzilla amb l'anàlisi d'injecció per flux (FIA, de l'anglès *Flow Injection Analysis*). Aquesta tècnica presenta diferents modalitats, d'entre les quals n'hi ha alguna que pot utilitzar-se per realitzar mesures cinètiques. Es va escollir, doncs, la tècnica del FIA per solucionar els problemes de mesura en continu de l'activitat enzimàtica, el color i el contingut en compostos aromàtics.

L'automatització d'aquestes anàlisis permet mesurar els paràmetres de forma més ràpida i fiable; a més, es poden obtenir els valors en línia, facilitant un possible control del sistema des de l'ordinador.

Els aparells de mesura i control com poden ser pHmetres o mesuradors d'oxigen acostumen a portar una sortida analògica (variació de voltatge o intensitat) que permet realitzar el monitoratge del valor de la variable amb un registrador.

En el nostre cas es va utilitzar com a registrador un ordinador, que ofereix unes possibilitats de monitoratge i control que no poden oferir els registradors. Els ordinadors són equips digitals, que no poden tractar els senyals analògics directament. La diferència entre un senyal digital i un senyal analògic és fàcil d'entendre si comparem un interruptor (digital) de llum, amb un regulador (analògic) de llum. Mentre que l'interruptor només pot encendre o apagar el llum i, per tant, té dos estats (1 encès, 0 apagat), el regulador permet, en canvi, regular la intensitat de la llum. Els circuits interns dels ordinadors només poden detectar si els arriba corrent o no (0 o 1), són per tant aparells digitals. La unitat d'informació més petita que tracten els ordinadors són els bits (*Binary digit*), que prenen els valors de 0 o 1. El conjunt de vuit bits s'anomena byte, que representarà un caràcter i serà la unitat bàsica de la informàtica.

Cal doncs, primer de tot, convertir el senyal analògic en un senyal digital. Per realitzar aquesta conversió s'utilitza un tipus de component anomenat ADC (*Analog Digital Converter* o conversor analògic digital). Aquest circuit pren mostres del senyal analògic d'entrada a intervals de temps determinats, de forma que com més elevada sigui la velocitat de mostratge, més punts adquirirem en un temps concret i, per tant, el senyal digital s'ajustarà més al senyal original. El número de mostres que es prenen per segon s'anomena freqüència de mostratge i es mesura amb quilohertz (kHz). Un component ADC només pot convertir un senyal cada vegada, per tant, teòricament hauriem de tenir un component ADC per a cada canal d'entrades analògiques, fet que encariria molt l'adquisició de dades. Sortosament, utilitzant un dispositiu anomenat multiplexor podem convertir en digitals els senyals de diferents canals analògics. El multiplexor anirà enviant els senyals dels diferents canals d'entrada, un darrere l'altre, cap al component ADC. Malauradament, com que un sol ADC

està convertint senyals de diferents canals, la velocitat de mostratge de cada canal és inversament proporcional al número de canals mostrejats.

El senyal obtingut és converteix en bits (senyal digital). El nombre de bits utilitzat per convertir cada mostra presa influirà també en la qualitat del senyal convertit. Anomenarem resolució al número de bits utilitzats per representar el senyal analògic. Suposem una resolució de 3 bits, el rang de mesura dins el qual variarà el senyal analògic es divideix en  $2^3$  divisions, cada divisió es representa en codi binari entre 000 i 111. Si el rang de mesura va entre 0 i 10 i en fem 8 divisions ( $2^3$ ), el mínim que podrem detectar seran increments del senyal analògic d'1.25 unitats (10/8). Per tant, com major sigui el nombre de bits que s'utilitzin major serà la resolució, és a dir, menor serà l'increment de senyal analògic que es podrà detectar.

Al mateix temps, un senyal digital es pot convertir en senyal analògic, mitjançant un DAC (*Digital Analog Converter* o conversor digital analògic).

Tenim doncs dos tipus de senyals bàsics (digitals i analògics) als quals podem afegir els senyals TTL (*Transistor Transistor Logic*), que són senyals digitals de baixa intensitat, utilitzats comunament en els aparells de microelectrònica. Aquests senyals TTL tant poden ser d'entrada a l'ordinador com de sortida. Parlarem aleshores de sortides o entrades digitals TTL compatibles.

Tots aquests components es poden trobar en les anomenades targetes d'adquisició de dades. Cada un dels components citats anteriorment té la seva funció en el control i el monitoratge. L'ADC s'utilitzarà per convertir el senyal analògic rebut d'un aparell de mesura en un senyal digital. El DAC es podrà utilitzar per controlar des de l'ordinador un aparell que funcioni amb voltatge variable. Les sortides digitals permeten el control *on-off* d'aparells com ara bombes, vàlvules o banys termostatitzats, i les entrades digitals poden utilitzar-se, per exemple, per determinar si un aparell està o no en funcionament.

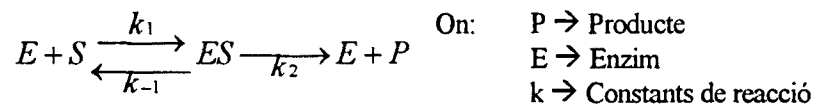
Les targetes d'adquisició de dades ens obren, doncs, una via de comunicació entre l'ordinador i l'exterior. Hi ha però altres vies. Una d'elles, utilitzada en aquest treball, és el port de comunicacions en sèrie d'entrada/sortida (RS-232C). El port en sèrie treballa amb un senyal digital, enviant els bits un darrere l'altre. La unitat de mesura en la velocitat de la transmissió són els Baudis (aproximadament bits per segon). El port RS-232 connectarà, doncs, dos aparells digitals, de forma que tant un com l'altre poden rebre i enviar dades. La comunicació entre els dos aparells es basa en una sèrie de mots claus establerts en el que s'anomena protocol de comunicació. D'aquesta manera des de l'ordinador i a través del port RS-232C podem controlar i rebre informació d'un aparell que, per les seves característiques, no es pot controlar amb un senzill senyal digital, com per exemple un espectrofotòmetre.

El control sobre una placa d'adquisició de dades, o sobre el port RS-232C, cal realitzar-lo utilitzant llenguatges de programació que ens permeten transmetre les operacions que cal realitzar a l'ordinador. Existeixen diversos llenguatges de programació com són el Basic, el Fortran o el C. Cada un d'ells té els seus avantatges i desavantatges, uns són més indicats per realitzar càlculs i els altres són d'utilització més general. Per a una aplicació com la que es realitza en aquest treball el llenguatge Basic pot ser-nos adequat.

## FONAMENTS TÈORICS DE CINÈTICA ENZIMÀTICA

Els estudis sobre enzims (del grec enzimon; el que es troba a l'interior del llevat) s'iniciaren a principis del segle XIX, quan Schwann va aïllar la pepsina i Payen i Persoz, el 1883, varen descobrir la diastasa (ara anomenada amilasa). Més tard, el 1898 Duclaux, va adoptar el sufix -asa com a terminació de tots els noms dels enzims.

Un enzim és un catalitzador d'origen natural la finalitat del qual és, per tant, la d'augmentar la velocitat de la reacció. L'enzim interacciona amb el substrat formant un intermedi, inestable, per donar posteriorment el producte de la reacció. En termes generals una reacció enzimàtica es descriu de la següent forma:



*Equació 3.1.1*

L'equació 3.1.2, coneguda com equació de Michaelis-Menten, ens descriu la velocitat de formació de producte en funció del temps.

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{[S] + k_m}$$

On:  $K_M$ : és la constant de Michaelis-Menten  
 $[E]_0$ : és la concentració total d'enzim inicial  
 $k_2$ : és una constant de velocitat  
 $[S]$ : és la concentració de substrat

*Equació 3.1.2*

En treballar a concentracions de substrat elevades podem considerar que  $[S] \gg K_M$ . Al mateix temps, sota aquestes condicions obtindrem la velocitat màxima de la reacció ( $V_{m\grave{a}x}$ ), és a dir:

$$\left[ \frac{d[P]}{dt} \right]_{m} = V_{m\grave{a}x} = k_2 \cdot [E_0] \quad \text{Equació 3.1.3}$$

La reacció esdevé d'ordre zero respecte al substrat i per tant la velocitat de la reacció és directament proporcional a la concentració de l'enzim i a la seva activitat.

Substituint l'equació 3.1.3 en la 3.1.2, obtenim una nova interpretació de l'equació de Michaelis-Menten:

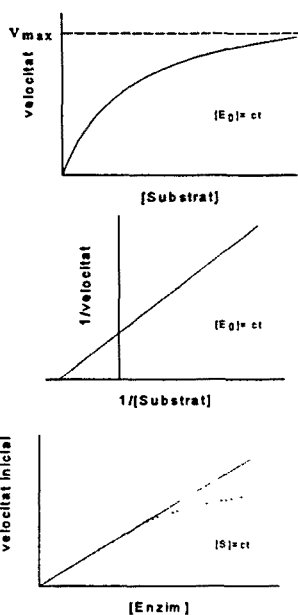
$$V = V_{m\grave{a}x} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equació 3.1.4}$$

Aquesta equació descriu una hipèrbole rectangular, que correspon a la representació gràfica de la variació de la velocitat en funció de la concentració de substrat (figura 3.1.1a), per a una concentració inicial d'enzim.



A partir de l'equació 3.1.4, podem obtenir:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{Equació 3.1.5}$$



equació que rep el nom de lineiarització de Lineweaver-Burk (figura 3.1.1b), on representem la inversa de la velocitat inicial en front de la inversa de la concentració de substrat inicial. A partir d'aquesta representació, podem calcular els paràmetres de l'equació 3.1.4,  $K_M$  (ordenada a l'origen) i  $V_{\max}$  (pendent de la recta).

La quantitat d'enzim present en un medi es podria determinar, com la quantitat de proteïna present, si aquesta únicament correspongués a l'enzim. El problema d'aquesta mesura és que inclou tant l'enzim actiu (amb capacitat catalítica) com l'inactiu. Per determinar la quantitat d'enzim actiu en un medi s'utilitza el que s'anomena assaig d'activitat enzimàtica. Aquest assaig es basa en l'equació 3.1.3. Es treballa a concentracions de substrat elevades, per tal d'assegurar que tot l'enzim és saturat, i a unes condicions de pH, temperatura i agitació òptimes, que permetin mesurar la velocitat intrínseca de la reacció. La velocitat de la reacció, calculada sota aquestes condicions, serà proporcional a la concentració d'enzim (equació 3.1.3).

**Figura 3.1.1:** (a) Representació de Michaelis-Menten. (b) Representació de Lineweaver-Burk. (c) Desviacions de la linealitat en augmentar la concentració d'enzim.

Un cop definides les condicions de l'assaig, cal veure la influència de la concentració d'enzim en la mesura de l'activitat. Les equacions descrites anteriorment, que ens serveixen per determinar la concentració d'enzim

actiu, es basen en el fet que la concentració d'enzim és molt més petita que la de substrat i, per tant, tot l'enzim present en el medi de reacció es troba lligat al substrat. Però si la concentració d'enzim va augmentant, arribarà un punt en què es perdre la linealitat (figura 3.1.1c), en aquesta zona no lineal, la concentració d'enzim no serà proporcional a la velocitat inicial de la reacció.

### FONAMENTS TÈORICS DEL FIA

La tècnica FIA es basa en la mesura de la resposta d'un detector davant un corrent en el qual és transportat un fragment de mostra. En el camí que va des de la injecció a la detecció, la mostra es dispersa junt amb el portador, reaccionant amb els reactius que aquest pot contenir. Es produeix, per tant, una mescla incompleta, però reproducible, donant lloc a un gradient de concentració variable amb el temps al llarg del sistema. En arribar la mostra al detector, es mesura en forma d'un pic, que correspon a un producte de format durant la reacció o bé a algun component de la mostra.

Generalment l'anàlisi es realitza mesurant l'alçada del pic obtingut, encara que també podria utilitzar-se com a mesura l'àrea del pic. Aquesta mesura (alçada o àrea) serà directament proporcional a la concentració de l'analit que volem mesurar.

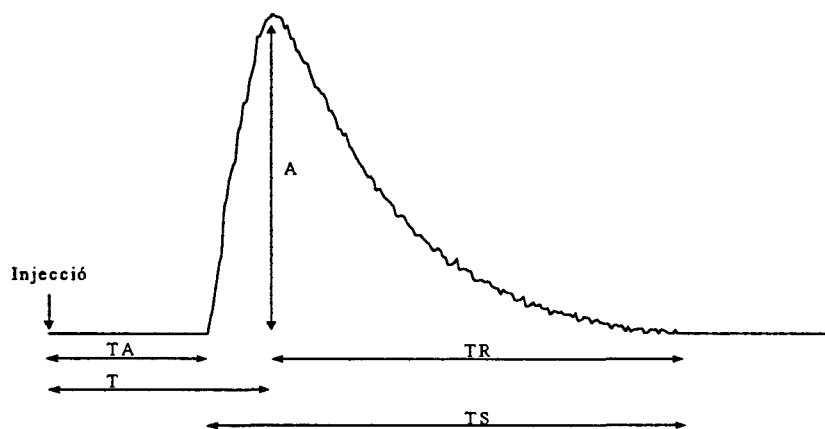
La tècnica FIA és una metodologia iniciada el 1975 per Ruzicka i Hanssens, des d'aleshores s'ha utilitzat per resoldre un ampli ventall de problemes analítics. Les seves característiques més importants són (Valcarcel i col. 1984):

- És una tècnica flexible, que pot adaptar-se a la majoria de reaccions tant de tipus químic com bioquímic.
- És compatible amb la majoria dels mètodes de detecció.
- És requereix poc volum de mostra i de reactius.
- És de resposta ràpida.
- Permet el monitoratge en línia de processos.

Aquests avantatges han fet que en l'actualitat els sistemes FIA no siguin només una tècnica utilitzada en laboratoris d'investigació, sinó que es trobin ja aparells comercials basats en tècniques FIA.

De l'enregistrament del pic obtingut, anomenat fiagrama, en podem determinar diferents característiques (figura 3.1.2):

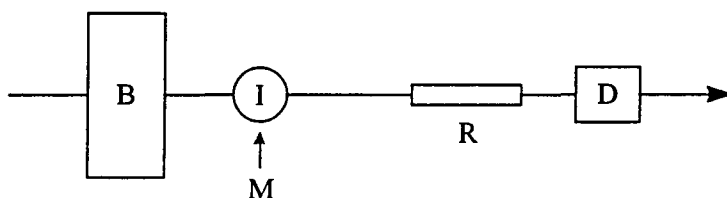
- **L'alçada del pic (A):** Es relaciona amb la concentració del component de la mostra que es vol determinar.
  - **El temps de residència (T):** Correspon al temps transcorregut des de la injecció fins al màxim del senyal.
  - **El temps d'aparició (TA):** Correspon al temps transcorregut des de la injecció fins a la "sortida" del senyal de la línia de base (augment de l'1 al 2%).
  - **Temps de retorn (TR):** Temps transcorregut entre el moment en què el senyal arriba al màxim i el moment en què retorna a la línia de base.
  - **Temps d'aparició del senyal (TS):** Correspon al temps durant el qual el senyal és fora de la línia de base.
-



**Figura 3.1.2:** Diferents zones d'un fiagrama.

Els elements essencials necessaris per realitzar un muntatge FIA (figura 3.1.3) són:

- **Unitat de propulsió (B)**, que estableix un flux de cabal el màxim constant possible d'una dissolució o de més d'una, que pot dur dissolt un reactiu o actuar com a simple portador. Pot tractar-se d'una bomba peristàltica, un sistema de pressió de gasos o simplement de la força de la gravetat.
- **Un sistema d'injecció (I)**, que permetrà inserir un fragment de mostra en mig del flux de portador. El volum injectat ha de ser constant i cal que durant la injecció no s'interrompi el flux.
- **Un fragment de tub**, anomenat normalment reactor (R), a través del qual es transporta la mostra fins al detector. Aquest tub pot ser recte o en serpenti, pot ser reblert de boles inertes o de material químicament actiu, etc., tot depenent del tipus de sistema FIA de què es tracti.
- **Una cel·la de flux**, incorporada en un sistema de detecció (D) (colorímetre, fluorímetre, potenciòmetre, etc.) que transmet el senyal continu a un registrador i/o a un microprocessador.



**Figura 3.1.3:** Representació esquemàtica d'un sistema FIA i els seus components.

Les modalitats de FIA més importants es poden incloure dins d'un dels següents grups:

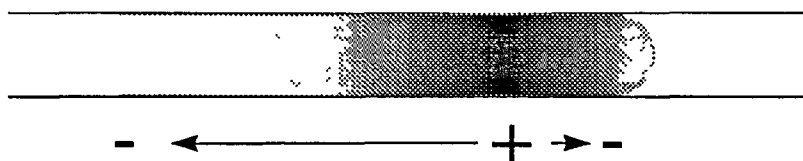
- **Sistemes FIA primaris:** S'inclouen en aquest grup tots aquells sistemes en què hi ha una única injecció de mostra que s'insereix en el flux d'un portador, amb el qual pot haver-hi o no reacció, i que són impulsats de forma contínua.
- **Tècniques FIA de gradient:** La majoria de les tècniques FIA es fonamenten, com ja s'ha dit anteriorment, en la mesura de l'alçada del pic o de la seva àrea. Les tècniques de gradient utilitzen la informació que proporciona la resta del fiagrama. Utilitzen mesures realitzades abans o després del temps de residència, aprofitant el gradient de concentració que es forma entre la mostra i el portador.

En aquest treball en concret s'utilitza una tècnica de FIA primari i dues tècniques FIA de gradient:

- Dilució electrònica (FIA de gradient).
- Interrupció del flux (FIA de gradient).
- Combinació de zones (FIA primari).

### Dilució electrònica

De l'anglès *electronic dilution* (Olsen i col. 1982) també anomenada dilució per gradient, aquesta modalitat de FIA es basa en el fet que una zona de mostra en dispersió, a mesura que viatja a través del detector, ofereix un nombre infinit de relacions mostra/reactius o mostra/portador. D'aquesta manera, realitzant mesures a temps superior al temps de residència tindrem mesures a diferents dilucions.



*Figura 3.1.4: Gradient de concentracions en el fragment de mostra*

Aquesta modalitat, però, té les seves limitacions quan al procés normal de transport s'hi afegeix un procés químic. Per tal de no perdre la linealitat cal que es compleixin les següents condicions (Olsen i col. 1982):

- El detector ha de respondre de forma lineal a la concentració de l'espècie que es mesura.
- No s'han de donar efectes d'inhibició causat per productes o altres components de la reacció.
- Cal que ho hagi un excés de reactius en l'element de fluid considerat.

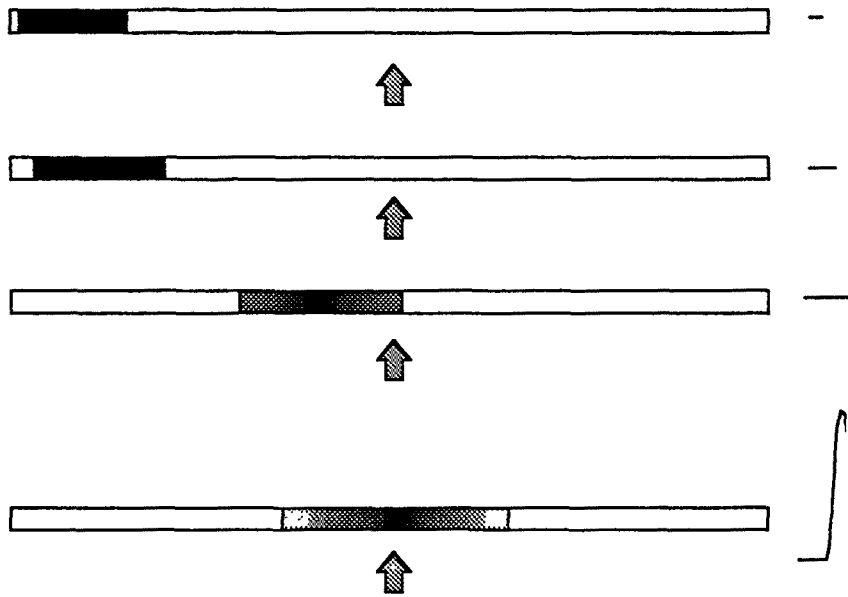
Aquesta tècnica s'utilitza bàsicament per evitar una dilució prèvia d'aquelles mostres amb una concentració excessivament elevada, simplificant d'aquesta forma l'esquema del FIA.

### **Interrupció del flux**

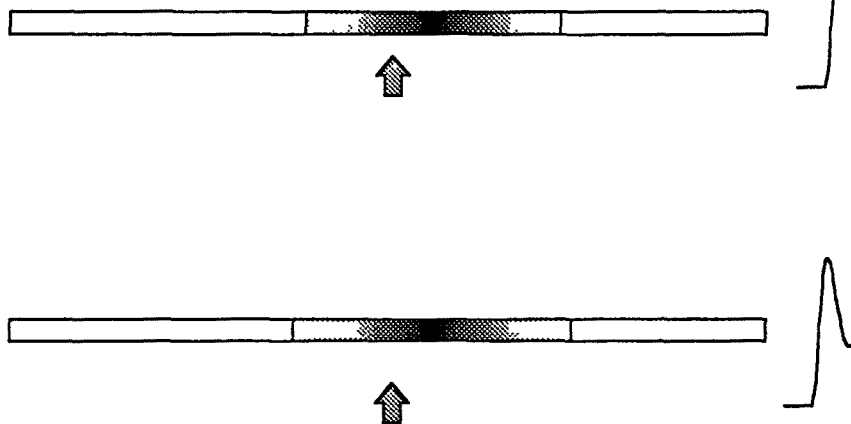
De l'anglès *stop-flow*. Aquesta tècnica es basa en la interrupció del flux després del màxim del senyal. Un cop interromput el flux es segueix l'evolució de la reacció monitoritzant de forma contínua el senyal del detector (figura 3.1.5).

Va ser utilitzada per primera vegada per Ruzicka el 1981, per a la determinació d'alcohol en sang (Worsfold i col. 1981). Més tard el mateix autor utilitzà el mateix mètode per a la determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa (Olsen i col. 1982).

Injecció / Bomba en marxa



Mesura d'activitat / Bomba aturada



Neteja del sistema / Bomba en marxa



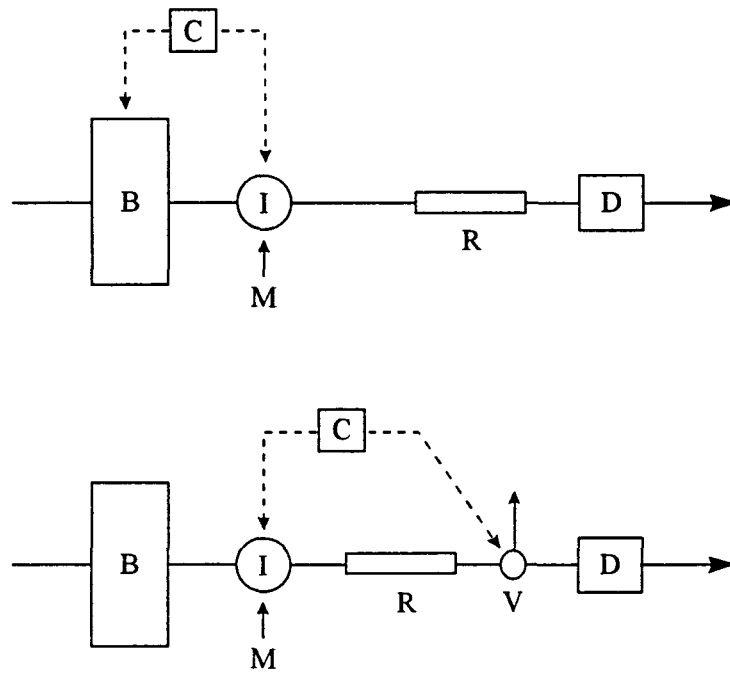
Figura 3.1.5: Esquematzació del funcionament de la tècnica d'aturada de flux.

Des d'aleshores, aquesta tècnica ha estat poc utilitzada per a la determinació d'activitats enzimàtiques. De fet, deu anys més tard, el mateix Ruzicka recordava que la tècnica del flux aturat era una modalitat de FIA infrautilitzada (Ruzicka 1992). En aquest mateix article Ruzicka detalla els principals avantatges d'aquesta metodologia:

- En aturar el flux, aturem la dispersió, mentre continua la reacció química, augmentant d'aquesta manera la sensibilitat del mètode, ja que reactius i reactants ja no es dilueixen més.
- Es disminueix el consum de reactius.
- La zona de mostra escollida queda aturada en la cel·la de flux, fent possible la mesura de velocitats de reacció.
- L'aturada del flux pot realitzar-se de dues maneres:
  - Aturant la bomba (figura 3.1.6a). La interrupció del flux es realitza per aturada de la bomba. Es requereix algun tipus de control automàtic (C) sobre la bomba i la vàlvula d'injecció, per obtenir resultats fiables.
  - Desviant el flux amb una vàlvula (figura 3.1.6b). La interrupció del flux es realitza desviant el flux un cop la mostra ha arribat al detector. En aquest cas a més a més del control automàtic (C), es necessita una vàlvula de tres vies. Un inconvenient d'aquest sistema és que si el portador és una mescla de diferents fluxos hi ha una despesa més elevada de reactius.

Sigui quina sigui la forma d'aturar el flux a la cel·la, la utilització d'aquesta modalitat FIA complica lleugerament el sistema, des del moment que és necessari utilitzar algun tipus de controlador per engegar i aturar la bomba, o per activar la vàlvula. La reproductibilitat dels valors obtinguts, dependrà en bona mesura de la precisió amb què es pot actuar sobre la bomba o la vàlvula. Per tant, per obtenir el màxim de precisió es fa necessària la utilització d'un ordinador que controli aquest procés, a la vegada, s'utilitzarà per a l'adquisició de les dades i per al càlcul de l'activitat.

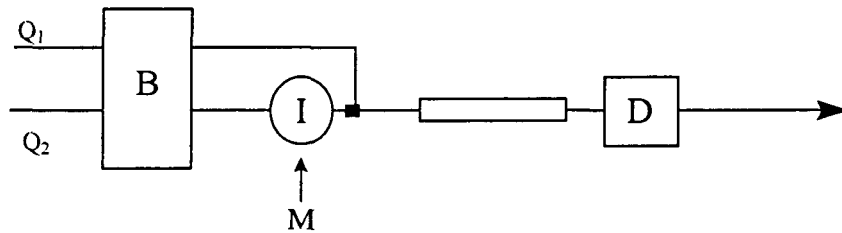
---



**Figura 3.1.6:** (a) Aturada de flux per aturada de la bomba. (b) Aturada de flux per desviació amb una vàlvula.

**Combinació de zones**

De l'anglès *merging zones* (Olsen i col. 1982). Hem vist que es forma un gradient de concentració al llarg del fragment de mostra, que afecta tant als reactius com a la mostra en si. Per tant, on tinguem màxima concentració de mostra tindrem mínima concentració de reactius. En determinades ocasions, pot ser necessari mantenir la mateixa concentració de reactius al



**Figura 3.1.7:** Sistema FIA amb combinació de zones.

llarg del fragment de mostra, això s'aconsegueix injectant la mostra en un portador inert i afegint els reactius necessaris via un flux lent, constant i convergent amb l'anterior (figura 3.1.7).



## ② MESURA DEL pH i EL pO<sub>2</sub>

El pH i l'oxigen dissolt són dues variables del sistema que ens poden aportar informació, alhora que ens interessa controlar-les. El pH d'un medi en què està creixent un microorganisme tendeix a variar amb les etapes de creixement. El pH òptim de creixement del fong *Trametes versicolor* és al voltant de 4.5, així mateix l'activitat dels enzims que es produeixen dependrà del pH del medi. Ens interessa, doncs, en el cas del pH poder mesurar i controlar el seu valor.

### Materials i mètodes

L'ordinador utilitzat (Sanyo 8088) es va equipar amb una targeta d'adquisició de dades PC-MultiLab Card model PCL-711B, amb vuit entrades analògiques, una sortida analògica, un canal de 16 bits d'entrada digital TTL compatible i un canal de 16 bits de sortida digital TTL compatible.

El pH es va mesurar amb un controlador/mesurador de pH Crison model Industrial 252, amb una sonda de pH Ingold model 465-50-57. Es va utilitzar NaOH 0.1 M i HCl 0.1 M per mantenir el pH al valor predeterminat.

L'oxigen dissolt es va mesurar amb un mesurador Ingold model 170, amb una sonda d'oxigen Ingold.

### Programari

Per al monitoratge del sistema es va realitzar un programa en QuickBasic 4.5 de Microsoft, sota l'entorn MS-DOS.

El programa desenvolupat és estructurat en diferents menús, que més endavant, en realitzar el programari per al FIA, permet ampliar fàcilment l'estructura, enllaçant uns menús amb altres. Inicialment es desenvoluparen, doncs, els programes necessaris per permetre l'adquisició de les dades provinents de les sondes de pH i pO<sub>2</sub> (Apèndix 1).

Previ a l'inici de qualsevol experiment és necessari calibrar les sondes de pH i pO<sub>2</sub>. Independentment al calibratge dels aparells, cal que l'ordinador pugui convertir els valors de voltatge que està rebent en valors de pH i pO<sub>2</sub>. Així, al mateix temps que es calibren els aparells de forma manual, l'ordinador mesura els voltatges a pH 7 i 4 i a pO<sub>2</sub> 100% i calcula la seva recta de calibratge. També s'han de calibrar abans d'iniciar l'experiment els cabals de les bombes d'addició d'àcid i àlcali. Després de realitzar el calibratge de les sondes i les bombes, es crea el fitxer d'adquisició i el programa inicia l'adquisició de dades

El programa presenta cada segon en pantalla els valors adquirits i convertits ja a mesures de pH i pO<sub>2</sub>. Cada un dels valors presentats suposa la mitjana de 10 valors adquirits. Tenim doncs una freqüència de mostratge de 10 mesures/seg. Dels valors obtinguts se'n fa també una representació gràfica, que mostra en pantalla els valors de les últimes 24 h, actualitzant-se cada 6 minuts. Els valors obtinguts es guarden al fitxer de dades cada 10 minuts. En cas reinicialització de l'ordinador (aturada elèctrica), el programa s'inicia automàticament a l'engegar-se l'ordinador, llegint el fitxer de les dades adquirides i presentant en pantalla el gràfic de les dades obtingudes les últimes 24 h.

### Maquinari

El mesurador de  $pO_2$  (figura 3.2.1, n° 4) i el pH (n°1) disposen cada un d'ells d'un senyal de sortida analògic entre 4-20 mA; és necessari, doncs, utilitzar una resistència (220

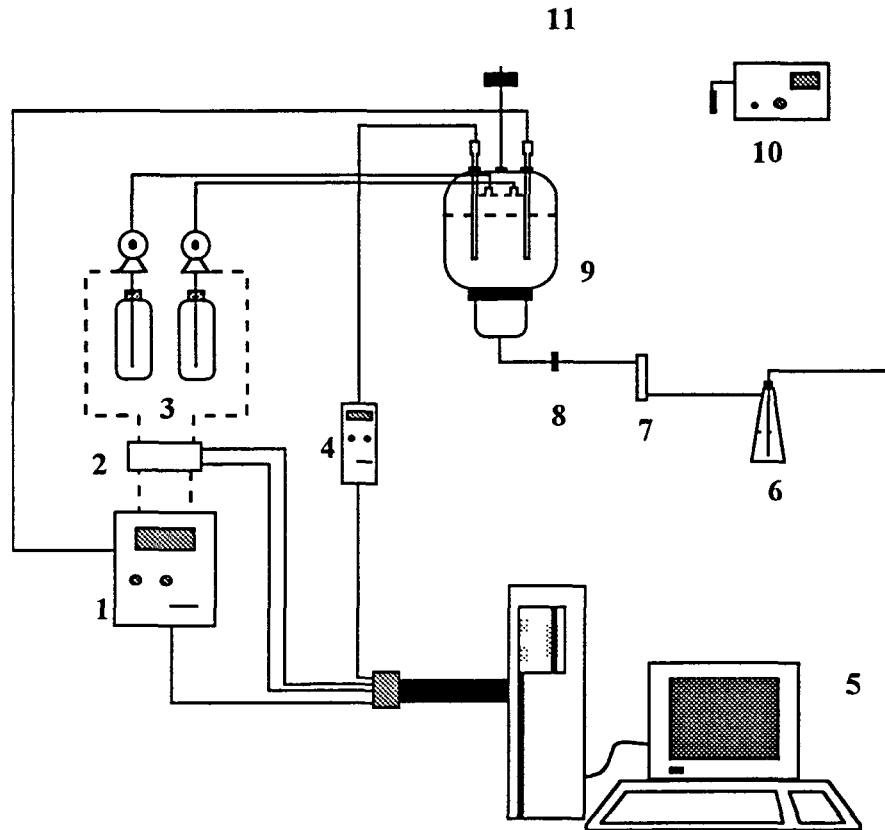


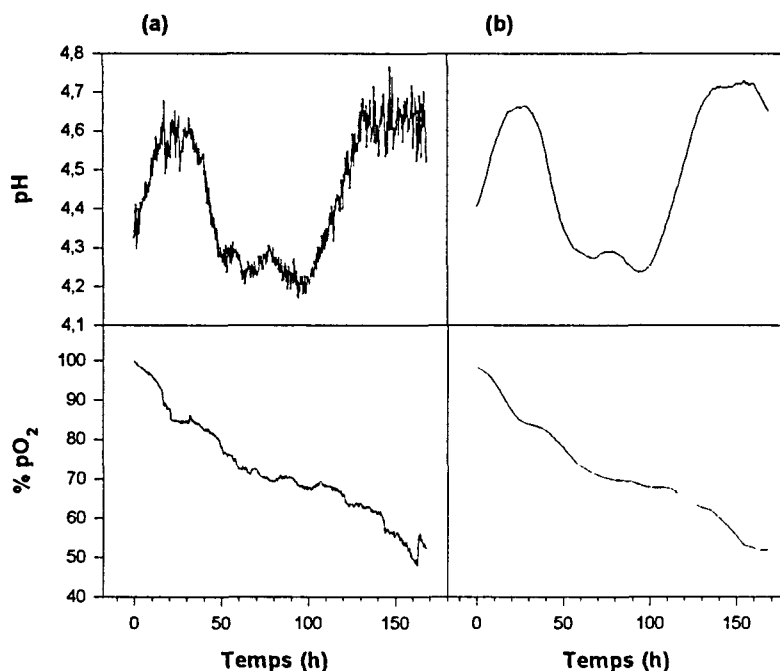
Figura 3.2.1: Esquema del muntatge experimental.

Ohms) per convertir la variació de la intensitat en variació de voltatge i poder-lo convertir posteriorment en un senyal digital.

Per tant, les connexions utilitzades entre els aparells i l'ordinador (5) seran a través de la targeta d'adquisició de dades, mitjançant els canals d'entrada analògica.

Per determinar el volum d'àcid o base (3) afegits, s'utilitzen els canals d'entrades digitals. Mitjançant dos relés (2), que s'obren o tanquen segons si les bombes estan en funcionament o no i, per tant, l'ordinador rep o no un senyal digital, es pot quantificar el temps que les bombes estan en funcionament i, per tant, mesurar el volum d'àcid o àlcali afegits.

El reactor (9) està situat en una cambra termostatitzada a  $23^{\circ}C$  (11) que és la temperatura òptima del procés; el controlador de temperatura (10) tant pot actuar sobre un calefactor com sobre un aparell d'aire condicionat per mantenir la temperatura. Anterior a l'entrada de l'aire al reactor hi trobem un filtre (8), un rotàmetre (7) i un flascó (6) per humidificar l'aire d'entrada i reduir les pèrdues per evaporació.



**Figura 3.2.2:** Evolució del pH i el  $pO_2$  obtinguts amb el sistema descrit anteriorment. (a) Dades adquirides. (b) Dades filtrades.

El sistema es va posar a punt realitzant un experiment amb lleixius negres i el fong *Trametes versicolor*, en forma de pèl·lets en un reactor tipus llit fluiditzat. Les característiques del procés (inoculació, medi, etc.) són les assenyalades en el Capítol 2 per als experiments amb llit fluiditzat..

En la figura 3.2.2 es presenta l'evolució de les dades obtingudes en realitzar l'esmentat experiment. En les gràfiques de la columna (a) es presenten les dades tal com són emmagatzemades al fitxer. Per millorar la imatge dels valors obtinguts, tot i que s'aprecia clarament la tendència dels dos paràmetres, les dades es filtren mitjançant un filtre de pas variable. Es pot apreciar a la columna (b) com es redueix considerablement el soroll de fons, sense perdre les tendències de les corbes.

S'obté doncs un muntatge experimental base (ordinador i sistema d'adquisició de dades) sobre el qual realitzar els experiments, que s'anirà ampliant i millorant al llarg del treball.

## ③ ANÀLISI AUTOMATITZADA DE L'ACTIVITAT LACASA

### MATERIALS I MÈTODES

#### Components del sistema FIA

Els materials utilitzats per al muntatge de les línies del FIA han estat tubs de tipus PTFE de 0.8 mm de diàmetre intern, amb connexions de polipropilè.

Per a la mesura de l'absorbància s'utilitzà un espectrofotòmetre UV/visible d'Unicam sèrie 8625, equipat amb un port RS-232 i una sortida analògica. Es va utilitzar una cel·la de flux, de quars, d'1 cm de pas de llum i un volum de 30 µl. La cel·la estava situada en un suport termostatitzat per aigua. Un bany extern mantenia la temperatura desitjada.

Una bomba multicanal Gilson Minipuls 2 fou utilitzada per impulsar el portador i els reactius. La bomba s'engegava i s'aturava des de l'ordinador a partir d'un senyal TTL. La injecció de la mostra es realitzà amb una vàlvula d'injecció automàtica d'Omnifit, que disposa d'una entrada de senyal de tipus TTL compatible que permet el seu control des d'un ordinador.

#### Maquinari i programari

L'adquisició de dades i el control del sistema FIA eren gestionats per un ordinador personal Norgate 80286, IBM compatible. Es va utilitzar una placa PC-MultiLab Card model PCL-711B com a convertidor analògic/digital.

L'error en la lectura analògica comès per la placa al adquirir les dades de l'espectrofotòmetre es del 0.03%.

Per al control i monitoratge del sistema es va realitzar un programa en QuickBasic 4.5 de Microsoft, sota l'entorn MS-DOS. El funcionament del programa i la implementació pràctica es comentarà més endavant, un cop s'hagi explicat el funcionament del FIA.

#### Mesura del volum d'injecció

El volum de mostra injectada no correspon únicament al volum del *loop* utilitzat, sinó que cal tenir en compte el volum intern de la vàlvula d'injecció. Per determinar el volum real d'injecció es va utilitzar un mètode de valoració àcid/base.

Es va estandarditzar una solució de NaOH 0.1 M (valor teòric) amb biftalat potàssic i es va obtenir un valor real de concentració de 0.0997 M. Amb aquesta solució de NaOH es va estandarditzar una solució d'HCl 1 M (valor teòric), i es va obtenir una concentració de 0.9896 M.

Volum de NaOH (ml)	Volum d'injecció (µl)
9.1	91.7
9.8	98.7
8.9	89.6

Taula 3.3.1: Mesura del volum d'injecció.

Es van realitzar deu injeccions de la solució d'HCl, utilitzant com a portador aigua destil·lada. La solució recollida es va valorar amb la solució d'NaOH estandarditzada. Es van realitzar tres tandes de 10 injeccions. Els valors que es van obtenir es presenten a la taula 3.3.1.

Fent la mitjana es determina el volum d'injecció en 93.7  $\mu$ l.

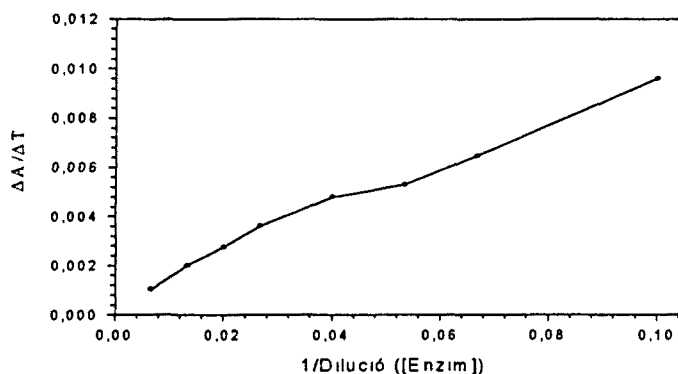
## ANÀLISI DEL MÈTODE CONVENCIONAL

Ens referirem a partir d'ara al *mètode convencional* de detecció de la lacasa com a la metodologia explicada en el Capítol 2 per a la detecció d'aquest enzim, i al *mètode FIA* com al mètode de determinació de l'activitat lacasa mitjançant la tècnica FIA.

Per obtenir un valor d'activitat, només cal tenir el sistema FIA ben calibrat, de manera que els resultats siguin reproduïbles. En aquest cas cal mantenir constants el cabal i els diferents temps d'aturada. D'aquesta manera obtindriem un pendent que relacionariem directament amb l'activitat. El valor obtingut, però, no podria comparar-se amb altres valors obtinguts anteriorment, ja que s'utilitzarien mètodes diferents per mesurar l'activitat. Per aquest motiu es va realitzar una correlació entre els dos mètodes, el convencional i el proposat mitjançant la tècnica FIA.

Abans de trobar les equacions de correlació entre el mètode convencional i el mètode FIA, és necessari realitzar un petit estudi del mètode convencional, per determinar a quins rangs de concentració d'enzim a la cubeta hem de treballar i quin és l'error d'aquesta metodologia.

En la figura 3.3.2 es mostren els resultats obtinguts, a partir d'una mostra amb activitat 1400 UA, en representar diferents dilucions de la mostra (és a dir, diferents concentracions d'enzim) enfront de la velocitat inicial obtinguda. S'obté una representació amb una tendència lineal, els punts que es desvien poden considerar-se errors experimentals. Per assegurar que treballarem en una zona lineal, es decideix diluir la mostra de manera que el pendent obtingut sigui entre els valors  $5 \cdot 10^{-3}$  i  $2 \cdot 10^{-3}$ . En la mostra analitzada això suposa dilucions entre 18 i 50 vegades.



**Figura 3.3.1:** Representació de la concentració d'enzim, enfront de l'activitat enzimàtica, mesurada com un pendent.

Es va determinar l'error del mètode convencional a partir de l'estudi de 12 mostres de diferents activitats, realitzats per triplicat, obtenint-se un error del 4%.

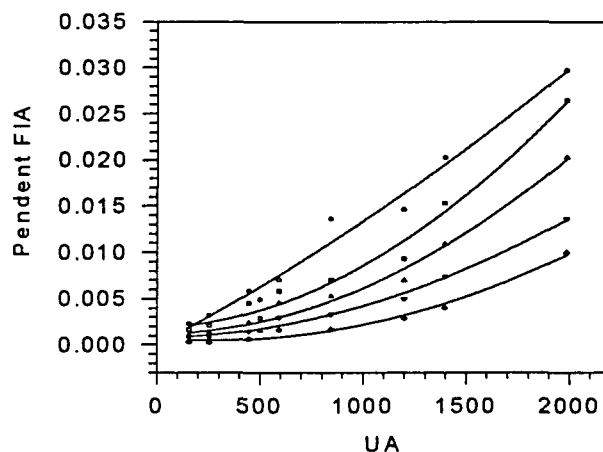
## FIA AMB LACASA COMERCIAL

Inicialment es va intentar obtenir una correlació entre l'activitat obtinguda pel mètode convencional i l'activitat obtinguda pel mètode FIA, utilitzant una lacasa comercial. La lacasa utilitzada fou subministrada per Sigma i procedia d'un cru de *Pyricularia oryzae*. S'intentava d'aquesta forma obtenir una solució d'enzim més purificada que la que podíem obtenir nosaltres sense realitzar purificacions del medi de creixement.

En la figura 3.3.2 es representen les gràfiques obtingudes als diferents temps d'aturada assajats. No s'explica amb detall com varen ser obtingudes, ja que el procediment és el mateix que s'utilitzarà més endavant per obtenir la correlació amb la lacasa obtinguda per *Trametes versicolor*.

Com es pot comprovar en els gràfics, els punts obtinguts presenten certa dispersió, i no són lineals, com en principi caldria esperar, almenys en un cert rang d'activitats. Aquests fets poden ser deguts a:

- Errors de manipulació, l'enzim es subministrava en forma de sòlid, que calia dissoldre amb aigua per realitzar l'assaig. Per tal de cobrir un marge ampli d'activitats era necessari fer dilucions de mostres concentrades.



*Figura 3.3.2: Correlacions obtingudes entre el mètode convencional i el mètode FIA proposat, treballant amb lacasa comercial.*

- Per obtenir tots els punts necessaris es van utilitzar tres vials d'enzim, corresponents a dos lots de producció diferents. Es podien comprovar a simple vista les diferències (color, textura) entre els diferents vials.
- Les corbes obtingudes poden fer pensar en la presència d'alguna substància activadora en el sòlid que conté l'enzim. De manera que en treballar a concentracions d'enzims elevades, la quantitat de sòlid necessari es més elevada i, per tant, augmenta també la quantitat d'activador, que provoca un augment irregular de l'activitat enzimàtica..

## FIA AMB LACASA DE *TRAMETES VERSICOLOR*

Vist que no es pot obtenir un calibrat raonable utilitzant lacasa comercial, es decideix fer un calibrat amb lacasa produïda durant el creixement de *Trametes versicolor* en lleixius negres.

Per tal d'obtenir lacasa suficient per poder definir una correlació entre el mètode convencional de mesura i el mètode FIA proposat, es van fer alguns creixements de *Trametes versicolor*, immobilitzat en cubs de niló. Un cop immobilitzat (vegeu Capítol 2), el creixement va realitzar en un reactor de tipus llit fix i en un medi que contenia lleixius negres. Cada dia es realitzaven anàlisis de l'activitat lacasa amb els dos mètodes, d'aquesta manera es tenien mostres a diferents activitats, sense necessitat de fer dilucions.

### Disseny del FIA

Com s'ha comentat anteriorment, els mètodes convencionals FIA es basen en la mesura de l'alçada del pic format. Aquesta tècnica únicament podria utilitzar-se per mesurar activitat enzimàtica en aquells casos en què l'enzim es trobés en un medi en què les possibles interferències no variessin amb el temps. L'efluent utilitzat en aquest estudi, és ben sabut que té un color marró fosc, que absorbeix en la longitud d'ona en la qual es realitza l'anàlisi (468 nm). Atès que com a conseqüència del creixement del fong en aquest medi el seu color pot decreixer o augmentar, ens trobem davant d'un cas en el qual la mesura del pic FIA no seria representativa únicament de l'activitat enzimàtica, ja que l'alçada del pic seria funció de dues variables, el color i l'activitat enzimàtica. És per tant necessari dissenyar un sistema FIA utilitzant la tècnica de l'aturada del flux. Amb aquesta tècnica, un cop aturat el flux, l'evolució del senyal obtingut correspondrà a una recta, el pendent de la qual estarà relacionat amb l'activat enzimàtica.

Hem vist, però, que utilitzant la tècnica de l'aturada de flux únicament podem mesurar l'activitat en un punt determinat, però si combinem la tècnica de l'aturada de flux amb la dilució electrònica, aturant el flux a diferents temps després de la injecció, tindrem diferents relacions mostra/portador i, per tant, diferents dilucions de l'enzim. Com més elevat sigui el temps d'aturada major serà la dilució de l'enzim (figura 3.3.4b).

Es dissenyà un sistema on l'aturada del flux es realitzà per aturada de la bomba. Es disposava d'una bomba que no permetia el control des de l'ordinador, calia doncs realitzar una interfície que permetés aturar i engegar la bomba a un senyal de l'ordinador (vegeu Apèndix 4). Al mateix temps es realitza un programa d'adquisició de les dades procedents de l'espectrofotòmetre que, a més, acompanyat de diferents modificacions en el maquinari, pot controlar l'espectrofotòmetre (canvi de longitud d'ona, fer el zero, ...), engegar i aturar la bomba i injectar la mostra. El funcionament del programa, ja adaptat a realitzar les mesures de forma automàtica, es comentarà més endavant; el seu llistat es troba a l'Apèndix 1.

Per tal de poder combinar les tècniques d'aturada de flux i de dilució electrònica, és necessari que la concentració de substrat (DMP) sigui la mateixa en tots els segments del fragment de mostra. D'aquesta manera en aturar el flux a diferents temps, l'únic que variarà serà la concentració de l'enzim. Per aconseguir-ho, és necessari introduir el DMP al sistema després de la injecció de la mostra.

En la figura 3.3.3 es mostra la representació gràfica del FIA, on es poden observar les diferents connexions a l'ordinador (O), representades per línies discontinües i els tubs FIA representats per línies contínues. Q<sub>1</sub> representa la línia de flux de la solució de DMP amb tampó

malonat, propulsada amb la bomba peristàltica (B) a un cabal de 2.8 ml/min, Q<sub>2</sub> representa la línia de flux del portador (tampó malonat) a un cabal de 2.8 ml/min. L representa la llargada del tub (reactor) entre la vàlvula d'injecció (I) i el detector (D) que és de 102 cm. Tant la cel·la de flux del detector com les solucions de reactiu i portador es mantenen a 30°C amb el bany termostatitzat (T).

Per engegar o apagar els aparells (espectrofotòmetre, bany termostatitzat i bomba) s'utilitzen les sortides digitals que mitjançant un relé deixen passar o no corrent cap als aparells. La vàlvula d'injecció també es controla amb les sortides digitals. Per adquirir les dades de l'espectrofotòmetre s'utilitza una entrada analògica i la comunicació amb l'espectrofotòmetre es fa via comunicació amb el port RS-232.

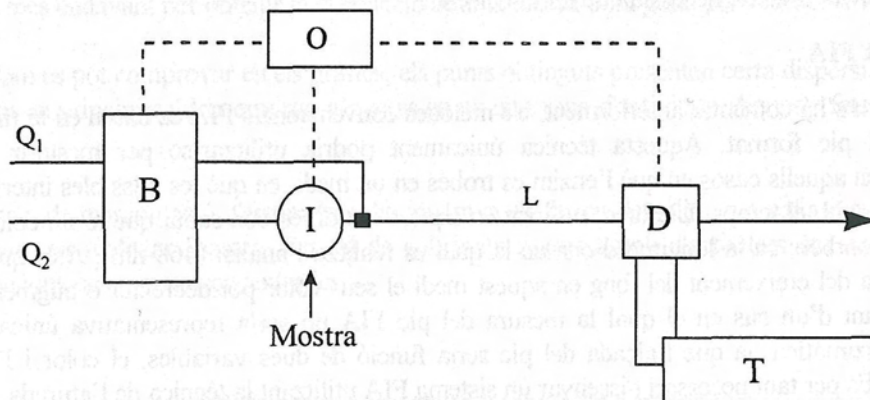


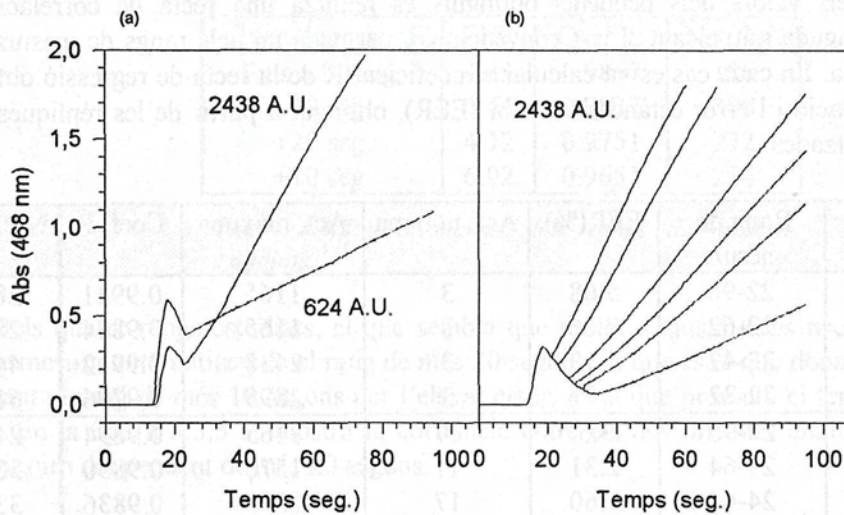
Figura 3.3.3: Esquema del FIA de mesura d'activitat lacasa.

### Influència de les interferències

Les diferents mostres d'aigua residual utilitzades per fer la correlació entre els dos mètodes tenien color diferent. Això va permetre comprovar que, efectivament, utilitzant la tècnica de l'aturada de flux el color no interferia en la mesura de l'activitat.

Es pot comprovar en la figura 3.3.4a que l'alçada del pic no és proporcional al pendent obtingut després de l'aturada del flux (activitat), així la mostra amb el pic més elevat correspon a la de menor activitat. La diferència en l'alçada del pic és doncs deguda al color de la mostra. Per tant, la variació en el color de la mostra al llarg del procés no afectarà a la mesura de l'activitat de la lacasa.





**Figura 3.3.4:** (a) Variació de l'alçada del pic en funció del color de la mostra i l'activitat enzimàtica. (b) Variació del pendent en variar el temps d'aturada.

### Obtenció de la correlació entre les dues metodologies

Amb les mostres obtingudes del reactor es mesurava primer l'activitat amb el mètode convencional, tenint cura que el valor de pendent obtingut quedés dins els marges de linealitat comentats anteriorment i, per tant, realitzant les dilucions que fossin necessàries. Seguidament es realitzaven les punxades al FIA.

Es varen seleccionar set temps d'aturada diferents, que cobreixen un bon rang de dilucions. Els temps seleccionats foren: 19, 21, 24, 26, 28, 30 i 32 segons després de la injecció. Tots ells corresponen a la zona posterior al temps de residència, essent 19 segons el temps més proper al màxim del pic i, per tant, el de major concentració d'enzim. Cada mostra, obtinguda del reactor, fou analitzada per triplicat a cadascun dels temps d'aturada seleccionats.

Inicialment es va utilitzar un temps total d'anàlisi de 95 segons. Per tal d'optimitzar el temps de l'assaig, cal determinar el valor del pendent a diferents rangs de temps, després de l'aturada del flux. Es varen escollir els següents rangs de mesura:

- 3 segons després del temps d'aturada i fins als 90 segons.
- 3 segons després del temps d'aturada i més 40 segons.
- 3 segons després del temps d'aturada i més 20 segons.
- 3 segons després del temps d'aturada i més 10 segons.

Amb els valors dels pendents obtinguts es realitzà una recta de correlació amb l'activitat obtinguda mitjançant el test convencional, per cada un dels rangs de mesura i dels temps d'aturada. En cada cas es va calcular el coeficient R de la recta de regressió obtinguda en fer la correlació i l'error estàndard relatiu (EER), obtingut a partir de les rèpliques de les injeccions realitzades.

T. aturada (seg.)	Rang de mesura	EER(%)	Act. mínima	Act. màxima	Coef. R	Nre.Inj
19	22-90	5.08	3	1165	0.9921	28
19	22-62	7.06	3	1165	0.9844	28
19	22-42	5.13	3	2438	0.9912	44
19	22-32	4.87	3	2895	0.9796	61
21	24-90	3.5	17	1165	0.9894	24
21	24-64	2.31	17	1576	0.9850	30
21	24-44	3.60	17	2895	0.9836	33
21	24-34	7.11	17	3507	0.9778	38
24	27-90	5.35	95	1576	0.9517	22
24	27-67	3.62	95	2895	0.9839	26
24	27-47	4.70	95	3507	0.9835	33
24	27-37	7.21	95	3507	0.9699	33
26	29-90	3.86	95	2438	0.9845	25
26	29-69	4.19	95	3507	0.9701	32
26	29-49	39.59	95	3507	0.9842	32
26	29-39	6.44	95	3507	0.9701	32
28	31-90	4.62	249	2895	0.9922	26
28	31-71	4.56	249	3507	0.9941	29
28	31-51	3.37	249	3507	0.9821	29
28	31-41	5.03	249	3507	0.9646	29
30	33-90	3.32	249	3507	0.9732	29
30	33-73	3.73	249	3507	0.9696	29
30	33-53	3.82	249	3507	0.9629	29
30	33-43	5.54	249	3507	0.9439	29
32	35-90	5.33	337	3507	0.9828	32
32	35-75	5.65	337	3507	0.9772	32
32	35-55	4.69	337	3507	0.9385	32
32	35-45	5.94	337	3507	0.9529	32

Taula 3.3.1: Descripció dels diagrames utilitzats per obtenir la correlació.

En la taula 3.3.1 es poden veure els resultats obtinguts de l'anàlisi dels diagrames de les mostres injectades, així com el nombre d'injeccions vàlides per a cada cas. Com que per adquirir els valors d'absorbància des de l'ordinador s'utilitzava la sortida analògica de l'espectrofotòmetre (0-1 Volts) i aquesta ens permet un valor màxim d'activitat de 2 unitats d'absorbància, s'ha afegit també el rang d'activitats que pot ser mesura per cada rang escollit.

Si agrupem les dades de la taula 3.3.1 segons el rang de mesura, obtenim un EER i un coeficient R mitjans, que ens permetran decidir quin és el rang de mesura òptim.

Rang de mesura	EER	Coef. R	Nre. Inj
Fins a 90 seg.	4.43	0.9857	186
+40 seg.	4.44	0.9827	206
+20 seg.	4.12	0.9751	232
+10 seg.	6.02	0.9651	254

Taula 3.3.2: Paràmetres dels rangs de mesura estudiats.

Dels quatre rangs estudiats, el que sembla que millor s'ajusta a les necessitats d'un mètode de mesura automatitzat és el rang de més 20 segons, ja que és el que dona menys error i, descartant el rang de més 10 segons per l'elevat error, és el que presenta el temps d'anàlisi més curt. En la figura 3.3.5 es mostra la correlació entre els dos mètodes analitzats, per un rang de mesura del pendent de més 20 segons.

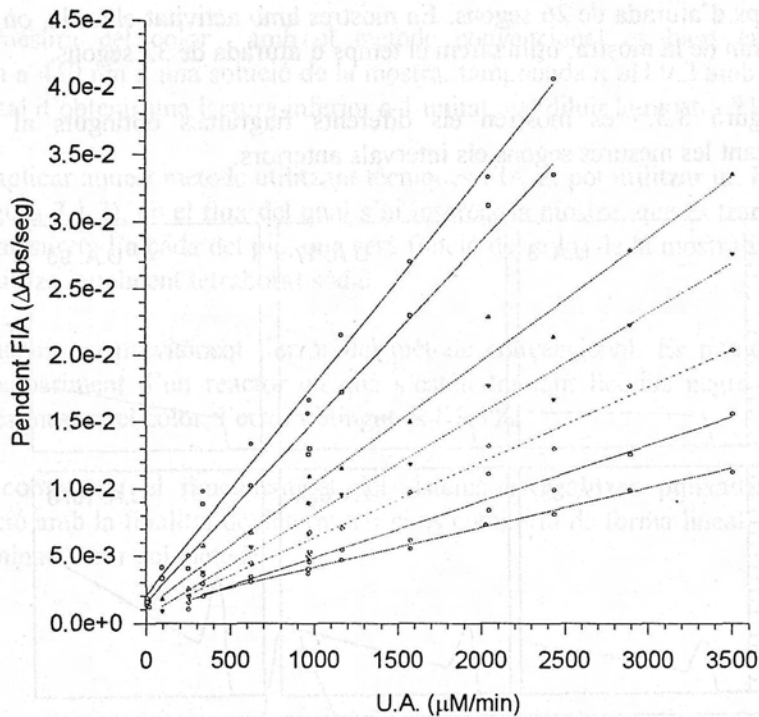


Figura 3.3.5: Rectes de calibratge obtingudes amb lacasa de *Trametes versicolor*, entre el mètode convencional i el mètode proposat per FIA.

Les equacions de les rectes de correlació obtingudes es venen descrites segons paràmetres de la taula 3.3.3.

Temps d'aturada	Coefficient R	Ordenada a l'origen	Pendent
19 segons	0.99122	0.00209	$1.56 \cdot 10^{-5}$
21 segons	0.98362	0.00112	$1.36 \cdot 10^{-5}$
24 segons	0.98350	0.00127	$9.2 \cdot 10^{-6}$
26 segons	0.98424	0.000531	$7.53 \cdot 10^{-6}$
28 segons	0.98209	0.000733	$5.61 \cdot 10^{-6}$
30 segons	0.96293	0.000645	$4.19 \cdot 10^{-6}$
32 segons	0.93854	0.000823	$2.82 \cdot 10^{-6}$

Taula 3.3.3: Paràmetres característics de les rectes de correlació.

Per determinar l'activitat d'una mostra no cal fer l'anàlisi a cada un dels temps d'aturada; segons l'activitat de la mostra, aturarem el flux a un temps determinat. Per a activitats baixes (fins a 250 U.A.), utilitzarem el temps d'aturada de 19 segons, ja que és el que dona més sensibilitat. En mostres amb una activitat prevista entre 250 i 2000 UA utilitzarem el temps d'aturada de 26 segons. En mostres amb activitat elevada, on necessitem una dilució més gran de la mostra, utilitzarem el temps d'aturada de 32 segons.

En la figura 3.3.5 es mostren els diferents fiagrames obtinguts al llarg d'un tractament, realitzant les mesures segons els intervals anteriors.

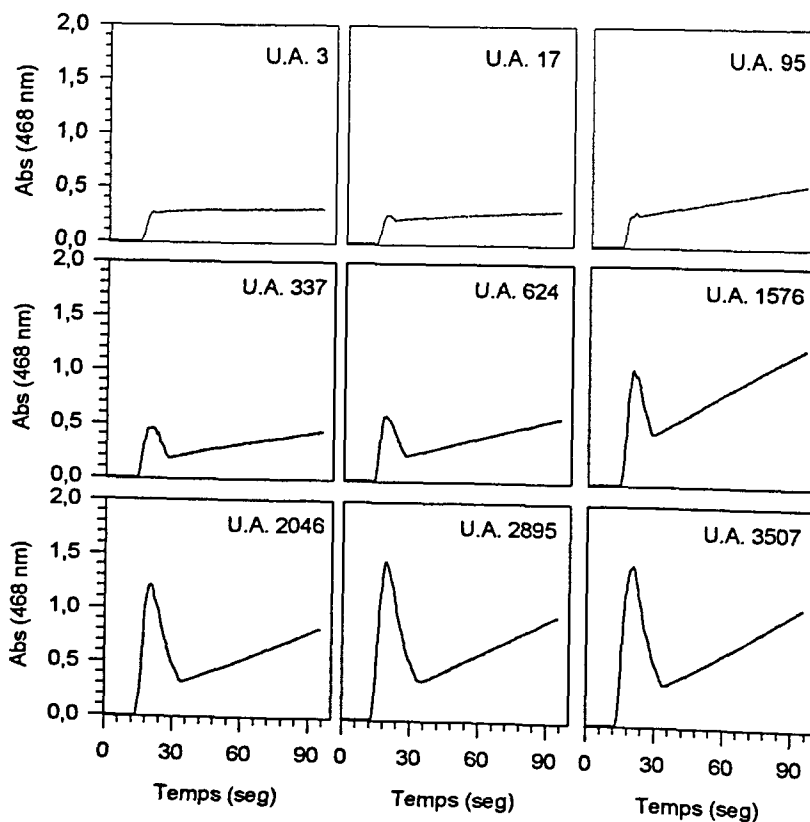


Figura 3.3.5: Fiagrames obtinguts a diferents temps d'aturada i a activitats diferents.

## ④ FIA DE COLOR I COMPOSTOS AROMÀTICS

Un cop dissenyat el FIA de l'activitat lacasa, ens proposarem mesurar el color i els compostos aromàtics, utilitzant el mateix sistema FIA dissenyat. Això vol dir que hi ha certes variables del sistema que no poden modificar-se, com són:

- Llargada del reactor.
- Velocitat de la bomba.
- *Loop* d'injecció.

La variació de qualsevol d'aquests paràmetres suposaria haver de tornar a repetir el calibratge del FIA de lacasa.

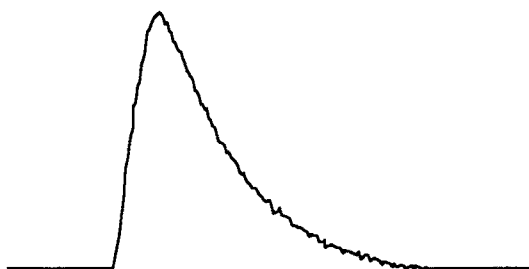
### MESURA DEL COLOR

La mesura del color amb el mètode convencional es basa en la lectura de l'absorbància a 440 nm d'una solució de la mostra, tamponada a pH 9.2 amb tetraborat sòdic 0.02 M. Per tal d'obtenir una lectura inferior a 1 unitat, cal diluir la mostra 21 vegades.

Per aplicar aquest mètode utilitzant tècniques FIA es pot utilitzar un FIA senzill, d'un sol canal (figura 3.1.3), en el flux del qual s'hi insereix la mostra, que és transportada fins al detector, on mesurem l'alçada del pic, que serà funció del color de la mostra injectada. Com a portador s'utilitza igualment tetraborat sòdic.

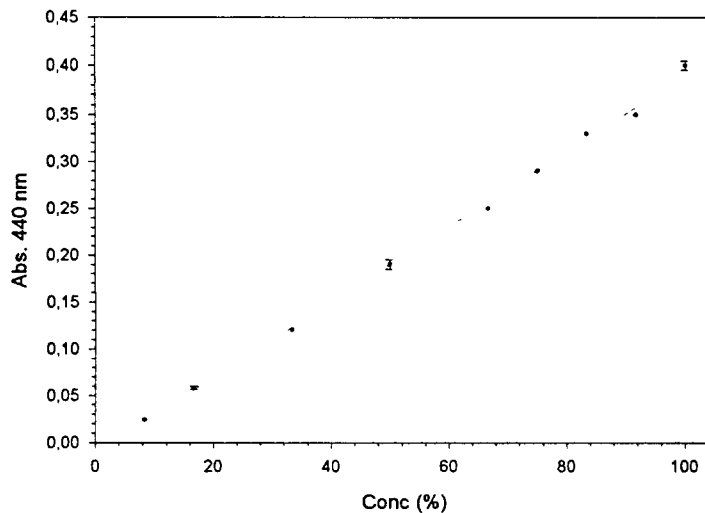
Es determina prèviament l'error del mètode convencional. Es prenen 10 mostres a l'inici d'un experiment d'un reactor en què s'estan tractant lleixius negres amb *Trametes versicolor* i es mesura el color, l'error obtingut és l'1.5%.

Per comprovar el funcionament del sistema es realitzen punxades de mostres a diferent dilució amb la finalitat de determinar si es comporta de forma lineal, al mateix temps que es determina l'error del mètode.



*Figura 3.4.1: Aspecte d'un fiagrama per la mesura del color.*

El resultat ens dona una resposta lineal de l'absorbància en funció de la concentració de la mostra. Els errors obtinguts a partir de 10 injeccions cada un, mesurats en tres punts diferents, són de l'1.2% en mostres amb color elevat (mostra inicial), 2.65% quan l'absorbància es troba al voltant de 0.2 unitats i del 3% a valors baixos d'absorbància.



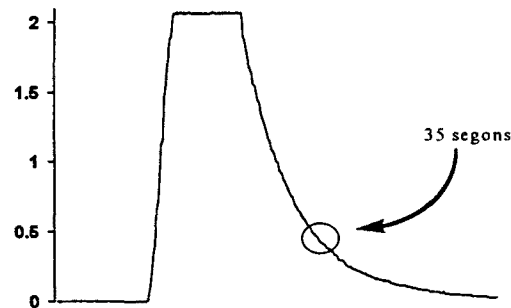
*Figura 3.4.2: Variació de l'absorbància (alçada del pic) amb la concentració de la mostra.*

## MESURA DELS COMPOSTOS AROMÀTICS

La mesura dels compostos aromàtics amb el mètode convencional es basa en la lectura de l'absorbància a 280 nm d'una solució de la mostra, tamponada a pH 9.2 amb tetraborat sòdic 0.02 M. Per tal d'obtenir una lectura inferior a 1 unitat, cal diluir la mostra 66 vegades.

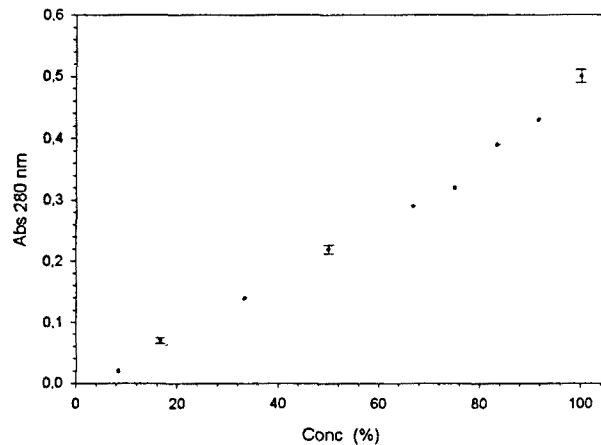
Es determina prèviament l'error del mètode convencional. Es prenen 10 mostres a l'inici d'un experiment d'un reactor en què s'estan tractant lleixius negres amb *Trametes versicolor* i es mesura l'absorbància a 280 nm, l'error obtingut és el 2.8%.

En aquest cas s'utilitza el mateix esquema de FIA que en la mesura del color, però com es pot comprovar en la figura 3.4.3, a les concentracions de mostra a què es treballa, el màxim del pic queda per sobre de les 2 unitats d'absorbància (que és el valor màxim que permet la sortida analògica utilitzada). El problema es soluciona aplicant la tècnica de la dilució electrònica, ja comentada anteriorment. És a dir, si la mesura de l'absorbància es realitza sempre a un temps determinat després de la injecció, la porció de mostra que passarà en aquell moment pel detector sempre serà la mateixa, sempre hi haurà la mateixa relació mostra/portador. Es decidí prendre com a temps de mesura 35 seg. després de la injecció, un a valor que queda cap a la cua del pic, una zona en què l'absorbància disminueix més lentament que a valors posteriors al màxim, que ens permet reduir els errors de mesura.



*Figura 3.4.3: Aspecte del diagrama obtingut en la mesura dels compostos aromàtics.*

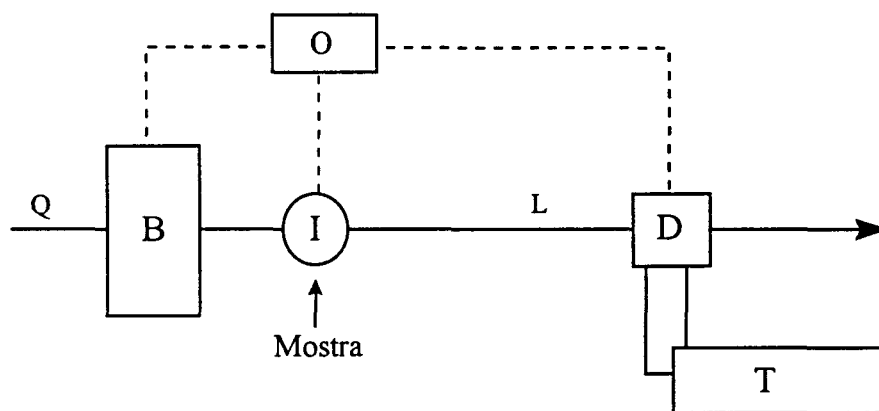
Igual que en el FIA de color, en aquest cas també es comprova la linealitat del valor d'absorbància amb la concentració de la mostra, així com els errors obtinguts, que varien entre 2.1% per a valors d'absorbància elevada i 6.3% per a valors de baixa absorbància.



*Figura 3.4.4: Variació de l'absorbància (mesura a 35 seg.) amb la concentració de la mostra.*

## FIA COMBINAT PER A LA MESURA DEL COLOR I ELS COMPOSTOS AROMÀTICS

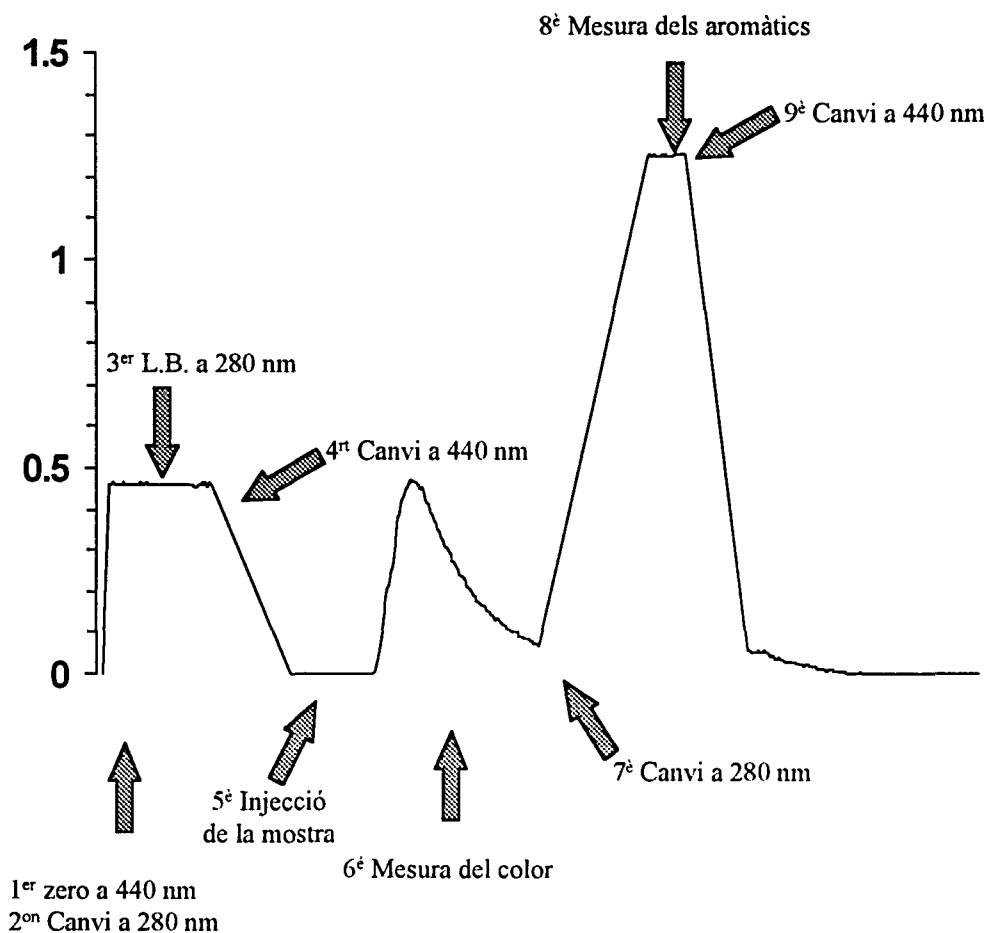
Atès que amb el muntatge experimental utilitzat es podia variar la longitud d'ona de l'espectrofotòmetre, es plantejà la possibilitat d'obtenir les mesures de color i compostos aromàtics en un sol assaig. L'esquema del FIA resultant es mostra en la figura 3.4.5 El tetraborat sòdic es propulsava amb una bomba peristàltica (B) a un cabal de 2.5 ml/min. L representa la llargada del tub (reactor) entre la vàlvula d'injecció (I) i el detector (D) que era de 102 cm. Tant la cel·la de flux del detector com les solucions de reactiu i portador es mantenien a 30°C amb el bany termostatitzat (T). La bomba, la vàlvula d'injecció i el detector estaven controlats mitjançant un ordinador (O).



*Figura 3.4.5: Esquema del FIA utilitzat per a la mesura conjunta de color i compostos aromàtics.*

El procediment per poder realitzar les mesures en una sola injecció s'esquematitza en la figura 3.4.6. L'anàlisi s'inicia fent el zero a 440 nm, després es canvia a 280 nm es llegeix el valor de l'absorbància durant 14 segons i es fa la mitjana dels valors trobats, obtenint-se d'aquesta manera una línia base a 280 nm. Seguidament es torna a 440 nm i s'injecta la mostra. Es mesura l'absorbància a 440 nm, als 60 segons d'anàlisi es torna a 280 nm i es mesura durant 7 segons l'absorbància i es calcula la mitjana dels valors obtinguts a 280 nm. El valor del color vindrà donat pel màxim d'absorbància assolit a 440 nm, i el valor de concentració de compostos aromàtics es calcularà restant a la mitjana obtinguda a 280 nm el valor de la línia de base a 280 nm.

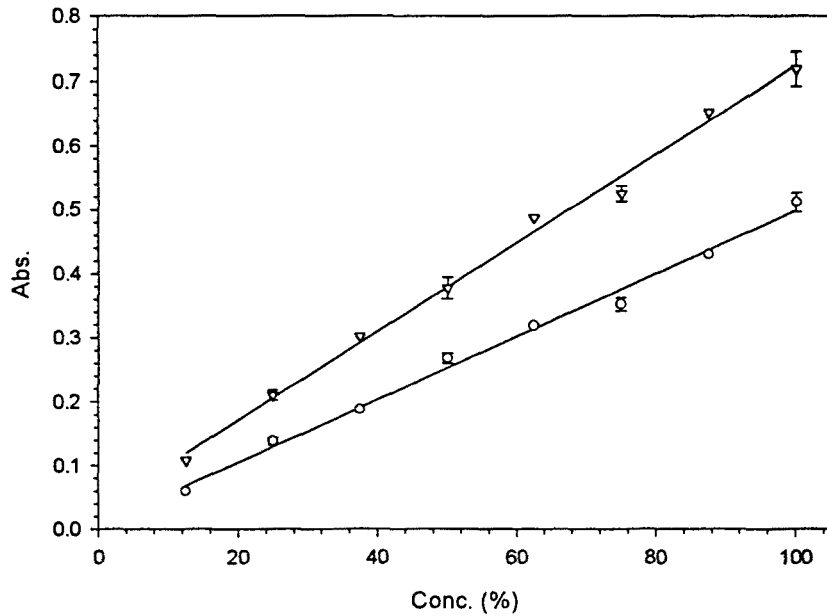




**Figura 3.4.6:** Fiagrama de la mesura combinada del color i els compostos aromàtics.

Es realitzen igualment en aquests cas les proves per mostrar la linealitat de l'assaig i determinar l'error que es comet. Les dades s'obtenen a partir de 8 mostres diferents 4 de les quals són injectades 10 vegades cada una.

Els errors obtinguts (figura 3.4.7) en el cas del color són constants al llarg del rang de concentracions estudiat, girant al voltant del 3%. Per a la mesura dels compostos aromàtics l'error és lleugerament més elevat, entre el 3.5 i el 4%. Tot i que els errors són més elevats que els obtinguts en l'assaig manual, els sistema FIA té l'avantatge de ser automàtic.



*Figura 3.4.7: Estudi dels errors i de la linealitat en el FIA combinat de color (O) i compostos aromàtics(∇).*

## ⑥ INTEGRACIÓ DEL FIA DE LACASA AMB EL DE COLOR I AROMÀTICS

Un cop automatitzades les dues anàlisis per separat, calia integrar-les en un sol sistema, per tal de poder obtenir valors en línia dels tres paràmetres. Per poder fer la integració calia afegir dos nous components al sistema d'anàlisi:

- Com que s'han de realitzar dues anàlisis diferents, i cada una utilitza els seus reactius, cal que al sistema hi arribin només els reactius de cada anàlisi. Això es pot aconseguir de dues maneres: Utilitzant una bomba per a cada anàlisi o fent servir vàlvules de tres vies per recircular els reactius que no es necessiten. S'opta per la segona opció i es dissenya un sistema de tres vàlvules de tres vies (vegeu Apèndix 6 i 7).
- Substituir la interfície per engegar i apagar la bomba per una placa de relés comercial (PCLD 885) que disposa de 16 entrades digitals, la qual cosa ens permetrà controlar diferents aparells des de l'ordinador. A aquesta placa s'hi connecten la vàlvula d'injecció, la bomba i el sistema de vàlvules (veure connexions en l'Apèndix 5).

Al mateix temps cal modificar el programari, per tal de realitzar l'anàlisi en línia. Abans, però, de realitzar les anàlisis s'ha d'executar un programa d'inicialització i neteja del



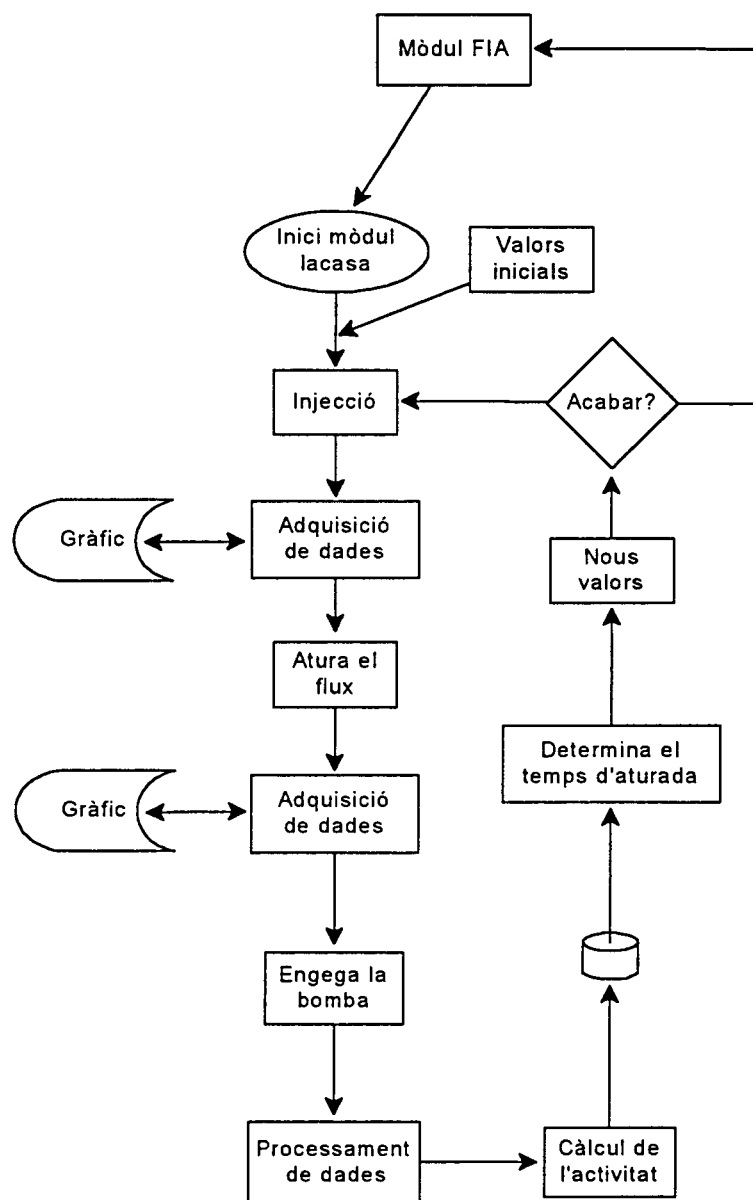


Figura 3.5.2: Diagrama de flux del funcionament del mòdul de mesura de lacasa.

El temps inicial d'aturada de flux és fixat a 19 segons, que és en la situació en què es poden detectar valors més baixos d'activitat. Per tant, la primera anàlisi que es realitza en un procés de tractament es fa a un temps d'aturada de 19 seg; a partir del valor obtingut, es determina el temps d'aturada de l'anàlisi següent segons la taula 3.5.1.

Activitat (UA)	Temps d'aturada següent anàlisi (seg)
0 - 250	19
250 - 2000	26
2000 -3500	32

*Taula 3.5.1: Càlcul del temps d'aturada segons l'activitat obtinguda.*

En el cas que en qualsevol de les mesures s'arribi a una absorbància més gran que 2 unitats, abans que hagin transcorregut els 20 segons necessaris per mesurar el pendent, es repeteix l'anàlisi, realitzant l'aturada del flux al temps d'aturada següent.

Un cop finalitzada l'anàlisi i determinat el temps d'aturada per l'anàlisi següent, es retorna el control al mòdul del FIA, que neteja el sistema, fent passar durant 10 minuts tetraborat sòdic. Seguidament, s'apaguen tots els aparells i es retorna el control al mòdul de mesura de pH i pO<sub>2</sub>, que s'iniciarà presentant en pantalla el gràfic del pH i el pO<sub>2</sub> de les últimes 24 hores, així com els valors de l'activitat lacasa, el color i els compostos aromàtics obtinguts en l'última anàlisi i l'hora a la qual s'ha realitzat.

Amb aquesta integració dels diferents mòduls el sistema queda completat. Els components del sistema de monitoratge (figura 3.5.3) són:

1. Manòmetre.
2. Generador de polsos d'aire.
3. Humidificador de l'aire d'entrada.
4. Vàlvula d'agulla.
5. Rotàmetre.
6. Filtre.
7. Reactor.
8. Bomba de recirculació.
9. Relés per mesurar l'àcid i l'àlcali afegits.
10. Bombes d'addició d'àcid i àlcali.
11. Mesurador/controlador de pH.
12. Mesurador de pO<sub>2</sub>.
13. Bany termostatitzat.
14. Tampó tetraborat sòdic.
15. Tampó malonat sòdic.
16. Tampó malonat sòdic + DMP.
17. Bomba peristàtica multicanal.
18. Vàlvules de recirculació.
19. Vàlvula d'injecció.
20. Espectrofotòmetre.
21. Recollida de reactius sobrants.
22. Aire condicionat.
23. Estufa.
24. Controlador de temperatura.
25. Placa de relés PCLD 885.
26. Ordinador.

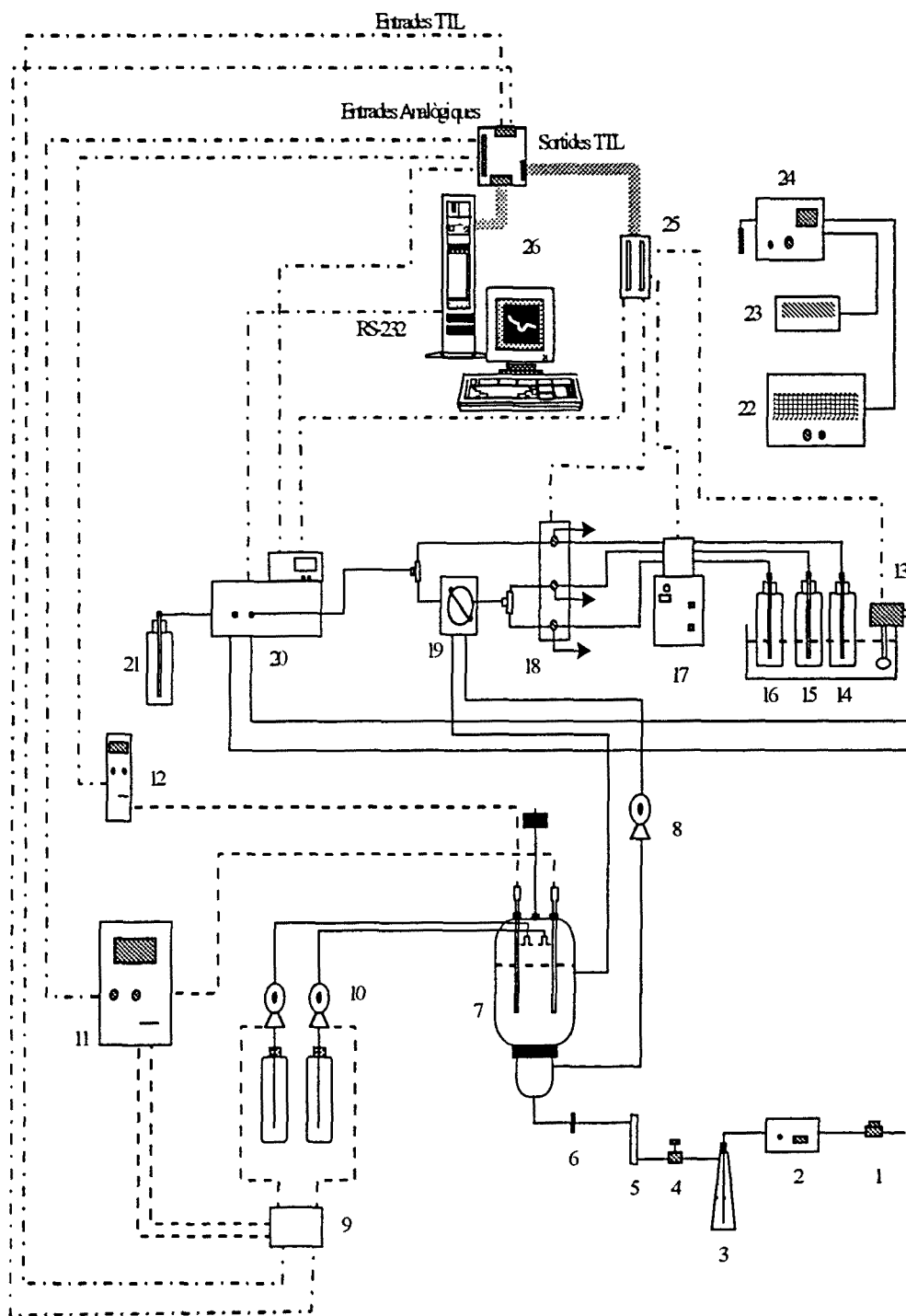


Figura 3.5.3: Esquema del sistema realitzat per al monitoratge dels diferents paràmetres durant el tractament de lleixius negres.

## ⑥ SISTEMA FIA PER MESURAR LIGNINA PEROXIDASA

Un cop calibrat el FIA per la lacasa i integrats els diferents sistemes de monitorització en un de sol, es va decidir realitzar un FIA per mesurar un altre enzim important en la degradació de la lignina, com és la lignina peroxidasa (LiP). La tècnica FIA utilitzada serà la mateixa, aturada de flux, combinada amb dilució electrònica.

### MATERIALS I MÈTODES

#### Mesura de la LiP

El test per a la mesura de l'activitat enzimàtica de la LiP és més complex que el de la lacasa. Per a la mesura de l'activitat LiP es va utilitzar el test proposat per Tien (Tien 1984), per oxidació d'una solució d'alcohol veratrílic en un medi tamponat a pH 2.5 amb àcid tartàric i en presència d'aigua oxigenada. Com que sota determinades condicions els fongs ligninolítics poden produir certs enzims (oxidases) amb capacitat per oxidar l'alcohol veratrílic sense presència d'aigua oxigenada, és necessari realitzar una segona mesura, en què s'avalui l'activitat d'aquests enzims. Aquesta mesura s'obté sota les mateixes condicions que l'assaig de la LiP, però sense afegir-hi aigua oxigenada. Com que en el medi poden haver-hi petites quantitats d'aigua oxigenada, produïdes pel fong, és necessari afegir-hi catalasa (enzim que reacciona amb l'aigua oxigenada) de manera que eliminem les interferències de la LiP. D'aquesta manera podrem mesurar l'activitat de les oxidases i restar-la a l'obtinguda en presència d'aigua oxigenada, obtenint-se d'aquesta forma únicament el valor de l'activitat corresponent a la LiP.

Així doncs les condicions de l'assaig són: 500 µl de mostra, 200 µl de tartrat sòdic 250 mM, 200 µl d'alcohol veratrílic 10 mM. Es mesura l'evolució del senyal a 280 nm durant 2 minuts. Es fa una nova mesura afegint a la solució anterior 100 µl d'aigua oxigenada 4 mM i seguint l'evolució del senyal durant 3 minuts. En el cas que en la primera mesura s'observés un pendent significatiu, caldria realitzar un assaig amb catalasa per mesurar l'activitat corresponent a les oxidases. Es defineix 1 Unitat d'Activitat (UA) com els nmols d'alcohol veratrílic oxidats per minut i per ml.

#### Obtenció de la LiP

Com que no es va detectar al laboratori LiP procedent de *Trametes versicolor* (vegeu Capítol 2) es produí aquest enzim amb el fong *Bjerkandera sp.* BOS55. El creixement del fong es realitzà en matrassos Erlenmeyer, en cultius estàtics a 30°C. La composició del medi es detalla a continuació:

Composició del medi (per 1 litre):

Glucosa	10 g
Tartrat diamònic	0.2 g
Clorur amònic	1.375 g
Tampó 2,2-dimetilsuccínic	500 ml

(0.04 M, pH 4.5)

Medi BIII	100 ml
Tiamina (200 ppm)	10 ml

Composició del medi BIII (per 1 litre):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54.42 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.23 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.32 g
Solució d'elements traça	100 ml

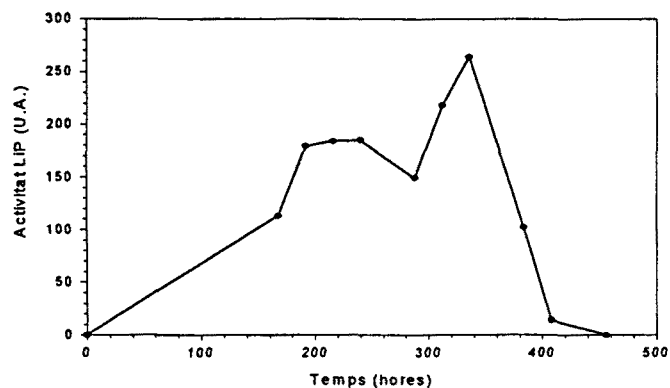
Composició de la solució d'elements traça (per 1 litre):

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.12 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.55 g
NaCl	1 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
CoCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.19 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1564 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01 g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.01 g
Nitrilacetat	1.5 g

Primer es dissol el nitrilacetat en 800 ml d'aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 6.5 amb KOH 5M, a continuació s'hi addicionen la resta de components de la solució.

En la figura 3.6.1 es pot observar l'evolució de la producció de LiP al llarg d'un cultiu amb *Bjerkandera sp.* Es varen aconseguir valors d'activitat LiP al voltant de 400 UA. Per aconseguir valors més elevats d'activitat, sense haver d'optimitzar els cultius de *Bjerkandera*, es va concentrar un brou de cultiu amb una activitat LiP de 483 UA per rotoevaporació, obtenint-se un brou amb una concentració de 748 UA.





*Figura 3.6.1: Evolució de la producció de LiP amb Bjerkandera.*

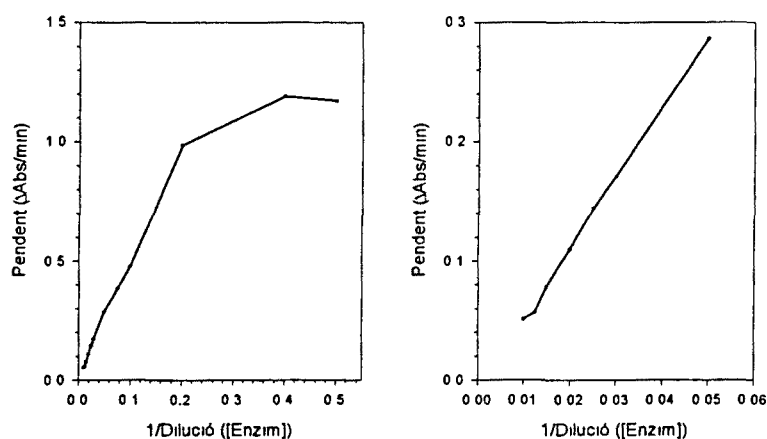
### Maquinari i programari

S'utilitzà el mateix maquinari que en el FIA de la lacasa i s'adaptà un nou programa per a mesurar l'activitat LiP.

Els assaigs enzimàtics per al mètode convencional es realitzaren en un espectrofotòmetre Unicam Series 8625, implementant el programari necessari per poder fer el seguiment de la variació de l'absorbància i el càlcul del pendent.

### ANÀLISI DEL MÈTODE CONVENCIONAL

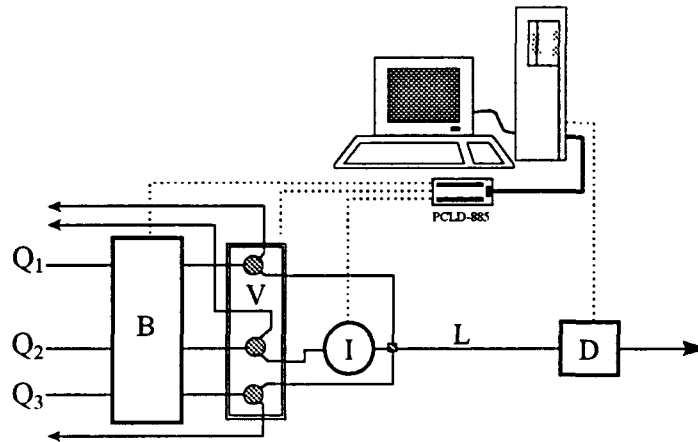
Es començà fent una anàlisi del mètode convencional. Es mesuraren 11 mostres de diferent activitat per triplicat. Com es pot veure en la figura 3.6.2, en el cas de la LiP (al contrari del que havíem vist per la lacasa) hi ha una desviació de la linealitat, en representar el pendent (activitat) enfront de la concentració d'enzim. Cal doncs acotar els valors dels pendents, per treballar sempre dins el rang de linealitat. Es proposa el rang 0.06-0.3. Es calcula l'error del mètode convencional en un 1.7 %.



*Figura 3.6.2: Variació del pendent (activitat LiP) enfront de la concentració d'enzim. A l'esquerra rang de concentració d'enzim estudiada. A la dreta zona lineal.*

## DISSENY DEL SISTEMA FIA

Es dissenya el nou sistema FIA sobre el sistema integrat explicat anteriorment. Es mantenen les principals característiques com són la longitud del reactor i el *loop* d'injecció. Esquemàticament el FIA és el mateix, però, en utilitzar-se dos reactius, és necessari utilitzar un canal més. En la figura 3.6.3 es pot veure un esquema del FIA.



*Figura 3.6.3: Esquema del sistema FIA per mesurar activitat LiP.*

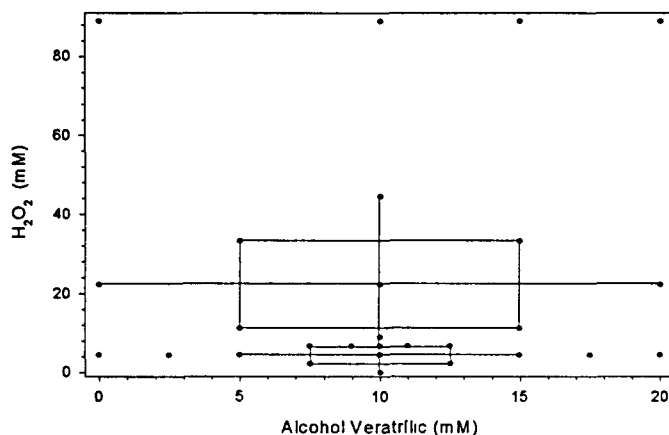
En diferents assaigs es va observar que mantenint els cabals com en el sistema de la lacasa, el límit de detecció d'activitat LiP era molt elevat, per tal de disminuir-lo, es pot o bé augmentar la quantitat de mostra injectada o augmentar els cabals per tal de disminuir la dilució de la mostra en el portador. Es va optar per aquesta segona opció amb la finalitat de mantenir el màxim de variables constants entre els dos sistemes. L'augment de cabal no es realitzà variant les revolucions de la bomba, sinó utilitzant una conducció amb un diàmetre més gran. Així doncs, la línia  $Q_1$  correspon a l'aigua oxigenada amb un cabal de 0.8 ml/min, la línia  $Q_2$  correspon a aigua destil·lada (portador) amb un cabal de 5.2 ml/min i, finalment, la línia  $Q_3$  correspon a l'alcohol veratrílic amb un cabal de 1.4 ml/min. La longitud del reactor (L) era de 102 cm

Donat cas que fos necessari realitzar un assaig utilitzant catalasa, s'utilitzaria el canal de l'aigua oxigenada per la catalasa. Com que abans de cada punxada sempre es mesurava la LiP amb el test convencional i no es va detectar en cap cas la presència d'oxidases, no va ser necessari utilitzar la catalasa. L'esquema del FIA proposat per al cas en què fos necessari utilitzar catalasa es pot veure en l'Apèndix 8.

## OPTIMITZACIÓ DE LES CONCENTRACIONS DE REACTIUS

Abans de fer el calibrat, i com que en aquest cas es treballava amb dos reactius, l'aigua oxigenada i l'alcohol veratrílic, es van fer una sèrie d'experiments per optimitzar la concentració d'ambdós reactius. Cal tenir en compte que els reactius utilitzats es dilueixen entre ells i amb la mostra al llarg del camí fins al detector. Això fa que, sobretot en aquest cas en què es treballa amb dos reactius, sigui necessari optimitzar les concentracions dels reactius, per assegurar que estem treballant amb excés de substrats.

Els punts assajats es mostren en la figura 3.6.4. Es va realitzar una primera tanda d'anàlisi amb la intenció de cobrir una bon marge de concentracions dels dos productes. A continuació, i a partir de les dades obtingudes, es van centrar les noves anàlisis entre els marges de 0 i 10 mM d'aigua oxigenada. Excepte alguns punts realitzats a concentracions escollides, la resta de punts responen a la utilització d'un disseny de composició central.



**Figura 3.6.4:** Punts analitzats per determinar l'òptim de concentracions d'aigua oxigenada i alcohol veratrilic en el test de la LiP.

El conjunt dels valors obtinguts es mostra en la figura 3.6.5a. Es realitzà una anàlisi per regressió dels punts al voltant del màxim d'activitat, entre 5 i 15 mM d'alcohol veratrilic i entre 3 i 11 mM d'aigua oxigenada. El càlcul de la superfície de resposta es va realitzar amb l'ajut d'un programa cedit per M. Sarrà. La superfície obtinguda respon a la següent equació:

$$f = 0.4299 \cdot 10^{-2} + 0.9374 \cdot 10^{-3} \cdot X_1 + 0.7709 \cdot 10^{-4} \cdot X_2 - 0.4292 \cdot 10^{-4} \cdot X_1^2 - 0.4110 \cdot 10^{-6} \cdot X_2^2 - 0.1075 \cdot 10^{-6} \cdot X_1 \cdot X_2$$

on:  $f$ : és la funció  
 $X_1$ : concentració d'alcohol veratrilic  
 $X_2$ : concentració d'aigua oxigenada

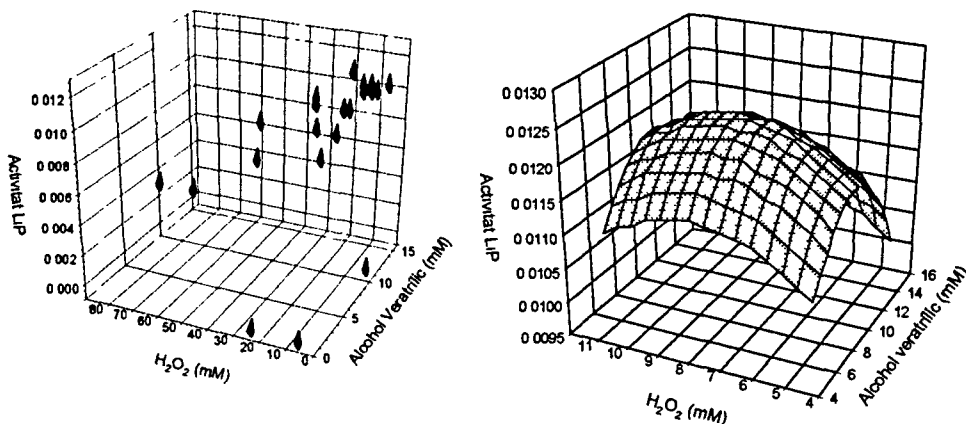


Figura 3.6.5: (a) Punts experimentals. (b) Variació de l'activitat enzimàtica LiP en funció de les concentracions d'alcohol veratrilic i aigua oxigenada.

La superfície obtinguda (figura 3.6.5b) correspondrà a l'efecte de l'alcohol veratrilic (5-15 mM) i de l'aigua oxigenada (3-11 mM) sobre l'activitat LiP. S'observa una àmplia zona amb una activitat màxima que correspon a l'òptim de concentracions.

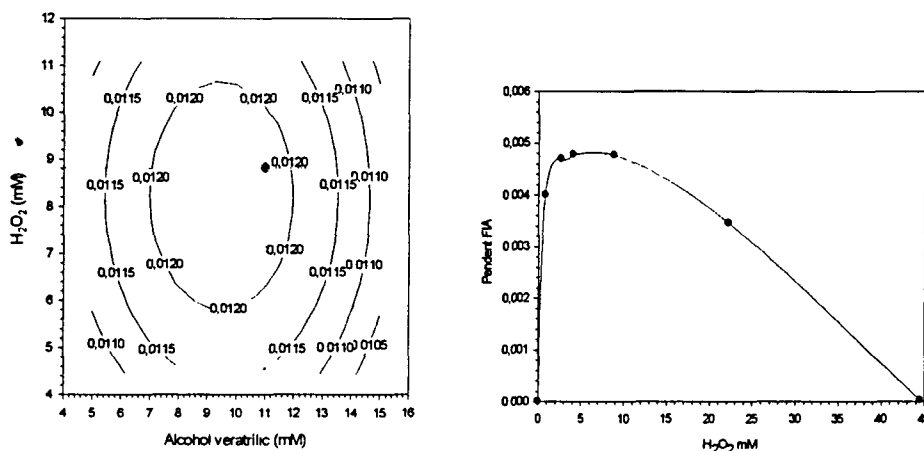


Figura 3.6.6: (a) Corbes de superfície que indiquen una zona de màxima activitat LiP. (b) Variació de l'activitat en funció de la concentració d'aigua oxigenada.

A partir de l'equació obtinguda es generà un gràfic de corbes de nivell (figura 3.6.6a) per determinar un punt òptim d'ambdós reactius. Pot observar-se com hi ha una gran zona delimitada per 10.5 i 6 mM d'aigua oxigenada i 7 i 12 mM d'alcohol veratrilic que, segons l'ajust, correspon al màxim d'activitat i per tant a l'òptim de concentracions.

A partir del gràfic de corbes de nivell s'escolliren les concentracions d'aigua oxigenada i alcohol veratrilic. S'escollí un punt tal que les concentracions dels dos reactius fossin màximes. Els valors resultants són 8.88 mM d'aigua oxigenada i 11 mM d'alcohol veratrilic. En la figura 3.6.6b es mostra com per a una concentració fixa d'alcohol veratrilic

trobem un màxim al voltant de 8 mM d'aigua oxigenada. En aquesta mateixa figura es pot observar com a partir d'una concentració d'aigua oxigenada de 10 mM l'activitat enzimàtica comença a disminuir per a un efecte d'inhibició. Al contrari, a concentracions baixes d'aigua oxigenada, un petit increment en la seva concentració mostra un augment important de l'activitat.

### OBTENCIÓ DE LA RECTA DE CALIBRATGE PER AL FIA DE LiP

La metodologia utilitzada per obtenir la recta de calibratge fou la mateixa que la utilitzada per al FIA de la lacasa. En aquest cas, però, veient que en el cas de la lacasa a l'hora de determinar valors d'activitat en línia no s'utilitzaven tots els temps d'aturada, es decidí realitzar el calibratge amb dos temps d'aturada. S'escollí un temps proper al màxim (11 seg.) per a mostres amb poca activitat i 13 seg. per a mostres més concentrades.

Els assaigs tenien inicialment un temps total de 115 seg.; amb els fiagrames obtinguts es realitzà l'anàlisi de les dades per determinar quin era el millor rang de mesura. Els rang estudiats van ser:

Inici del rang $\Delta t$ (seg.) després de l'aturada	Fi del rang $\Delta t$ (seg.) després de l'aturada
5	24
5	39
5	64
5	104
15	24
15	39
15	64
15	104

*Taula 3.6.1: Rangs de mesura dels pendents estudiats.*

Tal com es va fer en el cas del FIA de la lacasa, es van calcular per a cada una de les mostres injectades i per a cada rang de concentracions els valors del coeficient de regressió lineal (R) i l'error estàndard relatiu (EER). Tot i tenir valors d'activitat inferiors a 100 UA, no s'utilitzen en fer els càlculs ja que comporten un error molt elevat (superior al 15%). Els resultats obtinguts es presenten en la taula 3.6.2:

Temps d'aturada	Rang de mesura	Coef. R	EER	Activitat mínima	Activitat màxima	Nre. d'injecc.
11	16-35	0.996723	3.39	97	748	43
11	16-50	0.998581	3.30	97	748	43
11	16-75	0.999470	3.17	97	748	43
11	16-115	0.998609	3.33	97	551	37
11	26-35	0.996049	3.49	97	748	43
11	26-50	0.999287	3.44	97	748	43
11	26-75	0.999701	3.22	97	748	43
11	26-115	0.998953	3.38	97	551	37
13	18-35	0.995469	2.96	151	748	27
13	18-50	0.997574	3.02	151	748	27
13	18-75	0.998785	3.04	151	748	27
13	18-115	0.999355	3.33	151	748	27
13	28-35	0.990637	4.13	151	748	27
13	28-50	0.998645	3.47	151	748	27
13	28-75	0.999476	3.21	151	748	27
13	28-115	0.999609	3.42	151	748	27

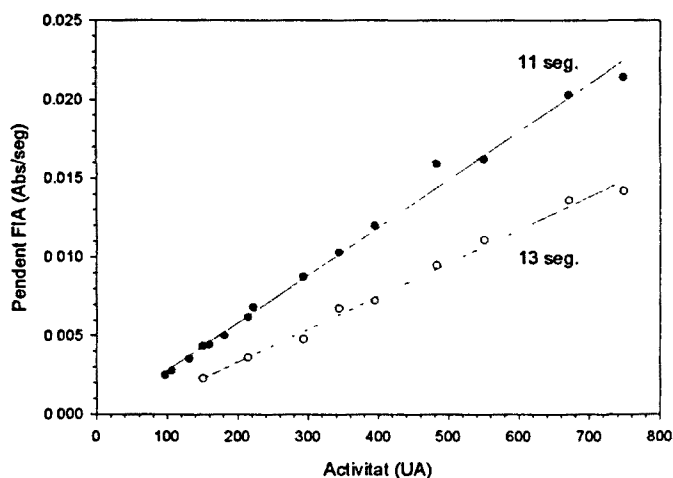
Taula 3.6.2: Paràmetres determinats per a cada rang de mesura estudiat.

Rang de mesura	R	EER	Nre. Injec.
+5 fins a 35	0.996096	3.18	70
+5 fins a 50	0.998078	3.16	70
+5 fins a 75	0.999127	3.11	70
+5 fins a 115	0.998982	3.33	64
+15 fins a 35	0.993343	3.81	70
+15 fins a 50	0.998966	3.46	70
+15 fins a 75	0.999589	3.22	70
+15 fins a 115	0.999281	3.40	64

Taula 3.6.3: Valors mitjans calculats per a cada rang de mesura.

En la taula 3.6.3 es mostren els resultats obtinguts al fer la mitjana entre rangs de mesura, on pot observar-se que el rang de mesura del pendent que presenta un error estàndard relatiu més baix és el que va des dels 5 segons després de l'aturada fins als 75 segons; és a dir, es mesura el pendent durant 59 segons. Tot i tenir l'EER més baix, aquest rang de mesura no correspon al del coeficient de regressió lineal més alt; aquest valor el té el rang de mesura entre els 15 segons després de l'aturada fins als 75 segons. Com que la durada total de l'assaig és la mateixa en els dos casos, es decideix escollir com a rang més apropiat el primer.

Un cop determinat el millor rang de mesura, es calculen les rectes de regressió per cada un dels temps d'aturada. Les rectes obtingudes es presenten a la figura 6.3.7.



**Figura 3.6.7:** Rectes de calibrat entre el mètode convencional de mesura d'activitat LiP i el FIA proposat, a temps d'aturada de 11 i 13 segons.

A partir de les equacions de les rectes (taula 3.6.4) es poden calcular amb el sistema proposat, valors d'activitat entre 100 i 750 UA amb un error del 3.11%.

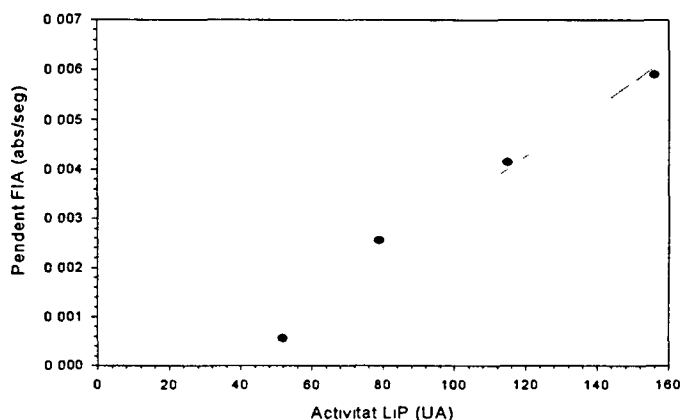
Temps d'aturada	R	Ord. Origen	Pendent
11	0.993139	$-2.7238 \cdot 10^{-4}$	$3.0382 \cdot 10^{-5}$
13	0.991839	$-8.8915 \cdot 10^{-4}$	$2.1031 \cdot 10^{-5}$

**Taula 3.6.4:** Paràmetres obtinguts per a les rectes de calibrat

També en el cas de la LiP, l'error comès és més alt en el cas del sistema FIA que el comès pel mètode convencional (1.7%), però, el mètode FIA té l'avantatge de poder-se utilitzar per obtenir valors en línia de l'activitat LiP.

Per mesurar valors d'activitat inferiors a 100 UA, caldria modificar el sistema FIA, augmentant el volum del *loop* d'injecció, reduint els cabals, ... Per no modificar el sistema es proposa augmentar la quantitat de mostra injectada fent dues injeccions seguides i disminuint a 10 seg. el temps d'aturada. D'aquesta manera s'aconsegueix augmentar la concentració d'enzim en la zona central de la mostra i, per tant, augmentar la sensibilitat del mètode.

S'estudia un rang d'activitats amb valors inferiors a 150 UA. Els resultats mostren que es poden obtenir valors amb el mètode FIA de doble injecció entre 50 i 150 UA amb un EER del 2.65%.



**Figura 3.6.8:** Recta de calibratge per al FIA de lignina peroxidasa, a un temps d'aturada de 10 seg. amb doble injecció.

Com es pot observar en la figura 3.6.8, amb el sistema de doble injecció es poden detectar valors més baixos d'activitat LiP, tot i que, com es pot veure, la recta obtinguda, no passa pel punt d'activitat 0 i, per tant, mai es podran detectar amb aquest sistema activitats menors que 40 UA. L'equació de la recta de correlació es descriu a la taula 3.6.5.

Temps d'aturada	R	Ord. Origen	Pendent
10	0.983899	$-1.7457 \cdot 10^{-3}$	$5.0071 \cdot 10^{-5}$

**Taula 3.6.5:** Paràmetres obtinguts per la recta de calibrat amb doble injecció i temps d'aturada de 10 segons.

Finalment s'obté un sistema FIA que permet mesurar activitats LiP en línia, entre 50 i 750 UA. Aquest rang d'activitats entraria dins la majoria dels valors trobats a la bibliografia.

Fong	Activitat (U.A.)	Ref.
<i>Bjerkandera</i>	350	Mester et al. 1995
<i>Bjerkandera</i>	150	Kaal et al. 1993
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2500	Bonnarme et al, 1991
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	800	Bonnarme et el 1992
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	120	Asther et al. 1990
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	180	Asther et al. 1988
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	150	Feijoo et al. 1994
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	80	Moyson et al. 1993

**Taula 3.6.6:** Valors d'activitat LiP trobats a la bibliografia.

## 7 IMPLEMENTACIÓ DEL FIA DE LiP

Hem vist que en el cas de la lignina peroxidasa el calibratge es va realitzar amb un brou de cultiu sintètic amb el fong *Bjerkandera sp*; no contenia, per tant, lleixius negres. En intentar validar el FIA amb un med. amb lleixius negres, es va veure que no es podia detectar

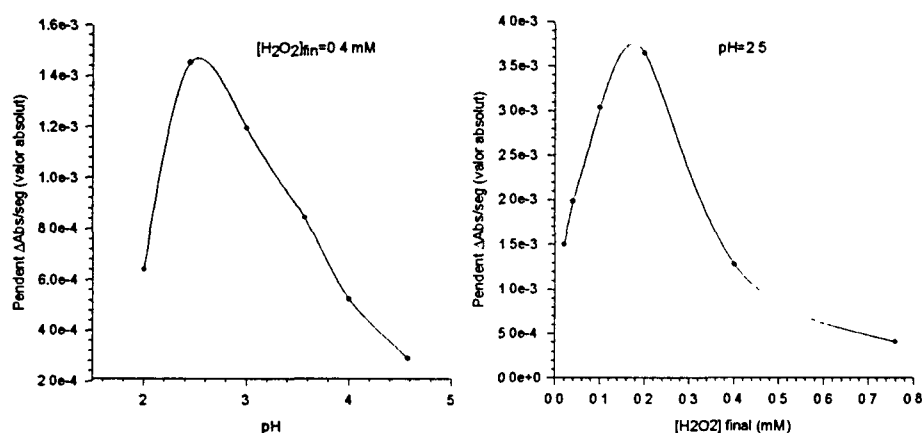


lignina peroxidasa. L'assaig consistia a barrejar una mostra de brou de cultiu amb activitat LiP i lleixius negres. En veure que no es detectava la LiP, es va passar a fer nous assaigs, però aquest cop amb el test convencional.

## MATERIALS I MÈTODES

### Mesura de la LiP

Es varen utilitzar dos mètodes per a mesurar la LiP, el proposat per Tien (Tien, M 1984), i el proposat per Archibald (Archibald 1992), que consisteix en la decoloració d'una solució d'Azure B en presència de LiP. Es van modificar lleugerament les condicions de l'assaig, en funció de proves realitzades a diferents pH (figura 3.7.1a) i diferents concentracions d'aigua oxigenada (figura 3.7.1b).



**Figura 3.7.1:** (a) Variació de l'activitat LiP amb el pH, a una concentració d'aigua oxigenada de 0.4 mM. (b) Variació de l'activitat LiP en funció de la concentració d'aigua oxigenada, a un pH de 2.5.

Les condicions escollides són: 200 µl de tampó tartrat sòdic 50 mM a pH=2.5, 10 µl d'una solució d'Azure B 320 µM, 50 µl d'una solució d'aigua oxigenada 4 mM i fins a 740 µl de mostra. Es segueix la disminució de l'absorbància a 651 nm.

Els avantatges de l'assaig de l'Azure B sobre el d'oxidació de l'alcohol veratrílic, són:

- Els intermedis radicals formats per l'oxidació de l'alcohol veratrílic i el mateix veratrílic poden ser reduïts altre cop a alcohol veratrílic per diversos components excretats pels fongs al medi de cultiu.
- La mesura en el test de l'alcohol veratrílic es realitza a 310 nm, longitud d'ona en què absorbeixen molts compostos, entre ells la lignina i derivats i compostos excretats pels fongs. Al mateix temps a 310 nm, els efectes de la terbolesa són més importants que al visible.

- Alguns fongs basidiomicets secreten oxidases, que poden oxidar l'alcohol veratrilic a veratrilaldehid, en canvi l'Azure B es mostra més selectiu per la LiP.

### Obtenció de la LiP

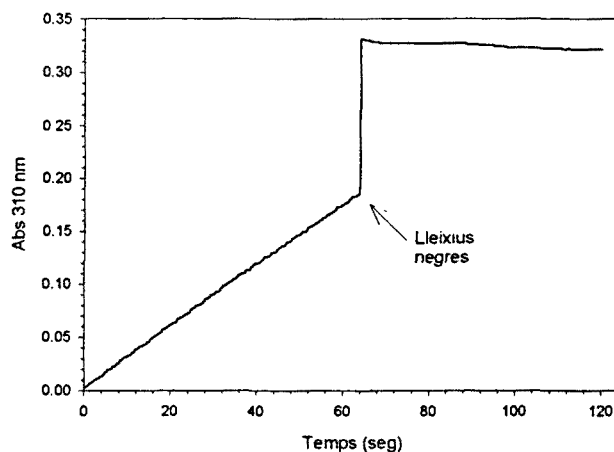
La LiP necessària per realitzar tots els assaigs fou obtinguda de cultius de *Bjerkandera*, sota les condicions exposades a l'apartat 6.

### Maquinari i programari

Els assaigs enzimàtics es realitzaren en un espectrofotòmetre Unicam sèrie 8625, implementant el programari necessari per poder fer el seguiment de la variació de l'absorbància i el càlcul del pendent.

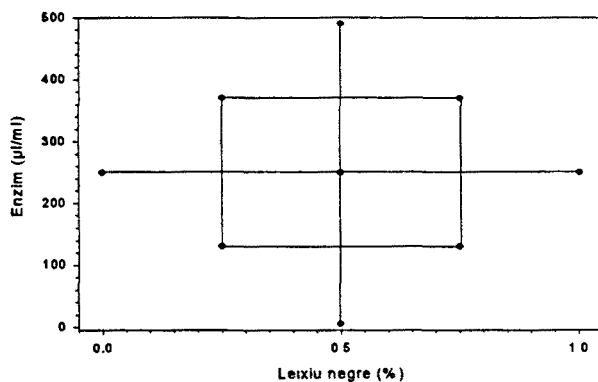
## ESTUDI DE LA LiP I LA LIGNINA

Es va iniciar la validació del sistema utilitzant mostres procedents de cultius de *Bjerkandera* amb activitat enzimàtica coneguda, a les quals s'afegia una quantitat determinada de lleixius negres. Les mostres s'injectaven al FIA i es mesurava el pendent obtingut. Es va comprovar que en les mostres en què s'afegia lleixius negres l'activitat LiP desapareixia. En veure que no es detectava LiP, es va passar a fer nous assaigs utilitzant el test convencional de mesura de activitat LiP. Semblava que hi havia un efecte inhibitor d'algun component dels lleixius negres sobre l'activitat LiP. En la figura 3.7.2 es pot comprovar com, en afegir 10 µl de lleixius negres en una cela on s'està determinant l'activitat LiP, el pendent (activitat) desapareix totalment.



**Figura 3.7.2:** Efecte dels lleixius negres sobre el test de la lignina peroxidasa.

Per determinar si hi havia una concentració mínima de lleixius negres a partir de la qual no hi havia un efecte inhibitori sobre l'activitat LiP, es realitzà un disseny de composició central entre el contingut en lleixius negres d'una mostra i la quantitat real d'enzim. Els punts experimentals assajats es mostren en la figura 3.7.3. L'activitat LiP de la mostra era de 160 UA.

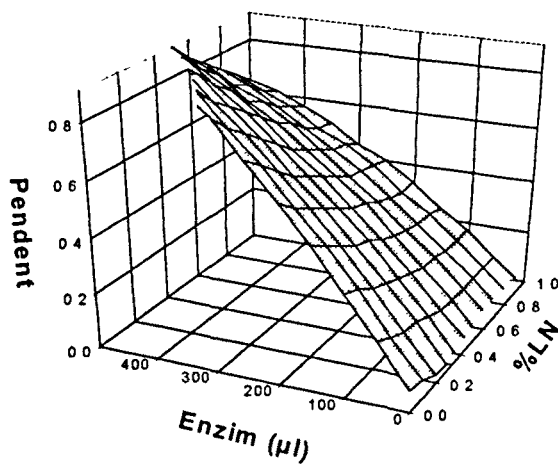


**Figura 3.7.3:** Punts experimentals assajats per determinar l'efecte dels lleixius negres sobre l'activitat LiP.

Els valors obtinguts es varen ajustar a una superfície (figura 3.7.4) que respon a l'equació:

$$f=0.7711 \cdot 10^1 - 0.31X_1 + 0.2969 \cdot 10^{-2} \cdot X_2 + 0.2153 \cdot X_1^2 + 0.1168 \cdot 10^{-5} \cdot X_2^2 - 0.1087 \cdot 10^{-2} \cdot X_1 \cdot X_2$$

- on:
- $f$ : Funció.
  - $X_1$ : % de lleixius negres.
  - $X_2$ : Concentració d'enzim.



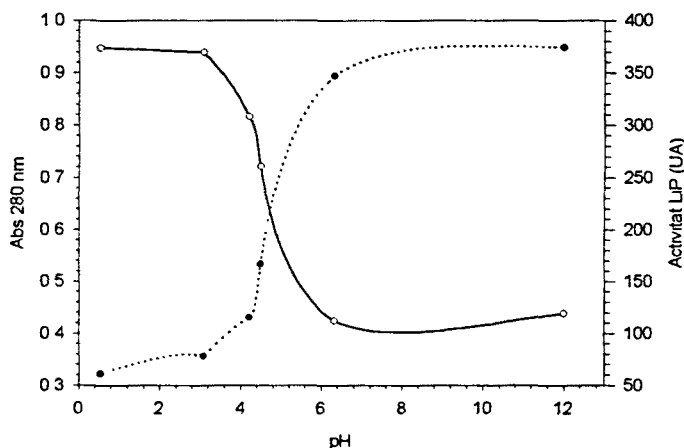
**Figura 3.7.4:** Efecte del lleixius negres sobre l'activitat LiP.

Els processos de tractament es realitzen a una concentració del 5.6% de lleixius negres. Com pot comprovar-se en la figura 3.7.4, l'efecte dels lleixius negres sobre l'activitat

LiP comença a tenir un efecte destacable a partir de l'1%. Una activitat de 160 UA sense lleixiu negre passa a 95 UA quan la concentració de lleixiu negre a la cel·la de mesura és de l'1%.

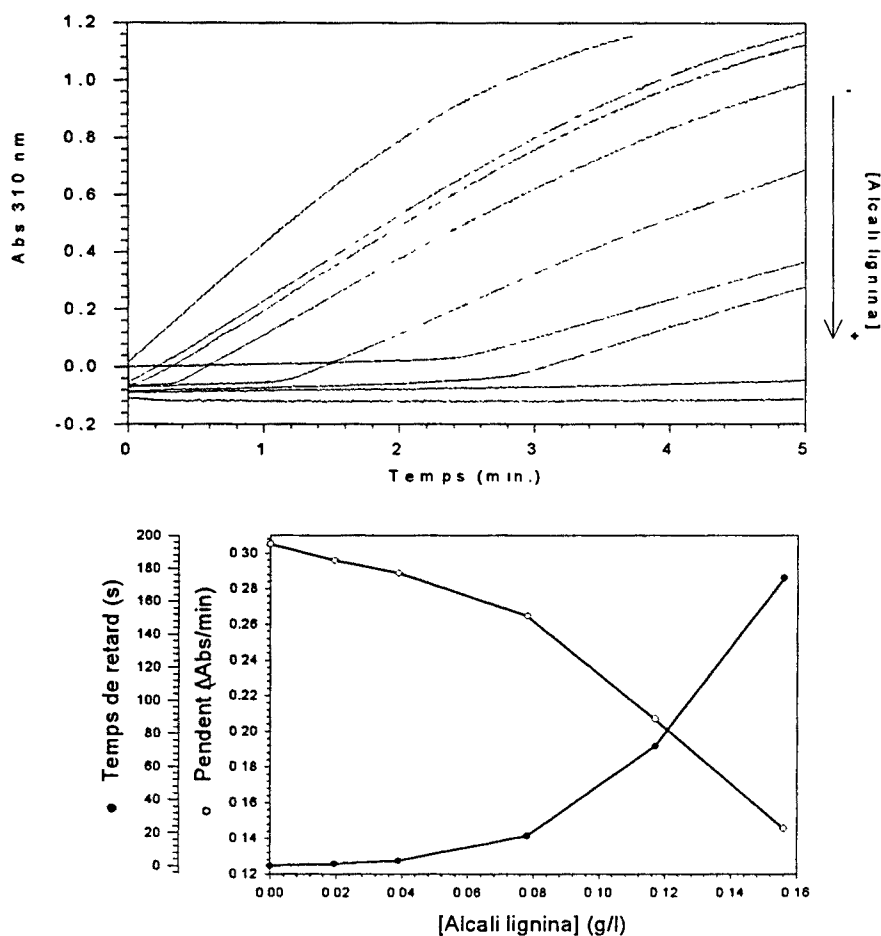
En realitzar els assaigs, a més de determinar un efecte inhibitor dels lleixius negres sobre l'activitat LiP, es comprovà que l'inici del pendent causat per l'oxidació del l'alcohol veratrílic per la LiP es retarda amb la presència del lleixiu negre, augmentant el temps de retard amb la concentració de lleixiu negre a la cel·la.

Per determinar si l'efecte inhibitor era degut als components lignínics dels lleixius negres o a altres components, es realitzà el següent assaig. Una de les formes d'eliminar lignina dels lleixius negres consisteix a disminuir el pH, obtenint-se un precipitat compost principalment per derivats de la lignina. Es realitzà un experiment mesurant l'activitat LiP a mostres que havien portat a diferents pH, s'havien filtrat i tornat a pH 4. La quantitat de lignina, mesurada com a absorbància a 280 nm, disminueix amb el pH, mentre que l'activitat LiP augmenta en disminuir el pH (figura 3.7.5). Això mostra un efecte inhibitor dels components ligninolítics sobre l'activitat LiP.



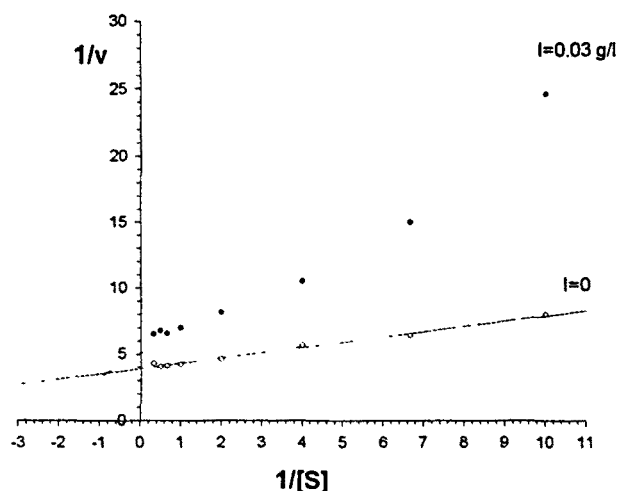
*Figura 3.5.5: Efecte del pH sobre els lleixius negres i l'activitat LiP. Absorbància a 280 nm (●) Activitat LiP (O).*

A continuació es realitzaren diversos assaigs d'activitat LiP amb diferents concentracions d'àlcali lignina comercial (Aldrich). Es comprovà que també, en aquest cas, hi havia una disminució de l'activitat acompanyada d'un efecte de retard en l'inici de l'oxidació de l'alcohol veratrílic (figures 3.7.6a i 3.7.6b).



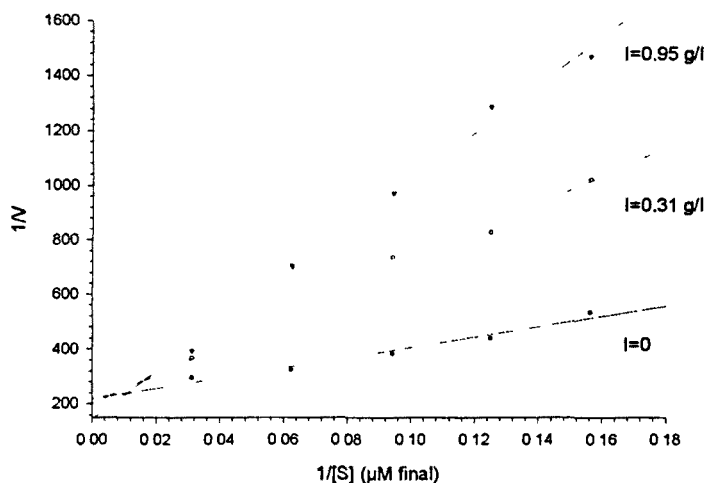
**Figura 3.7.6:** (a) Efecte de l'àlcali lignina sobre l'activitat LiP i sobre el temps de retard. (b) Disminució de l'activitat i augment del temps de retard al augmentar la concentració d'àlcali lignina.

Els assaigs realitzats fins aquest moment reafirmaven la primera hipòtesi d'un efecte inhibitor de components ligninolítics sobre l'activitat LiP, o bé la presència d'altres substrats que competeixen amb el substrat de la reacció, l'alcohol veratrílic. Mitjançant la representació de Lineweaver-Burk es podria determinar de quina inhibició es tracta. Es realitzaren diferents assaigs a concentració de substrat (alcohol veratrílic) variable amb i sense àlcali lignina. Els resultats obtinguts (figura 3.7.7) mostren un clar efecte inhibitor que segons la representació podria correspondre a una inhibició reversible de tipus no competitiva.



**Figura 3.7.6:** Representació de Lineweaver-Burk per una concentració d'àlcali lignina a la cèl·lula de 0.03 g/l.

Per descartar que l'efecte inhibitor fos degut a alguna interferència en l'assaig d'activitat, es realitzaren els assaigs necessaris per fer la representació de Lineweaver-Burk (figura 3.7.7) amb el test de l'Azure B. Es determina que igualment amb aquest test hi ha una inhibició, tot i que en aquest cas podria correspondre a una inhibició reversible de tipus competitiu.



**Figura 3.7.7:** Representació de Lineweaver-Burk de l'activitat LiP amb els test de l'Azure B.

Amb els diferents assaigs realitzats, sembla clar que hi ha un efecte dels compostos ligninolítics sobre l'activitat LiP, tot i que no queda clar si aquest efecte és una inhibició directa sobre l'enzim o bé és un efecte de competició entre substrats. Per determinar exactament a què es deu aquesta reducció d'activitat i quin o quins components en són els causants caldria realitzar més assaigs, com per exemple assajar més concentracions

d'inhibidor o provar altres compostos de tipus lignínic. El treball presentat serveix per demostrar que hi ha una interferència dels components lignínics en l'activitat LiP, si més no en la mesura d'aquest paràmetre.

