



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències
Departament de Química
Unitat de Química Analítica

MEMBRANES POLIMÈRIQUES ENZIMÀTIQUES

*Apliació al tractament de biomassa vegetal per a la
recuperació d'oligosacàrids*

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química

Memòria presentada per
n'Àngels Cano i Òdena per
a optar al grau de Doctor en
Química. Juliol 2006



Universitat Autònoma de Barcelona

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química

Cristina Palet i Ballús, professora titular del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

que els estudis descrits a la present memòria sota el Títol “MEMBRANES POLIMÈRIQUES ENZIMÀTIQUES. APLICACIÓ AL TRACTAMENT DE BIOMASSA VEGETAL PER A LA RECUPERACIÓ D’OLIGOSACÀRIDS” que presenta **Àngels Cano i Òdena**, llicenciada en Química, han estat realitzats sota la meva direcció per a optar al grau de Doctor en Química.

I perquè així consti, signo la present a Bellaterra a 17 de Juliol de 2006.

Cristina Palet i Ballús



Els treballs que es recullen en la present memòria formen part dels projectes:

- “Preparación y caracterización de membraas poliméricas enzimáticas para la separación, purificación y recuperación selectiva de oligosacáridos de hemicelulosa enlazados a lignina” (PPQ 2002-04201-C02-01), finançat pel *Ministerio de Educación, Cultura y Deportes*.
- PROQUISEP “Desarrollo de procesos químicos de separación para la caracterización y remedio de sistemas contaminados” (ref. CTQ2005-09430-C05-01/PPQ), finançat pel *Ministerio de Educación y Ciencia*.

Tanmateix ha estat possible dur-los a terme gràcies a:

- L’atorgament d’una beca predoctoral per a la formació del personal investigador (referència 2003FI 00501), per part del *Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI)* de la Generalitat de Catalunya.
- La concessió del corresponents ajuts per mobilitat (referències 2004 BV2 0054, per 3 mesos a Estats Units i 2006 BE 00037, per 5 setmanes a Holanda) també per part del *Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI)* de la Generalitat de Catalunya.

I també vull agrair les següents persones per la col·laboració i les aportacions científiques en aquesta tesi doctoral:

Dr. Ramón Alibés, Dr. Jordi Coello, Dra. Maria José Esplandiú, Cristina López Gómez, Dra. Montse López Mesas, Dr. Gustavo Pérez, i Dr. Josep Vendrell (UAB).

Dra. Cristina Minguillón, Biotza Gutiérrez i Dr. Alberto Adeva (PCB).

Dr. Josep M. Paulís (SAQ).

Dr. Julio Fraile (ICMAB).

Dra. Tània Gumí (IEM).

Dra. Sylvia Daunert, Dra. Elizabeth Moschou i Dra. Shifen Xu (UKY).

Prof. Dr. Matthias Wessling, Dra. Míriam Gironès i Joao de Sousa André (UT).

Dra. Sílvia Bronsoms (IBB).

Dr. Daniel Montané i Dr. Carles Torras (URV).

A la meva família

ÍNDIX GENERAL

Índex general.....	ix
Índex de figures i taules	xiii
SUMMARY	xix
1. INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1. Carbohidrats	3
1.1.1. Classificació dels carbohidrats	3
1.1.2. Materials lignocel·lulòsics	3
1.1.2.1. El xilà.....	5
1.1.2.2. Recuperació de xilooligosacàrids a partir de residus de biomassa vegetal.....	5
1.1.2.3. Aplicacions dels xilooligosacàrids	8
1.2. Enzims	10
1.2.1. Classificació i nomenclatura dels enzims.....	10
1.2.2. Les xilanases.....	11
1.2.2.1. Estructura.....	11
1.2.2.2. Mecanisme catalític i inhibició.....	14
1.2.2.3. Aplicacions de les xilanases	15
1.3. Immobilització d'enzims	16
1.3.1. Mètodes d'immobilització.....	16
1.3.2. Efectes de la immobilització	19
1.3.3. Selecció del mètode d'immobilització.....	20
1.3.4. Aplicacions dels enzims immobilitzats	20
1.3.5. Tècniques de biologia molecular aplicades a la immobilització dirigida d'enzims	22
1.4. Membranes	24
1.4.1. Classificació de les membranes.....	24
1.4.1.1. Membranes líquides.....	24
1.4.1.2. Membranes polimèriques	25
1.4.1.3. Membranes inorgàniques.....	29
1.4.2. Transport a través de membranes	30
1.4.3. Processos de membrana i aplicacions.....	32
1.4.4. Caracterització de membranes.....	33
1.4.5. Inconvenients dels processos de membrana	40
1.4.6. Membranes aplicades a la immobilització d'enzims.....	40
1.5. Objectius.....	42
Referències	43
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	47
2.1. Immobilització d'enzims en membranes	49
2.1.1. Immobilització per retenció física	49
2.1.2. Immobilització química.....	49
2.1.2.1. Derivatització de la polisulfona	49
2.1.2.2. Preparació de les membranes d'acrilat de polisulfona	53
2.1.2.3. Fixació de la proteïna a les membranes d'acrilat de polisulfona.....	53
2.1.2.4. Membranes de polímers monolítics.....	57

2.1.2.5. Optimització i disseny d'experiments	58
2.1.2.6. Preparació de les membranes de polímers monolítics	60
2.1.2.7. Fixació de la proteïna a les membranes de polímers monolítics	60
2.1.3. Tècniques de biologia molecular aplicades a la immobilització dirigida d'enzims	62
2.1.3.1. Materials i mètodes	62
2.1.3.2. Procediment	63
2.2. Caracterització de membranes	70
2.2.1. Activitat enzimàtica i paràmetres cinètics	70
2.2.2. Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)	71
2.2.3. Microscòpia de Força Atòmica (AFM)	72
2.2.4. Fluxos d'aigua pura	73
2.2.5. Adsorció/desorció de gasos	73
2.2.6. Permporosimetria	75
2.2.7. Angle de contacte	76
2.3. Hidròlisi de materials lignocel·lulòsics	76
2.3.1. Experiments d'hidròlisi d'oligosacàrids amb enzim en dissolució	76
2.3.2. Experiments d'hidròlisi utilitzant mòduls de membrana	78
2.3.2.1. Cel·la UAB	78
2.3.2.2. Mòdul de filtració frontal	78
2.3.2.3. Consideracions generals	79
2.4. Tècniques d'anàlisi de xilooligòmers	80
2.4.1. Determinació de sucres reductors (Mètode de Nelson)	80
2.4.2. Electroforesi capil·lar de zona (CZE)	83
2.4.2.1. Determinació directa	85
2.4.2.2. Determinació indirecta	85
2.4.2.3. Determinació amb derivatització prèvia a l'anàlisi per CZE	86
2.4.3. Cromatografia de permeació en gel (GPC)	87
2.4.4. Espectrometria de masses amb ionització induïda per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS)	89
Referències	92
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	95
3.1. Immobilització per retenció física	97
3.2. Immobilització química	97
3.2.1. Síntesi de membranes d'acrilat de polisulfona	97
3.2.2. Disseny de membranes de polímers monolítics	104
3.3. Caracterització de membranes d'acrilat de polisulfona i membranes de polímers monolítics	111
3.3.1. Capacitat d'immobilització d'enzims	111
3.3.2. Influència del temps d'immobilització en l'activitat enzimàtica de les membranes	115
3.3.3. Estabilitat temporal de les membranes enzimàtiques	117
3.3.4. Efecte de la immobilització en l'activitat enzimàtica respecte pH i temperatura	117
3.3.5. Paràmetres cinètics de les membranes enzimàtiques	119
3.3.6. Caracterització física	125
3.4. Mutagènesi dirigida de l'enzim endo-1,4-β-xilanasas II	145
3.5. Experiments d'hidròlisi enzimàtica emprant mòduls de membrana	148
3.5.1. Experiments amb la cel·la UAB	148

3.5.2. Experiments amb el mòdul de filtració frontal.....	153
3.6. Caracterització dels productes d'hidròlisi enzimàtica	159
3.6.1. Caracterització per electroforesi capil·lar de zona (CZE)	159
3.6.2. Resultats de la cromatografia de permeació en gel (GPC).....	163
3.6.3. Resultats obtinguts per espectrometria de masses amb ionització induïda per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS).....	173
Referències.	182
4. VALORACIÓ DEL PROCÉS. Possibilitats d'aplicació i perspectives de millora .	185
4.1. Estimació dels costos de recuperació d'oligosacàrids	187
4.2. Propostes de millora del procés	192
Referències	200

5. CONCLUSIONS.....	201
----------------------------	------------

ANNEX A

Estructures i figures

ANNEX B

Cano, A.; Torras, C.; Garcia-Valls, R.; Palet, C.

Purification and treatment of vegetal biomass oligosaccharides with enzymatic polymeric membranes.

Proceedings. Int Conf. PERMEA 2003, I Membrane science and technology conference of Visegrad countries, Tatranské Matliare, Slovakia, Sept. 7-11, 2003.

ANNEX C

Cano, A.; Minguillón, C.; Palet C.

Immobilization of endo-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: synthesis and characterization.

Journal of Membrane Science 280 (2006) 383-388.

ANNEX D

Cano, A.; Moschou, E.A.; Daunert, S.; Coello, J.; Palet, C.

Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments (DOE).

Bioprocess and Biosystems Engineering (acceptat 29 juny 2006) in press.

ANNEX E

Cano, A.; Palet, C.

Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS.

Submitted to *Journal of Membrane Science*.

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

1. INTRODUCCIÓ

Figures

Fig. 1.1.	Unitat de xilosa.....	4
Fig. 1.2.	Monòmers constituents de la lignina.....	4
Fig. 1.3.	Diagrama de procés de recuperació d'oligosacàrids de biomassa vegetal.....	7
Fig. 1.4.	Mode d'acció de les endoxilanasas de les famílies 10 i 11. Les fletxes indiquen els llocs d'atac sobre diferents substrats.....	12
Fig. 1.5.	Analogia entre l'estructura terciària de la XYN I (a) i XYN II (b), i analogia amb l'estructura de la mà dreta.....	13
Fig. 1.6.	Model esquemàtic per a representar els llocs actius d'XYN I i XYN II, respectivament.....	14
Fig. 1.7.	Representació dels mecanismes de: a) retenció i b) inversió de la configuració en reaccions catalitzades per glicosidases.....	15
Fig. 1.8.	Estructura de la polisulfona.....	28
Fig. 1.9.	Estructura de l'acrilat de polisulfona.....	29
Fig. 1.10.	Transport difusional.....	31
Fig. 1.11.	Transport facilitat no acoblat.....	31
Fig. 1.12.	Transport facilitat acoblat.....	31
Fig. 1.13.	Cotransport.....	31
Fig. 1.14.	Contratransport.....	31
Fig. 1.15.	Isoterma de tipus IV d'adsorció (ABCDEFGF) i desorció (GHIJDB).....	36
Fig. 1.16.	Esquema de les etapes del procés de desorció: (i) porus completament ple de líquid a la pressió de saturació, (ii) just abans d'iniciar la desorció, (iii) just abans de completar-se l'evaporació (encara hi ha la capa t) i (iv) la desorció s'ha completat.....	38
Fig. 1.17.	Representació de l'angle de contacte en diferents superfícies.....	38

Taules

Taula 1.1.	Classificació dels enzims en funció del tipus de reacció que catalitzen.....	10
Taula 1.2.	Alguns exemples d'enllaços covalents implicats en la immobilització de proteïnes.....	18
Taula 1.3.	Resum de les característiques més rellevants dels mètodes d'immobilització.....	20
Taula 1.4.	Resum de les aplicacions dels enzims immobilitzats.....	22
Taula 1.5.	Polímers habituals en la preparació de membranes.....	27
Taula 1.6.	Tipus de membranes en funció de la selecció del parell solvent/no solvent.....	28
Taula 1.7.	Recull dels diferents processos de membrana i de les forces directores (<i>driving forces</i>) per a cadascun d'ells.....	30
Taula 1.8.	Processos de membrana i els seus respectius camps d'aplicació.....	32
Taula 1.9.	Classificació dels processos de membrana en funció de la mida de partícula a separar.....	33
Taula 1.10.	Algunes de les aplicacions dels processos de membrana impulsats per diferència d'activitat.....	33

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Figures

Fig. 2.1.	Representació del procés d'obtenció d'una membrana per inversió de fase (immersió en un no solvent).....	49
Fig. 2.2.	Reacció entre la polisulfona i l'epiclorhidrina per a la formació de la glicidilpolisulfona.....	50
Fig. 2.3.	Representació dels diferents tipus d'hidrogens de la glicidilpolisulfona i llista de senyals de l'espectre RMN- ¹ H amb els seus corresponents desplaçaments químics.....	51
Fig. 2.4.	Reacció entre la polisulfona i el clorur d'acrilil per a la formació d'acrilat de polisulfona.....	51

Fig. 2.5.	Representació del diferents tipus d'hidrogen de l'acrilat de polisulfona i llistat de senyals de l'espectre RMN- ¹ H, amb els seus corresponents desplaçaments químics i de les bandes observades a l'espectre IR.....	52
Fig. 2.6.	Reacció entre l'acrilat de polisulfona i 1,12-dodecanodiamina per a la formació del 3-(12-aminododecil) aminopropionat de polisulfona.....	52
Fig. 2.7.	Representació dels diferents tipus d'hidrogen del 3-(12-aminododecil) aminopropionat de polisulfona i llista de senyals de l'espectre RMN- ¹ H, amb els seus corresponents desplaçaments químics.....	53
Fig. 2.8.	Reacció de derivatització d'amines primàries i secundàries amb AQC.....	56
Fig. 2.9.	Esquema de les etapes del protocol <i>Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit</i> de <i>Stratagene</i> ® per a la mutagènesi dirigida.....	65
Fig. 2.10.	Esquema de la reacció de la PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	67
Fig. 2.11.	Transformació bacteriana. L'ADN de cèl·lules mortes es fragmenta i surt, de manera que pot ser incorporat per cèl·lules competents i incorporar-se a les cèl·lules hoste.....	68
Fig. 2.12.	Representació de la determinació de V_0	71
Fig. 2.13.	Sistema experimental per a mesurar els fluxos d'aigua pura, on es destaca el mòdul emprat.....	73
Fig. 2.14.	Representació del procés d'adsorció i desorció.....	74
Fig. 2.15.	Etapes del procés d'adsorció incrementant la pressió de vapor relativa en l'ordre $i < ii < iii < iv$ i on r_p : radi de porus, r_k : radi de Kelvin i t : gruix de la capa adsorbida.....	74
Fig. 2.16.	Representació del sistema experimental.....	75
Fig. 2.17.	Muntatge experimental per a la hidròlisi d'oligosacàrids amb enzim en dissolució.....	77
Fig. 2.18.	Esquema i fotografia de la cel·la UAB.....	78
Fig. 2.19.	Mòdul de filtració frontal.....	79
Fig. 2.20.	Formació d'un hemiacetal.....	81
Fig. 2.21.	Reacció d'oxidació d'un aldehyd a àcid carboxílic.....	81
Fig. 2.22.	Representació esquemàtica de l'electroforesi capil·lar.....	83
Fig. 2.23.	Esquema de l'aminació reductiva de carbohidrats.....	86
Fig. 2.24.	Ionització de la mostra per irradiació amb làser; M es refereix a la mostra i m a la matriu.....	90

Taules

Taula 2.1.	Resum de les variables i els seus respectius valors als tres nivells.....	59
Taula 2.2.	Experiments del Disseny d'Experiments (DOE).....	59
Taula 2.3.	Composició de les dissolucions precursors de membrana a cada experiment del disseny d'experiments.....	60
Taula 2.4.	Taula resum dels experiments realitzats en cada cas.....	80
Taula 2.5.	Condicions d'anàlisi per al mètode de determinació directa per electroforesi capil·lar.....	85
Taula 2.6.	Condicions d'anàlisi per al mètode de determinació indirecta per electroforesi capil·lar.....	86
Taula 2.7.	Condicions d'anàlisi per al mètode de determinació amb derivatització prèvia dels analits per electroforesi capil·lar.....	87

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Figures

Fig. 3.1.	Incorporació el grup epòxid en membranes de Nylon®.....	97
Fig. 3.2.	Reaccions de derivatització de la polisulfona per a introduir el grup epòxid i posterior formació de la sal de diazoni per a reaccionar amb grups funcionals de l'enzim.....	98
Fig. 3.3.	Ampliació de l'espectre RMN- ¹ H de la glicidilpolisulfona.....	99
Fig. 3.4.	Reacció de derivatització de la polisulfona per a introduir el grup acrilat.....	100
Fig. 3.5.	Espectre RMN- ¹ H de l'acrilat de la polisulfona.....	100
Fig. 3.6.	Producte esperat de la reacció entre l'acrilat de polisulfona i p-fenilendiamina.....	101
Fig. 3.7.	Esquema de la reacció d'immobilització de la proteïna.....	102
Fig. 3.8.	Cromatograma d'endo-1,4-β-xilanasa II comercial.....	103
Fig. 3.9.	Cromatograma de la membrana enzimàtica ACPS.....	103
Fig. 3.10.	Gràfic dels <i>scores</i> PC2 vs PC1 de la matriu experimental. PC1 està relacionat amb l'activitat enzimàtica.....	104

Fig. 3.11.	Gràfics de superfície de resposta: activitat enzimàtica de les membranes de polímers monolítics respecte de la relació molar de dissolvents porogènics i el contingut d'EDMA a tres nivells d'AEM.....	106-107
Fig. 3.12.	Reacció d'immobilització de l'enzim assistida per EDC i NHS a les membranes de polímers monolítics per a la formació d'un enllaç covalent.....	108
Fig. 3.13.	Gràfic del perfil d'immobilització en condicions dinàmiques per a les membranes ACPS.....	113
Fig. 3.14.	Gràfic del perfil d'immobilització en condicions dinàmiques per a les membranes N25.....	114
Fig. 3.15.	Activitat enzimàtica relativa de les membranes respecte del temps d'immobilització estàtica.....	116
Fig. 3.16.	Perfil d'activitat enzimàtica relativa de l'enzim lliure i immobilitzat en membranes ACPS i N25 en funció del pH del medi.....	118
Fig. 3.17.	Perfil d'activitat enzimàtica relativa de l'enzim lliure i immobilitzat en membranes ACPS i N25 en funció de la temperatura.....	118
Fig. 3.18.	Concentració de producte (xilosa) respecte del temps, a diferents concentracions de substrat en membranes ACPS.....	122
Fig. 3.19.	Concentració de producte (xilosa) respecte del temps a diferents concentracions de substrat en membranes N25.....	123
Fig. 3.20.	Representació de dobles recíprocs per a les membranes ACPS.....	123
Fig. 3.21.	Representació de dobles recíprocs per a les membranes N25.....	124
Fig. 3.22.	Imatges SEM de la superfície de membranes ACPS (a) blanc (sense enzim) (b) amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada i (c) després d'usar-la en la reacció d'hidròlisi.....	125
Fig. 3.23.	Imatges SEM de talls transversals de membranes ACPS: (a) blanc i (b) amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada.....	126
Fig. 3.24.	Estructura dels porus en funció de la tècnica de preparació de membranes.....	127
Fig. 3.25.	Resultats gràfics del tractament de les imatges SEM de les figures 3.24 (a) i 3.24 (b) amb el programa IFME®.....	127
Fig. 3.26.	Imatges SEM de la superfície de membranes de polímers monolítics (N25) (a) blanc, (b) amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada, i (c) després d'usar-la en la reacció d'hidròlisi.....	129
Fig. 3.27.	Imatges SEM de la superfície de membranes de polímers monolítics (N25) (a) blanc, i (b) amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada.....	129
Fig. 3.28.	Imatges SEM del tall transversal de membranes de polímers monolítics (N25): (a) blanc i (b) amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada.....	130
Fig. 3.29.	Resultats gràfics del tractament de les imatges SEM de les figures 3.28 (a) i 3.28 (b) amb el programa IFME®.....	131
Fig. 3.30.	Fotografies AFM de la membrana d'acrilat de polisulfona (blanc).....	132
Fig. 3.31.	Fotografies AFM de la membrana d'acrilat de polisulfona amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada.....	133
Fig. 3.32.	Fotografies AFM de la membrana de polímers monolítics N25 (blanc).....	134
Fig. 3.33.	Fotografies AFM de la membrana de polímers monolítics N25 amb endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada.....	134
Fig. 3.34.	Cabal d'aigua pura a través de membranes ACPS (a) i N25 (b).....	135
Fig. 3.35.	Isoterma d'adsorció/desorció per a membranes ACPS.....	138
Fig. 3.36.	Distribucions de mida de porus per a l'adsorció i desorció per a les membranes ACPS.....	139
Fig. 3.37.	Isoterma d'adsorció/desorció per a membranes N25.....	140
Fig. 3.38.	Distribucions de mida de porus per a l'adsorció i desorció per a les membranes N25.....	140
Fig. 3.39.	Representació de l'àrea BET de membranes de polímers monolítics respecte del contingut d'AEM i de la relació molar de dissolvents porogènics (mols ciclohexanol/mols dodecanol). En tots els punts es manté la quantitat d'agent d'entrecreuament (EDMA) constant (714 μ l).....	142
Fig. 3.40.	Representació de diàmetre de porus de membranes de polímers monolítics respecte del contingut d'AEM i la relació molar de dissolvents porogènics (mols ciclohexanol/mols dodecanol, mantenint la quantitat d'EDMA constant (714 μ l).....	144
Fig. 3.41.	Detall de la seqüència de bases nitrogenades del plàsmid recombinant obtingut (AC12) i comparació amb la seqüència de l'endo-1,4- β -xilanasas II (XYN2).....	147
Fig. 3.42.	Experiments d'hidròlisi enzimàtica amb la cel·la UAB. tant per a les membranes ACPS com per a les membranes N25 a 23 °C i 50 °C.....	149
Fig. 3.43.	Experiments d'hidròlisi enzimàtica amb la cel·la UAB a 50 °C i temps llargs.....	150
Fig. 3.44.	Experiments d'hidròlisi enzimàtica amb membranes ACPS emprant la cel·la UAB a 50 °C, amb una dissolució de càrrega a pH 6.....	151
Fig. 3.45.	Experiments de reutilització de les membranes ACPS amb la cel·la UAB.....	152
Fig. 3.46.	Reutilització de la membrana N25 en experiments d'hidròlisi enzimàtica de <i>Birchwood xylan</i> consecutius a 50°C amb la cel·la UAB.....	153

Fig. 3.47.	Hidròlisi de <i>Birchwood xylan</i> amb el mòdul de filtració frontal amb membranes ACPS i N25 amb el mòdul de filtració frontal.	154
Fig. 3.48.	Reutilització de les membranes N25 en experiments consecutius d'hidròlisi de <i>Birchwood xylan</i> amb el mòdul de filtració frontal.	156
Fig. 3.49.	Reutilització de les membranes ACPS en experiments consecutius d'hidròlisi de substrats tipus URV, amb el mòdul de filtració frontal.	157
Fig. 3.50.	Reutilització de les membranes N25 en experiments consecutius d'hidròlisi de substrats tipus URV, amb el mòdul de filtració frontal.	158
Fig. 3.51.	Identificació dels xilooligòmers al cromatograma de la mescla de patrons	160
Fig. 3.52.	Electroferogrames de la injecció de les mostres d'hidròlisi enzimàtica de <i>Birchwood xylan</i>	161
Fig. 3.53.	Electroferogrames corresponents a les mostres d'hidròlisi del substrat URV.	162
Fig. 3.54.	Recta de calibratge obtinguda per a la xilosa emprant ribosa com a patró intern. En lila s'indica la mostra de control	162
Fig. 3.55.	Cromatograma UAB 0	165
Fig. 3.56.	Cromatograma UAB 1	165
Fig. 3.57.	Cromatograma UAB 6	166
Fig. 3.58.	Cromatograma UAB 24	166
Fig. 3.59.	Cromatograma URV 0	167
Fig. 3.60.	Cromatograma URV 1	167
Fig. 3.61.	Cromatograma URV 6	168
Fig. 3.62.	Cromatograma URV 24	168
Fig. 3.63.	Corba GPC corresponent a la mostra UAB 0	169
Fig. 3.64.	Corba GPC corresponent a la mostra UAB 1	169
Fig. 3.65.	Corba GPC corresponent a la mostra UAB 6	170
Fig. 3.66.	Corba GPC corresponent a la mostra UAB 24	170
Fig. 3.67.	Corba GPC corresponent a la mostra URV 0	171
Fig. 3.68.	Corba GPC corresponent a la mostra URV 1	171
Fig. 3.69.	Corba GPC corresponent a la mostra URV 6	172
Fig. 3.70.	Corba GPC corresponent a la mostra URV 24	172
Fig. 3.71.	Espectre de masses de la mescla de xilooligòmers	174
Fig. 3.72.	Superposició dels espectres MALDI de la hidròlisi de <i>Birchwood xylan</i> (substrat tipus UAB) amb enzim en dissolució.	175
Fig. 3.73.	Espectres MALDI d'hidròlisi del substrat tipus URV amb enzim en dissolució	176
Fig. 3.74.	Espectres MALDI de la hidròlisi del substrat tipus UAB i emprant el mòdul UAB i enzim immobilitzat en membranes ACPS.	177
Fig. 3.75.	Espectres MALDI de la hidròlisi de substrat tipus UAB amb el mòdul UAB emprant l'enzim immobilitzat en membranes N25.	178
Fig. 3.76.	Espectres MALDI de la hidròlisi del substrat tipus UAB i emprant el mòdul de filtració frontal i enzim immobilitzat en membranes ACPS.	178
Fig. 3.77.	Espectres MALDI de la hidròlisi de substrat tipus UAB amb l'enzim immobilitzat en membranes N25 i emprant el mòdul de filtració frontal.	179
Fig. 3.78.	Intensitat relativa del pic de xilotriosa respecte el pic de referència a 326 unitats de massa en funció del temps.	179
Fig. 3.79.	Espectres MALDI de la hidròlisi del substrat tipus URV, emprant l'enzim immobilitzat en membranes ACPS amb el mòdul de filtració frontal.	181

Taules

Taula 3.1.	Resultats de la microanàlisi elemental de la membrana d'ACPS precontacte amb proteïna. ...	102
Taula 3.2.	Resultats de la microanàlisi elemental de la membrana d'ACPS postcontacte amb proteïna ...	102
Taula 3.3.	Anàlisi de la regressió de l'activitat enzimàtica de les membranes de polímers monolítics.	105
Taula 3.5.	Resultats d'immobilització estàtica	111
Taula 3.6.	Resultats d'immobilització dinàmica	114
Taula 3.7.	Estabilitat de l'activitat enzimàtica de les membranes amb el temps	117
Taula 3.8.	Valors de velocitats inicials per a membranes ACPS i N25	124
Taula 3.9.	Resultats numèrics dels paràmetres obtinguts a partir del tractament de les imatges SEM de les figures 3.24 (a) i 3.24 (b) amb el programa IFME	128
Taula 3.10.	Resultats numèrics dels paràmetres obtinguts a partir del tractament de les imatges SEM de les figures 3.28 (a) i 3.28 (b) amb el programa IFME®	131
Taula 3.11.	Mesures d'angle de contacte per diferents membranes ACPS	145

Taula 3.12.	Resum de les masses dels pic observats als espectres MALDI dels xilooligòmers patró i comparació amb la massa teòrica dels adductes formats amb l'ió sodi	173
Taula 3.13.	Intensitat relativa de pics per a les mostres d'hidròlisi dels substrat tipus UAB.....	176
Taula 3.14.	Intensitat relativa de pics per a les mostres d'hidròlisi de la URV	177

4. VALORACIÓ DEL PROCÉS. Possibilitats d'aplicació i perspectives de millora.

Figures

Fig. 4.1.	Representació de la immobilització a l'atzar i la immobilització dirigida	193
Fig. 4.2.	Esquema del mòdul de membrana de configuració rectangular.....	194
Fig. 4.3.	Representació del procés de dessalinització mitjançant un sistema CMD.....	198

Taules

Taula 4.1.	Preus de l'any 2006, corresponents als 1,4- β -D-xilooligosacàrids. Font: catàleg Megazyme®.	187
Taula 4.2.	Resum dels costos de la derivatització de la polisulfona	188
Taula 4.3.	Resum dels costos de preparació de les membranes ACPS	188
Taula 4.4.	Resum dels costos d'immobilització de l'enzim.....	188
Taula 4.5.	Resum dels costos operatius	188
Taula 4.6.	Resum dels costos de la dissolució de <i>Birchwood xylan</i>	189
Taula 4.7.	Resum de quantitat de xilooligosacàrids recuperats a partir de la hidròlisi enzimàtica amb membranes ACPS	189
Taula 4.8.	Resum del cost d'obtenció de xilooligosacàrids amb processos de membrana i comparació amb el preu de xilotriosa comercial	190
Taula 4.9.	Resum dels costos de preparació de les membranes N25	190
Taula 4.10.	Resum dels costos d'immobilització de l'enzim.....	191
Taula 4.11.	Resum de quantitat de xilooligosacàrids recuperats a partir de la hidròlisi enzimàtica amb membranes N25	191
Taula 4.12.	Resum del cost d'obtenció de xilooligosacàrids amb processos de membrana i comparació amb el preu de xilotriosa comercial	192
Taula 4.13.	Dades del cost total de preparació de membranes enzimàtiques ACPS i N25 per m ² de membrana.....	195
Taula 4.14.	Resum dels costos operatius de treballar amb el mòdul de configuració rectangular	195
Taula 4.15.	Quantitats hipotètiques de xilooligosacàrids recuperats a partir de la hidròlisi enzimàtica amb membranes ACPS i N25 i el mòdul de configuració rectangular.....	196
Taula 4.16.	Resum del cost d'obtenció de xilooligosacàrids amb les dues membranes i els dos substrats amb el mòdul de configuració rectangular.....	196

SUMMARY

Nowadays, processes oriented to waste reduction and recovery of high added value products appear as a promising target. In this thesis, membrane systems based on selective membranes for the treatment of vegetal biomass waste like lignocellulosic materials are presented. Such waste products comprise a wide fraction of waste in oligosaccharide recovery processes in Catalonia and the Mediterranean area.

The different biomass resources, organic non-fossil material that can produce renewable energy, can be classified in terms of their origin as forestry, agricultural or residual biomass. Lignocellulosic waste materials have three main components: cellulose, hemicellulose and lignin, which represent a carbohydrate source. Celluloses and hemicelluloses represent between 75 and 95% of the total dry weight of carbohydrates. In particular, hemicelluloses are of special interest because they are more soluble than celluloses and they can provide valuable products. Hemicelluloses are heteropolysaccharides, as they contain at least two different types of sugar residues. The most common monomers are glucose, arabinose and xylose. These polymers present side chains and an amorphous structure, which is responsible for their physical properties. Among them, xylan is based on a polymeric backbone of xylose residues joined by 1,4- β -glycosidic bond and side branches linked attached by 1,2- α -glycosidic bond to the structure.

Oligosaccharides can be recovered by xylan hydrolysis. These oligosaccharides, which have a degree of polymerization between 2 and 10, become very relevant for certain applications in the pharmaceutical (viral processes and cancer treatment) and food industry (either as *Bifidobacteria* stimulating growth or as sweeteners and dietary fibres). In the last years, they have been considered in emerging and promising areas of application, such as the production of renewable energy sources like biofuels (bioethanol and biodiesel), which can be used in the automobile industry to reduce toxic emissions. Moreover, a growing interest is being focussed on new applications for biomass processing, like *Controlled Ecological Life Support Systems (CELSS)*, which aim to apply vegetal biomass as power and feed supply in space stations.

Membrane technology offers a promising alternative to conventional separation techniques for xylooligosaccharide recovery, since the use of organic solvents or other toxic reagents is excluded. The use of these compounds in the food and pharmaceutical

industry is very critical since it could affect the final product. The aim of this thesis is the design of enzymatic polymeric membranes for endo-1,4- β -xylanase II immobilization, which is the enzyme responsible for the hydrolysis of 1,4- β -glycosidic linkages of the xylan backbone.

Two different polymeric membranes and immobilization methods have been investigated. Physical entrapment in the polymeric structure led to the lost of the catalytic activity of the enzyme due to its deactivation, because of the presence of organic solvents in the membrane preparation. Consequently, only covalent immobilization between functional groups of the enzyme's amino acids side chains and groups in the support was performed. The first type of membranes used consisted of polysulfone acrylate (ACPS membranes). The raw polysulfone was functionalized with acrylate groups, which react with amino groups of lysine and arginine through a Michael type addition reaction. Protein immobilization was confirmed by HPLC analysis by comparison of the amino acid content in polysulfone acrylate membranes with the amino acid content in the free commercial xylanase solution.

The second type of membranes used were based on monolithic polymers (N25 membranes), which are porous polymeric materials that result from the polymerization of a monomer mixture and a crosslinking agent in an inert solvent. Both the crosslinker and the inert solvent are responsible for the final crosslinking degree and the porosity of the material. Therefore, the chemical characteristics of the monolithic polymers (i.e. functionality) and their physical properties (porosity and mechanical stability, among others) depend on the proper selection of the components and their content in the monolithic precursor solution. In our research, amino groups were included in the monolithic membrane composition to attach the activated enzyme-NHS conjugate. The composition of different membranes was varied to obtain the best catalytic activity. A response surface method was used to analyze the effect of variations in the settings of the experimental variables (components in the membrane precursor solution) in the response (enzymatic activity). From the obtained model it is possible to analyze all the experimental variables and obtain the best precursor membrane composition (amount of functional monomer, crosslinking agent and porogenic solvents ratio) in order to get the highest enzymatic activity for the immobilized enzyme.

In order to improve the efficiency of the enzymatic membranes, standard molecular biology techniques were used to genetically modify the amino acid sequence

of endo-1,4- β -xylanase II and introduce a single cysteine in the 3' end of the protein chain. This experimental part was carried out in collaboration with the University of Kentucky (USA). As this enzyme has no cysteine amino acids in its sequence, the introduction of this single cysteine at the end of the sequence would allow 'Site-directed immobilization' by reacting the sulfhydryl group of this cysteine with a proper reactive support. In this sense, the covalent linkage would be achieved in one step, away from the active site of the enzyme. In this sense, blockage of this active site, which can take place during random immobilization, could be avoided. This led to a higher content of "real" immobilized active enzyme on the surface. Nevertheless, as the results of the site directed mutagenesis were not satisfactory, 'Site-directed immobilization' could not be performed, leaving this research topic still open for further investigation.

Different enzyme immobilization conditions in both types of membranes were studied and compared to evaluate their immobilization capacity. For the two proteins considered (endo-1,4- β -xylanase II and lysozyme) higher enzyme retention was obtained in static conditions, as the residence time of the enzyme solution with the reactive support was not high enough to enable the linkage in dynamic conditions. Moreover, ACPS membranes retained more enzyme than N25, although this does not imply higher enzymatic activity, since activity depends on the stabilization of the immobilized protein. The influence of the immobilization parameters on the enzymatic activity (temperature and pH) was studied for both immobilized enzymatic membranes and compared with the results obtained for the free enzyme. In the latter case, as well in ACPS membranes, the optimum pH observed was 6, while in N25 membrane the best results, were obtained at pH 5. Concerning temperature, in all cases the best results were achieved when working at 50 °C. With regard to the enzyme kinetic parameters, Michaelis constant K_m experimental values for the immobilized enzyme in the two membranes were close to the bibliographic ones for the free enzyme towards the same substrate and at the same conditions. This means that the enzyme affinity for the substrate considered (Birchwood xylan) remained intact. Moreover, the optimization of the enzyme immobilization time and the enzymatic activity of the immobilized enzymes were studied. The results showed that, once immobilized, in both membranes the enzyme kept its enzymatic activity for a month, which is interesting for applications in real processes.

Different techniques were used for the physical characterization of ACPS and N25 membranes. Scanning Electron Microscopy (SEM) results showed that ACPS

membranes present an asymmetric porous structure with macrovoids, while the N25 monolithic membranes are symmetric and constituted from different aggregates. The voids among these aggregates form the pores of such structures. When SEM and Atomic Force Microscopy (AFM) images of membranes without (blank) and with enzyme were compared, only significant differences were observed for N25 membranes. The pure water fluxes were also determined, and results revealed that the N25 membranes exhibit higher fluxes than the ACPS ones, due to the resistance offered by a dense layer detected by SEM imaging. Surface area and pore distribution data were calculated from gas adsorption-desorption measurements. N25 membranes have a higher surface area and pore distributions with higher average pore diameter than ACPS. Contact angle measurements showed a more hydrophilic character for N25 than ACPS, with increasing hydrophilicity with immobilized enzyme in both membrane types.

Apart from the physical properties, the selection of the best membrane depends on its performance in hydrolysing the target substrates. Our membranes were used for the treatment of substrates from different biomass resources: Birchwood xylan and samples from direct treatment of vegetal feedstock (URV substrate samples) that result from the hydrolysis of dry corn shells (performed at *Grup de Biopolimers Vegetals de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química (ETSEQ), Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona, Catalunya*). Two different membrane modules were used to study the enzymatic hydrolysis of the previously mentioned solutions. Complete separation of the products from the initial feed substrate was achieved only in dead-end mode. By using N25 membranes higher yields of hydrolysis products from enzymatic hydrolysis of *Birchwood xylan* (0.650 $\mu\text{mol/ml}$, expressed as xylose) were obtained, compared to ACPS membranes under the same conditions (0.150 $\mu\text{mol/ml}$ expressed as xylose too). It was not possible to reuse the N25 enzymatic membranes in a second hydrolysis cycle with new substrate solution. In contrast, when treating URV substrate samples, ACPS membranes could be reused, although the concentration of products was lower than that obtained during the first hydrolysis experiment. This different behaviour is due to the dependence of the enzyme affinity with the substrate. These results indicate that the final choice of membrane will depend on the final application and besides xylooligosaccharide recovery, further aspects, such as economic feasibility and performance requirements, should be considered.

Three analytical techniques, besides the colorimetric assay (Nelson's method), were considered in the study and characterization of the hydrolysis products: Capillary Electrophoresis (CE), Gel Permeation Chromatography (GPC) and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). Among them, GPC and MALDI-TOF-MS were selected to determine the degree of polymerization of the products. Despite the high cost of the equipment, the latter technique was of special importance as it exhibited the advantage of low simple requirements, low waste generation, quick result acquisition and availability. In the analyzed samples from the treated substrates, the unique observed specie was xylotriose, which could be expected according to the catalytic structure of the enzyme active side. Only in few samples treated for longer reaction times xylobiose was also observed.

Finally, a global evaluation of these membrane processes is presented in this work, as well as main improvements to be considered during future research.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1. Carbohidrats

Inicialment s'emprava el mot carbohidrat per a referir-se a aquells compostos que en la seva composició responien a la fórmula $C_x(H_2O)_y$. Actualment designa compostos de tipus polihidroxialdehid i cetones i els seus derivats,¹ així com aquelles substàncies que en ser hidrolitzades alliberen polihidroxialdehids o cetones. Constitueixen una font d'energia molt important per als organismes vius i també tenen funcions de tipus estructural.

1.1.1. Classificació dels carbohidrats

Els monosacàrids són els sucres més simples que es coneixen i no es poden hidrolitzar en entitats més petites. Els disacàrids estan constituïts per dues unitats de monosacàrids unides a través d'un enllaç glicosídic (per pont d'oxigen, en el qual es perd una molècula d'aigua). Si contenen entre 2 i 10 unitats de monòmer, els carbohidrats corresponents es coneixen com a oligosacàrids. Els polisacàrids, també coneguts amb el nom de glicans,² consisteixen en monosacàrids units entre ells per enllaços glicosídics. Els polisacàrids formats per un sol tipus d'unitat de monosacàrid s'anomenen homopolisacàrids, mentre que els que contenen més d'un tipus d'unitat de monòmer reben el nom d'heteropolisacàrids.

1.1.2. Materials lignocel·lulòsics

Els materials lignocel·lulòsics estan constituïts per 3 components principals: cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina, a més d'altres components minoritaris com cendres i extractants, entre d'altres. Els tres primers components tenen un pes molecular elevat i són majoritaris. Generalment, el percentatge de cel·lulosa en aquests materials és d'un 60%, en pes sec; l'hemicel·lulosa, entre un 20 i un 40%; i la lignina, entre un 5 i un 25 %. La resta de components es troben en baixa proporció respecte del pes total.³ El contingut de carbohidrats total en pes sec en els materials lignocel·lulòsics comprèn entre un 55% i un 75%.

En termes de percentatge en pes de cel·lulosa i hemicel·lulosa, les fustes de tipus dur (*hardwood*) presenten un contingut elevat d'aquests components, mentre que les fustes de tipus tou (*softwood*) tenen una proporció de lignina més alta que les anteriors.

La cel·lulosa és un polímer lineal que està constituït per residus de glucosa units a través d'enllaços 1,4- β -glicosídics per a donar lloc a un esquelet de glucogen. Les cadenes de cel·lulosa s'ordenen de manera paral·lela per donar lloc a una estructura cristal·lina, a conseqüència de la formació de ponts d'hidrogen intra i intermoleculars, a través dels grups OH.

Les hemicel·luloses comprenen un grup d'heteropolisacàrids complexos que contenen un mínim de dos tipus diferents de residus de sucres.¹ Els polímers d'hemicel·luloses tenen cadenes curtes, ramificacions i una estructura amorfa. A conseqüència d'aquesta estructura amorfa, són parcialment solubles en aigua. L'esquelet de les cadenes d'hemicel·lulosa pot ser un homopolímer o un heteropolímer (repetició de més d'un residu de monosacàrid diferent). Alguns monòmers que constitueixen les hemicel·luloses són la glucosa, la manosa, l'arabinosa i la xilosa, i les cadenes laterals contenen xilosa, galactosa i fucosa.⁴ De tots ells, el component majoritari n'és la xilosa.

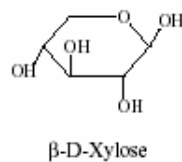


Fig. 1.1. Unitat de xilosa.

Les hemicel·luloses s'associen per enllaços d'hidrogen a les fibres de cel·lulosa la qual cosa origina una xarxa que proporciona l'esquelet estructural de les parets de les cèl·lules vegetals.⁵ La lignina és un polímer d'elevat pes molecular i de naturalesa aromàtica, constituït generalment per unitats de fenilpropà, que presenta una estructura complexa ramificada i entrecreuada.⁶ La lignina confereix estabilitat mecànica a la fusta ja que actua d'agent reforçant de les fibres. Normalment la lignina recobreix els constituents de tipus carbohidrat (cel·luloses i hemicel·luloses) prevenint l'acció dels enzims responsables de la degradació d'aquests.⁶ Algunes de les unitats monomèriques de la lignina es mostren a continuació.

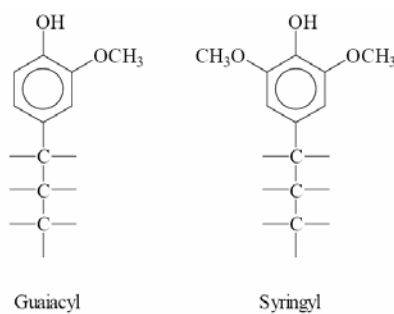


Fig. 1.2. Monòmers constituents de la lignina.

Els extractants són compostos orgànics d'elevat pes molecular i solubles en dissolvents neutres. Exemples d'aquest tipus de compostos són les resines, ceres, àcids grassos, alcohols, terpentines, tanins i flavonoides, entre d'altres.

1.1.2.1. El xilà

És un polímer de tipus hemicel·lulòsic que és hidrolitzat per animals i microorganismes.⁷ Està constituït per un esquelet de residus de xilosa units entre si per enllaços 1,4- β -glicosídics i per ramificacions a través d'enllaços 1,2- α -glicosídics amb grups d'àcid 4-O-metilglucurònic. En alguns casos, els grups OH laterals poden estar substituïts per grups O-acetil, concretament en els C2 i C3.⁸

Els xilans comercials que es recuperen a partir d'extracció alcalina tenen un baix percentatge de substitució⁹ i l'eliminació dels grups acetil, i el trencament de part dels entrecreuaments, augmenta la degradabilitat del xilà. A mesura que disminueix el grau de substitució, el grau de digestibilitat de les hemicel·luloses augmenta. Per aquest motiu, la majoria d'assaigs i estudis es fan amb xilans comercials.

1.1.2.2. Recuperació de xilooligosacàrids a partir de residus de biomassa vegetal

El conjunt de materials que procedeixen de plantes es coneix amb el nom de biomassa i comprèn material orgànic d'origen no fòssil a partir del qual és possible obtenir energia. Aquest concepte inclou materials que es poden classificar en funció del seu origen, en fangs de plantes de tractaments d'aigües, residus sòlids urbans, i residus d'origen agrícola i forestal. Els majoritaris són precisament aquests darrers, que comprenen productes que provenen directament de conreus, manteniment de boscos i subproductes del tractament de la fusta i representen aproximadament 40 milions de tones de residus sòlids per any.¹⁰ D'acord amb les dades de l'Institut Català de l'Energia (ICAEN) al Pla Estratègic de l'Energia a Catalunya per al període 2006-2015,¹¹ es preveu que la reutilització de biomassa d'origen agrícola i forestal per a diferents aplicacions s'incrementi en un 45,5 % respecte de les dades relatives al consum per a l'any 2003.

Els materials lignocel·lulòsics constitueixen la fracció vegetal no digerible (*non-edible*) de la biomassa vegetal, i representen el reservori més gran de carbohidrats potencialment fermentables al món. S'estima que un 50% o més dels residus secs vegetals no són digeribles,¹² i que aproximadament es produeixen a escala mundial 50 bilions de tones dels materials lignocel·lulòsics majoritaris (cel·lulosa i hemicel·lulosa).¹³ La conversió d'aquesta fracció no digerible en mono i oligosacàrids

proporciona una via de recuperació de sucres que presenten un ampli ventall d'aplicacions, que han evolucionat des de les més tradicionals (construcció, alimentació de bestiar) fins a nous usos industrials en diferents àmbits, com ara la seva incorporació a aliments per al consum humà o com a font de nutrients, i per a la proliferació de cultius bacterians, de llevats i de fongs. De la multiplicitat d'aplicacions dels productes recuperats de biomassa vegetal, se'n parla amb més detall en aquest capítol.

El fraccionament dels materials lignocel·lulòsics mitjançant processos físicoquímics per a separar els 3 polímers constituents (cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina) és una etapa necessària per al desenvolupament de qualsevol aplicació, ja sigui en química de base o química fina. És d'especial importància el pretractament dels residus crus, ja que permet reduir i alterar els impediments estructurals intrínsecs dels materials lignocel·lulòsics per tal d'afavorir posteriorment els processos d'hidròlisi, tot facilitant l'accessibilitat dels enzims que converteixen els polímers de carbohidrats en sucres més petits.⁵ L'objectiu, en tots els casos, és trencar el recobriment de lignina i alterar l'estructura cristal·lina de la cel·lulosa. Hi ha diferents categories de pretractaments, bé de tipus físic (vapor a altes pressions sense addició de catalitzadors, i tractaments amb aigua a temperatures elevades), químic (tractaments hidrolítics en medi àcid o bàsic), o en alguns casos una combinació de tots dos.¹⁴ Per la mateixa naturalesa dels materials lignocel·lulòsics, els processos de tractament hidrolític, ja siguin en medi àcid o bàsic, constitueixen l'opció més efectiva per a aconseguir el seu fraccionament amb un rendiment adequat per als seus usos posteriors.⁵

La recuperació d'oligosacàrids a partir del tractament de residus sòlids és una àrea en desenvolupament. Per exemple, en la indústria del malt, els grans i els fragments de closques de civada o d'avellana es tracten en aigua per tal d'hidrolitzar la fracció d'hemicel·lulosa (reacció d'autohidròlisi). Les hemicel·luloses procedents de closques de civada¹⁵ són xilans substituïts en els quals l'esquelet de 1,4- β -D-xilopiranoses té substituents com arabinosa, àcid urònic i/o acetils. En condicions d'autohidròlisi, l'acció dels ions hidroni presents a l'aigua i dels generats pels grups acetyl condueix al trencament dels heterocicles d'èter dels xilans, donant com a resultat l'obtenció dels xilooligosacàrids. El tractament directe dels residus sòlids és un procés complicat a causa de la presència d'altres components dels residus vegetals, com per exemple la lignina. Per això el medi de reacció és més complex, de manera que la solubilitat dels xilooligosacàrids pot estar limitada. A conseqüència d'això, cal un tractament posterior del medi obtingut després del procés d'autohidròlisi, per tal d'eliminar els components

no oligosacàrids i purificar els productes d'interès. Alguns tractaments inclouen l'ús de membranes polimèriques¹⁶ o membranes de carbó activat.¹⁷

A partir de les fraccions obtingudes en processos d'autohidròlisi, també es pot realitzar un tractament enzimàtic, per tal de degradar les fraccions del xilà i obtenir oligosacàrids de grau de polimerització menor, útils tant en la indústria alimentària com farmacèutica. Un aspecte clau en els processos de fraccionament de materials lignocel·lulòsics és disposar d'operacions de purificació que permetin aïllar els productes (oligosacàrids) amb un elevat grau de puresa. Aquest és un aspecte crític si l'aplicació dels productes anteriors és en els esmentats camps (alimentari o farmacèutic). L'ús de dissolvents o additius en etapes de separació convencionals, com per exemple l'extracció líquid-líquid,¹⁸ pot comportar la presència de traces de contaminants que farien inviables les aplicacions anteriors, per la qual cosa els processos de separació basats en membranes ofereixen un ampli ventall de possibilitats de concentració i purificació de productes. Es pretén utilitzar processos de baix impacte ambiental per al desenvolupament de totes les etapes de producció i purificació implicades en el procés.

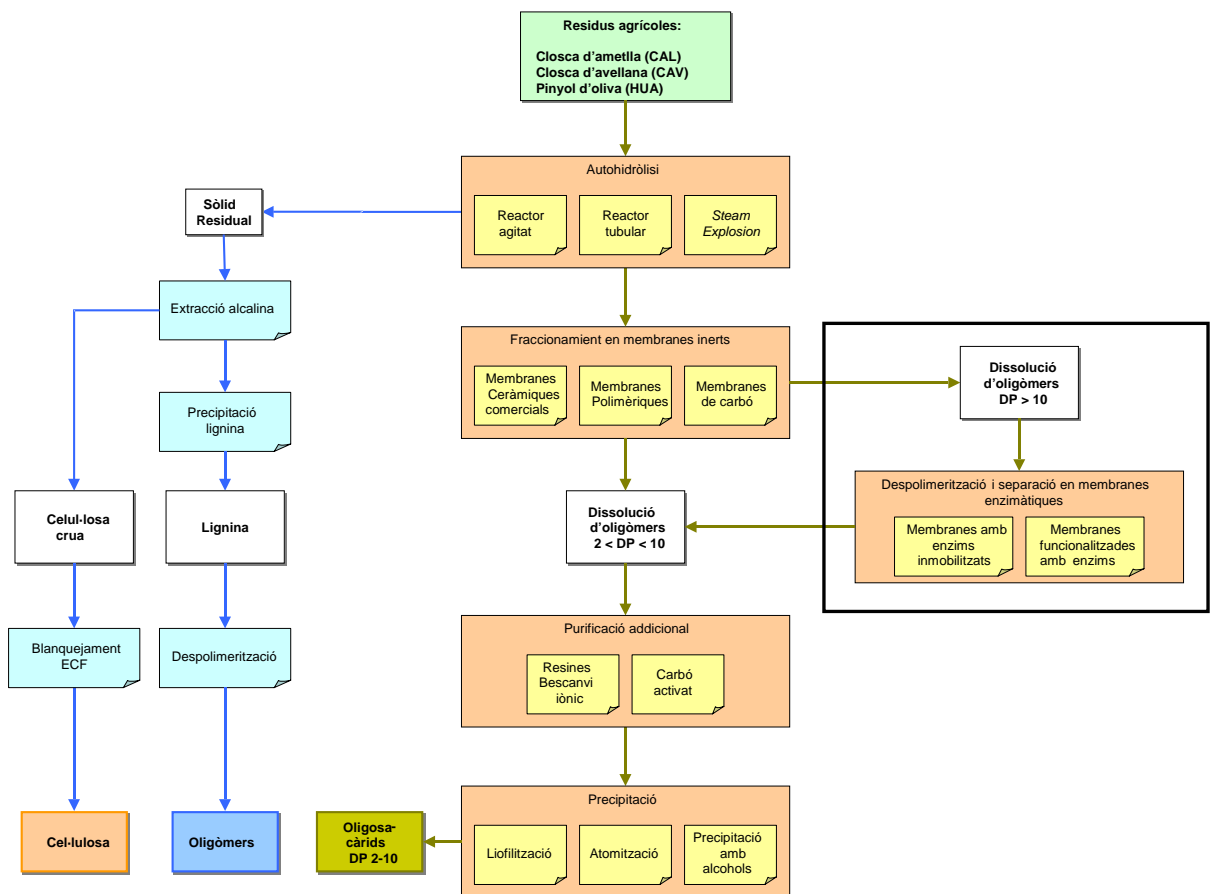


Fig. 1.3. Diagrama de procés de recuperació d'oligosacàrids de biomassa vegetal.

1.1.2.3. Aplicacions dels xilooligosacàrids

A partir de la hidròlisi de residus agrícoles de biomassa vegetal, és possible obtenir diferents fraccions que continguin carbohidrats de diferent pes molecular, així com lignina. D'aquesta mescla es poden recuperar oligosacàrids de mida molecular determinada (grau de polimerització entre 2 i 10), que s'utilitzen per a aplicacions posteriors. En el camp alimentari, els xilooligòmers d'interès comprenen aquesta fracció de baix pes molecular, i solen emprar-se com a edulcorants sintètics i fibres dietètiques¹⁹ i com a ingredients en aliments probiòtics, ja que presenten efectes beneficiosos per a la salut en preparats alimentaris. Alguns avantatges que ofereixen aquests xilooligòmers són que tenen bones propietats organolèptiques, no presenten toxicitat ni efectes nocius sobre la salut²⁰ i no són metabolitzables pel sistema digestiu humà. També presenten més estabilitat a pH àcid i temperatures moderades que d'altres oligosacàrids no metabolitzables, la qual cosa suposa un avantatge en l'aplicació a aliments processats.

Respecte de les aplicacions fora del camp de l'alimentació, dins de l'àrea farmacèutica s'han desenvolupat diferents usos dels xilooligòmers en el desenvolupament de derivats actius per al tractament de processos virals^{21, 22, 23} i cancerosos,²⁴ igual que en el tractament preventiu d'infeccions intestinals, com a agents contra l'osteoporosi i l'otitis; i també en l'àrea d'alimentació d'animals i en aplicacions agrícoles, com a estimulants del creixement i del rendiment d'alguns cultius.²⁰

L'aplicació dins del camp dels aliments probiòtics és d'especial interès. Estudis duts a terme *in vitro* posen de manifest que les *Bifidobacteria* utilitzen els xilooligosacàrids com a font d'energia, mentre que *Clostridium* i *E. Coli* no proliferen davant aquests carbohidrats.

El xilooligòmers són estables a pH 7 o inferior;²⁵ per tant, no són degradats pel baix pH dels sucus gàstrics ni per enzims digestius humans ni animals. Així doncs, els xilooligòmers poden arribar al tracte intestinal inferior sense ser absorbits i poden ser emprats com a estimulants del creixement de *Bifidobacteria*. Experiments realitzats *in vivo* amb adults demostren que amb la ingestió de xilooligosacàrids el percentatge de *Bifidobacteria* s'incrementa d'un 10% a un 32%, a la segona setmana des que comença l'administració.²⁶ Atès que la quantitat de *Bifidobacteria* disminueix després d'interrompre l'administració de xilooligòmers, s'arriba a la conclusió que l'increment era conseqüència de l'efecte dels xilooligosacàrids. Tenint en compte que aquests afavoreixen pràcticament només l'increment de *Bifidobacteria*, mentre que els nivells

d'altres espècies es mantenen constants, els xilooligosacàrids poden ser considerats amb propietats d'efecte "bifidus", i els efectes es poden atribuir a una dosi diària de 2 g en edat adulta.²⁶ En altres estudis realitzats, es posa de manifest que un increment de les *Bifidobacteria* redueix el risc de patir càncer de còlon.

Una altra aplicació dels xilooligosacàrids és la producció de xiclets, que presenten avantatges respecte dels xiclets convencionals,²⁷ i permeten evitar els seus efectes adversos en l'estómac i els intestins. En aquest cas, la base del xiclet està constituïda per un 20-30% de goma, un 10-30% de xilooligosacàrids i entre un 40-70% d'additius. Comparant-los amb xiclets convencionals, aquests no presenten efectes laterals o nocius en l'aparell digestiu.^{28,29}

Una de les aplicacions més innovadores dels oligosacàrids obtinguts en el tractament de residus agrícoles és la producció d'energia. D'aquesta manera, alhora que es redueix la quantitat de residus s'està obtenint energia renovable.³⁰ A partir dels carbohidrats és possible obtenir biofuels (bioetanol i biodièsel), que es poden emprar com a combustibles per a vehicles o com a additius dels combustibles convencionals, per a reduir les emissions. La combustió de recursos fòssils augmenta la concentració de CO₂ a l'atmosfera i contribueix a incrementar l'anomenat efecte hivernacle, que condueix a un escalfament global del planeta. L'ús d'energies renovables, a banda de representar una millora econòmica i una independència de recursos exteriors, permet reduir aquest impacte ambiental. El bioetanol s'obté de la fermentació de sucres procedents de biomassa. Les etapes de producció de bioetanol comprenen en un primer pas la hidròlisi, tant en medi àcid com enzimàtica, de polisacàrids complexos en sucres de menor pes molecular. L'etapa següent consisteix en la fermentació d'aquests sucres, assistida per bacteris o llevats, que els converteixen en etanol i CO₂. Aquest etanol requereix etapes posteriors de recuperació, purificació i deshidratació abans de ser emprat com a combustible. En aquest procés, la lignina que estava present en els materials de partida també s'aprofita, ja que la seva combustió permet obtenir energia, la qual és necessària per als processos de producció del bioetanol, tot afavorint econòmicament el procés global.³

Paral·lelament s'han dut a terme estudis en els quals es considera el processament de la biomassa vegetal alhora com a font d'energia i com a aliment per integrar-se en un sistema ecològic autosuficient controlat, conegut amb el nom de *Controlled Ecological Life Support System* (CELSS).⁶ En un CELSS, la hidròlisi enzimàtica és un procés atractiu, ja que no requereix l'ús de reactius tòxics, els productes de degradació no

constitueixen un problema de residus i en cas que fos necessari es poden produir enzims *in situ*. Aquests estudis s'orienten cap a la possibilitat d'aplicació en un futur a estacions espacials.

1.2. Enzims

Un enzim es una proteïna que catalitza o accelera una reacció química. El nom prové del grec *ένζυμο*, *énsymo*, que literalment vol dir *én* (en) i *symo* (ferment o llevat).

Els enzims són catalitzadors biològics o biocatalitzadors formats per una part proteica, anomenada apoenzim. Per tal que presentin activitat necessiten una part no proteica, que s'anomena coenzim, si es tracta d'una molècula orgànica, i cofactor, si es el cas d'un ió metàl·lic. El conjunt de l'enzim amb el corresponent coenzim o cofactor s'anomena holoenzim.³¹ Com a catalitzadors, no es consumeixen al llarg d'una reacció química, romanen inalterats. No alteren el balanç energètic de la reacció, només ofereixen una via de reacció amb una menor energia d'activació, l'energia necessària per iniciar la reacció química, per la qual cosa el procés arriba a l'estat d'equilibri més ràpidament.

El paper dels enzims en els sistemes vius és d'especial importància, ja que en els sistemes biològics la majoria de reaccions que tenen lloc transcourrien molt lentament o conduirien a l'obtenció d'altres tipus de productes.

1.2.1. Classificació i nomenclatura dels enzims

La nomenclatura i classificació dels enzims està assignada per la Comissió dels Enzims (EC, *Enzyme Commission*, organització internacional), la qual assigna a cada enzim un número de 4 xifres (E.C. number) i un nom. L'EC classifica els enzims en 6 grups, en funció del tipus de reacció catalitzada. Si bé hi ha d'altres criteris de classificació dels enzims, per conveni s'utilitza el proposat per l'EC. Aquests grups es presenten a la següent taula:

<i>Grup</i>	<i>Número</i>	<i>Reacció catalitzada</i>
Oxidoreductases	1	Reaccions de transferència d'electrons (redox)
Transferases	2	Transferència d'un àtom o grup d'àtoms entre dues molècules
Hidrolases	3	Reaccions d'hidròlisi i a la inversa
Liasas	4	Reaccions d'eliminació d'un grup d'àtoms del substrat
Isomerases	5	Isomeritzacions moleculars
Ligases o sintetases	6	Formació d'enllaços covalents entre dues molècules

Taula 1.1. Classificació dels enzims en funció del tipus de reacció que catalitzen.

1.2.2. Les xilanases

Les xilanases són enzims del tipus hidrolasa, és a dir, catalitzen una reacció d'hidròlisi, i dins del grup de les hidrolases pertanyen al grup 3.2, corresponent a les glicosidases, que hidrolitzen enllaços glicosídics. Alhora se subclassifiquen dins el grup 3.2.1, que són les que hidrolitzen els enllaços S- i O-glicosídics.

Les xilanases són específiques per a enllaços 1,4- β -glicosídics del xilà i es designen com a endoxilanases. Hi ha diferents tipus d'endoxilanases. La majoritària es l'endo-1,4- β -xilanasa II (E.C. 3.2.1.8), la qual, tal com indica el seu nom, catalitza específicament la hidròlisi dels enllaços anteriors a l'interior d'una cadena polimèrica de xilà. Generalment, l'activitat i l'afinitat de les xilanases decreix quan el grau de polimerització del substrat decreix.³² Algunes xilanases són específiques per a hidrolitzar enllaços de xilà no substituït, mentre que en altres casos requereixen grups substituents adjacents a l'enllaç glicosídic que hidrolitzen. En aquests darrers casos s'ha observat que la presència dels grups substituents és essencial per a orientar el substrat al centre actiu de l'enzim.³³

En general, aquests enzims trenquen els enllaços 1,4- β interns de l'esquelet del xilà i alliberen preferentment xilobiosa i xilotriosa, o oligòmers substituïts de 2 a 4 unitats. La majoria de xilanases trenquen el xilà, deixant a l'extrem no reductor el substituït.³⁴

L'activitat enzimàtica de l'endo-1,4- β -xilanasa II es determina normalment mesurant els sucres reductors alliberats del xilà,³⁵ per acció de l'enzim seguint el mètode de Nelson³⁶ o el *nitrosalicilic method* (DNS).^{37, 38} Tot i que aquests dos mètodes permeten detectar la capacitat d'un enzim d'hidrolitzar el xilà, no posen de manifest quins productes s'han obtingut, la qual cosa és important en l'estudi de degradació del xilà. Per tant, cal una anàlisi dels productes obtinguts per a obtenir informació detallada sobre el mode d'acció del xilà en qüestió.

1.2.2.1. Estructura

Basant-se en la seqüència d'aminoàcids, les xilanases s'agrupen dins les famílies 10 i 11 de les glicosidases.³⁹ La família 10 comprèn les xilanases de tipus àcid i de pes molecular alt, mentre que les de tipus bàsic i pes molecular baix pertanyen a la família 11. S'ha observat que les endoxilanases de la família 10 hidrolitzen homoxilans i heteroxilans (substituïts) en un grau de polimerització més alt que les de la família 11.

A més a més, les xilanases de la família 10 requereixen dues unitats de xilosa no substituïdes entre els punts de ramificació, mentre que les de la família 11 en requereixen tres.⁴⁰ El mode d'acció predit per a ambdues famílies es mostra a la figura següent:

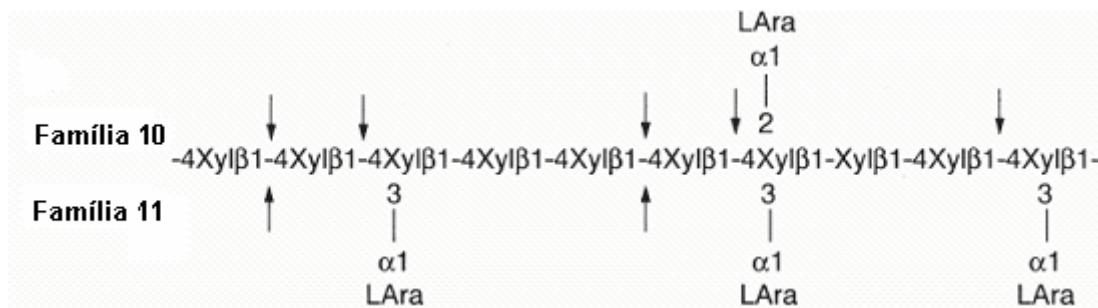


Fig.1.4. Mode d'acció de les endoxilanases de les famílies 10 i 11. Les fletxes indiquen els llocs d'atac sobre diferents substrats.

La família 10 presenta una estructura de plegament α/β barrel (barril) mentre que les de la família 11 tenen una estructura β -jelly roll (rotlle de gelatina), amb dues fulles β paral·leles que es pleguen sobre si mateixes, i una α -hèlix.⁴¹ Les dues famílies es diferencien també en el seu comportament enfront de xilans substituïts o no. En general, les xilanases de la família 10 hidrolitzen xilotriosa i xilotetraosa més ràpidament que les xilanases de la família 11. Les de la família 10, a més, també poden hidrolitzar alguns enllaços 1,4- β -glucopiranosil, mentre que les de la família 11 no.⁴⁰

Les endoxilanases són produïdes per diferents tipus de microorganismes, *Euphausia superba*, *Streptomyces sp* i *Trichoderma reesei* entre d'altres. En el cas de les xilanases produïdes per *Trichoderma reesei*, se'n diferencien dos tipus anomenats endo-1,4- β -xilanasa I i endo-1,4- β -xilanasa II (XYN I i XYN II, respectivament). Ambdues pertanyen específicament a la família 11 i, per tant, tenen la propietat de retenir la configuració del carboni anomèric durant la reacció d'hidròlisi.⁴²

Respecte de la seva estructura terciària, la XYN I és més petita, ja que està formada per 178 residus d'aminoàcids, mentre que la XYN II és una molècula d'un sol domini que en conté 190. Com ja s'ha comentat, tenen una estructura β -jelly roll, de manera que les dues fulles β paral·leles estan recargolades i formen un rínxol en un costat. A més, té una α -hèlix. Normalment, s'estableix una analogia entre l'estructura terciària de les xilanases i una mà dreta. Les fulles β s'assimilen als dits, mentre que l'hèlix α correspondria al palmell. La llarga espiral entre les cadenes B7 i B8 recorden la forma del dit gros de la mà (polze o thumb).

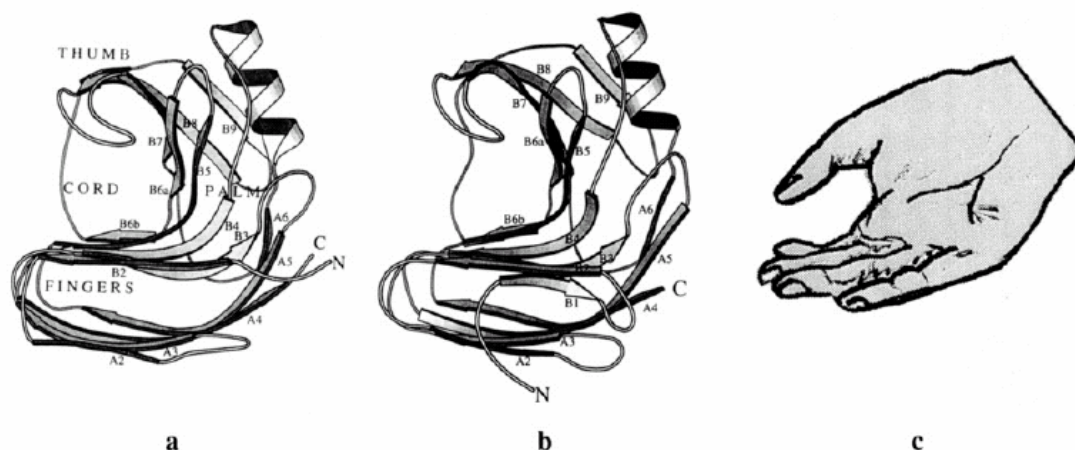


Fig. 1.5. Analogia entre l'estructura terciària de la XYN I (a) i XYN II (b), i analogia amb l'estructura de la mà dreta.

La XYN I és un enzim àcid, té un punt isoelèctric de 5,2 i presenta activitat màxima a pH 3,5, mentre que la XYN II és bàsica i té un punt isoelèctric de 9,0 i un pH òptim entre 5 i 6. La diferència principal entre aquestes, respecte de la composició química, és el nombre de residus d'arginina i lisina. Mentre que a la XYN I només n'hi ha 4, a la XYN II n'hi ha 10. Aquests residus, carregats positivament, es troben principalment als extrems del polze.

La XYN I té un rang de pH actiu entre 3 i 6 (amb un màxim a 3,5), mentre que la XYN II té activitat entre pH 4 i 8 (i el màxim a 5,3). El pH òptim depèn de les propietats àcid-base dels àcids glutàmic Glu 164_{XYNI} i Glu 177_{XYNII}. La diferència en el pH òptim entre les dues xilanases rau en la diferència en l'enllaç d'hidrogen d'aquests residus de Glu. A la XYN I, l'aminoàcid àcid aspàrtic, Asp 33_{XYNI}, fa un pont d'hidrogen fort amb el Glu 164_{XYNI}, per la qual cosa s'estabilitza l'àcid glutàmic i, per tant, disminueix el pKa d'aquest aminoàcid⁴² i, com a conseqüència, la XYNI és capaç de cedir el seu protó a pH més baixos, de manera que es justifica que el seu pH òptim sigui inferior al de la XYNII. En aquesta altra, en canvi, hi ha una asparagina Asn 44_{XYNII}. L'enllaç d'hidrogen és més dèbil i hi ha una menor interacció entre els residus. Això incrementa el valor del pKa del Glu en la XYN II fins a 6,7^{41, 43} mentre que en forma lliure és 4,3 i, per tant, es produeix també un increment del seu pH òptim de treball.

A la XYN I hi ha 3 llocs catalítics, mentre que a la XYN II n'hi ha 5. En el cas de la XYN I, el lloc corresponent a l'extrem reductor només en té un i el no reductor en té 2; per tant, l'enllaç amb el substrat està orientat cap a l'extrem no reductor. A la XYN II hi ha 5 llocs catalítics, 3 a l'extrem reductor i 2 a l'extrem no reductor. D'aquesta manera, la xilopentaosa pot ser hidrolitzada al segon, tercer o quart enllaç glicosídic,⁴⁴ la qual cosa podria explicar-se tenint en compte que el primer o darrer lloc catalítics estan

desocupats, i la resta participen en la unió amb el lligand (substrat). A més llocs catalítics en l'extrem reductor, més probabilitat de dirigir l'enllaç del lligand cap a l'extrem reductor de la cadena de xilosa.

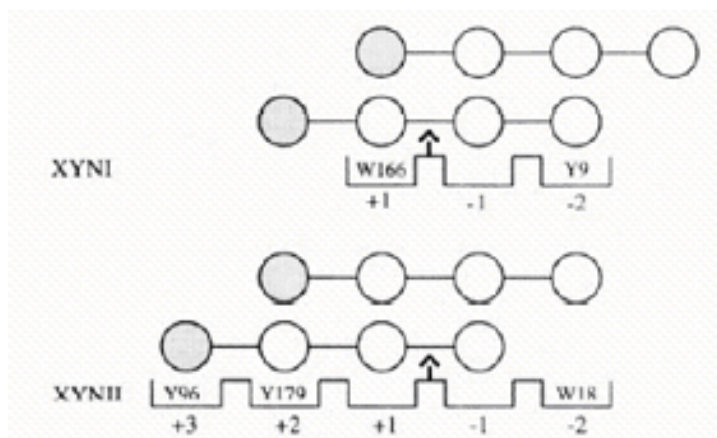


Fig. 1.6. Model esquemàtic per a representar els llocs actius d'XYN I i XYN II, respectivament. Els nombres positius representen els extrems reductors i els negatius els no reductors.

1.2.2.2. Mecanisme catalític i inhibició

Com s'ha esmentat anteriorment, les xilanases catalitzen hidròlisis estereoselectives dels enllaços glicosídics (enllaços que uneixen molècules de sucres entre si, a través de la unió entre un grup hemiacetal d'un sacàrid i un hidroxil) amb inversió o retenció de la configuració respecte del centre anomèric.⁴⁵ La inversió té lloc a través d'un mecanisme de desplaçament simple, mentre que la retenció és conseqüència d'un doble desplaçament. Tots dos mecanismes segueixen una hidròlisi assistida de tipus àcid-base. Durant la inversió, la protonació de l'oxigen glicosídic i la sortida de l'aglicona (part no sucre de la molècula) estan acompanyats per un atac d'una molècula d'aigua que és activada per una molècula de base. La substitució nucleofílica condueix a l'obtenció d'un producte amb estereoquímica oposada al substrat. El mecanisme de retenció comporta dues etapes: en la primera, un residu catalític àcid protona l'oxigen glicosídic i es trenca l'enllaç C-O. El carboxilat desprotonat, actuant com a nucleòfil, ataca el centre anomèric per a donar un intermedi covalent glicosil-enzim. L'etapa següent implica l'atac d'una molècula d'aigua, assistida per la base conjugada de l'àcid, per tal d'alliberar el sucre amb retenció de la configuració.

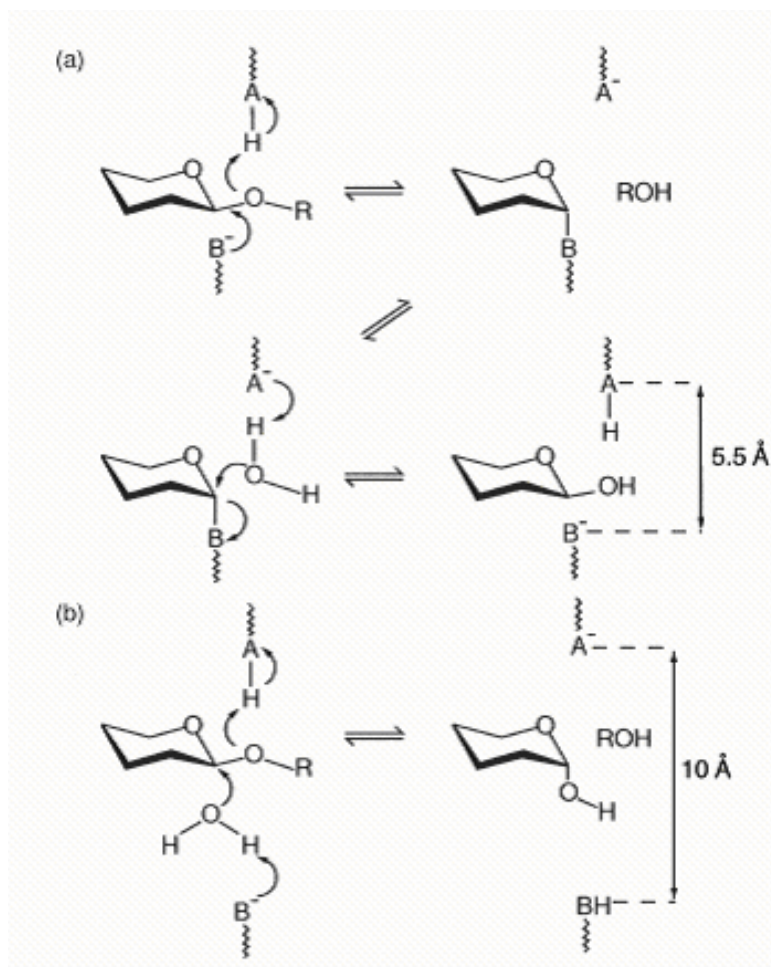


Fig. 1.7. Representació dels mecanismes de: a) retenció i b) inversió de la configuració en reaccions catalitzades per glicosidases.

Les xilanases de les famílies 10 i 11 segueixen el mecanisme catalític de retenció de configuració i als seus centres actius hi ha glutamats.

Quant al mecanisme d'inhibició, s'ha observat que les xilanases poden ser inhibides per concentracions elevades de xilobiosa, però no de xilosa.⁹

1.2.2.3. Aplicacions de les xilanases

A la indústria del vi i de l'alimentació en general, les xilanases s'utilitzen per a l'obtenció de xilooligosacàrids, de xilitol, i per a la producció d'espessidors i d'agents per a millorar la textura de productes de pastisseria.⁴⁶ En el tractament de tèxtil, paper i fusta s'utilitzen per a blanquejar, i també s'empren en el tractament de residus municipals i agrícoles, on l'ús de les xilanases per a la recuperació de carbohidrats és d'especial interès i rellevància, com s'ha comentat a l'apartat corresponent.

1.3. Immobilització d'enzims

La biotecnologia és considerada com una alternativa als processos tecnològics convencionals, tant en el camp industrial com en l'analític. Els processos catalitzats per enzims són cada vegada més utilitzats en l'àmbit industrial ja que presenten una sèrie d'avantatges respecte dels catalitzadors convencionals. A diferència dels catalitzadors químics, els enzims presenten una elevada activitat catalítica a més d'una alta especificitat pel substrat (en alguns casos, fins i tot estereoselectivitat i regioespecificitat), i són actius en condicions suaus de treball, com serien temperatura ambient i pressió atmosfèrica.

Malgrat aquests avantatges, l'ús dels enzims no s'ha generalitzat, ja que tenen la propietat que són solubles en aigua; això fa que, d'una banda no es pugui reutilitzar el catalitzador i que de l'altra es necessitin etapes de separació per a obtenir l'enzim, separat dels reactius i productes.

La immobilització d'enzims es defineix com el procés pel qual es confina un enzim en una regió definida de l'espai, per exemple una matriu, per tal d'obtenir formes que siguin insolubles i, per tant, en permetin la reutilització, alhora que mantenen la seva activitat catalítica. Posteriorment, la definició s'ha ampliat i comprèn el procés pel qual es restringeix totalment o parcial els graus de llibertat de l'enzim o molècula, a conseqüència de la seva unió a un suport.⁴⁷

La immobilització permet l'ús d'enzims en la producció industrial de productes químics, farmacèutics, d'aliments, en el processament de residus i en el tractament d'algunes malalties.⁴⁸ L'ús dels enzims en dissolució no s'ha generalitzat, en processos industrials atès que la majoria d'enzims no són estables en les condicions de treball. Per altra banda, ja que són solubles en aigua, la seva separació dels substrats i productes és complicada. Amb la immobilització d'enzims s'han pogut superar aquestes dificultats, cosa que ha conduït a processos biotecnològics més rendibles.

1.3.1. Mètodes d'immobilització

Hi ha diferents estratègies d'immobilització d'enzims en suports, que es poden classificar en dos grans grups: els mètodes d'immobilització física (atrapament) i la inclusió en membranes, i els d'immobilització química, a través d'enllaços amb el suport, o bé per reticulació o *cross-linking*.

Mètodes físics

Quant a l'atrapament, es basa en la retenció física de l'enzim en una matriu sòlida porosa. La immobilització normalment té lloc a partir de la suspensió de l'enzim en una dissolució del monòmer i, a continuació, iniciant la polimerització, per l'addició d'un agent químic o per un canvi de condicions (per exemple, temperatura o irradiació). D'aquesta manera, l'enzim queda atrapat en estructures de tipus gel o de fibres; en el darrer cas presenta més resistència. L'atrapament ofereix una via d'immobilització simple, ja que no altera la conformació de l'enzim malgrat que s'ha de tenir un control rigorós de les condicions de polimerització, per tal que la natura química del procés no afecti els grups funcionals de la proteïna. Els polímers emprats solen ser resines fotoentrecruables, prepolímers de poliuretà⁴⁹ i polímers acrílics com ara la poliacrilamida.^{50,51} Aquesta no és un suport útil en la indústria alimentària, a conseqüència de la seva toxicitat, però té aplicacions potencials en el tractament de residus així com en la fabricació de dispositius analítics, com ara biosensors.

Respecte de la inclusió en membranes, es pot alhora subdividir en dos tipus. La microencapsulació consisteix en la introducció de l'enzim en membranes que són impermeables a aquest, però que permeten el pas de substrats i productes. L'altra metodologia és la inclusió en reactors de membranes que consisteix en l'adsorció de l'enzim a membranes, bé per contacte continu entre membrana i dissolució d'enzim, o pel pas d'una solució tamponada d'enzim a la membrana. En aquest cas, la membrana també és permeable a substrats i productes, i no pas als enzims, i es fa passar un flux de substrat a través de la membrana per a travessar el reactor. Aquesta és la tècnica més simple i la que altera menys l'activitat de l'enzim immobilitzat.

Mètodes químics

La unió química és potser el mètode d'immobilització més interessant des del punt de vista industrial. La selecció del suport i del tipus d'enllaç són determinants per al comportament posterior del catalitzador. Alhora, cal que aquest suport ofereixi resistència mecànica en les condicions operatives del reactor. La unió pot ser de tipus iònic (per exemple mitjançant ponts d'hidrogen) o covalent. Normalment, el procediment es basa en l'activació del suport, de tal manera que disposi de grups funcionals adequats per a reaccionar amb grups funcionals de les cadenes laterals dels aminoàcids de les proteïnes. Els enzims s'uneixen generalment a través de grups funcionals que no són essencials per a l'activitat catalítica. Tenint en compte l'existència de 20 aminoàcids naturals amb cadenes laterals amb grups funcionals

diferents, existeix un ampli ventall de possibilitats d'enllaç, tot i que els més habituals es recullen a la taula següent.

<i>Grup funcional a l'enzim</i>	<i>Aminoàcids</i>	<i>Grup funcional al suport</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Reacció</i>
SH	cisteïna	SH	Pyridine-2,6-14C2, 2,2'-dithiobis- (9CI)	Bescanvi tiol-disulfur
NH2	arginina, lisina	OH	IO ⁴⁻	Formació d'una base de Schiff
NH2, Ar-OH,	arginina, lisina, fenilalanina, tirosina	Ar-NH2	NaNO ₂ , HCl	Formació d'un enllaç diazo
NH2, OH, SH	arginina, lisina, serina, cisteïna	OH	Epiclorhidrina	Alquilació

Taula 1.2. Alguns exemples d'enllaços covalents implicats en la immobilització de proteïnes.⁴⁸

Als enzims de tipus glicoproteïna, per exemple, en els quals la part no proteica (carbohidrat) no és essencial per a la seva activitat, es pot introduir un grup aldehid a partir de l'oxidació del carbohidrat amb periodat, sense afectar l'activitat enzimàtica. D'aquesta manera, es pot enllaçar l'enzim a un suport que contingui grups amino a través d'una reacció de formació d'una imina o base de Schiff.^{52, 53}

L'avantatge més significatiu de la immobilització per enllaç covalent és que s'estabilitza l'estructura terciària de la proteïna, la qual cosa confereix una resistència més alta a la seva desactivació a conseqüència de canvis de temperatura, pH o força iònica, entre d'altres. Tanmateix, hi ha la possibilitat que l'estructura del centre actiu es pugui alterar, a conseqüència de la restricció espacial de l'enzim. Per això és essencial conèixer la densitat de grups funcionals disponibles per unitat de superfície del suport, per a evitar la formació de derivats inactius.

La reticulació o *cross-linking* és un mètode que emprava reactius bifuncionals⁵⁴ que originen unions entre molècules d'enzim. El resultat del reticulat són enzims amb enllaços intermoleculars irreversibles, que són capaços de resistir condicions extremes de pH i temperatura. Alguns d'aquests reactius bifuncionals són dialdehids, diisocianats i diiminoésters. En alguns casos, en funció de la quantitat d'enzim que es vol immobilitzar, es fa servir una segona proteïna, però sense activitat enzimàtica. En aquest cas ens referim al coreticulat.

1.3.2. Efectes de la immobilització

En termes generals, la immobilització d'enzims presenta avantatges i desavantatges respecte de l'ús d'enzims en dissolució. Els avantatges són:

- L'augment de l'estabilitat de l'enzim.
- La possible reutilització de l'enzim immobilitzat, cosa que redueix els costos del procés.
- La possibilitat de dissenyar reactors enzimàtics de fàcil ús i control, adaptats a l'aplicació de l'enzim immobilitzat i que poden incloure etapes de reciclatge, que permetria obtenir productes de puresa més elevada.

Com a desavantatges, cal tenir en compte tenim:

- L'alteració de la conformació de l'enzim respecte del seu estat nadiu.
- Pèrdua d'activitat de l'enzim, ja que en immobilitzar-lo poden quedar bloquejats alguns dels llocs actius.

A continuació, es fa una referència més detallada dels aspectes que resulten afectats a conseqüència de la immobilització.

Efectes en l'estabilitat

Normalment s'observa un increment en l'estabilitat dels enzims immobilitzats, respecte de la seva forma lliure, que es pot relacionar amb els processos següents:⁵⁵

- Estabilització conformacional: l'estructura terciària de les proteïnes esdevé més rígida i, per tant, més resistent respecte de la desactivació química o tèrmica.
- S'evita l'agregació intermolecular, ja que es mantenen les molècules d'enzim retingudes en una regió de l'espai.
- Alteració del microentorn de l'enzim: el suport té un efecte tamponador, de manera que es manté el pH òptim de l'enzim al seu microentorn, malgrat que es produeixin canvis en el pH del conjunt de la dissolució.

Efectes en l'activitat enzimàtica

L'activitat dels enzims pot disminuir i presentar pèrdues a conseqüència de la immobilització, ja que l'accés del substrat al lloc catalític pot estar impedit, la unió de l'enzim al suport pot tenir lloc a través d'un aminoàcid essencial per a l'activitat catalítica o poden haver-hi canvis conformacionals que condueixin a una forma inactiva de l'enzim.

Si després de la immobilització la pèrdua d'activitat no és total, la disminució pot ser conseqüència que l'accés del substrat cap al centre actiu de l'enzim pot tenir impediments, tant de tipus intern (perquè el substrat ha de travessar el medi on es troba

immobilitzat l'enzim) o extern (ja que el substrat ha de travessar la pel·lícula líquida estacionària, anomenada també capa de difusió, que hi ha a les proximitats del suport).

1.3.3. Selecció del mètode d'immobilització

No hi ha un mètode d'immobilització universal, per a tots els enzims i casos. La selecció del mètode depèn de les condicions de la reacció a catalitzar, el tipus de reactor, la natura de l'enzim i del substrat que s'ha de processar, i l'aplicació final dels productes de la reacció enzimàtica entre d'altres aspectes.

A la taula següent es fa un resum de les característiques més significatives dels diferents mètodes d'immobilització esmentats.

<i>Selecció del mètode d'immobilització</i>					
	<i>Mètodes físics</i>			<i>Mètodes químics</i>	
Mètode	Inclusió en membranes	Atrapament	Reticulat	Adsorció química	Enllaç covalent
Estabilitat	mitjana	alta	alta	baixa	alta
Cost del procés	mitjà	mitjà	mitjà	baix	alt
Regeneració del suport	sí	no	no	sí	difícil
Força d'unió	baixa	mitjana	mitjana	mitjana	alta
Complexitat del procés	mitjana	alta	mitjana	baixa	alta

Taula 1.3. Resum de les característiques més rellevants dels mètodes d'immobilització.

S'observa que aquells mètodes d'immobilització que comporten un procés més complex i amb costos més alts són els que permeten obtenir biocatalitzadors més estables, mentre que en la resta de casos la unió enzim-suport és més dèbil, la qual cosa comporta pèrdues d'activitat i la necessitat de regenerar el derivat immobilitzat. Així, doncs, la selecció del mètode d'immobilització dependrà del compromís entre la obtenció d'un derivat estable, tenint en compte la viabilitat del procés i els costos associats.

El derivat immobilitzat, un cop obtingut, s'ha de caracteritzar⁵⁶ tant per mètodes físics com químics, per a determinar les característiques físiques del suport amb l'enzim incorporat, a més de la seva estabilitat, la possibilitat de reutilització i canvis en l'activitat enzimàtica, entre d'altres.

1.3.4. Aplicacions dels enzims immobilitzats

De l'ampli ventall d'aplicacions dels enzims immobilitzats, aquestes es poden classificar en diversos camps majoritaris: aplicacions analítiques, aplicacions mèdiques, farmacèutiques i aplicacions industrials i alimentàries.

- En el camp de les aplicacions analítiques, els enzims immobilitzats s'empren en el disseny i la creació de biosensors. Aquests incorporen l'enzim immobilitzat en una regió propera a un traductor que transformarà el senyal químic, produït pel contacte de l'enzim amb un analit, en un altre tipus de senyal (elèctric, òptic o calorimètric entre d'altres⁵⁷). Normalment, els mètodes més utilitzats en la immobilització aplicada a biosensors són la inclusió en membranes o la unió covalent.
- Dins de les aplicacions mèdiques, els enzims immobilitzats s'utilitzen en el tractament de malalties, bé originades per la manca de l'enzim en qüestió, bé perquè l'enzim presenti una activitat antitumoral, o amb altres activitats terapèutiques.⁵⁸ Els avantatges de tenir l'enzim immobilitzat rau en el fet que la seva acció pot ser més prolongada, perquè són resistents a l'acció de proteases, i d'altra banda perquè l'acció pot estar més localitzada al lloc que ho requereix. Per això s'han immobilitzat enzims en fibres i teixits d'apòsits i benes.⁵⁹
- A la indústria farmacèutica, l'ús d'enzims immobilitzats ofereix la possibilitat de treballar en condicions suaus, d'especial interès en processos que no poden dur-se a terme a temperatures elevades i en processos en els quals es requereix una alta especificitat de substrat. És d'especial interès l'aplicació d'enzims immobilitzats en la síntesi de fàrmacs òpticament purs. En alguns fàrmacs la seva acció depèn de l'estereoquímica de manera que s'observa un comportament farmacològic diferent en diferents isòmers d'un fàrmac. Els enantiòmers de la mescla racèmica tenen un comportament diferent, ja que un d'ells presenta activitat terapèutica, mentre que l'altre no, o fins i tot pot tenir efectes adversos; per tant, és essencial obtenir-ne un dels dos pur. Per exemple, és possible obtenir l'isòmer S d'antiinflamatoris de tipus no esteroide (ibuprofè, naxoprè o ketoprofè) d'alta puresa fent servir lipases de *Candida rugosa* immobilitzades.⁶⁰
- Respecte de les aplicacions alimentàries, els enzims immobilitzats s'utilitzen en la hidròlisi de proteïnes (els enzims proteolítics immobilitzats s'incorporen per tal de modificar el contingut proteic de certs aliments⁶¹) i d'hidrats de carboni (hidròlisi de lactosa en derivats làctics, de midó per obtenir edulcorants rics en fructosa, que s'utilitzen en la preparació de refrescs), en la millora de les propietats organolèptiques (per exemple, s'utilitzen cèl·lules immobilitzades d'*Athrobacter globilis* per a eliminar el gust amarg de suc de cítrics) i en

l'obtenció d'additius i colorants alimentaris, tal i com s'ha esmentat en l'apartat del tractament de materials lignocel·lulòsics.

<i>Camps d'aplicació dels enzims immobilitzats</i>	
Aplicacions analítiques	Biosensors
Aplicacions mèdiques	Subministrament d'un enzim absent Enzims amb efectes terapèutics
Aplicacions farmacèutiques	Obtenció de fàrmacs enantiomèricament purs
Aplicacions alimentàries	Hidròlisi de proteïnes Hidròlisi d'hidrats de carboni Obtenció de colorants i additius Millora característiques aliments
Aplicacions químiques	Síntesi de productes d'alt valor afegit
Altres aplicacions	Tractament d'aigües residuals

Taula 1.4. Resum de les aplicacions dels enzims immobilitzats.

1.3.5. Tècniques de biologia molecular aplicades a la immobilització dirigida d'enzims

La tecnologia de membranes tradicional ofereix moltes possibilitats en el camp de la reacció i separació. La possibilitat de combinar les propietats de les membranes amb la selectivitat a través del reconeixement molecular ha conduït al desenvolupament de membranes biofuncionals, en les quals s'immobilitzen biomolècules. Aquestes membranes ofereixen un ampli ventall d'aplicacions, tant en el camp de l'anàlisi (biosensors), la separació (afinitat) i la catàlisi (bioreactors basats en membranes enzimàtiques). És en aquest darrer punt en el qual s'ha desenvolupat la present tesi doctoral.

Malgrat que la immobilització generalment incrementa l'estabilitat dels enzims,⁶² quan el procés té lloc a l'atzar es pot produir el bloqueig dels llocs actius, la qual cosa pot impedir l'accessibilitat dels substrats. També es pot produir una alteració de la conformació de l'enzim, que en algun cas pot comportar la seva desnaturalització. Per tant, tot i que s'hagi pogut immobilitzar la biomolècula pot ser que no sigui activa.

Normalment, la immobilització té lloc aleatòriament a través dels residus d'aminoàcids de les proteïnes. A conseqüència d'aquest procés, la bioactivitat del catalitzador resulta disminuïda per les diferents orientacions de l'enzim respecte del suport o a conseqüència de la unió entre aquests per més d'un punt d'enllaç.⁶³ Per tal de superar aquest inconvenient i poder aprofitar al màxim els avantatges del procés

d'immobilització, és essencial la immobilització dirigida a través de la unió orientada fora del lloc catalític.

Hi ha diferents procediments que comprenen química biofísica i bioanalítica i basats en tècniques de biologia molecular, els quals permeten dur a terme aquesta immobilització dirigida. Resultats obtinguts en diferents estudis previs ^{63, 64} posen de manifest que en aquests casos els enzims presenten més activitat catalítica que els enzims immobilitzats per procediments convencionals. Els mètodes més emprats són la fusió gènica, la modificació posttranslacional i la mutagènesi dirigida. La fusió gènica consisteix a incorporar una etiqueta d'afinitat a l'extrem terminal C o N de l'enzim. Els enzims s'enllacen amb aquesta etiqueta d'afinitat a una altra etiqueta complementària present al suport. Per exemple, al suport s'hi incorpora un anticòs específic per a una etiqueta que s'ha enllaçat a l'enzim, de manera que la interacció entre aquests dos grups és altament específica. La modificació posttranslacional comprèn la introducció d'una biotina a la proteïna. Aquesta proteïna biotilada s'uneix a un suport que conté avidina, a través d'una interacció selectiva i molt forta, amb una constant d'estabilitat alta ($K_d 10^{-15}$), malgrat que no es tracti d'una unió covalent. La mutagènesi dirigida, per exemple, implica la introducció d'una cisteïna a l'enzim, per tal que aquest es pugui enllaçar a una superfície reactiva amb tiols, a través del grup sulfhidril de la cisteïna, situada al costat oposat del centre actiu de l'enzim. Normalment es modifica genèticament una serina per obtenir una cisteïna, tot substituint el grup -OH per un grup -SH. Interessa que l'enzim no tingui d'altres cisteïnes, i que a l'extrem terminal hi tingui residus de serina susceptibles de ser modificats.

La seqüència d'aminoàcids de l'endo-1,4- β -xilanasas II és coneguda.⁶⁵ L'enzim no conté cap residu de cisteïna, i presenta diverses serines. En aquest cas d'estudi, tenint en compte aquestes característiques de l'enzim, s'opta per triar la tècnica de mutagènesi dirigida, la qual permet la introducció d'una única cisteïna a l'extrem 3'-terminal de la seqüència d'aminoàcids (per tant lluny del centre actiu). La mutació d'una serina cap a cisteïna no afecta l'estructura de la proteïna. A través d'aquesta cisteïna es pot establir l'enllaç covalent amb un suport reactiu a tiols i el centre actiu estarà orientat lluny d'aquest punt d'unió amb el suport. Per obtenir la proteïna recombinant es necessiten tècniques estàndard de biologia molecular. Un cop introduïda la mutació, es requereixen etapes d'expressió i purificació de la proteïna prèvies a la immobilització.

1.4. Membranes

Una membrana es pot definir com una barrera més o menys selectiva entre dues fases⁶⁶ immiscibles amb aquesta. Atès que la membrana separa aquestes fases, es pot considerar com una interfase, que alhora permet el pas selectiu de certes espècies d'una fase, anomenada fase de càrrega o *feed*, a l'altra, anomenada fase receptora o *stripping*. Aquesta es una definició macroscòpica, mentre que el procés de separació ha de ser considerat a nivell microscòpic. Les membranes es poden classificar segons diferents criteris, com són les seves aplicacions, la seva morfologia i l'estructura (simètriques o asimètriques), l'origen (naturals o sintètiques) i, dins de les sintètiques, entre inorgàniques i orgàniques. Aquestes darreres es poden subclassificar alhora entre líquides o polimèriques (sòlides).

Els processos de separació mitjançant membranes són relativament recents i ha estat en els darrers 25 anys que s'ha començat a considerar-los importants des del punt de vista tècnic. La tecnologia de membranes és un camp emergent i en constant desenvolupament, la qual cosa permet ampliar-ne el ventall d'aplicacions.

1.4.1. Classificació de membranes

La classificació que se segueix a continuació és en funció de l'origen de les membranes; totes les membranes emprades al llarg d'aquesta memòria són sintètiques. Malgrat que només s'ha treballat amb membranes polimèriques (sòlides), s'introdueix breument el concepte de membrana líquida, ja que són sistemes que han estat aplicats en diversos camps dins de l'àmbit de la tecnologia de membranes.

1.4.1.1. Membranes líquides

A les membranes líquides, la part activa de la membrana és un líquid que separa dues fases (líquides o gasoses) immiscibles amb la membrana. Per tant es troben dins la classificació de membranes sintètiques orgàniques. El mecanisme de transport a través de la membrana es basa en processos d'extracció líquid-líquid, de manera que l'extracció i la reextracció tenen lloc simultàniament i sense que s'hagin d'assolir les condicions d'equilibri. Normalment, la diferència de potencial químic entre totes dues fases és la força impulsora per al transport des de la fase de càrrega fins a la receptora. Les membranes líquides poden adoptar diferents configuracions.⁶⁷ Les més destacades són les membranes líquides de volum, les quals consisteixen en un volum de líquid

entre la dissolució de càrrega i la receptora. Segons la densitat relativa de les fases i de la membrana, adopten diferents disposicions.^{68,69}

Un altre tipus de configuració habitual són les membranes líquides d'emulsió,⁷⁰ les quals són conseqüència de la dispersió en la dissolució de càrrega d'una emulsió inversa, que està constituïda per la fase receptora, en la qual s'hi ha dispersat la fase de membrana en presència d'un tensoactiu.⁷¹ D'aquesta manera, alhora que es transporten, els analítics es concentren a la fase receptora. Un tercer tipus de configuració considera les anomenades membranes líquides suportades.⁷² En aquest cas, s'impregna el líquid que constitueix la fase de membrana en un suport polimèric porós, que separarà la fase de càrrega de la receptora.

En general les membranes líquides s'utilitzen només per a aplicacions limitades, ja que presenten una baixa selectivitat.⁶⁶ Aquesta selectivitat es basa en diferències dels coeficients de distribució dels components de les fases de càrrega i receptora amb la fase de membrana. La difusibilitat de components de mida comparable és similar, de manera que la selectivitat, que depèn tant de la difusibilitat com de la solubilitat, no serà gaire elevada. En alguns casos, per tal d'incrementar-la, s'incorpora alguna molècula a la membrana líquida, que rep el nom de transportador i que té una alta afinitat per algun component, de manera que incrementi el transport i la separació d'aquest component. Tanmateix, les membranes líquides presenten un temps de vida inferior i menor estabilitat operativa que les membranes polimèriques,^{73,74} per la qual cosa el desenvolupament d'aquestes darreres ha estat més important.

1.4.1.2. Membranes polimèriques

Les membranes polimèriques estan formades, tal com indica el seu nom, per polímers; es tracta de compostos d'elevat pes molecular que contenen unitats bàsiques, anomenades monòmers, que es repeteixen. Aquestes membranes es diferencien per l'estructura bàsica de la cadena del polímer. Els polímers que se solen emprar han de presentar una bona estabilitat química i tèrmica i permetre el pas d'espècies a través seu. En funció de la seva morfologia, es pot realitzar una classificació de les membranes polimèriques entre poroses i no poroses. En el cas de membranes poroses, la naturalesa del polímer no afecta al transport, sinó que és la mida del porus el que determina el grau de selectivitat.⁶⁶ En canvi, a les membranes no poroses, també anomenades denses, la naturalesa del polímer és essencial per a decidir el transport, ja que determina l'estabilitat, la selectivitat i la permeabilitat de la membrana. La difusibilitat de les

espècies depèn de característiques del polímer com ara la flexibilitat de les cadenes polimèriques, les interaccions inter i intrapolimèriques i el pes molecular. Aquestes s'utilitzen per a la separació de gasos, pervaporació i òsmosi inversa.

Polímers de membrana

A efectes pràctics, de la gran diversitat de materials polimèrics existents, només un nombre limitat d'aquests són els que es fan servir en la preparació de membranes.

La selecció del polímer depèn del tipus de membrana i de la seva aplicació i serà diferent en el cas de preparació de membranes poroses respecte de membranes denses.

Les membranes poroses s'utilitzen per a processos de filtració com ara la microfiltració (0,1-10 μm) i la ultrafiltració (2-100 nm). La mida de porus és el que diferencia les membranes d'ultrafiltració de les de microfiltració. Per al primer cas s'utilitzen polímers com el policarbonat, el politetrafluoroetilè o el polipropilè isotàctic (polímers hidrofòbics). Malgrat l'excel·lent estabilitat química i tèrmica dels polímers hidrofòbics, els polímers hidrofílics adquireixen cada vegada més interès com a materials per a preparar membranes de microfiltració, ja que presenten una tendència a l'adsorció de soluts reduïda.⁶⁶ L'adsorció de soluts té una influència negativa, ja que creen una capa d'adsorció que presenta una resistència extra a la transferència de massa a través de la membrana, la qual cosa comporta un descens en el flux. Aquests polímers hidrofílics comprenen la cel·lulosa i els seus derivats (per exemple triacetat de cel·lulosa, nitrat de cel·lulosa). Per a processos d'ultrafiltració se solen emprar poliamides, poliimides i polisulfones.

Respecte de les membranes denses (les quals se solen aplicar en la separació de gasos i en la pervaporació), la selecció del polímer va lligada estrictament al procés d'aplicació. En aquests casos s'utilitzen materials que van des dels elastòmers fins a vidres. Normalment en la separació de gasos s'utilitzen els polímers de tipus vidre (per exemple, les polioxadiazoles), que presenten una elevada selectivitat i resistència a altes temperatures.

A continuació es presenta una taula on es recullen alguns dels polímers més habituals en la preparació de membranes.

<i>Membranes polimèriques poroses</i>	Policarbonat (PC)
	Poliàmida (PA)
	Polisulfona (PS)
	Polietetercetona (PEEK)
	Ésters de cel·lulosa
	Polieterimida (PI)
	Polipropilè (PP)
	Politetrafluoroetilè (PTFE o Tefló)
<i>Membranes polimèriques denses</i>	Polidimetilsiloxà (PDMS)
	Polieterimida (PI)
	Polisulfona (PS)
	Polimetilpentè
	Polietilè clorur de polivinil (PVC)
	Poliestirè

Taula 1.5. Polímers habituals en la preparació de membranes.

En aquest treball s'han utilitzat derivats de polisulfona i polímers basats en metacrilat (anomenats polímers monolítics) per a la preparació de membranes polimèriques enzimàtiques. La selecció dels materials ha tingut en compte la possibilitat d'introduir una funcionalització per a la immobilització de l'enzim, les bones propietats dels polímers en si mateixos i l'existència d'antecedents en el seu ús tant en el camp d'immobilització de biomolècules,⁷⁵ com en altres camps d'interès.

Hi ha diferents tècniques de preparació de membranes polimèriques,¹⁸ com són la sinterització, l'estirament, el gravat de porus, la lixiviació temperada, la inversió de fase i el recobriments. En aquest treball, la que s'ha utilitzat ha estat la inversió de fase i, per tant, a continuació s'explica més detalladament.

Consisteix a solidificar de manera controlada un polímer que es troba dissolt en un solvent adequat. D'aquesta manera s'obtenen membranes poroses i no poroses. La precipitació pot tenir lloc per evaporació del dissolvent controlada amb vapor, tèrmicament o bé per immersió. En el darrer cas, la dissolució de polímer s'introdueix en un bany de coagulació que conté un no solvent i l'intercanvi entre solvent i no solvent és el que indueix la precipitació del polímer i condueix a l'obtenció de la membrana polimèrica. En funció de la tècnica d'inversió de fase emprada, les membranes obtingudes presentaran unes determinades característiques físiques o d'altres, ja que la transferència de massa i la velocitat de separació de fases determinaran les seves propietats. En general, transferències de massa i separacions de fase lentes donen lloc a membranes denses, amb més simetria que quan aquests fenòmens tenen lloc a més velocitat. En el darrer cas, s'obtenen membranes poroses i

asimètriques, i fins i tot presenten els anomenats *macrovoids*, que són espais microscòpics buits.⁶⁶ Com a exemple, a la taula següent es recullen alguns dels parells solvent/no solvent utilitzats en la inversió de fase i el tipus de membrana obtinguda en cada cas.

<i>Solvent</i>	<i>No solvent</i>	<i>Tipus de membrana</i>
Dimetilformamida (DMF)	Aigua	Porosa
N-metilpirrolidona (NMP)	Aigua	Porosa
Dimetilacetamida (DMAc)	Aigua	Porosa
Dimetilacetamida (DMAc)	n-propanol	Densa
Cloroform	Metanol/etanol/propanol	Densa
Diclormeta	Metanol/etanol/propanol	Densa

Taula 1.6. Tipus de membranes en funció de la selecció del parell solvent/no solvent.

Un cop obtingudes, es pot dipositar una capa densa superficial sobre les membranes polimèriques, per donar lloc al que es coneix com a membrana compost.⁷⁶ El procés per a obtenir aquesta capa superficial s'anomena recobriment i habitualment es duu a terme per polimerització interfacial, per reacció entre dos monòmers en la interfase de dos dissolvents immiscibles.⁷⁷

Les membranes polimèriques poden adoptar diferents configuracions. Les més habituals són la configuració plana, que seria equivalent a un full, i la configuració tubular, que seria equivalent a un cilindre; en funció del diàmetre es pot aplicar en diferents tipus de reactors: mòduls de fibra buida ($d_i < 0,5 \text{ nm}$), capil·lars ($0,5 < d_i < 5 \text{ mm}$) i tubulars ($d_i > 5 \text{ mm}$).⁶⁶

A la present tesi doctoral, atès que s'han preparat membranes poroses per la inversió de fase per immersió, el parell solvent/no solvent que s'ha utilitzat és DMF/aigua. Les membranes que s'utilitzaran en aquest treball són membranes de configuració plana i estan constituïdes per una capa de polímer (obtinguda per precipitació per immersió, com ja s'ha indicat), dipositada sobre un suport no teixit (polièster) que actua de recolzament físic. El polímer emprat per a preparar aquestes membranes és un derivat de la polisulfona (fig. 1.8), a la qual s'introdueix prèviament un grup acrilat, l'estructura del qual es mostra a continuació (fig. 1.9):

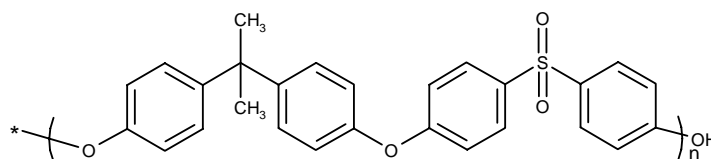


Fig.1.8. Estructura de la polisulfona.

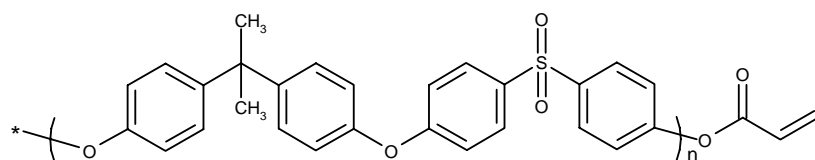


Fig.1.9. Estructura de l'acrilat de polisulfona.

D'altres membranes polimèriques que també s'han desenvolupat al llarg d'aquesta tesi es basen en els anomenats polímers monolítics, que són materials amb propietats físiques i funcionals úniques que fan que s'hagin emprat en un ampli ventall d'aplicacions analítiques.^{78, 79} Són materials porosos, amb un alt índex de reticulació, l'estructura dels quals consisteix en nombroses cavitats interconnectades.⁸⁰ S'obtenen com a resultat d'un procés de separació de fases durant la polimerització radicalària d'una dissolució de monòmers i un agent d'entrecreuament en un medi de dissolvents inerts.⁸¹ Tant l'agent d'entrecreuament com els dissolvents són els responsables del grau de reticulació i de la porositat final del polímer.⁸² Presenten l'avantatge de mantenir les seves característiques estructurals en estat sec, a diferència d'altres materials polimèrics que requereixen impregnació en un dissolvent per esdevenir porosos. Addicionalment, presenten una baixa resistència al flux de transferència de matèria en comparació amb d'altres materials.⁸³ Una altra característica és que permeten introduir diferents grups, funcionals segons la selecció dels monòmers constituents.

1.4.1.3. Membranes inorgàniques

En general les membranes inorgàniques presenten una estabilitat química i tèrmica més gran que les membranes polimèriques, així com un temps de vida més llarg. Dins d'aquest grup s'inclouen les membranes ceràmiques, que estan constituïdes per la combinació d'un metall (alumini) amb un no-metall (en forma d'òxid, sulfur o carbur). S'obtenen a partir de processos de sinterització, és a dir, aplicant pressió a una pols de partícules que conduirà a la unió d'aquestes, deixant uns espais entre elles que seran els porus de la membrana. També es poden preparar mitjançant processos de sol-gel, els quals impliquen l'obtenció d'un gel a partir de la polimerització d'una suspensió col·loïdal de partícules. Un altre tipus de membranes inorgàniques són les membranes de vidre (preparades per lixiviació), les metàl·liques (obtingudes per sinterització de metalls en pols) i les basades en zeolites, que estan formades per silicats d'alúmina microporosos. Les aplicacions d'aquest tipus de membrana encara són emergents i fins

al moment no s'han desenvolupat prou àmpliament, si bé es pot esmentar el procés d'enriquiment d'hexafluorur d'urani a través de membranes ceràmiques poroses.⁶⁶

1.4.2. Transport a través de membranes

Com ja s'ha esmentat anteriorment, les membranes tenen la capacitat de transportar preferentment uns components respecte d'altres a conseqüència de diferències en les propietats físiques o químiques entre la membrana i els components que cal separar. El transport és el resultat d'una força directora actuant en els components de la fase de carrega. Si es defineix una membrana com una barrera selectiva entre dues fases homogènies, es considera que una partícula és transportada a través de la membrana d'una fase a l'altra a conseqüència que hi ha alguna força directora (*driving force*) que actua sobre la molècula o partícula. La magnitud d'aquesta força es pot determinar com el gradient de potencial o diferència de potencial a través de la membrana, dividida pel gruix d'aquesta.⁶⁶

$$\text{Força directora} = \frac{\Delta X}{l} \quad (1.1)$$

On Δx és la diferència de potencial, i l és el gruix de la membrana. Aquesta diferència de potencial és conseqüència de diferències de pressió, concentració, temperatura o potencial elèctric i és proporcional al gradient d'aquestes. Els diferents processos de membrana es poden classificar en funció de la força directora que hi actua, tal com queda recollit a la taula 1.7.

<i>Procés de membrana</i>	<i>Força directora</i>	<i>Fase 1</i>	<i>Fase 2</i>
Microfiltració	ΔP	líquid	líquid
Ultrafiltració	ΔP	líquid	líquid
Nanofiltració	ΔP	líquid	líquid
Òsmosi inversa	ΔP	líquid	líquid
Separació de gasos	Δp	gas	gas
Pervaporació	Δp	líquid	gas
Electrodialisi	ΔE	líquid	líquid
Destil·lació amb membranes	$\Delta T/\Delta p$	líquid	líquid
Electròlisi amb membranes	ΔE	líquid	líquid

Taula 1.7. Recull dels diferents processos de membrana i de les forces directores (*driving forces*) per a cadascun d'ells, on ΔP , Δp , ΔE i ΔT són els gradients de pressió, pressió parcial (activitat), potencial elèctric i temperatura, respectivament.

Hi ha diferents tipus de transport, en funció de si es requereix un aportament energètic exterior al sistema o no. En un transport de tipus passiu, els components són transferits des d'on hi ha un alt potencial cap on hi ha un baix potencial. Si no hi actuen forces externes, el sistema arribarà a l'equilibri quan aquesta diferència de potencial esdevingui zero (quan s'igualen les concentracions d'analit als dos costats de la membrana, per exemple). És el cas del transport no facilitat o difusional (fig. 1.10).

Un altre tipus de transport passiu és l'anomenat transport facilitat, també conegut com a *carrier-mediated*. En aquest cas, el transport d'un component a través de la membrana és augmentat per la presència d'un agent transportador. Aquest *carrier* interacciona de manera específica amb un o més d'un dels components de la dissolució de càrrega (*feed*) i un mecanisme addicional, a part de la difusió, comporta un increment en el transport en estat estacionari. Dins del transport facilitat es pot distingir entre el transport acoblat i el no acoblat (fig. 1.11 i 1.12). En el transport facilitat no acoblat, únicament es transporta l'analit a través de la membrana. En canvi, si és acoblat hi ha una altra espècie, a part de l'analit, que es transporta simultàniament a través de la membrana mitjançant l'acció de l'agent transportador, bé en el mateix sentit que l'analit (cotransport, fig. 1.13) bé en sentit contrari (contratransport, fig. 1.14). En aquests casos, els analits són transportats en contra del gradient de potencial químic i el transport d'aquesta segona espècie és la força directora que condiciona el transport.

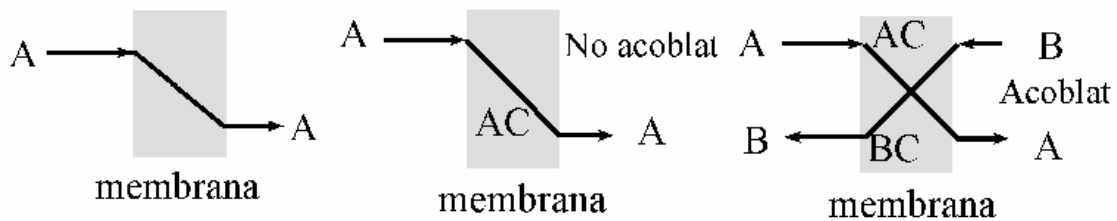


Fig. 1.10. Transport difusional.

Fig. 1.11 i 1.12. Transport facilitat no acoblat i acoblat

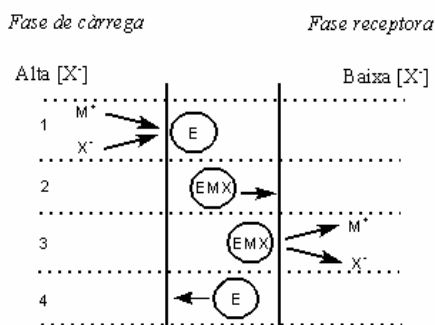


Fig. 1.13. Cotransport.

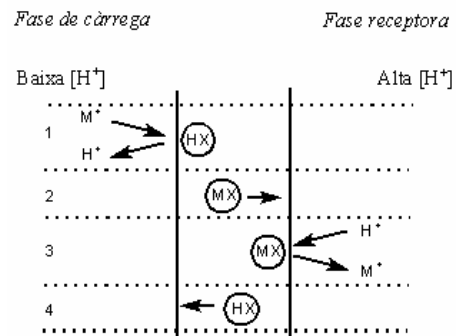


Fig. 1.14. Contratransport.

El transport actiu és aquell que és possible si s'aporta energia al sistema. Aquest és el cas d'algunes membranes, en sistemes biològics.

En el cas de les membranes enzimàtiques que volem obtenir, no estem incorporant un carrier a la membrana, sinó que estem suportant el catalitzador d'una reacció. Aquest catalitzador ha d'interaccionar amb el substrat a la fase de càrrega, per tal que la reacció tingui lloc. Un cop formats els productes en aquesta fase, l'objectiu és recuperar-los a la fase receptora. Si es pretén assolir el pas de les espècies cap a la fase receptora, és probable que s'hagi d'aplicar alguna força externa, com ara aplicar pressió, per afavorir el procés, en cas que el gradient de concentració entre les dues fases no sigui suficient per a determinar el transport dels productes. En aquest cas es podria considerar com un tipus de transport actiu, perquè es dona energia externa al sistema.

1.4.3. Processos de membrana i aplicacions

Actualment hi ha processos de membrana basats en diferents principis de separació que cobreixen tot el rang de mides de partícules, fins a molècules.

Un resum dels diferents processos de membrana i el seu rang d'aplicació es recull a la taula següent:

<i>Mida de partícula</i>	<i>Atòmic/iònic</i>	<i>Baix pes molecular</i>	<i>Alt pes molecular</i>	<i>Micropartícules</i>	<i>Macropartícules</i>
Pes molecular	≥100	≥1000	≥100000	≥500000	
Soluts	Sals ions	Sucres	Virus proteïnes	Sílica bacteris	Cèl·lules de llevat
Procés de membrana	Electrodiàlisi òsmosi inversa, Separació de gasos, Pervaporació	Nanofiltració	Ultrafiltració	Microfiltració	Microfiltració

Taula 1.8. Processos de membrana i els seus respectius camps d'aplicació.

Els processos impulsats per una diferència de pressió s'apliquen en la concentració i purificació de dissolucions diluïdes. El dissolvent i alguns components de la fase de càrrega passen a través de la membrana, mentre que d'altres queden retinguts. En funció de la mida de la partícula que cal separar es distingeixen els processos següents:

<i>Procés</i>	<i>Tipus de membrana</i>	<i>Mida de porus</i>	<i>Pressió</i>	<i>Separació de</i>
Microfiltració	porosa asimètrica	0,05-10 um	<2bar	bacteris
Ultrafiltració	porosa asimètrica	1-100 nm	1-10 bar	virus proteïnes
Nanofiltració	compòsit	<2nm	10-25 bar	ions polivalents
Òsmosi inversa	compòsit	<2nm	15-80 bar	ions monovalents

Taula 1.9. Classificació dels processos de membrana en funció de la mida de partícula a separar.

Els processos impulsats per una diferència d'activitat presenten una gran versatilitat. Dins d'aquest grup s'inclou la separació de gasos, la pervaporació, la diàlisi i el transport facilitat. El que és comú a tots ells és l'ús de membranes denses:

<i>Procés</i>	<i>Tipus de membrana</i>	<i>Aplicacions</i>
Separació de gasos	Asimètrica compòsit densa no porosa	Recuperació H ₂ Eliminació H ₂ O Recuperació de vapors orgànics de l'aire
Pervaporació	Asimètrica compòsit densa no porosa	Deshidratació de dissolvents orgànics Eliminació de components orgànics de l'aigua

Taula 1.10. Algunes de les aplicacions dels processos de membrana impulsats per diferència d'activitat.

1.4.3. Caracterització de membranes

La caracterització de membranes condueix a la determinació de les propietats morfològiques i estructurals d'aquestes i és necessària per tal de relacionar-ne les característiques amb el seu comportament. Aquesta informació pot donar indicacions sobre el comportament posterior de les membranes. Hi ha diferents tècniques i en funció de l'aplicació de la membrana o les seves característiques, se n'utilitzen unes o altres, les quals permeten obtenir informació determinada. Les tècniques de caracterització més habituals són les següents:

Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)

Permet obtenir imatges superficials i de talls transversals de les membranes. Un feix d'electrons es projecta sobre la superfície de la mostra i, en incidir sobre aquesta, s'obtenen diferents senyals que donen informació de la morfologia de la mostra.⁸⁴ El feix d'electrons incident té una energia de l'ordre de 1-25 kV. Aquests electrons incidents també s'anomenen primaris, per diferenciar-los dels secundaris (els alliberats pels àtoms de la superfície de la mostra i que són els que determinen la imatge).

Quan una membrana o polímer s'exposa al feix d'electrons, és possible que es deteriori. Això es pot evitar si es recobreix la superfície de la mostra amb una capa d'or, com a capa conductora,⁶⁶ que augmenta la producció d'electrons i comporta un augment del contrast de les imatges.⁸⁴

Microscòpia de força atòmica

Permet l'adquisició d'imatges a partir del control i enregistrament de l'oscil·lació vertical d'una punta petita i esmolada (*tip*) que realitza un escombrat superficial de la mostra. Es basa en la interacció entre el *tip* i la superfície de la mostra. Aquest *tip* es troba al final d'una palanca mòbil i flexible (*cantilever*) sobre el qual hi incideix un feix làser, que un cop reflectit és detectat per un fotodetector sensible a la posició (PSPD). El *tip* recorre una superfície per a generar una imatge topogràfica. A mesura que el *tip* escombra la mostra, les forces entre el *tip* i la superfície provoquen doblegaments del *cantilever*. Per exemple, en trobar un "obstacle" sobre la superfície es produeix una deflexió del *cantilever* que provoca la reflexió del làser que incideix sobre el fotodetector. A mida que el *cantilever* es doblega, la posició del feix incident del làser es desplaça. El PSPD pot mesurar desplaçaments de llum tan petits com 1 nm. La mostra es diposita sobre una superfície que es troba a sobre d'un cristall piezoelèctric. El cristall piezoelèctric es mou per a establir la posició de la mostra que no alteri la incidència del raig làser.

Hi ha diferents modes d'operació en AFM, els quals es diferencien pel tipus de contacte entre el *tip* i la mostra i es poden classificar en diferents modes de treball. El mode contacte es basa a fer mesures a partir del lliscament del *tip* sobre la superfície. En canvi, en mode *tapping* es realitzen mesures a partir del contacte intermitent entre el *tip* i la mostra, de manera que es minimitza la deformació de mostres fràgils. D'altra banda, en mode no contacte es fan mesures de la topografia a partir de la detecció de forces atractives de Van der Waals entre la superfície de la mostra i l'extrem del *tip*. L'avantatge que presenta aquest darrer mode respecte els anteriors és que en aquestes condicions les mostres no són contaminades ni deteriorades a conseqüència del contacte amb el *tip*. Amb aquesta tècnica s'obté informació de la rugositat superficial de les membranes polimèriques.

Tècniques de punt de bombolla

Permeten la determinació de la mida de porus més gran, a partir de la mesura de la pressió necessària per a fer passar aire a través d'una membrana impregnada de líquid.

Augmentant gradualment la pressió, l'aire arriba a passar a través dels porus i s'estableix una relació matemàtica entre la pressió i el radi de porus. El principal desavantatge de la tècnica és que els resultats varien en funció del líquid que s'utilitza per a humitejar la membrana. La tècnica de porosimetria per intrusió de mercuri (MIP) és una variació de l'anterior. En aquest cas, es força el mercuri a passar per una membrana seca, de manera que es determina el volum de mercuri introduït a cada pressió. El problema que presenta és que els porus de mida petita requereixen altes pressions, la qual cosa pot conduir a la destrucció de la membrana. Permet determinar tant la grandària dels porus com la seva distribució. A pressions baixes, els porus més grans seran omplerts pel mercuri. A mida que s'incrementa la pressió s'aniran omplint també els porus més petits, i així successivament fins que tots els porus estiguin plens i s'assoleixi un valor màxim de volum d'intrusió. Normalment, amb la tècnica MIP es poden determinar mides de porus compreses entre 5 nm i 10 µm, a més de la seva distribució.

Tècniques de permeabilitat

Permeten determinar la mida dels porus a partir de la mesura del flux d'un líquid o un gas a través de la membrana a una pressió constant. S'estableix una relació proporcional entre la pressió aplicada i el flux a través de la membrana. Normalment s'utilitza en la caracterització tant de membranes de micro com d'ultrafiltració. En el cas de membranes denses es pot relacionar el flux amb la naturalesa del polímer. El cas més habitual és estudiar el flux d'aigua pura, que és una mesura de la permeabilitat hidràulica i depèn de la distribució i mida dels porus, a més de la tortuositat i del gruix de la capa activa superficial de la membrana,⁸⁵ i estarà influït pels fenòmens de polarització per concentració i embrutament o *fouling*, dels quals es parlarà posteriorment en aquest capítol.

Adsorció/desorció de gasos

La isoterma d'adsorció/desorció d'un gas inert es determina com una funció de la pressió relativa, la relació entre la pressió aplicada i la pressió de saturació. Normalment s'utilitza nitrogen com a gas inert. Es comença a pressió relativa baixa i es va incrementant, fins que a prop de la pressió de saturació tots els porus estan plens. El volum total de porus es determina a partir de la quantitat de gas adsorbit al voltant de la pressió de saturació. La desorció té lloc en anar reduint la pressió, començant a la pressió de saturació. Durant l'adsorció i la desorció, les corbatures de la interfase

líquid/gas són diferents i, els processos d'adsorció i desorció no són exactament un l'invers de l'altre, per tant, ens trobem amb un fenomen d'histèresi. En funció del perfil d'aquesta histèresi es poden considerar diferents models per a descriure l'estructura i forma dels porus.⁸⁵ La raó és que la condensació capil·lar té lloc de manera diferent en adsorció i en desorció. A conseqüència del menisc còncav del líquid al porus, el nitrogen s'evapora a una pressió relativa més baixa perquè la pressió de vapor del líquid és més reduïda.

El procés d'adsorció/desorció es pot considerar de la manera següent. A conseqüència de forces dispersives, les molècules del gas s'adsorbeixen sobre la superfície d'un material porós, però aquesta adsorció només està restringida a una capa fina a les parets (perfil ABC de la fig. 1.15). Les molècules adsorbides es troben en equilibri termodinàmic amb la fase gas a la superfície i la quantitat adsorbida depèn de la pressió relativa del gas i de la corbatura de la superfície. A mesura que s'incrementa la pressió s'adsorbeixen més molècules de gas a les parets i es forma una nova interfase líquid-gas (D). A conseqüència de la corbatura de la interfase, la pressió de vapor del líquid disminueix, de manera que quan la corbatura del menisc supera un punt crític els porus que tenen una mida propera a la corbatura s'omplen, de manera que té lloc la condensació capil·lar (E) i així successivament es van omplint els porus de mida superior (EFG). Durant la desorció té lloc el procés invers. A una pressió relativa alta tots els porus estan plens de líquid (GHI). Si es disminueix la pressió relativa, el líquid s'evapora, de manera que es buiden els porus (JDB).

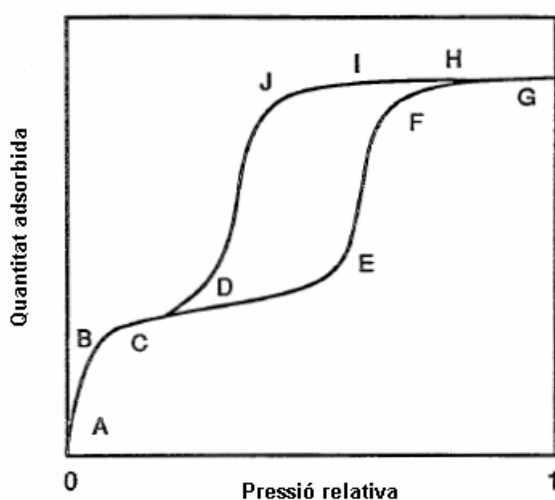


Fig. 1.15. Isotherma de tipus IV d'adsorció (ABCDEF) i desorció (GHIJDB).

Presenta el desavantatge que també es mesuren els porus tancats (i que, per tant, no intervenen en els processos de transport o separació).⁸⁶ El principal inconvenient

d'aquesta tècnica és que cal de disposar de mostres completament seques abans de procedir a analitzar-les, de manera que les membranes presenten una configuració diferent que quan s'utilitzen en processos de filtració. Pot donar-se el cas que l'estructura dels porus pugui resultar afectada durant el procés d'asseccament.

Termoporosimetria

Es basa en la mesura del punt de fusió d'un líquid que s'introdueix dins dels porus d'una membrana, que està relacionat amb la corbatura superficial d'aquest fluid que és dins els porus. Així, per exemple, en el cas de l'aigua pura, en disminuir la mida de porus la temperatura de fusió de l'aigua decreix.⁶⁶ Desafortunadament, els porus tancats també es consideren, en realitzar aquest tipus de mesures.

Permporosimetria

A diferència de les anteriors, amb aquesta tècnica només es mesuren els porus actius, és a dir, els porus que contribueixen realment a la permeabilitat. Es basa en la condensació capil·lar d'un gas, el qual bloqueja de manera controlada els porus de la membrana, i en la mesura simultània del flux d'un altre gas (no condensable) a través dels porus. En disminuir la pressió relativa aplicada, el líquid es comença a evaporar, donant lloc a un segon flux de gas que es mesura. Es relaciona matemàticament la pressió relativa d'aquest segon gas amb el radi dels porus i també és possible determinar la distribució d'aquests. Com que aquesta tècnica es basa en l'equació de Kelvin, només es pot aplicar en el rang de mesoporus, que se solen considerar entre valors de radi de 2 a 50 nm.

La condensació capil·lar implica la condensació d'un vapor en porus petits a valors de pressió de vapor relativa inferiors a 1 (pressió de vapor relativa = pressió de vapor/pressió de vapor de saturació). A valors molt baixos només es produeix adsorció en una capa fina (de gruix t). A mesura que s'incrementa el valor de la pressió de vapor relativa es comencen a omplir els porus, començant pels de mida menor, fins que al final s'ha omplert tot el sistema. La pressió relativa a la qual es comencen a omplir els porus depèn del radi i es pot determinar a partir de l'equació de Kelvin (1.2), en la qual es considera $\cos \theta = 1$ de manera que es pot simplificar.

$$\ln p_r = (-\gamma v/RT) \cos \theta * (1/r_{k1} + 1/r_{k2}) \quad (1.2)$$

On p_r : pressió relativa (-); γ : tensió superficial (N/m); v : volum molar del líquid (m^3/mol); θ : angle de contacte ($^\circ$) i r_{ki} : radi de Kelvin, que descriu la corbatura de la interfase.

La desorció presenta un comportament similar a l'adsorció, i en aquest cas els porus no es buiden fins que s'assoleix una pressió de vapor relativa inferior al valor d'equilibri,

que ve donat per l'equació 1.2. Igual que en el cas de l'adsorció-desorció de gasos, ambdós fenòmens no solen presentar el mateix perfil a conseqüència de fenòmens d'histèresi.

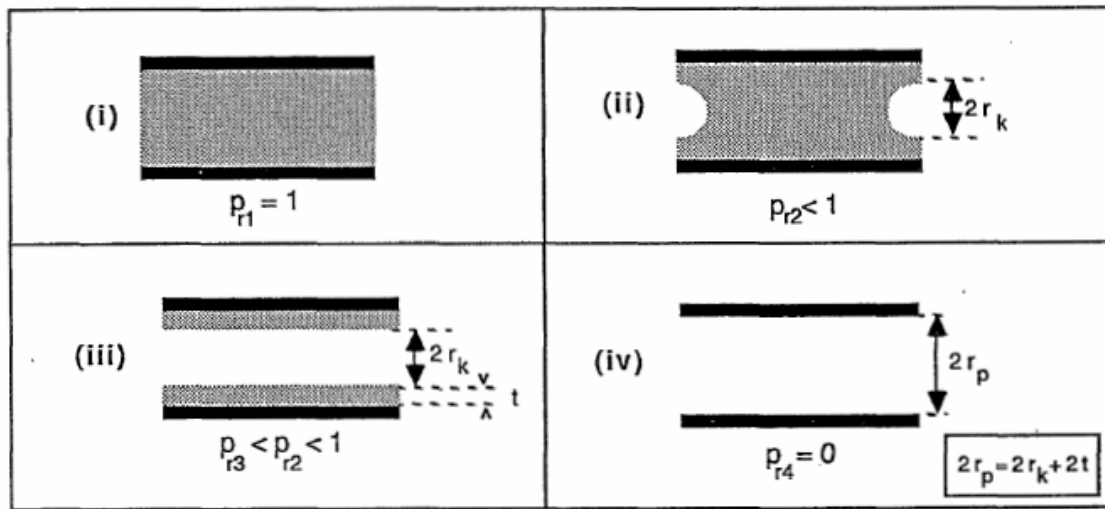


Fig. 1.16. Esquema de les etapes del procés de desorció: (i) porus completament ple de líquid a la pressió de saturació, (ii) just abans d'iniciar la desorció, (iii) just abans de completar-se l'evaporació (encara hi ha la capa t) i (iv) la desorció s'ha completat.

Mesures de l'angle de contacte

Dóna informació sobre el caràcter hidrofòbic/hidrofílic de la superfície de les membranes, el qual depèn del grau d'inflament de la membrana a conseqüència de la humitat, a partir de mesures de la tensió superficial. L'angle de contacte es defineix com una mesura quantitativa d'humitejament d'un sòlid per un líquid. Es defineix geomètricament com l'angle format pel líquid al límit de les tres fases sòlid, líquid i gas, tal com es mostra a la figura següent.

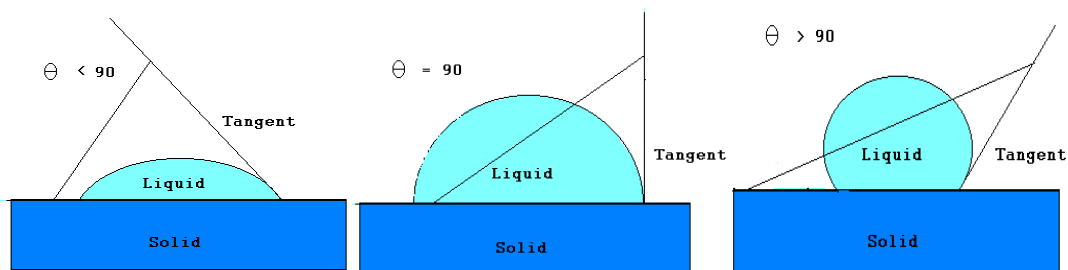


Fig. 1.17. Representació de l'angle de contacte en diferents superfícies.

D'acord amb la representació de la figura 1.17, valors baixos per als angles θ indiquen que el líquid s'espereix i es dispersa bé damunt la superfície, mentre que valors alts impliquen un baix grau d'humitejament. Si l'angle indicat és inferior a 90° , es diu que el

líquid humiteja el sòlid, i si és superior a 90° es considera que el líquid no l'humiteja. Un angle de contacte 0° implica un humitejament complet. Per tant, a partir d'aquestes mesures es pot obtenir informació relacionada amb el caràcter hidrofílic de les superfícies estudiades.

Els dos mètodes més habituals són els anomenats de la bombolla captiva i de la gota sèssil. El primer consisteix a dipositar una gota de líquid que ha estat prèviament purificat damunt la superfície que es vol estudiar i se n'augmenta a poc a poc el volum, mentre s'observa amb un microscopi i es mesuren els angles d'avenç i retrocés de la gota amb ajuda d'un goniòmetre. Aquests angles corresponen, respectivament, als angles que es formen entre la gota i la superfície quan la gota conté el màxim i el mínim volum de líquid, abans del desplaçament del límit de les tres fases. En el mètode de la gota sèssil, que és el que s'ha utilitzat en aquest treball, es diposita una gota d'aigua Milli-Q de volum $1 \mu\text{l}$ sobre la superfície plana de les membranes, amb ajuda d'una xeringa. Es mesura l'angle entre la gota i la superfície en el moment que aquesta es diposita amb l'ajuda d'un goniòmetre. Els angles de contacte, a les superfícies polimèriques, depenen de la rugositat superficial i de la naturalesa química, l'orientació molecular, el grau d'inflament i les capes d'adsorció, per la qual cosa permeten obtenir força informació sobre les característiques de la membrana.

Rebuig de soluts

Permeten determinar el pes molecular de tall (*molecular weight cutt-off*, MWCO), que es defineix com el pes molecular que és rebutjat en un 90% per la membrana. Aquest valor es pot relacionar amb la mida de porus de la membrana.⁸⁷ Es realitzen experiments de separació i de transport de soluts de mides diferents, emprant les condicions en les quals la membrana s'ha d'aplicar. Tanmateix, amb aquests mètodes és difícil predir el funcionament de la membrana, ja que hi intervindran factors com la polarització per concentració, que afectarà la selectivitat i la velocitat de permeació a través de la membrana.

Mètodes d'anàlisi de superfícies

Es basen en la irradiació o bombardeig amb partícules de les superfícies, per tal de produir l'excitació d'aquestes, la qual cosa comportarà emissions que proporcionen informació sobre la presència de grups funcionals, àtoms o tipus d'enllaços a la superfície. Dins d'aquest grup s'agrupen l'espectroscòpia d'infraroig amb transformada de *Fourier* (FTIR), l'espectroscòpia fotoelectrònica de raigs X (XPS)⁸⁸ i l'espectroscòpia electrònica per a l'anàlisi química (ESCA), entre d'altres.

1.4.5. Inconvenients dels processos de membrana

Malgrat els avantatges i la versatilitat dels processos de membrana, que fa que siguin aplicables en un ampli ventall d'àrees, els processos en si poden presentar problemes intrínsecs a la membrana mateixa. Els més coneguts són l'embrutament o *fouling* i la polarització per concentració.

En el cas del *fouling*, aquest és conseqüència de la deposició irreversible de partícules a la superfície de la membrana. Això comporta el bloqueig dels porus i la formació de capes d'adsorció i de gels, que dificultaran el flux a través de la membrana. Una manera de minimitzar aquests fenòmens és el tractament previ de la dissolució de càrrega per a eliminar al màxim les partícules, l'optimització de la composició de la membrana per canviar les seves propietats de superfície, i el disseny de mòduls de membrana que permetin integrar fàcilment processos de neteja periòdics, per tal de perllongar la vida de la membrana.

Respecte de la polarització per concentració, apareix sobretot als processos induïts per pressió. En aquests casos, la concentració de les espècies que no són transportades a les proximitats de la membrana és més elevada que a la resta de la dissolució de càrrega, tot originant una capa adjacent a la superfície de la membrana que incrementarà la resistència al transport dels soluts. Aquesta capa presenta un cert gruix (δ), que està relacionat amb el coeficient de transferència de massa (K) i el coeficient de difusió (D) a través de la següent equació:

$$K = D / \delta \quad (1.3)$$

En els processos induïts per gradients de concentració la concentració del solut que es transporta serà menor a les proximitats de la membrana que en el si de la dissolució de càrrega, la qual cosa també condueix a la formació d'una capa de difusió que s'oposa al transport, de manera que el flux dels analits també estarà determinat pel paràmetre K .

Una manera de minimitzar la polarització per concentració consistiria a modificar aquest paràmetre K . Tenint en compte l'equació 1.3, es podria incrementar el coeficient de difusió augmentant la temperatura. Si no hi ha un canvi de temperatura, es podria incrementar K a partir d'un increment del flux de la dissolució (que normalment s'aconsegueix) per un canvi de configuració del mòdul de membrana.⁶⁶

1.4.6. Membranes aplicades a la immobilització d'enzims

A l'apartat d'immobilització d'enzims ja s'han esmentat els camps d'aplicació dels enzims immobilitzats. En el cas dels enzims immobilitzats a membranes, se'n coneixen

diverses aplicacions; per exemple, en la producció de compostos a partir del tractament de compostos d'alt pes molecular com el dextrà⁸⁹ emprant membranes polimèriques poroses en la configuració de fibres buides. També en el camp de l'obtenció de compostos enantiomèrics, com per exemple la producció de L-metionina per hidròlisi asimètrica d'acetil-DL-metionina, emprant enzims immobilitzats en múltiples capes en membranes polimèriques de fibra buida.⁹⁰ D'altres àrees són el tractament d'aigües per a la disminució de la concentració d'urea en aigües agrícoles,⁶² emprant la ureasa immobilitzada covalentment a membranes polimèriques de tipus *Nylon*® modificades, en configuració plana. També s'empen en química orgànica, com a catalitzadors heterogenis.⁹¹

A la present tesi doctoral, com ja s'ha esmentat, la immobilització de l'enzim endo-1,4- β -xilanas II té com a finalitat el tractament de residus de biomassa vegetal, per a l'obtenció de productes d'alt valor afegit, i s'empraran membranes polimèriques de diferent naturalesa, en configuració plana i en diferents bioreactors i mòduls de membrana.

1.5. Objectius

Els objectius de la present tesi doctoral, tenint en compte els aspectes exposats a la introducció, es poden agrupar en els punts següents:

1. Disseny de membranes polimèriques que permetin la immobilització de l'enzim endo-1,4- β -xilanasa II.
2. Avaluació dels canvis en l'activitat enzimàtica a conseqüència de la seva immobilització, tenint en compte la influència del pH i de la temperatura del medi que envolta la membrana enzimàtica. Determinació de l'estabilitat temporal de l'enzim immobilitzat i dels paràmetres enzimàtics, i comparació dels resultats obtinguts amb els corresponents per a l'enzim en estat lliure.
3. Caracterització de les membranes obtingudes per tal de determinar-ne propietats físiques, emprant diferents tècniques.
4. Estudi de la hidròlisi enzimàtica de materials hemicel·lulòsics, del tipus xilà, de diferent origen, per a determinar i identificar els productes d'hidròlisi. Comparació dels resultats obtinguts amb els diferents tipus de membranes enzimàtiques preparades i amb l'enzim lliure en dissolució.
5. Avaluació de l'aplicabilitat d'aquestes membranes enzimàtiques per a la hidròlisi enzimàtica dels substrats esmentats (xilans) i per a la seva potencial aplicació a escala real.

Referències

- ¹Kadlec, P. *Carbohydrate chemistry. A: Carbohydrates in Grain Legume Seeds*, Hedley, C.L. ed., 2000 CABI Publishers, Oxfordshire, UK, p: 15-59
- ²Solomons T. W. G. *Organic Chemistry sixth edition*. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA, 1996
- ³Perlack, R. D.; Wrigth, L. L.; Turhollow, A. F.; Graham, R. L. Ed. *Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a Billion-ton annual supply* Environmental Sciences Division, U.S. Department of Energy (DOE) Biomass Program, Oak Ridge, Tennessee, USA, 2005
- ⁴Palomer Tarrides, F. X. *Caracterització i propietats de dues endo- β -(1,4)-Glucanases implicades en l'estovament del fruit de maduixa*. Tesi doctoral, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalunya, juny 2002
- ⁵Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. *Bioresource Technology* 96 (2005) 673-686.
- ⁶Kohlman, K. L, *Advanced Space Research* 18 (1996) num 1-2, 251-265.
- ⁷Whistler, R.; Masak, E. *Enzymatic hydrolysis of xylan*. Vol 77. (1995) 1241-1243
- ⁸Ibrahim, M. *Clean fractionation of biomass - steam explosion and extraction*, Master thesis, Department of Wood Science and Forest Products, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1998.
- ⁹Jeffries, T. W. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 337-342.
- ¹⁰Romero, J.; Miralles, J. *Perspectiva ambiental 24: Biocombustibles*. Ed. Fundació Terra, Barcelona, 2002. p: 4-5.
- ¹¹*Pla de l'energia de Catalunya 2006-2015*. Pla estratègic. Edicions Generalitat de Catalunya, Barcelona, 2005.
- ¹²Petersen, G. R. *Enzyme Microbial Technology*, 10 (1988) 586-592.
- ¹³Bruce, E. *Annual reports on Fermentation Process*. Vol 8 (pp 299-323). Academia press Inc. Department of Agricultural and Chemical Engineering Colorado State University, USA. De l'article Godliving, M.; Nakamura, Y. *Biodegradation* 16 (2005) 493-499.
- ¹⁴Hsu, T.A. *Pretreatment of Biomass* in Wyman, C.E. (Ed) *Handbook on bioethanol production and utilization*. Taylor & Francis, Washington, D.C, USA, 1996.
- ¹⁵Vegas, R.; Alonso, J.L.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. *Industrial engineering chemical research* 44 (2005), 614-620.
- ¹⁶Mänttari, M.; Nyström, M. *Journal of Membrane Science* 170 (2000) 2: 257-273.
- ¹⁷Torras, C.; Torné, V.; Fierro, V.; Montané, D.; Garcia-Valls, R. *Journal of Membrane Science* 273 (2006) 38-46.
- ¹⁸Cruz, J. M.; Domínguez, J. M.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. *Food Chemistry* 67 (1999) 147-153.
- ¹⁹Meyer, P. D. *Journal of AOAC International* 87 (2004), 3, 718-726.
- ²⁰Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. *Trends in Food Science and Technology*, 11(2000) 387-393.
- ²¹Watson, K.; Gooderham, N. K.; Davies, D. S.; Edwards, R. J., *Biochemical Pharmacology*, 57 (1999) 7: 775-783
- ²²Stone, A. L.; Melton, D. J.; Lewis, M. S., *Glycoconjugate Journal* 15 (1998) 7: 697-712.

-
- ²³Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S.; Coto, C. E. *Chemotherapy* 42 (1996) 1: 57-64.
- ²⁴Hisado, K.; Minoru, K.; Yoshitada, M.; Suguru, T.; Kiichi, U.; Nobuhiro, W.; Hisao, Y. US Patent 4762825 (1985).
- ²⁵Fujikawa, S.; Okazaki, M. *Food Chemistry* 1 (1989) 63-68.
- ²⁶Okazaki, M.; Fujikawa, S.; Matsumoto, N. *Bifidobacteria Microflora* 9 (1990) 2: 77-86.
- ²⁷Ji, Pengsong. *A xylooligosaccharide chewing gum*. Chinese patent CN 1561784 (2005).
- ²⁸Milov, D. E. ; Andres, J. M.; Erhart, N. A.; Bailey, D. J. *Pediatrics* 102 (1998) 2 p. 22.
- ²⁹Hyams J. S. *Gastroenterology* 84 (1983) 80-83.
- ³⁰Godliving, M.; Nakamura, Y. *Biodegradation* 16 (2005) 493-499.
- ³¹*Enzyme Nomenclature 1992* [Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12-227164-5 (hardback), 0-12-227165-3 (paperback)] with Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) and Supplement 5 (in *Eur. J. Biochem.* 1994, **223**, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1995, **232**, 1-6; *Eur. J. Biochem.* 1996, **237**, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1997, **250**, 1-6, and *Eur. J. Biochem.* 1999, **264**, 610-650; respectively) [Copyright IUBMB].
- ³²Coughan, M. P.; Hazlewood, G. P. *Biotechnology and applied Biochemistry* 17 (1993) 259-289.
- ³³Nishitami, K.; Nevins, D. J. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 6539-6543.
- ³⁴Dekker, R. F. H. *Biodegradation of hemicelluloses* in Higuchi, T. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, Academic Press, Orlando, Florida, USA (1985) 505-533.
- ³⁵Bhat, M. K.; Hazlewood, G. P. *Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases*, p: 11-60, en. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, ed. Bedford, M. R. and Partridge, G. G. Finnfeeds International, Marlborough, Wiltshire, UK, CAB International, Oxfordshire, UK, 2001.
- ³⁶Nelson, N. *Journal of Biological Chemistry* 153 (1944) 375-380.
- ³⁷Paton, F. J. *Biochem J.* 18 (1924) 5: 965-970.
- ³⁸Jeffries, T. W.; Yang, V. W.; Davis, M. W. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72 (1998) 257-268.
- ³⁹Henrissat, B.; Bairoch, A. *Biochemical Journal* 293 (1993) 781-788.
- ⁴⁰Biely P.; Vranska, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. *Journal of Biotechnology* 57 (1997) 151-166.
- ⁴¹Torronen, A.; Rouvinen, J.; *Journal of Biotechnology* 57 (1997) 137-149.
- ⁴²Torronen, A.; Rouvinen, J. *Biochemistry* 34 (1995), 847-856.
- ⁴³Davoodi, J.; Wakarchuk, W. W.; Campbell, R. L.; Carey, P. R.; Surewicz, W. K., *Eur J Biochem* 232 (1995) 839-843.
- ⁴⁴Biely P *Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases*, in Coughan, M. P.; Hazlewood, G. P. *Hemicelluloses and hemicellulases* Portland Press, London, UK, 1993, 29-51.
- ⁴⁵Sinnott, M. L. *Chemical Review* 90 (1990) 1171-1202.
- ⁴⁶Maat, J; et al. *Xylanases and their applications in bakery*, in Visser, I. et al. *Xylans and Xylanases. Progress in biotechnology*, Vol7, Elsevier, Amsterdam, Países Baixos, (1992) 349-360.
- ⁴⁷Taylor, R. F. *Protein immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York, USA, 1991.
- ⁴⁸Arroyo, M. *Ars Pharmaceutica* 39 (1998) 2: 23-39.
- ⁴⁹Mosbach, K. (ed.) *Methods Enzymol.* Academic Press, London, UK, 1987, 135.
- ⁵⁰D'Souza, S. F. ; Nadkarni, G. B. *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 217-222.

-
- ⁵¹Deshpande, A.; D'Souza, S. F.; Nadkarni, G. B. *J. Biosci.* 11 (1987) 137–144.
- ⁵²Kolot, F. B. *Process Biochem.* 5 (1981), 2–9.
- ⁵³D'Urso, E. M.; Fortier, G. *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 482–488.
- ⁵⁴Hartmier, W. *Immobilized Biocatalysts: an Introduction*, Springer Verlag, Berlin, Alemanya 1988.
- ⁵⁵Klivanov, A. M. *Science* 219 (1983) 72-79.
- ⁵⁶Ladisch, M. R.; Lin, K. W.; Voloch, M.; Tsao, G. T. *Enzyme and microbial technology*, 5 (1983) 304-307.
- ⁵⁷Griffiths, D.; Hall, G. *Trends in biotechnology* 11 (1993) 122-130.
- ⁵⁸Veremenko K. M.; Karpenko, G. F. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* 51 (1979) 4: 409-19.
- ⁵⁹Honda, Y.; Kako, M.; Abiko, K.; Sogo, Y.; *Industrial applications of immobilized enzymes*. Tanaka, A et al. eds Marcel Dekker, New York, USA, 1993, p. 209-234.
- ⁶⁰Lalonde, J. J.; Govardham, C.; Kahlaf, N.; Martinez, A. G.; Visuri, K.; Margolin, A. L. *Journal of American Chemical Society* 117 (1995) 6845-6852.
- ⁶¹Katchalski-Katzir, E. *Trends in Biotechnology*, 11 (1993) 471-478.
- ⁶²El-Sherif, H.; di Martino, S.; Travascio, P.; de Maio, A; Portaccio, M.; Durante, D.; Rossi, S.; Canciglia, P.; Mitta, D. G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 2802-2811.
- ⁶³Butterfield, D.A.; Bhattacharyya, D.; Daunert, S.; Bachas, L. G, *Journal of Membrane Science* 181 (2001) 29-31.
- ⁶⁴Wang, J.; Bhattacharyya, D.; Bachas, L. G. *Biomacromolecules*, 2 (2001) 700-705.
- ⁶⁵Cano, A.; Minguillón, C.; Palet, C. *Journal of Membrane Science* 280 (2006) 383-388.
- ⁶⁶Mulder, M. *Basic principles of membrane Technology*, 2nd Ed, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Països Baixos, 2000.
- ⁶⁷Araki, T. , Sukube, H. *Liquid membranes: Chemical applications*, CRC Press Inc., Florida , USA, 1990.
- ⁶⁸Brinchi, L.; Germani, R.; Mancini, M.V.; Savelli, G.; Spreti, N.; *Eur. Journal Org. Chem* (2004) 1330-1335.
- ⁶⁹Chia, P.S.K.; Lindoy, L.F.; Walker, G.W.; Everett, G.W, *Pure and Appl. Chem.* 65 (1993) 3:521-526.
- ⁷⁰Reis , M. T. A.; de Freitas, O. M. F.; Ferreira, L. M., Carvalho, J. M. R. *Separation Science and Technology* 41 (2006) 5: 841-860.
- ⁷¹Gumí, T. *Membranes en la separació enantiomèrica del fàrmac propranolol. Desenvolupament i caracterització*. Tesi doctoral, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalunya, juliol 2004.
- ⁷²Gumí, T.; Valiente, M.; Palet, C. *Separation Science and Technology* 39 (2004) 2:431-447.
- ⁷³Neplenbroeck, A. M.; Bargeman, D.; Smolders, C.A. *Journal of Membrane Science* 67 (1992) 121-132.
- ⁷⁴Keperman, A.J.B.; Bargeman, D. *Separation Science and Technology*, 31 (1996) 2733-2762.
- ⁷⁵Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Biotech. Bioeng.* 49 (1996) 355.
- ⁷⁶Kesting, R. *Synthetic Polymeric Membranes*, Mc Graw Hill, New York, USA, 1971.
- ⁷⁷Souriajan, S. Ed. *Reverse Osmosis and Synthetic Membranes*, NRCC Publ. No 15627, Ottawa, Canadà, 1977.
- ⁷⁸Petro, M.; Svec, F.; Gitsov, I.; Fréchet, J.M.J. *Analytical Chemistry* 68 (1996) 315.
- ⁷⁹Nilsson, K.; Lindell, J.; Norrlof, O.; Sellergren, B. *Journal of Chromatography A* 680 (1994) 57.
- ⁸⁰Svec, F. *Journal of Separation Science* 27 (2004) 747-766.

-
- ⁸¹Viklund, C.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Chem. Materials* 8 (1996) 744-750.
- ⁸²Hodge, P.; Sherrington, D. C. *Syntheses and Separations using functional polymers*, Wiley, New York, USA, 1989.
- ⁸³Jungbauer, A.; Hahn, R. *Journal of Separation Science* 27 (2004) 767-778.
- ⁸⁴Macanás, J. *Síntesis y caracterización de membranas compuestas activadas con ácido di(2-etilhexil) ditiofosfórico y evaluación de sus propiedades de transporte*. Memoria el trabajo de investigación. Universitat Autònoma de Barcelona, Catalunya, març 2002.
- ⁸⁵Cuperus, F.P. *Characterization of ultrafiltration membranes: pore structure and top layer thickness*. Tesi doctoral. University of Twente, Països Baixos, setembre 1990.
- ⁸⁶Prádanos, P.; Rodríguez, M. L.; Calvo, J.I., Hernández, A.; Tejerían, F.; de Saja, J.A. *Journal of Membrane Science*, 117 (1996) 291-302.
- ⁸⁷Michaels, A. S. *Separation Science and Technology* 15 (1980) 1305-1322.
- ⁸⁸Ariza, M. J.; Rodríguez-Castelló N, E.; Rico, R.; Benavente, J.; Muñoz, M.; Oleinikova, M. *J. Colloid and interface Science* 226 (2000) 151-158.
- ⁸⁹Kawai, T.; Kawatita, H.; Sugita, K.; Saito, K.; Tamada, M.; Sugo, T.; Kawamoto, H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 1073-1076.
- ⁹⁰Kawai, T.; Nakamura, M.; Sugita, K.; Saito, K.; Sugo, T. *Biotechnol. Progress* 17 (2001) 872-875.
- ⁹¹Lozano, P.; Pérez-Marín, A. B.; de Diego, T.; Gómez, D.; Paolucci-Jeanjean, D.; Belleville, M.P.; Rios, G. M.; Iborra, J.L. *Journal of Membrane Science* 201 (2002) 55-64.

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1. Immobilització d'enzims en membranes

2.1.1. Immobilització per retenció física

Es procedeix al procés d'immobilització de l'endo-1,4- β -xilanasasa II en membranes de polisulfona, mitjançant la seva retenció física. Es prepara una dissolució de membrana que conté 8,3 g de polisulfona (PS) en 50 ml de dimetilformamida (DMF), totes dues d'Aldrich (Alemanya), a la qual se li afegixen 410 μ l d'una dissolució comercial de 93mg/ml d'endo-1,4- β -xilanasasa II (Genencor International, Països Baixos). A continuació es diposita la dissolució de polímer i enzim sobre un suport no teixit de tipus polièster (Hollytex® 3329, GA, USA) per tal d'obtenir una pel·lícula homogènia. Se'n controla el seu gruix mitjançant una barra pel·liculadora adequada, coneguda amb el nom de *casting knife*. Un cop formada, la pel·lícula es fa precipitar el polímer de polisulfona per la tècnica d'inversió de fase, submergeint el conjunt pel·lícula de polímer/suport no teixit en un bany d'aigua i gel a 5 °C. El resultat és una capa polimèrica porosa. La capacitat catalítica de les membranes obtingudes s'avalua realitzant assaigs d'activitat enzimàtica, segons el procediment descrit a l'apartat 2.2.1 d'aquest capítol, en front d'una dissolució de substrat comercial, xilà d'escorça de bedoll (*Birchwood xylan*) al 0,1% en pes.

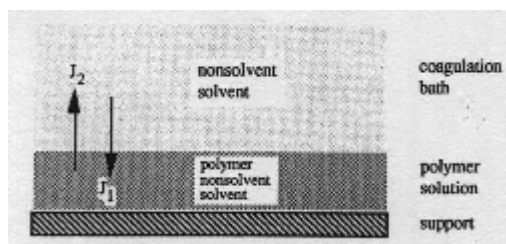


Fig. 2.1. Representació del procés d'obtenció d'una membrana per inversió de fase (immersió en un no solvent).

2.1.2. Immobilització química

2.1.2.1. Derivatització de la polisulfona

L'objectiu és l'adequada derivatització del polímer de polisulfona per tal de facilitar la immobilització de l'enzim a la seva estructura polimèrica. Els diferents procediments que s'han seguit es presenten a continuació.

a) Preparació de la glicidilpolisulfona

Per a dur a terme la derivatització de la polisulfona per a obtenir el polímer de glicidilpolisulfona, es consideren diferents procediments i condicions per a seguir la ruta sintètica que es mostra a la següent equació:

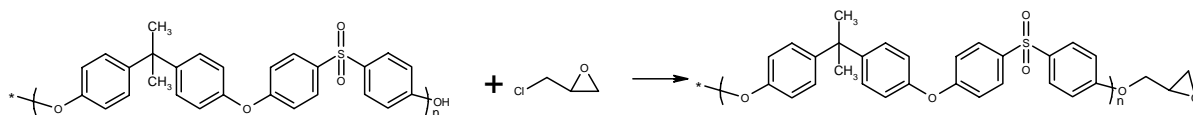
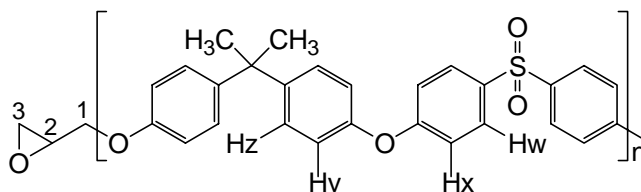


Fig. 2.2. Reacció entre la polisulfona i l'epiclorhidrina per a la formació de la glicidilpolisulfona.

Aquestes diferents condicions de reacció es descriuen a continuació:

- **Mètode A:** Es dissolen 0,500 g de polisulfona en 10 ml de DMF anhidre i s'afegeixen 0,660 g d'hidròxid de potassi (KOH) sòlid en forma de lleties. A continuació s'hi addicionen gota a gota 3 ml d'epiclorhidrina (densitat: 1,179 g/ml). La reacció es manté en agitació magnètica durant 48 hores a 40 °C. Després d'aquest temps, s'observa que la dissolució ha adquirit un color groc. La barreja es fa precipitar addicionant-la gota a gota, mentre es manté l'agitació, a 50 ml d'aigua destil·lada. El precipitat obtingut es filtra i es renta amb aigua fins que el pH de les aigües de rentat és neutre. S'obtenen 0,301 g de producte i s'enregistra el seu espectre RMN-¹H.
- **Mètode B:** Es dissolen 0,500 g de polisulfona en 10 ml de DMF anhidre i s'hi afegeixen 0,500 g d'hidrur de sodi (NaH). Tot seguit, s'hi addicionen gota a gota 3 ml d'epiclorhidrina. Aquesta reacció es realitza en atmosfera d'argó durant 48 hores i a 40 °C, amb agitació magnètica. En acabar la reacció, el producte obtingut s'aïlla del medi seguint el procediment descrit al mètode A. S'obtenen 0,280 g de producte i també s'enregistra el seu espectre RMN-¹H.
- **Mètode C:** Es dissolen 0,500 g de polisulfona en 10 ml d'hidròxid de sodi (NaOH) 1M i s'hi afegeix gota a gota 1ml d'epiclorhidrina. Es manté la reacció en agitació magnètica durant 24 hores a 25 °C. Passat aquest temps s'observa que s'ha format un sòlid de color blanc. Es filtra el precipitat i es renta, primer amb aigua destil·lada i després amb èter dietílic. S'obtenen 0,260 g de glicidilpolisulfona i se n'enregistra l'espectre RMN-¹H.

- Mètode D: Es repeteix el procediment anterior (C) però s'augmenta la quantitat d'epiclorhidrina afegida fins a 3 ml. S'obtenen 0,272 g de producte i se n'enregistra l'espectre RMN-¹H.
- Mètode E: Se segueix el mateix procediment que el del mètode C, però afegint-hi 0,400 g de Bu₄N⁺Br⁻, que actua com a catalitzador de transferència de fase. S'obtenen 0,105 g de producte i se n'enregistra l'espectre RMN-¹H.



RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 1,56 (ba, OH); 1,69 (s, CH₃); 2,62 (m, C³Ha); 2,81 (m, C³Hb); 3,18 (m, C²H); 3,45 (ddd, C¹Ha); 3,82 (ddd, C¹Hb); 6,93 (d, ArHy); 7,00 (d, ArHx); 7,23 (d, ArHz); 7,84 (d, ArHw). *

Fig. 2.3. Representació dels diferents tipus d'hidrogens de la glicidilpolisulfona i llista de senyals de l'espectre RMN-¹H amb els seus corresponents desplaçaments químics.

Segons la integració relativa dels senyals a δ 3,18 i δ 6,93, el producte obtingut seguint el mètode C té un grup glicidil per cada 8 unitats monomèriques de polisulfona.

b) Preparació de l'acrilat de polisulfona

Es dissolen 5,600 g de polisulfona en 200 ml de cloroform. Un cop dissolta, s'hi afegeixen 70 ml de NaOH 2M i tot seguit s'hi addicionen gota a gota 10 ml de clorur d'acrilòil (Aldrich, Alemanya), per a dur a terme la reacció següent:

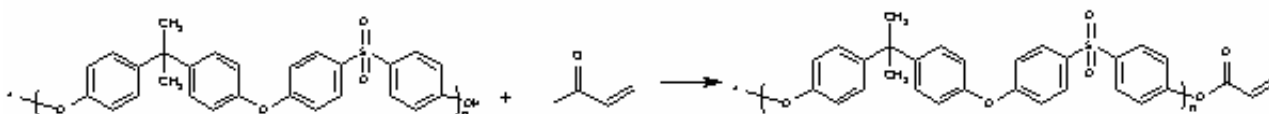
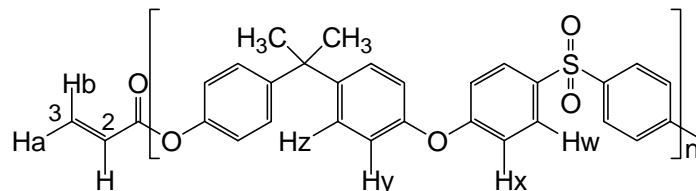


Fig. 2.4. Reacció entre la polisulfona i el clorur d'acrilòil per a la formació d'acrilat de polisulfona.

Es manté en agitació durant 4 hores a temperatura ambient (25 °C). Passat aquest temps, el contingut del baló es dilueix amb 100 ml d'aigua destil·lada. Les dues fases es passen a un embut de decantació. Se separa la fase orgànica i la fase aquosa s'extreu amb 3 volums de 75 ml de cloroform. Es reuneixen els extractes clorofòrmics amb la fase orgànica inicial i es renten amb 3 volums de 75 ml d'àcid clorhídric (HCl) 1N.

* Significat de la multiplicitat dels senyals dels espectres RMN-¹H: singlet (s), doblet (d), triplet (t), multiplet (m), doble doblet (ddd), banda ampla (ba).

Finalment es renta la fase orgànica amb 200 ml d'aigua destil·lada i s'asseca amb sulfat sòdic anhidre. El cloroform s'evapora amb el rotavapor. Al baló s'obté un residu sòlid, que és l'acrilat de polisulfona (6,600 g). S'enregistren els espectres de RMN-¹H i d'IR per a caracteritzar el producte obtingut.



RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 1,69 (s, CH₃); 6,08 (dd, C³Ha); 6,20 (dd, C²H); 6,57 (dd, C³Hb); 6,93 (d, ArHy); 7,00 (d, ArHx); 7,23 (d, ArHz); 7,84 (d, ArHw).

IR (KBr): 1727 cm⁻¹ (C=O); 1246, 1149, 1107 cm⁻¹ (S=O, C-O).

Fig. 2.5. Representació del diferents tipus d'hidrogen de l'acrilat de polisulfona i llistat de senyals de l'espectre RMN-¹H, amb els seus corresponents desplaçaments químics i de les bandes observades a l'espectre IR.

Segons la integració relativa dels senyals a δ 6,57 i δ 6,93, el material preparat seguint el mètode anterior té un grup acrilat per cada 2 unitats monomèriques de polisulfona.¹

c) Preparació del 3-(12-aminododecil)aminopropionat de polisulfona

Es dissolen 2,000 g d'acrilat de polisulfona en 50 ml de cloroform i s'hi afegeixen 1,600 g de 1,12-dodecanodiamina. La reacció es mostra a la següent equació:

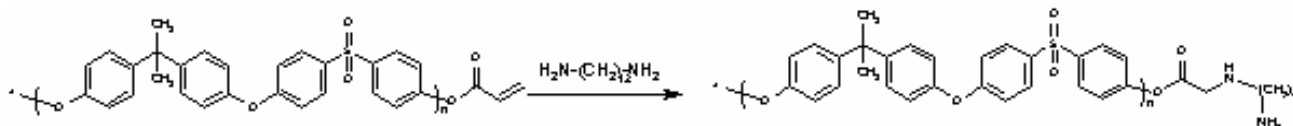
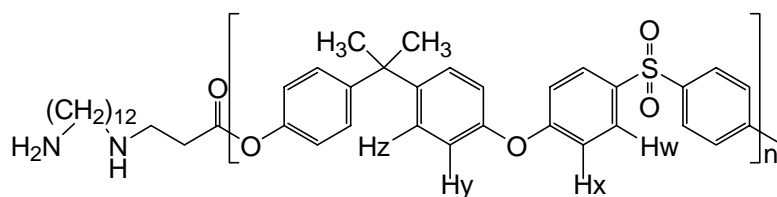


Fig. 2.6. Reacció entre l'acrilat de polisulfona i 1,12-dodecanodiamina per a la formació del 3-(12-aminododecil) aminopropionat de polisulfona.

Es deixa en agitació a 50 °C durant 21 hores. El contingut del baló es dilueix amb 100 ml d'aigua destil·lada. Les dues fases es passen a un embut de decantació, on se separa la fase orgànica. La fase aquosa s'extreu amb 3 volums de 75 ml de cloroform. Es reuneixen els extractes clorofòrmics amb la fase orgànica inicial i es renten amb 3 volums de 75 ml d' HCl 1N i amb 200 ml d'aigua destil·lada. S'asseca amb sulfat sòdic anhidre i s'evapora el cloroform amb el rotavapor. Al baló s'obtenen 3,100 g d'un residu sòlid i s'enregistra l'espectre RMN-¹H del producte.



RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 1,2-1,6 (m, CH₂); 1,69 (s, CH₃); 2,63 (t, CH₂N); 6,93 (d, ArHy); 7,00 (d, ArHx); 7,23 (d, ArHz); 7,84 (d, ArHw).

Fig. 2.7. Representació dels diferents tipus d'hidrogen del 3-(12-aminododecil) aminopropionat de polisulfona i llista de senyals de l'espectre RMN-¹H, amb els seus corresponents desplaçaments químics.

2.1.2.2. Preparació de les membranes d'acrilat de polisulfona

Es dissolen 8,300 g d'acrilat de polisulfona en 50 ml de DMF, i es deixen en agitació magnètica durant 24 hores. Un cop s'ha dissolt completament el polímer, es procedeix a la preparació de les membranes tot dipositant una pel·lícula de dissolució de membrana de gruix controlat amb el *casting knife* sobre el suport no teixit de tipus polièster (Hollytex® 3329, GA, USA) i induint la posterior inversió de fase per immersió en un bany de no solvent, com ja s'ha descrit a l'apartat 2.1.1. Aquestes membranes es conserven en aigua destil·lada a 4 °C fins al seu ús. Aquest tipus de membrana s'anomenarà ACPS.

2.1.2.3. Fixació de la proteïna a les membranes d'acrilat de polisulfona

Immobilització estàtica

S'introdueixen 5 membranes d'acrilat de polisulfona de 2,5 cm de diàmetre en 50 ml de dissolució tampó de bicarbonat/carbonat sòdic 0,1 M a pH 9,5 que conté enzim en una concentració de 0,5 mg/ml, tant en el cas d'estudi de l'endo-1,4-β-xilanasa II (dissolució comercial d'endo-1,4-β-xilanasa II de *Trichoderma reesei*, Multifect Xylanase® Genencor International, Països Baixos) com per a la immobilització de lisozim (*Lysozyme from chicken egg white*, Fluka, 62971, Alemanya). Es deixa en agitació orbital a 300 rpm, durant 24 hores i a temperatura ambient. Seguint aquest procediment s'optimitza el temps d'immobilització en aquestes condicions, per tal d'assolir la màxima activitat enzimàtica en el menor temps de contacte entre proteïna i membrana.² Un cop s'ha immobilitzat l'enzim es renten les membranes amb aigua destil·lada i es deixen submergides en aquest medi aquós a 4 °C fins al seu proper ús. La confirmació de la fixació de la proteïna s'obté a partir dels resultats de les proves de microanàlisi elemental (contingut de nitrogen de la membrana) i de l'anàlisi d'aminoàcids per

cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) de mostres procedents d'un tractament hidrolític de la membrana. Els detalls experimentals sobre aquestes anàlisis es comenten en apartats posteriors d'aquest capítol.

Tanmateix es determina la concentració de proteïna a la dissolució aquosa tant al moment inicial com transcorregudes 24 hores en contacte amb les membranes. Per la diferència de concentracions es pot determinar la quantitat d'enzim immobilitzat. En el cas del lisozim es duu a terme una mesura directa de l'absorbància a 280 nm, on aquesta proteïna presenta bandes d'absorció, de manera que l'absorbància es relaciona amb la concentració de proteïna. Per al cas de l'endo-1,4- β -xilanasasa II, en tractar-se d'una dissolució comercial, no és possible seguir la concentració per determinació directa de l'absorbància, per la qual cosa cal realitzar el test de Bradford³ per a cada mostra, que es basa en la mesura de l'absorbància del complex BCA-Proteïna a 595 nm.

La immobilització en condicions estàtiques s'utilitza també en la immobilització d'endo-1,4- β -xilanasasa II en membranes ACPS per a realitzar els experiments d'hidròlisi amb els mòduls de membrana. En aquests casos s'utilitzen 50 ml de la mateixa dissolució tampó, amb la mateixa concentració d'enzim, i les membranes considerades tenen una superfície de 7 cm². El temps d'immobilització també és de 24 hores.

Immobilització dinàmica

Un altre procediment d'immobilització de l'enzim a la membrana ACPS es basa en l'ús d'un sistema dinàmic. En aquest cas es fa servir un mòdul de membrana de filtració anomenat *dead-end*, de tipus Amicon® Cell. Està constituït per tres peces d'acer, una part on es recolza la membrana, un tub cilíndric al qual s'afegeix la solució de càrrega i una tercera part que permet tancar el sistema i establir les connexions de pressió i alhora disposa d'una barra amb un nucli d'agitació magnètic (per a afavorir l'homogeneïtzació de la dissolució de càrrega i així poder minimitzar processos de polarització per concentració i *fouling*, tal com s'ha comentat a l'apartat 1.4.4 del capítol anterior). Anàlogament als experiments d'immobilització en condicions estàtiques, s'utilitza una dissolució tamponada de bicarbonat/carbonat sòdic 0,1M a pH 9,5, amb una concentració d'enzim de 0,5 mg/ml. Aquesta dissolució es filtra aplicant pressió a través d'un sistema de 5 membranes (en un mateix experiment) convenientment situades al mòdul de filtració (*dead-end*). La pressió que s'utilitza depèn del temps de residència que es vol tenir a la membrana, que es defineix com el temps mitjà que l'enzim és en contacte amb la membrana i, per tant, correspon al temps durant el qual es pot dur a terme la immobilització de l'enzim al suport d'acrilat de polisulfona. Per tal de

comparar la immobilització a diferents experiments amb diferents membranes, cal emprar la mateixa concentració d'enzim i el mateix temps de residència. Per tant, a tots els experiments el que ha de ser constant és el flux, no pas la pressió aplicada, que sempre s'ajusta en funció del valor d'aquest flux. Així, doncs, el temps de residència està relacionat amb el flux a través de la membrana, i aquest, amb la pressió a través d'una equació lineal, que és diferent per a cada tipus de membrana. Aquestes equacions s'han obtingut en experiments de filtració d'aigua pura que s'han realitzat prèviament, i que s'expliquen a l'apartat 2.2.4 d'aquest capítol. El temps de residència utilitzat en el nostre cas és de 49 segons.

Es realitzen experiments d'immobilització dinàmica d'endo-1,4- β -xilanasas II de *Trichoderma reesei* a partir d'una dissolució comercial (*Multifect Xylanase*® Genencor International, Països Baixos) i de lizozim (*Lysozyme from chicken egg white*, Fluka, 62971, Alemanya).

Prèviament a la filtració de la dissolució d'enzim es realitza l'equilibració de les membranes durant 1 h en tots els casos, amb la mateixa dissolució tampó que s'utilitza per a la immobilització, però sense enzim.

Es recull el filtrat en diferents fraccions i es determina la concentració de proteïna a cadascuna. Per al cas del lizozim la determinació és directa, per mesura de l'absorbància a 280 nm, i per a l'endo-1,4- β -xilanasas II es realitza el test de Bradford, tal com ja s'ha comentat. Alternativament, per a l'endo-1,4- β -xilanasas II es realitza l'anàlisi de les diferents fraccions per HPLC, amb l'equip Waters® 2487 (*Dual λ Absorbance Detector*) i una columna *Biosuite* CM 10 μ m CXC de 7,5 * 75 mm, també de Waters® (que es tracta d'una columna de bescanvi de cations dèbil, de resina polimèrica d'èsters d'àcid metacrílic). La detecció es fa seguint l'absorbància a 280 nm.

Anàlisi de les membranes

La immobilització de l'enzim endo-1,4- β -xilanasas II a les membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) es comprova mitjançant diferents tècniques analítiques: la microanàlisi elemental i la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per a l'anàlisi d'aminoàcids.

a) Microanàlisi elemental

Es duu a terme la microanàlisi elemental de membranes d'acrilat de polisulfona que havien estat submergides en la dissolució d'enzim, i d'aquelles membranes que no han estat en contacte amb la proteïna, anomenades membranes blanc. L'objectiu consisteix a determinar el contingut de nitrogen en ambdós casos, per tal de relacionar-lo amb el

contingut d'enzim. Paral·lelament al contingut de nitrogen, també es determina el contingut de carboni, hidrogen i sofre. Les corresponents anàlisis es van fer al Servei d'Anàlisi Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El procediment seguit consisteix en una combustió a 1200 °C en atmosfera d'O₂, seguida de l'anàlisi quantitativa dels gasos formats. La mostra es confina en un tub que es troba inicialment a 1020 °C. S'hi afegeix Sn i catalitzadors, de manera que es forma SnO₂ en una reacció molt exotèrmica que fa augmentar la temperatura fins a 1200 °C. En condicions d'atmosfera oxidant es formen CO, CO₂, H₂O, N_xO_y, SO₂ i SO₃, entre d'altres, i a més tenim O₂ en excés. A continuació, els gasos es fan passar per un reactor on hi ha WO₃, que actua de catalitzador i transforma la mescla anterior en 4 espècies (CO₂, H₂O, N₂ i SO₂), que són les que es determinaran i quantificaran posteriorment. Seguidament circulen per un llit de Cu, de manera que es forma CuO per tal d'eliminar l'excés d'oxigen. La determinació de les espècies anteriors es fa per cromatografia de gasos, amb calibració externa enfront de patrons.

b) Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per a l'anàlisi d'aminoàcids

Per tal de determinar la presència d'aminoàcids a la membrana i confirmar-hi la immobilització de l'enzim es determina el contingut d'aminoàcids del polímer de membrana, abans i després de la immobilització de l'endo-1,4-β-xilanasa II, per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), amb el mètode *AccQTag method* de Waters®. Es realitza també la determinació de la dissolució comercial de l'enzim. Les anàlisis es realitzen als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

La reacció que té lloc consisteix a derivatitzar les amines primàries i secundàries dels aminoàcids amb 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC), que està dissolt en acetonitril, de manera que els derivats formats són estables a temperatura ambient i presenten absorció a 248 nm. L'esquema de la reacció que té lloc és el següent:

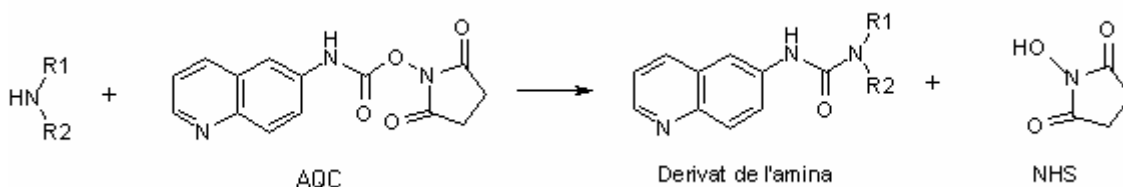


Fig. 2.8. Reacció de derivatització d'amines primàries i secundàries amb AQC.

En el cas de les membranes, cal realitzar prèviament una hidròlisi amb HCl 6 N durant 2,5 hores a 155 °C. S'analitzen tres mostres que es detallen a continuació i en cada cas es consideren tres replicats:

- PS-Blanc: correspon a 60,2 mg de polímer de membrana d'acrilat de polisulfona que no ha estat en contacte amb la proteïna; és a dir, la membrana que s'agafa com a "blanc".
- PS-E: 62,4 mg del mateix polímer que l'anterior però amb la diferència que s'ha submergit 24h en la dissolució d'endo-1,4-β-xilanasasa II, per a immobilitzar l'enzim al polímer, tal com s'explica a l'apartat d'immobilització estàtica.
- Una alíquota de 100 µl dissolució comercial d'endo-1,4-β-xilanasasa II de *Trichoderma reesei* (Genencor International, Països Baixos), concentració 93 mg/ml.

Per al mètode cromatogràfic, s'utilitza una columna AccQTag (referència WATO52885) de 3,9 mm * 150 mm, de mida de partícula 4 µm, C18, i s'empra un equip Waters® 2487, dual λ Absorbance detector.

Les fases mòbils utilitzades són:

Fase mòbil A: 19,05 g/l d'acetat sòdic trihidratat, 5 ml d'EDTA 200 ppm, 2,35 ml de trietilamina i ajust del pH amb àcid fosfòric concentrat.

Fase mòbil B: acetonitril i aigua Milli-Q en relació 3:2.

2.1.2.4. Membranes de polímers monolítics

Els polímers monolítics han estat emprats com a mitjans de separació per a aplicacions en HPLC,⁴ així com a suports per a processos de química de l'estat sòlid,⁵ bescanviadors d'ions i adsorbents.⁶ Tanmateix, es poden utilitzar com a materials de membrana. Tenen una estructura interna basada en porus interconnectats i una estructura rígida entrecreuada.⁷ També es caracteritzen per presentar una estructura porosa permanent que roman constant fins i tot en estat sec.

Els polímers monolítics utilitzats en aquesta tesi doctoral estan constituïts pels monòmers 2-aminoetilaminometà (AEM), hidroximetil metacrilat (HEMA) i etilendimetacrilat (EDMA), així com per 2-hidroxí-2-metilpropiofenona (HMPP) que és un generador de radicals lliures, tots ells adquirits a Aldrich (Alemanya). En la preparació d'aquests polímers cal incloure-hi un parell de dissolvents porogènics, que en aquest cas són el ciclohexanol (Panreac, Espanya) i el dodecanol (Aldrich, Alemanya), la funció dels quals és tant la dissolució dels monòmers com la formació de

l'estructura porosa del polímer final.⁸ Les característiques químiques d'aquests polímers (per exemple, la funcionalitat) i les seves propietats físiques (per exemple, la porositat i l'estabilitat mecànica) es poden modificar a partir de la selecció adequada dels constituents de la dissolució precursora i de la relació de concentració. Les variables més importants relacionades amb les propietats poroses d'aquests materials són la concentració d'agent d'entrecreuament (en aquest cas, EDMA) i la relació de dissolvents porogènics a la mescla de polimerització. Per tant, el primer pas per al disseny de membranes polimèriques enzimàtiques basades en polímers monolítics és l'optimització de la relació dels seus constituents, per tal d'assolir la màxima activitat enzimàtica.

2.1.2.5. Optimització i disseny d'experiments

Els mètodes de superfície de resposta s'utilitzen per a estudiar com estan relacionades les variables de resposta amb les variables experimentals, tot analitzant l'efecte de l'ajust d'aquestes darreres en la resposta estudiada.⁹ Aquests mètodes elaboren un model matemàtic per a expressar la resposta en funció de les variables, a partir del qual és possible analitzar el paper que té cadascuna d'aquestes variables experimentals, alhora que permet l'ajust de les variables que condueix a una resposta òptima.

S'utilitza el programa Modde© 6.0 d' Umetrics© (Noruega) per a construir i analitzar els resultats d'un Disseny d'Experiments (DOE). Un cop s'arriba al model adequat, el programa utilitza el mètode *Simplex* per a aproximar la localització de l'òptim. El procés inclou tres etapes: l'estimació dels coeficients del model matemàtic que descriu la resposta, la predicció de respostes i l'avaluació de la capacitat predictiva del model.

Al present estudi s'escull un model cúbic centrat a les cares, i es consideren sis punts centrals per tal de construir un model ortogonal, en el qual la precisió dels resultats serà independent del rang de valors considerats per a cada paràmetre.

Les variables de procés seleccionades són la relació molar de dissolvents porogènics, la quantitat d'agent d'entrecreuament (EDMA) i la quantitat del monòmer AEM, el qual reacciona amb l'enzim per a unir-lo covalentment a la resta de l'estructura. Aquestes variables es designen com a X_1 , X_2 i X_3 , respectivament. La resposta optimitzada és l'activitat enzimàtica de l'endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada, respecte de la hidròlisi de *Birchwood Xylan*, expressada en unitats d'activitat enzimàtica (U)/ml membrana.[†]

[†] Es defineix una unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat d'enzim que reacciona amb 1 μ mol de substrat o que allibera 1 μ mol de producte per minut.

La relació molar de dissolvents s'incrementa a partir valor mínim per tal que la membrana presenti resistència mecànica fins a un valor arbitrari (relació molar ciclohexanol/dodecanol de 2,54 a 35,29). El rang per a l'EDMA se selecciona d'acord amb una quantitat màxima que no sigui superior a la suma dels altres dos monòmers. La quantitat d'AEM depèn de la solubilitat del monòmer en la dissolució precursora de polímer (en aquestes condicions, l'AEM és soluble de 70 a 100 mg). Cal diferenciar, tres nivells per a cadascun dels paràmetres, baix, mig i alt, com es recull a la taula 2.1.

<i>Relació de dissolvents porogènics</i>	<i>EDMA (μl)</i>	<i>AEM (mg)</i>
2,54 (-1)	300 (-1)	70 (-1)
18,915 (0)	507 (0)	85 (0)
35,29 (1)	714 (1)	100 (1)

Taula 2.1. Resum de les variables i els seus respectius valors als tres nivells.

En aquest cas, considerant 3 variables independents, la resposta es pot expressar com una combinació lineal de les variables i els termes quadràtics i de productes creuats amb l'equació polinòmica de segon ordre (2.1), on A_0 correspon al terme independent, A_1 A_2 i A_3 són els coeficients de les contribucions lineals, A_{11} A_{22} i A_{33} són els coeficients dels termes quadràtics i A_{12} A_{23} i A_{13} són els coeficients dels productes creuats.

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{23}X_2X_3 + A_{13}X_1X_3 + A_{11}X_1X_1 + A_{22}X_2X_2 + A_{33}X_3X_3 \quad (2.1)$$

Es realitzen 20 experiments, els quals es presenten a la taula 2.2, per a estimar els coeficients del model.

<i>Experiment</i>	<i>Relació dissolvents porogènics</i>	<i>EDMA (μl)</i>	<i>AEM (mg)</i>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Taula 2.2. Experiments del Disseny d'Experiments (DOE).

2.1.2.6. Preparació de les membranes de polímers monolítics

Es preparen les dissolucions precursors de membrana, considerant els components anteriorment esmentats, en la proporció corresponent. Aquestes dissolucions es dipositen sobre un suport no teixit de tipus polièster (Hollytex® 3329, GA, USA) per tal d'aconseguir una pel·lícula d'un gruix determinat, anàlogament al procediment descrit per a les membranes d'acrilat de polisulfona (apartat 2.1.2.2).

La polimerització és un fenomen radicalari, induït per radiació UV. El conjunt de dissolució/suport s'irradia amb una làmpada UV a 254 nm durant 15 minuts. Passat aquest temps la membrana se submergeix en etanol per tal d'eliminar-ne l'excés de dissolvents porogènics. Posteriorment es renta en profunditat amb aigua destil·lada per a eliminar l'etanol, ja que la presència de dissolvents orgànics conduiria a la desactivació de l'enzim. Les membranes, un cop preparades, es conserven en aigua destil·lada a 4 °C fins al seu ús.

<i>Membrana</i>	<i>EDMA (mg)</i>	<i>AEM (mg)</i>	<i>HEMA (mg)</i>	<i>Rel molar dissolvents</i>	<i>Ciclohexanol (mg)</i>	<i>Dodecanol (mg)</i>	<i>HMPP (mg)</i>	<i>% monòmers</i>	<i>% dissolvents</i>
N1	315	70	1115	2,54	4416	3280	215	15,94	83,69
N2	315	70	1115	35,29	7776	410	215	15,15	84,51
N3	750	70	680	2,54	4416	3280	215	15,94	83,69
N4	750	70	680	35,29	7776	410	215	15,15	84,51
N5	315	100	1085	2,54	4416	3280	215	15,94	83,69
N6	315	100	1085	35,29	7776	410	215	15,15	84,51
N7	750	100	650	2,54	4416	3280	215	15,94	83,69
N8	750	100	650	35,29	7776	410	215	15,15	84,51
N9	532	85	883	2,54	4416	3280	215	15,94	83,69
N10	532	85	883	35,29	7776	410	215	15,15	84,51
N11	315	85	1100	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N12	750	85	665	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N13	532	70	898	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N14	532	100	868	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N15	532	85	883	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N16	532	85	883	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N17	532	85	883	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N18	532	85	883	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N19	532	85	883	18,92	7504	739	215	15,06	84,60
N20	532	85	883	18,92	7504	739	215	15,06	84,60

Taula 2.3. Composició de les dissolucions precursors de membrana a cada experiment del disseny d'experiments. Les variables estudiades s'indiquen en negreta, la quantitat d'HEMA s'ajusta per a mantenir el contingut total de monòmers constant a un 15% en pes i el ciclohexanol i dodecanol s'ajusten per a mantenir la relació molar entre ells.

2.1.2.7. Fixació de la proteïna en membranes de polímers monolítics

A partir de l'estudi anterior, se selecciona una membrana, anomenada a partir d'ara N25, que té la composició: EDMA 714µl, AEM 85 mg, relació molar de dissolvents de 49,15; HEMA 610 µl i HMPP 215 µl, per a continuar amb la resta del procediment

experimental ja indicat. L'elecció d'aquesta composició de membrana s'explica al capítol de resultats i discussió. Per tal d'enllaçar covalentment l'enzim endo-1,4- β -xilanasa II a les membranes de polímers monolítics, es requereix N-(3-Dimetilaminopropil) N'-etil-carbodiimida hidrocloreur (EDC) (Fluka, Alemanya) i N-Hidroxisuccinimida (NHS) (Aldrich, Alemanya). Es parteix d'una dissolució comercial d'endo-1,4- β -xilanasa II de *Trichoderma reesei* (Genencor International, Països Baixos), la qual es dialitza amb un Slide-A-lyzer (Pierce, IL, USA) de MWCO 3,5 KDa, en 3 cicles de 4 hores amb 2 l de dissolució tampó d'àcid acètic/acetat sòdic 0,05M a pH 5, per tal d'eliminar la presència de possibles interferents en la reacció d'immobilització presents a la dissolució comercial.

Igual que en el cas de l'acrilat de la polisulfona, s'estudia la immobilització en condicions estàtiques i dinàmiques. Com en el cas de les membranes ACPS, s'utilitza la immobilització d'endo-1,4- β -xilanasa II en condicions estàtiques a les membranes N25 que es fan servir per a experiments d'hidròlisi amb els mòduls de membrana, i també es consideren membranes de 7 cm² i s'utilitzen 50 ml de la mateixa dissolució tampó, amb la mateixa concentració d'enzim, durant 24 hores.

Immobilització estàtica

La reacció té lloc a temperatura ambient durant dues hores, en 50 ml d'un medi de tampó de di/monohidrogenfosfat de sodi 0,1M a pH 7,4, en presència de NaCl 0,15M, emprant una concentració 2mM en EDC i 5mM en NHS. S'hi addiciona dissolució d'enzim dialitzada a partir de la dissolució comercial per tal de tenir una concentració final de proteïna al medi de 0,5 mg/ml. Com en el cas de les membranes d'acrilat de polisulfona, s'introdueixen 5 membranes de 2,5 cm de diàmetre en 50 ml d'aquesta dissolució tampó, i es deixa en agitació orbital a 300 r.p.m. Passat aquest temps, les membranes en renten amb aigua destil·lada i es conserven a 4 °C fins al seu ús.

S'estudia la immobilització tant de lisozim com d'endo-1,4- β -xilanasa II.

Immobilització dinàmica

El procediment és anàleg al seguit per a les membranes d'acrilat de polisulfona. Es realitzen també experiments amb 5 membranes de polímers monolítics, en un mateix experiment de 2,5 cm de diàmetre i 100 μ m de gruix, però en aquest cas s'utilitza el medi de tampó de di/monohidrogenfosfat 0,1M a pH 7,4, NaCl 0,15M, 2mM en EDC i 5mM en NHS i una concentració final d'endo-1,4- β -xilanasa II de 0,5 mg/ml. La

concentració de proteïna a les fraccions de filtrat es determina per mesura de l'absorbància a 280 nm, en el cas del lisozim, i per assaig de Bradford i HPLC quan s'estudia la immobilització de l'endo-1,4- β -xilanasa II.

2.1.3. Tècniques de biologia molecular aplicades a la immobilització dirigida d'enzims

S'empren tècniques estàndard de biologia molecular per a introduir una mutació en la seqüència d'aminoàcids de l'endo-1,4- β -xilanasa II, concretament per a la mutació d'una serina per una cisteïna. El procediment experimental es descriu a continuació.

2.1.3.1. Materials i mètodes

Microorganismes i soques

- *Escherichia coli*, soca XL1-Blue. S'utilitza com a cèl·lula hoste per a obtenir la construcció genètica amb la mutació d'interès, donada la seva elevada eficiència per a obtenir una gran quantitat de plàsmid.
- *Pichia stipitis*, soca FPL-UC7, donada per T. W. Jeffries (*Institute for Microbial and Biochemical Technology*, Madison, WI, USA) Són cèl·lules hoste per a realitzar transformacions amb aquests llevats.¹⁰
- *Saccharomyces cerevisiae* Y294, cedida per La Grange et al.¹¹ (*University of Stellenbosch*, Sud-àfrica) i *P. stipitis* TJ26, donada per T. W. Jeffries (*Institute for Microbial and Biochemical Technology*, Madison, WI, USA). S'utilitzen com a soques d'expressió per a expressar la proteïna.

En tots els casos, les soques es mantenen a -80 °C, conservant-se com a cultiu de glicerol (addicionant un 15% de glicerol al cultiu).

Plàsmids

- pDLG6, donat per La Grange et al.¹¹ (*University of Stellenbosch*, Sud-àfrica). L'insert corresponent al gen *xyn2* de *Trichoderma Reesei*, que codifica l'expressió de l'endo-1,4- β -xilanasa II, s'havia obtingut a partir d'un fragment de 0,78 kB *XbaI/BglIII* del vector pDLG5, que s'havia clonat al vector pJC1 (*HindIII/HindIII*) per a donar lloc al vector pDLG6.
- pRDH14, donat per den Haan et al.¹² (*University of Stellenbosch*, Sud-àfrica). En aquest cas, s'havia insertat el gen *xyn2* de *T. Reesei*, a partir del fragment de 0,78 kB *XbaI/BglIII* del vector pDLG5 i posteriorment s'havia clonat al vector pRDH13 (*XbaI/BamHI*), per a donar lloc al vector pRDH14.

- Plàsmid de control pUC18 (del *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* de *Stratagene*®).

Tots els plàsmids es conserven a -80 °C.

Encebadors o primers

- M-xyn2-F seq 5' a 3' CCATTTGCCATGGTCTGCTTCACCTCCCTCC
- M-xyn2-R seq 5' a 3' GGAGGGAGGTGAAGCAGACCATGGCAAATGG

Tots dos adquirits a Qiagen® (CA,USA).

Antibiòtics

S'usa ampicil·lina com a antibiòtic. Es prepara una dissolució mare a 50 mg/ml que es filtra per a esterilitzar-la i es conserva a -20 °C. A partir d'aquesta dissolució mare, s'addicionarà als medis de cultiu per a tenir la concentració final de 100µg/ml.

Medis de cultiu

Medi YPD o YEPD (*yeast extract, peptone and dextrose*): 2,0% Peptona, 1,0% llevat, i 2,0% glucosa, a pH 6,5.

Medi NYZ⁺: 10 g NZ amina (hidrosilat de caseïna), 5 g d'extracte de llevat, 5 g de NaCl, aigua desionitzada (dd H₂O) fins a 1 l, s'ajusta el pH a 7,5 amb NaOH i s'autoclava. Just abans d'utilitzar s'hi afegeixen els següents suplement estèrils i filtrats: 12,5 ml de MgCl₂ 1M, 12,5 ml de MgSO₄ 1M i 10 ml de glucosa 2M.

Medi LB (Luria Bertrani): 10 g NaCl, 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 20 g d'agar i aigua desionitzada fins a 1 l. S'ajusta el pH a 7,5 amb NaOH, s'autoclava i es posen aproximadament 25 ml en plaques de petri i es deixa solidificar.

Medi SD (*yeast minimal media*): medi mínim per a llevats (SD *BioChemika*, per a microbiologia, (Fluka, Alemanya). Conté una base de nitrogen, sulfat amònic i una font de carboni (dextrosa).

Dissolucions

LiOAc: 0,1M en LiOAc, 10mM en Tris HCl (pH 8) i 1mM en EDTA.

Dissolució de PEG4000 al 50% en pes en aigua desionitzada i autoclavada.

Dissolució de *lyticase* 5mg/ml en medi 1,2M en sorbitol, 0,1M en NaPO₄, pH 7,4.

Dissolucions reguladores del pH (tampons) dels kits *QIAprep*® *Spin Miniprep Kit protocol* i *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* de *Stratagene*®.

2.1.3.2. Procediment

1. Expressió de l'enzim endo-1,4-β-xilanasa II en *S. cerevisiae*

En primer lloc es procedeix a l'expressió de l'enzim endo-1,4-β-xilanasa II de *T. reesei* en *S. cerevisiae*, clonat al plàsmid pDLG6. Per això s'incuben les soques Y294 de *S.*

cerevisiae en 2 ml de medi YPD i en presència d'ampicil·lina en una concentració final de 100 µg/ml a 30 °C tota la nit, segons el procediment descrit per La Grange.¹¹ A continuació es transfereix a 200 ml del mateix medi i s'hi afegeix glucosa fins al 0,8% en pes, i s'addiciona ampicil·lina per a mantenir-ne la concentració i s'incuba a 30 °C durant 3 dies per a afavorir el creixement dels microorganismes.

2. Purificació de l'endo-1,4-β-xilanasa II de *S. cerevisiae*

Un cop expressada, la proteïna es purifica d'acord amb el procediment de referència,¹¹ es resuspèn en 0,1 ml de dissolució tampó d'HEPES (àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfònic) i es guarda a 4 °C tot evitant-ne l'exposició a la llum. Un cop aïllada, es realitza un assaig de l'activitat enzimàtica d'aquesta seguint el *Sigma Quality Control Test Procedure: Enzymatic Assay of Xylanase*, el qual s'explica amb detall a l'apartat 2.4.1 d'aquest capítol. També es duu a terme una electroforesi en gels de poliacrilamida amb dodecilsulfat de sodi (*Sodium dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) per a comprovar les dimensions, la concentració i la puresa de la proteïna purificada. Aquesta tècnica permet la separació de proteïnes, basant-se en la migració diferencial d'aquestes sota l'aplicació d'un camp elèctric, a través d'un gel porós constituït per acrilamida/bisacrilamida. Les molècules de proteïna se separaran en funció de la seva càrrega i massa molecular. D'aquesta manera es comprova que és possible expressar l'enzim i que, un cop aïllat, presentarà activitat catalítica.

3. Extracció plasmídica en *P. stipitis*

Es fa créixer el plàsmid pRDH14 en *P. stipitis* en medi YPD i en presència d'ampicil·lina a 30 °C, durant 2 dies, i s'aïlla el plàsmid del llevat seguint el mètode descrit per Singh,¹³ conjuntament amb el *QIAprep® Spin Miniprep Kit protocol* de Qiagen. El cultiu se centrifuga a 4 °C durant 5 minuts a 2.000 g. Es descarta el líquid sobrenedant i l'agregat de cèl·lules es resuspèn en 1 ml de tampó P1 a 4 °C. S'hi afegeix 1 ml de dissolució de *lyticase* i s'incuba a 37 °C durant 45 minuts per a digerir les parets cel·lulars. A continuació, s'hi addiciona 2 ml de dissolució tampó P2 per a trencar les cèl·lules, a 25°C durant 5 minuts. L'ADN s'allibera i la dissolució esdevé viscosa. Tot seguit s'hi afegeixen 2,8 ml de tampó N3, i es barreja suaument i s'incuba en gel durant 30 minuts, continuant amb una centrifugació durant 10 minuts a 4°C a 10.000 g. El sobrenedant s'aplica a diferents columnes *Qiagen plasmid miniprep columns*. Aquestes es renten amb 0,50 ml de tampó PB, es centrifuguen durant 30 segons i se'n descarta el líquid sobrenedant. Tot seguit, es renten amb 0,75 ml de tampó PE i es tornen a centrifugar durant 60 segons. Se'n torna a descartar el líquid sobrenedant i llavors

s'elueix l'ADN amb 50 µl de tampó EB, incubant-ho a 22 °C durant 5 minuts i centrifugant-ho durant 1 minut. Per a incrementar la recuperació d'ADN, es repeteix aquest darrer pas. Un cop aïllat el plàsmid es procedeix a analitzar-lo per electroforesi d'agarosa en gel, per a comprovar que realment s'ha aïllat el plàsmid d'interès. Aquest es conserva a -20 °C.

4. Obtenció del mutant

Es fan dues reaccions, amb diferents quantitats d'ADN motlle (del plàsmid aïllat a l'etapa anterior). S'utilitza el protocol del *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* de *Stratagene*®. Aquest kit s'utilitza per a introduir mutacions puntuals, substituir aminoàcids i eliminar o insertar aminoàcids. En aquest cas s'introdueix la mutació Ser190Cys, per a insertar la cisteïna a l'extrem 3'-terminal del gen *xyn2*. Les etapes del procés de mutagènesi que es consideren dins d'aquest protocol es mostren a la fig. 2.9.

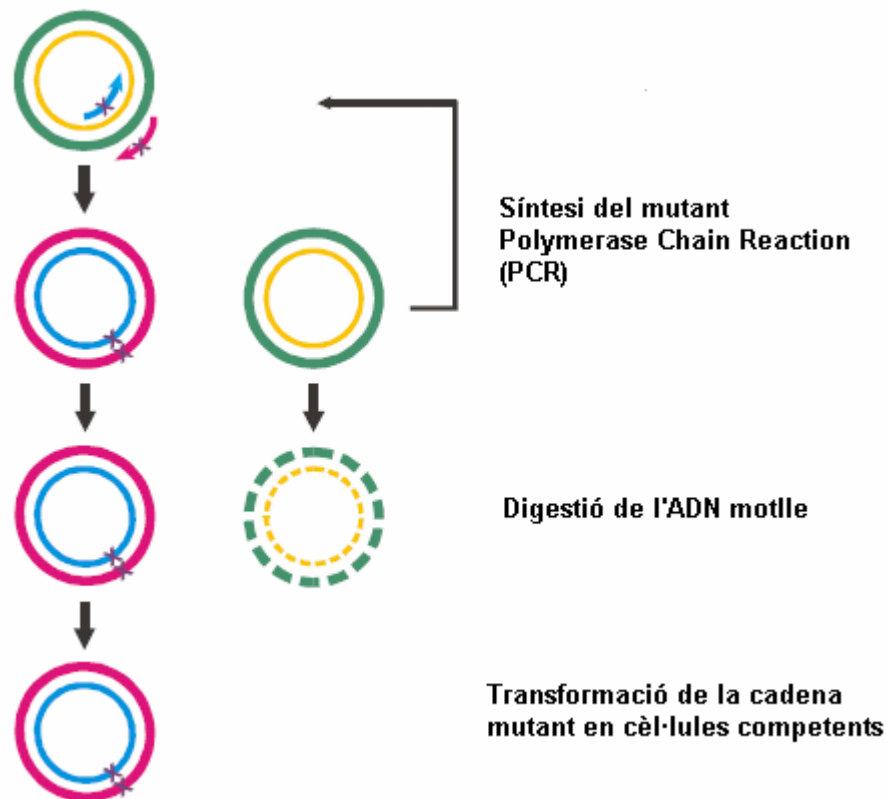


Fig. 2.9. Esquema de les etapes del protocol *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* de *Stratagene*® per a la mutagènesi dirigida.

Per a dur a terme la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), es requereix:

- L'ADN plantilla o motlle (també anomenat *target*) que es vol amplificar.
- Dos encebadors o *primers*, que són cadenes curtes d'ADN que s'adhereixen al motlle. Aquestes identifiquen la posició on la polimerasa comença la multiplicació de l'ADN i a partir de la qual s'inicia la replicació. És en la

seqüència de bases d'aquests encebadors on s'incorpora la mutació a la posició desitjada, per tal que la nova cadena d'ADN que se sintetitza incorpori el canvi. Els encebadors han de tenir unes 10-15 bases de la seqüència correcta, abans i després de la mutació; òptimament han de contenir un contingut mínim de G i C del 40% i han d'acabar en una o més bases de C o G. Cal un encebador directe i un de revers per a incorporar el canvi a les dues cadenes.

- *Taq polymerase*, que és l'enzim que realitza la reacció de replicació de l'ADN
- Nucleòtids tipus desoxinucleòtid trifosfat, (dNTP) per a construir la nova cadena de l'ADN.

Es fan dues reaccions, amb 1 µl i 0,5 µl d'ADN mutat, respectivament. A cada tub de PCR s'hi afegeixen 5 µl de dissolució tampó *10x reaction buffer*, 0,3 µl de l'encebador directe i 0,3 µl de l'encebador revers, 1 µl de mescla de dNTPs, 1 µl de *PfuUltra DNA polymerase* (2,5 U/µl) i 41,4 µl i 41,9 µl de ddH₂O, respectivament per a cada tub, fins a un volum final de 50 µl. També es fa una reacció de control amb 5 µl de *10x reaction buffer*, 2 µl de pWhitescript 4,5 Kb *control plasmid* (5 ng/ml), 1,25 µl l'encebador directe, 1,25 µl de l'encebador revers, 1 µl de mescla de dNTPs, 1 µl de *PfuUltra DNA polymerase* (2,5 U/µl) i 38,5 µl ddH₂O. La reacció consisteix en 16 cicles que comprenen les tres etapes següents, indicades a la figura 2.10:

- a) Desnaturalització: a 95 °C, durant 30 segons. La doble cadena d'ADN es fon i se separa, de manera que origina cadenes simples. En aquest punt, totes les reaccions enzimàtiques s'aturen.
- b) Hibridació o *annealing*: a 55°C, durant 1 minut. La temperatura depèn de l'encebador. S'estableixen interaccions iòniques entre la cadena simple de l'ADN plantilla i els motlles. En aquesta etapa, l'encebador s'hibrida amb la zona complementària de la cadena d'ADN.
- c) Extensió: a 68 °C, durant 8 minuts. Els encebadors estan fortament enllaçats a l'ADN motlle a partir de l'extrem 3' lliure, la polimerasa comença el procés d'extensió, tot afegint els nucleòtids complementaris als presents a la cadena motlle.

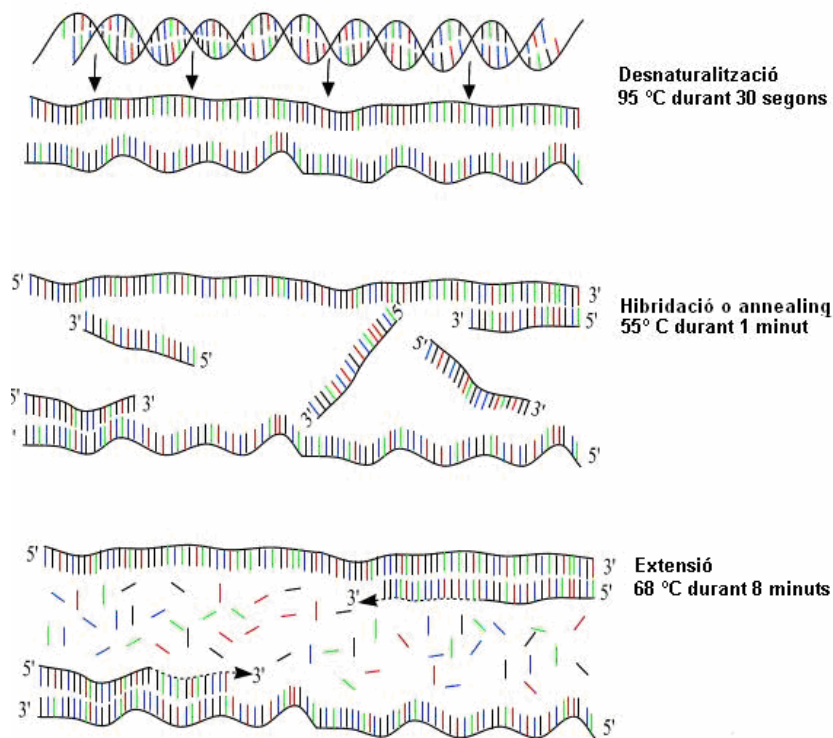


Fig. 2.10. Esquema de la reacció de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

5. Digestió

Un cop acabada la reacció de la PCR, s'ha de realitzar una digestió per a eliminar l'ADN motlle amb Dpn-I. El Dpn-I és un enzim restrictiu que elimina les seqüències metilades, i com que l'ADN sintetitzat *in vitro* no conté metilacions, d'aquesta manera només s'elimina l'ADN plantilla. S'afegeix 1 µl de l'enzim restrictiu Dpn-I directament a cada vial resultant de la reacció d'amplificació anterior. Se centrifuga i s'incuba a 37 °C durant una hora, per tal de digerir l'ADN plantilla (no mutat). Es realitza una electroforesi en gel d'agarosa per a comprovar la mida dels plàsmids aïllats i de diferents fragments d'aquests, obtinguts en digestions amb diferents enzims.

6. Transformació en cèl·lules supercompetents

En tubs de polipropilè Falcon® 2059, prèviament refredats amb gel, s'hi introdueix una alíquota de 50 µl de cèl·lules supercompetents (XL1-Blue) i 1 µl de l'ADN resultant de la digestió anterior. Addicionalment, per a verificar l'eficiència de la transformació, es realitza el mateix procediment considerant una mostra de control, utilitzant 1 µl del plàsmid de control pUC18 (0,1 ng/µl). Els tubs s'incuben en gel durant 30 minuts i seguidament se sotmeten a un xoc tèrmic a 42 °C durant 2 minuts. A continuació, s'afegeix a cada tub 0,5 ml de medi NYZ⁺, prèviament escalfat a 42 °C, i s'incuben a

37 °C durant una hora, agitant a 250 r. p. m. El darrer pas consisteix a sembrar 250 µl de cada tub de mostra en una placa d'agar i s'incuben a 37 °C un mínim de 16 hores, per tal que es produeixi el creixement de les colònies bacterianes. Per al plàsmid de control, se sembra un volum de 5 µl. A la figura 2.11 es mostra un esquema d'aquest procés.

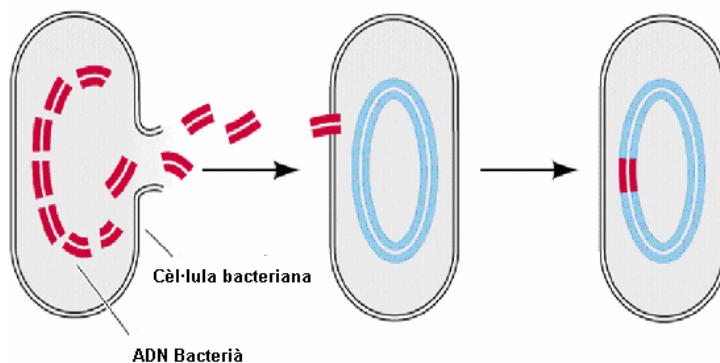


Fig. 2.11. Transformació bacteriana. L'ADN de cèl·lules mortes es fragmenta i surt, de manera que pot ser incorporat per cèl·lules competents i incorporar-se a les cèl·lules hoste.

7. Transformació en llevat¹⁴

Els plàsmids s'aïllen de les cèl·lules supercompetents d'acord amb el *QIAprep® Spin Miniprep Kit protocol*, de Qiagen, tal com s'ha explicat al punt 2, amb excepció del pas d'addicionar *lyticase*. El plàsmid mutat es conserva a -20 °C fins al seu ús en forma de cultiu de glicerol.

El següent pas consisteix a realitzar la transformació en cèl·lules competents de llevat FPL-UC7. Les cèl·lules s'incuben en 100 ml de medi YEPD a 30 °C fins que s'assoleix una densitat òptica de l'ordre de 0,700 (la densitat òptica mesurada a 550 nm permet estimar el grau de creixement d'un cultiu). Es reparteix el contingut en 4 tubs de plàstic estèrils i se centrifuga a 4.000 r. p. m. durant 2 minuts, a temperatura ambient. L'agregat de cèl·lules es renta amb dissolució de LiOAc i es transfereix a un tub. A continuació es resuspenen en 1 ml de dissolució de LiOAc, tot agitant suaument. En diferents tubs s'afegeixen 10 µl d'ADN recombinant a 100 µl de suspensió de cèl·lules de llevat. Es deixa durant 5 minuts a temperatura ambient i a continuació s'hi afegeixen 280 µl de dissolució de PEG4000; s'incuba sense agitar a 30 °C durant 45 minuts. Tot seguit s'hi afegeixen 43 µl de dissolució de dimetil sulfòxid (DMSO) i els tubs se sotmeten a un xoc tèrmic de 42 °C durant 5 minuts. Les cèl·lules es recuperen per centrifugació a 12.000 g durant 5 segons, es renten amb ddH₂O i es dissolen en 1 ml de ddH₂O. D'aquestes cèl·lules, se sembren alíquotes de 100 µl en plats amb un medi SD amb histidina, uracil i triptòfan i es deixen créixer a 30 °C durant 3 dies.

8. Seqüenciació de l'ADN recombinant

La seqüenciació consisteix en l'obtenció de la seqüència de bases nitrogenades d'un fragment d'ADN. Es duu a terme al *DNA Sequence Analysis Facility* del *Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, University of Kentucky* (KY,USA). Es fa servir un mètode automàtic,¹⁵ basat en l'anomenat *mètode de terminació en cadena o mètode de Sanger*.¹⁶ En primer lloc cal disposar de l'ADN motlle o un segment de l'ADN, del qual es vol determinar la seqüència de bases, en estat d'hèlix senzilla. Es preparen 4 mescles de reacció, cadascuna de les quals per separat conté els 4 nucleòtids trifosfat (dATP, dCTP, dTTP i dGTP), cadascuna amb el nucleòtid trifosfat marcat amb un fluorocrom diferent. També es requereix la presència de l'ADN polimerasa I del bacteriòfag T4, o un enzim que repliqui l'ADN, un encebador que és un oligonucleòtid curt de 20 bases de longitud aproximada i és necessari perquè l'ADN polimerasa I comenci a afegir nucleòtids per l'extrem 3' i un nucleòtid didesoxi, per exemple, ddATP, a baixa concentració. Els nucleòtids didesoxi són nucleòtids modificats que han perdut el grup hidroxil de la posició 3' de la desoxiribosa. Per tant, poden incorporar-se a la cadena d'ADN nova, però no és possible que se'ls uneixi cap altre nucleòtid per l'extrem 3', de manera que un cop incorporats s'acaba la síntesi de la cadena d'ADN. El nucleòtid didesoxi emprat competirà amb el seu homòleg (dATP) per a incorporar-se a la cadena d'ADN que s'està sintetitzant i produirà la terminació de la síntesi en el moment i lloc on s'incorpora, de manera que a cada mescla de reacció es produeixen una sèrie de molècules d'ADN de nova síntesi, de diferent longitud, que acaben en el mateix nucleòtid i totes marcades amb l'indicador fluorescent. Els fragments d'ADN de nova síntesi obtinguts a cada mescla de reacció se separen per mida mitjançant electroforesi, en gels verticals d'acrilamida fins (0,5 mm de gruix) i de gran longitud (aproximadament 50 cm) que permeten distingir fragments d'ADN que es diferencien en un sol nucleòtid. Tenint en compte que l'ADN de nova síntesi creix en la direcció 5' → 3', si comencem a llegir el gel pels fragments de mida menor (extrem 5') i avancem augmentant la dimensió dels fragments (cap a l'extrem 3'), obtindrem la seqüència d'ADN de nova síntesi en la direcció 5' → 3'. El procés està automatitzat ja que és possible llegir al mateix temps els ADN de nova síntesi, producte de les 4 mescles de reacció, perquè estan marcats de manera diferent. Al sistema de detecció dels fragments d'ADN, la detecció del tipus de fluorescència corresponent a cada reacció es duu a terme al mateix temps que l'electroforesi, de manera que els fragments d'ADN de

menor mida que ja han estat detectats es deixen escapar del gel, això permet augmentar el nombre de nucleòtids que es poden determinar a cada electroforesi i, per tant, a cada seqüenciació. Quan apareix la lletra N, significa que no ha estat possible determinar el nucleòtid existent en aquesta posició de la seqüència.

2.2. Caracterització de membranes

A continuació es presenten els diferents experiments i tècniques de caracterització utilitzades per a l'estudi de les membranes enzimàtiques.

2.2.1. Activitat enzimàtica i paràmetres cinètics

Es duen a terme tot un seguit d'estudis relatius a l'activitat enzimàtica de les membranes ACPS i N25. S'estudia l'efecte del pH i de la temperatura en la hidròlisi enzimàtica, tant per a l'enzim en dissolució com immobilitzat, en els dos casos anteriors.

Un altre aspecte que s'avalua és l'efecte del temps d'immobilització en l'activitat enzimàtica de les membranes. Es posen en contacte les membranes amb el corresponent medi d'immobilització (veure apartats 2.1.2.3 i 2.1.2.7, respectivament), en presència d'enzim, i es determina l'activitat enzimàtica després de 2, 3, 4, 6, 24, 48 i 72 hores d'immobilització. L'estabilitat temporal de les membranes enzimàtiques s'estudia a partir de l'assaig d'activitat enzimàtica de membranes després de 3, 12, 14 i 38 dies d'immobilització.

En tots aquests casos se segueix el mateix procediment, considerant 1 cm² de membrana. Tots els experiments fan referència al comportament de l'enzim, tant en forma lliure com immobilitzada, respecte de mostres preparades a partir d'un substrat comercial anomenat *Birchwood xylan* (Sigma, Alemanya) dissolt en un medi de dissolució tampó d'àcid acètic/acetat sòdic 0,05M a pH 5, en una concentració al 0,1% en pes. Aquest substrat s'obté a partir de l'escorça de l'arbre del bedoll. La preparació de les mostres i el mètode es descriuen detalladament a l'apartat 2.4.1 d'aquest capítol.

Tanmateix, es determinen els paràmetres de cinètica enzimàtica per a l'endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada, amb l'objectiu d'avaluar els canvis produïts pel procés d'immobilització. Tenint en compte que l'endo-1,4- β -xilanasas II segueix el model cinètic de Michaelis-Menten,¹⁷ es realitzen mesures de velocitat a diferents concentracions de substrat. Amb aquestes dades i aplicant la linealització de Lineweaver-Burk^{18, 19} es determinen la constant de Michaelis-Menten (K_m) i la velocitat màxima (V_{max}) per a l'enzim immobilitzat, tant en acrilat de polisulfona (ACPS) com en membranes de polímers monolítics (N25). Per a determinar gràficament els valors de

K_m i V_{max} s'utilitza la representació doble recíproca, també anomenada representació de Lineweaver-Burk ($1/V_0$ respecte de $1/[S]_0$, on V_0 és la velocitat inicial i $[S]_0$ la concentració inicial de substrat), que és una línia recta en la qual el pendent és K_m/V_{max} , l'abscissa a l'origen ($1/V_0 = 0$) és $-1/K_m$ i l'ordenada a l'origen ($1/[S]_0 = 0$) és $1/V_{max}$. D'aquesta manera, a partir de les dades experimentals es poden calcular els valors de K_m i V_{max} de l'enzim per a un substrat determinat. La V_0 es determina a partir del pendent de la gràfica de concentració de producte respecte del temps, considerant els punts inicials, que són els que presenten un comportament lineal, tal com s'indica a la figura 2.12.

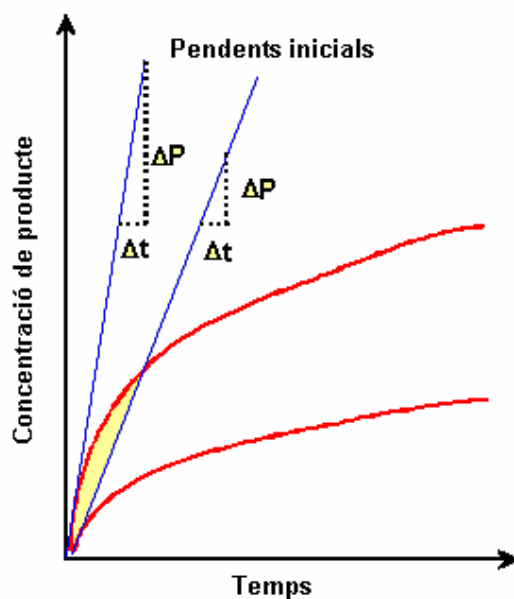


Fig. 2.12. Representació de la determinació de V_0 .

Els experiments es duen a terme a 25 °C i emprant també en aquests estudis, com a substrat, la dissolució de *Birchwood xylan* al 0,1% en pes en medi àcid acètic/acetat sòdic 0,05M a pH 5. S'analitza la concentració de sucres alliberats a conseqüència de la hidròlisi enzimàtica del substrats i se'n determina la concentració amb el mètode de Nelson, emprant estàndards de xilosa.

2.2.2. Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)

S'enregistren imatges SEM tant de la superfície com de talls transversals de les membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) i de polímers monolítics (N25). En el primer cas les fotografies s'adquireixen a 5 kV amb un microscopi JEOL JSM-5600 LV Scanning Electron Microscopy, del *Membrane Technology Group*, de la *Universiteit Twente* (Països Baixos) o bé amb el microscopi HITACHI-S570 del Servei de

Microscòpia Electrònica de la Univeristat Autònoma de Barcelona. Les imatges de seccions transversals s'obtenen amb un microscopi HITACHI S-570 del Servei de Microscòpia Electrònica de la UAB. Les mostres es dipositen sobre un portaobjectes especial i, prèviament a l'anàlisi SEM, es metal·litzen en una cambra de buit amb una capa d'or d'aproximadament 30 nm, a 24 ° C, emprant una intensitat de corrent de 15 mA durant 200 segons. Per a obtenir els talls transversals es requereix submergir les membranes primer en etanol i després en nitrogen, de manera que per simple doblament s'obté un tall regular.

En el cas de les membranes d'acrilat de polisulfona, s'analitzen les imatges SEM de talls transversals amb el programa IFME,²⁰ el qual permet obtenir informació sobre les dimensions i la distribució de porus amb una determinada profunditat que es detecta a partir de l'anàlisi de la variació de colors de la imatge.

2.2.3. Microscòpia de Força Atòmica (AFM)

Les imatges d'AFM s'han adquirit amb l'equip Nano Scope III de l'*Industrial Research Membrane Institute* (IMRI) de la *Univerity of Ottawa* (Canadà) i amb l'equip AFM Molecular Imaging Pico Spm del Grup de Sensors i Biosensors de la Universitat Autònoma de Barcelona. Les mostres de membranes estudiades comprenen una superfície d'1cm² i es realitza el rastreig d'un fragment d'1 µm² en el cas de les membranes ACPS i 49 µm² en l'estudi de les membranes N25. Es dipositen sobre un portamostres i es fixen amb una cinta adhesiva de doble cara. El portamostres es col·loca sobre el cristall piezoelèctric. Les fotografies s'enregistren en mode intermitent (*tapping*), amb una freqüència de 70 kHz, utilitzant *cantilevers* de nitrit de silicona i puntes de silici. A partir del tractament de la imatge obtinguda amb programa informàtic del mateix equip, es pot calcular la rugositat de la mostra. Es pot obtenir informació quantitativa sobre l'alçada relativa de cada punt analitzat de la superfície de la mostra i realitzant un tractament estadístic s'obté la mitjana d'aquest valor, que es representa per Z_m . A partir d'aquesta dada es pot calcular el paràmetre de rugositat (R_a), que es defineix segons l'equació (2.2),²¹ on n és el nombre de punts de la imatge i Z_i l'alçada de cada punt considerat.

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n |Z_i - Z_m| \quad (2.2)$$

2.2.4. Fluxos d'aigua pura

Es determinen els fluxos d'aigua Milli-Q a través de les membranes ACPS i del N25. El mòdul emprat es mostra a la fig 2.13 i és el mateix que l'utilitzat per als experiments d'immobilització d'enzim en condicions dinàmiques, és a dir, una cel·la del tipus Amicon® construïda als laboratoris de la *Universiteit Twente*. Els experiments es realitzen emprant un sistema de 5 membranes de 2,5 cm de diàmetre a cada experiment. S'aplica una pressió coneguda, es registra el pes d'aigua filtrada en intervals d'un minut fins a pes constant per a cada pressió i es relaciona el pes d'aigua obtingut amb el volum d'aigua filtrada. Es procedeix de la mateixa manera amb altres valors de pressió i s'estableix una relació lineal entre la pressió aplicada i el flux d'aigua pura a través de la membrana, que permetrà determinar les condicions de treball en experiments posteriors.

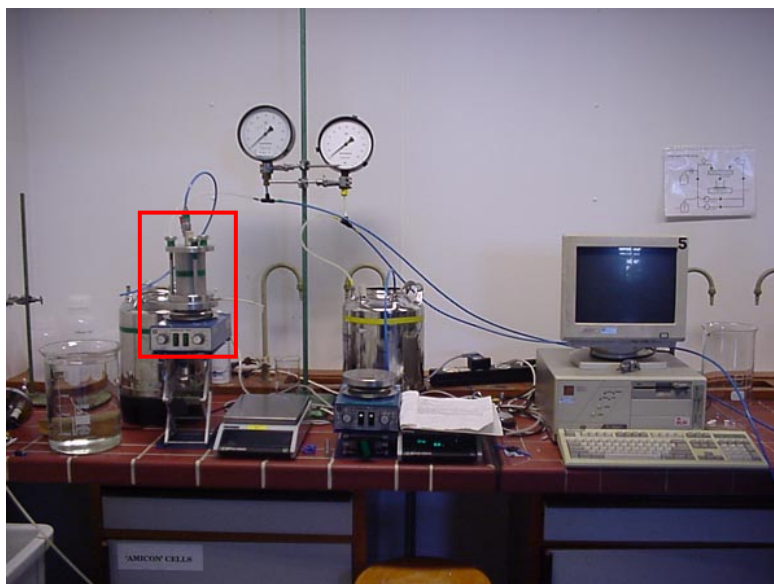


Fig. 2.13. Sistema experimental per a mesurar els fluxos d'aigua pura, on es destaca el mòdul emprat.

2.2.5. Adsorció/desorció de gasos

Les mesures d'adsorció/desorció de gasos per a les membranes ACPS i N25 es duen a terme amb l'aparell ASAP 2000 (Micrometrics, GA, USA) de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB), del CSIC. Les mostres se sotmeten a un procés de desgasament a una temperatura de 50 °C, amb un grau de buit màxim de 2 µm de Hg i durant un període de 24 hores. S'enregistren les isoterms d'adsorció i desorció, tant per a les membranes d'acrilat de polisulfona com per a les membranes de polímers monolítics, emprant nitrogen com a adsorbent. Es determina l'àrea específica BET i les distribucions de mida de porus pel mètode de Barrett-Joyner-Halenda (BJH)^{22, 23} tant en adsorció com en desorció.

A partir de l'equació de Kelvin (2.3) és possible calcular la distribució de porus.

$$\ln p_r = (-\gamma v/RT) \cos \theta * (1/r_{k1} + 1/r_{k2}) \quad (2.3)$$

On p_r és la pressió relativa (-); γ la tensió superficial (N/m); v el volum molar del líquid (m^3/mol); θ l'angle de contacte ($^\circ$) i r_{ki} el radi de Kelvin que descriu la corbatura de la interfase.

L'equació de Kelvin es pot simplificar si es consideren els porus com a capil·lars oberts:

$$\ln p_r = (\gamma v/RT) \cos \theta * (a/r_{k1}) \quad (2.4)$$

Si es considera que el líquid humiteja perfectament la superfície, en aquest cas de la membrana, es considera $\cos \theta = 1$. L'equació queda llavors:

$$\ln p_r = (-\gamma v/RT) * (a/r_{k1}) \quad (2.5)$$

On $a = 1$ a l'adsorció, $r_{k1} = r_k$ i $r_{k2} = \infty$, mentre que per a la desorció $a = 2$ i $r_{k1} = r_k = r_{k2}$.

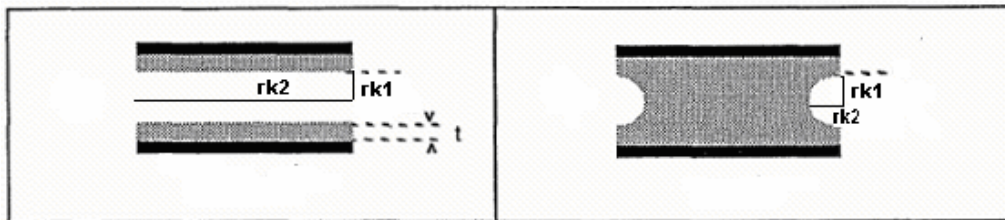


Fig. 2.14. Representació del procés d'adsorció i desorció.

El radi de Kelvin (r_k) és el radi del porus (r_p) menys el gruix de la capa absorbida (t),

$$r_k = r_p - t \quad (2.6)$$

r_p : radi del porus (m)

t : gruix de la capa adsorbida (m)

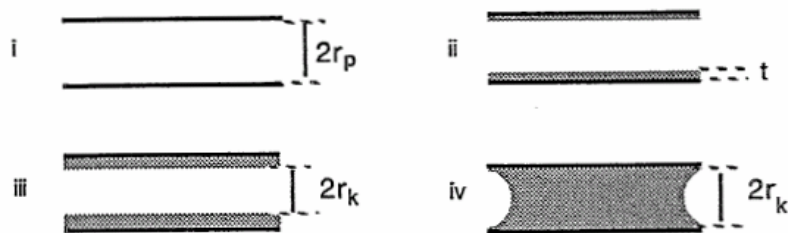


Fig. 2.15. Etapes del procés d'adsorció incrementant la pressió de vapor relativa en l'ordre i<ii<iii<iv i on r_p : radi de porus, r_k : radi de Kelvin i t : gruix de la capa adsorbida.

Cal tenir present que l'equació de Kelvin només es pot aplicar a mides de diàmetres de porus compresos entre 2 i 50 nm,²⁴ ja que per sobre del límit superior es presenta la dificultat experimental de mesurar radis i gruixos a pressions relatives properes a 1 (pressió relativa $p_r = p/p_o$).

Una vegada els valors de pressió relativa es converteixen en els corresponents valors de radi de porus (r_p) es pot calcular la distribució diferencial de volum específic de porus

amb un radi r_p , $dV_p/d r_p$, segons el mètode de Dollimore i Heal,²⁵ assumint que es tracta de porus cilíndrics, tant per adsorció com per desorció. Si es coneix la longitud dels porus, que s'assumeix igual al gruix de la membrana, es pot calcular la distribució diferencial del nombre de porus per a cada radi de porus, on Δx és el gruix de la membrana:

$$N(r_p) = V_p / (\pi r_p^2 * \Delta x) \quad (2.7)$$

2.2.6. Permporosimetria

Totes les mesures es realitzen amb un sistema dissenyat i construït a la *Univeristeit Twente* i la determinació del flux de gas es duu a terme per cromatografia de gasos amb un equip GC Varian 3400. L'esquema del sistema experimental es presenta a la figura 2.16. Prèviament a fer les mesures cal eliminar completament l'aigua de les membranes, per la qual cosa se submergeixen durant dues hores en etanol absolut. S'analitzen tant les membranes ACPS com les N25. S'ha treballat en absència de diferència de pressió a tots dos costats de la membrana. Es fan circular dos corrents de dos gasos no condensables, que, a les condicions operatives de treball, són inerts i no adsorbents (N_2 ; O_2 /aire), cada un a cada costat de la membrana. D'aquesta manera la força directora és el gradient de concentració d'aquests dos gasos entre els costats de la membrana. Juntament amb cada corrent de gas hi ha present un gas condensable (vapor d'etanol). El gas condensable, altrament anomenat adsorbat, pot ser qualsevol gas, amb el requisit que ha de ser inert a la composició de les membranes.

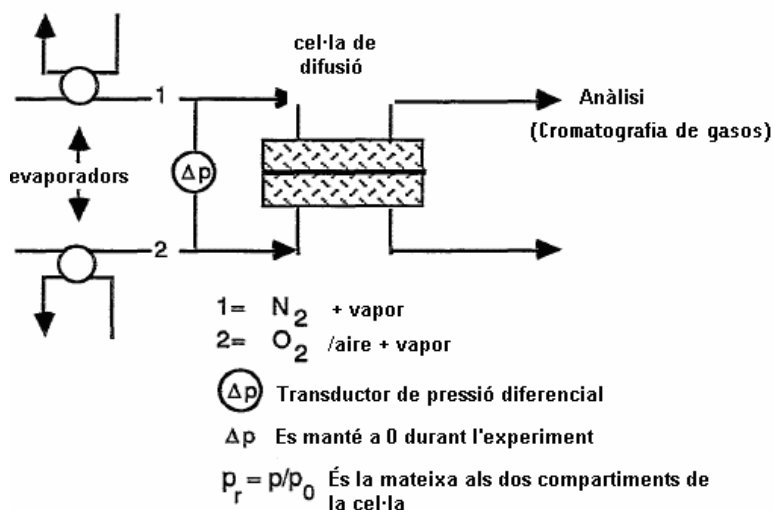


Fig. 2.16. Representació del sistema experimental.

Les mesures comencen amb una pressió de vapor relativa igual a 1, condicions en les quals el transport difusiu és mínim i tots els porus de la membrana estan plens del líquid

corresponent al gas condensable (etanol). La membrana s'equilibra a pressions de vapor relatives menors i en cada cas es mesura el transport difusiu de l'oxigen a través de la membrana (no condensable) per cromatografia de gasos. A partir de la concentració d'oxigen es pot calcular el flux d'aquest amb la següent equació, de manera que el relaciona amb el radi dels porus:

$$J_{k,i} = \frac{\pi N_T r_p^2 D_{k,i} \Delta p_i}{RT \Psi \Delta x} \quad (2.8)$$

On $J_{k,i}$ és el flux, $D_{k,i}$ el coeficient de difusió de Knudsen, r_p el radi de porus, Δx el gruix de la membrana, N_T el nombre de porus per unitat de superfície, Δp_i el gradient de pressió parcial i Ψ la tortuositat. $D_{k,i}$ depèn del pes molecular del gas que difon $M_{w,i}$ segons l'equació:

$$D_{k,i} = 0,66 * \left(\frac{8RT}{\pi M_{w,i}} \right)^{1/2} \quad (2.9)$$

Quan s'assoleix la pressió relativa de 0, el procés es reverteix i es mesura l'adsorció. El temps d'equilibrament de la membrana a cada pressió de vapor relativa pot variar entre 15 i 30 minuts, segons la quantitat de condensat que ha d'ésser absorbit i eliminat.

2.2.7. Angle de contacte

El mètode emprat per realitzar mesures estàtiques d'angle de contacte és el mètode de la gota sèssil. Es diposita una gota d'aigua Milli-Q de volum 1 μ l sobre la superfície plana de les membranes amb ajuda d'una xeringa. Es mesura l'angle entre la gota i la superfície en el moment que aquesta es diposita i també en un interval de temps de 5 segons. En tots els casos les mesures es realitzen per triplicat. L'equip utilitzat és el Contact Angle System OCA15+ de Dataphysics, de la *Univeriteit Twente*.

S'estudien les membranes ACPS i N25. En tots dos casos es determinen els angles de contacte de les membranes sense enzim (membranes blanc), les membranes enzimàtiques (tant en el cas d'immobilització estàtica com dinàmica) i les corresponents membranes enzimàtiques, un cop utilitzades en experiments d'hidròlisi.

2.3. Hidròlisi de materials lignocel·lulòsics

2.3.1. Experiments d'hidròlisi d'oligosacàrids amb enzim en dissolució

Es realitzen experiments d'hidròlisi d'oligosacàrids de diferents substrats. El primer es tracta d'una dissolució de *Birchwood xylan* al 0,1% en pes, en suspensió en una

dissolució tampó d'àcid acètic/acetat sòdic 0,05M a pH 5. Les mostres d'hidròlisi d'aquest substrat rebran el nom de mostres tipus UAB. D'altra banda, s'hidrolitza una mostra d'una solució procedent d'un reactor on es realitza la hidròlisi química de biomassa vegetal als laboratoris del Grup de Biopolímers Vegetals de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química (ETSEQ) de la Universitat Rovira i Virgili (URV). Aquesta s'havia obtingut a partir de 0,5 kg de closca de *moreno* seca que s'havia tractat amb 4 litres d'aigua a 179 °C, durant 22,4 minuts. En acabar la reacció, es filtra i es renta el sòlid amb aigua calenta i les aigües de rentat es reuneixen amb el líquid del reactor. Es prenen 100 ml d'aquesta dissolució que presenta un pH inicial de 3,88; es realitza una dilució 1:80 i s'ajusta el pH de la dissolució diluïda a 5 amb NaOH 0,1M. Aquestes mostres s'anomenaran d'ara endavant mostres tipus URV.

A ambdues dissolucions se'ls afegeix la mateixa quantitat de solució d'endo-1,4- β -xilanas II. Es fan experiments d'hidròlisi enzimàtica amb una concentració d'enzim de 0,5 mg/ml. El muntatge experimental consisteix en dos reactors amb 2 vasos termostatitzats connectats en sèrie, tal com es mostra a la figura següent 2.17.



Fig. 2.17. Muntatge experimental per a la hidròlisi d'oligosacàrids amb enzim en dissolució.

La reacció, té lloc a 50 °C durant 24 h, i es prenen tant mostres a temps inicial i a 1, a 6 i a 24 hores, que s'analitzen per electroforesi capil·lar, per cromatografia de permeació en gel i per MALDI-TOF-MS.

2.3.2. Experiments d'hidròlisi utilitzant mòduls de membrana

S'utilitzen diferents mòduls de membrana per a dur a terme la hidròlisi de substrats lignocel·lulòsics. A continuació, es descriuen cada un dels mòduls i els detalls del sistema experimental.

2.3.2.1. Cel·la UAB

El nom d'aquest mòdul s'ha assignat tenint en compte que fou dissenyat als nostres laboratoris. Tal com s'observa a la figura 2.18, consta de dos compartiments de 200 ml de volum a cada un dels quals es dipositen les dissolucions de càrrega i receptora, altrament anomenades *feed* i *stripping*, respectivament. Aquests compartiments estan connectats entre si per una finestra circular de 3,8 cm de diàmetre, on es diposita la membrana que es vol estudiar,²⁶ amb la cara activa en contacte amb el compartiment del *feed* i la no activa amb la dissolució d'*stripping*. Ambdós compartiments s'agiten contínuament durant tot l'experiment amb uns motors connectats a una font d'alimentació i mantenint constant una velocitat d'agitació de 1.200 r.p.m.²⁷

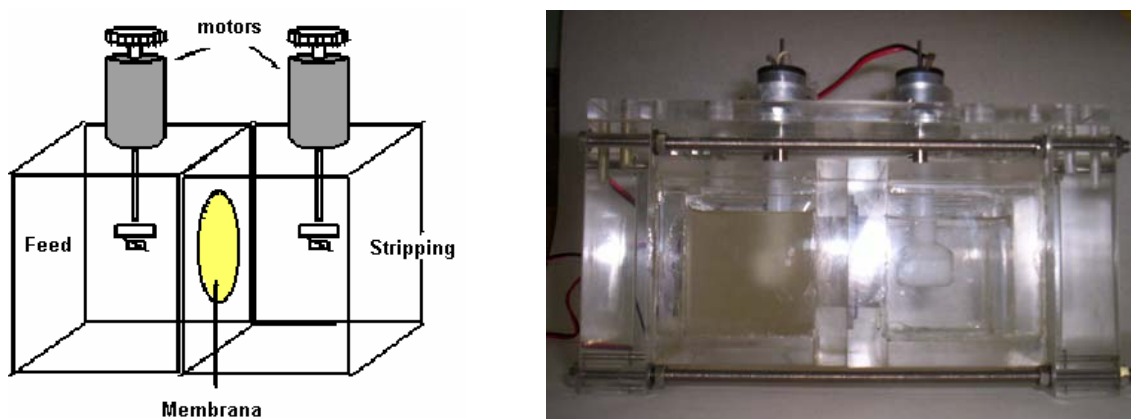


Fig. 2.18. Esquema i fotografia de la cel·la UAB.

2.3.2.2. Mòdul de filtració frontal

Aquest mòdul consta d'un compartiment cilíndric d'una capacitat de 80 ml, que es recolza sobre un suport en el qual es col·loca la membrana de 3 cm de diàmetre, amb la cara activa en contacte amb la dissolució. El sistema es tanca i es manté sota pressió gràcies a un flux de N₂. Els experiments es realitzen a una temperatura constant de 23 ± 1 °C, i aplicant una pressió d'1 bar per a afavorir el pas de la dissolució a través de la membrana.

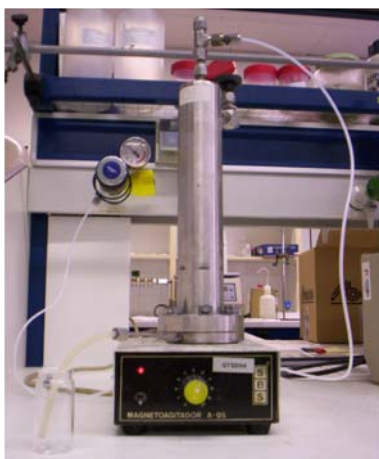


Fig. 2.19. Mòdul de filtració frontal.

2.3.2.3. Consideracions generals

En tots dos mòduls s'estudien tant les membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) com les de polímers monolítics (N25). Sempre es realitzen prèviament experiments de tipus blanc (amb membranes que no contenen enzim) i en tots els casos es realitzen tres replicats. Per a dur a terme la immobilització de l'endo-1,4- β -xilanas II, s'ha treballat en condicions estàtiques i emprant 50 ml de la corresponent dissolució per a cada tipus de membrana, amb la mateixa concentració d'enzim i reactius i amb el valor de pH adequat en cada cas, com s'indica als apartats 2.1.2.3 i 2.1.2.7 per a les membranes d'acrilat de polisulfona i de polímers monolítics, respectivament.

A l'estudi de la hidròlisi de les mostres de substrat comercial (mostres UAB) es fan experiments amb la cel·la UAB a 23 °C i a 50 °C, mentre que amb el mòdul de filtració frontal només es realitzen a 23 °C (temperatura ambient). En tots dos casos s'estudien les possibilitats de reutilització de les membranes enzimàtiques en successius cicles. Per al cas concret de la cel·la UAB es realitzen experiments a diferents concentracions de substrat.

Respecte de la hidròlisi de les mostres URV, només es fan experiments amb el mòdul de filtració frontal i també s'estudia la possibilitat de reutilitzar les membranes després del seu ús.

A la taula 2.4 es detallen tots els experiments d'hidròlisi enzimàtica que s'han realitzat, emprant les membranes preparades.

Cel·la UAB	Experiments blanc: membrana sense enzim Experiments amb membrana enzimàtica amb mostres de substrat comercial (mostres UAB) Comparativa de temperatures de treball Efecte del pH en la dissolució receptora Cicles de vida i reutilització de la membrana
Mòdul de filtració frontal	Experiments blanc: membrana sense enzim Experiments amb membrana enzimàtica amb mostres de substrat comercial (mostres UAB) Cicles de vida i reutilització de la membrana Experiments amb membrana enzimàtica amb mostres procedents de la hidròlisi de residus (mostres URV) Cicles de vida i reutilització de la membrana

Taula 2.4. Taula resum dels experiments realitzats en cada cas.

Quan s'empra la cel·la UAB, s'analitzen periòdicament mostres de dissolució de càrrega i receptora. En el cas del mòdul de filtració frontal es recull el filtrat a través de les membranes en diferents fraccions. Les mostres obtingudes en els experiments amb els dos mòduls s'analitzaren tant pel mètode de Nelson com per MALDI-TOF-MS, tal com es descriurà a l'apartat 2.4.4.

2.4. Tècniques d'anàlisi de xilooligosacàrids

Els productes resultants de la hidròlisi enzimàtica tant de *Birchwood Xylan* (mostres UAB) com de mostres de biomassa vegetal (mostres URV) s'analitzen per a quantificar-ne la concentració. Tanmateix, es determina el grau de polimerització dels xilooligòmers alliberats durant el procés d'hidròlisi enzimàtica, tant en dissolució com als reactors de membrana corresponents. La concentració total de productes es determina mitjançant un mètode colorimètric, anomenat mètode de Nelson. Respecte de l'estudi del grau de polimerització de les espècies, s'utilitza l'electroforesi capil·lar d'alta resolució (HPCE), la cromatografia de permeació en gel (GPC) i l'espectrometria de masses amb ionització induïda per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS). A continuació, es descriu el procediment experimental seguit per a cada tipus de determinació.

2.4.1. Mètode de Nelson

El mètode de Somogyi-Nelson^{28, 29} és un dels tests habituals d'anàlisi de sucres reductors. Els sucres reductors es poden definir com aquells sucres que disposen d'un grup aldehid o cetona lliure, el qual permet actuar al sucre com si es tractés d'un agent reductor.

Normalment, en dissolució aquosa, els sucres amb 5 o més àtoms de carboni estan en equilibri en la seva forma lineal o cíclica, formant anells en els quals hi intervé el grup aldehid o cetona. Aquestes molècules cícliques es coneixen amb el nom de piranoses (si l'anell té 6 membres) o furanoses (si en té 5), per analogia amb l'estructura del pirà i del furà, respectivament. Els anells es formen a partir de la reacció dels grup carbonil del sucre (aldehid o cetona) amb el grup hidroxil del penúltim carboni de la molècula, donant lloc a la formació d'un hemiacetal.

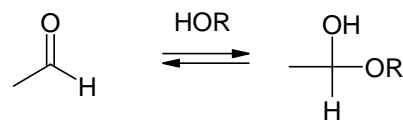


Fig. 2.20. Formació d'un hemiacetal.

Com a conseqüència de la formació de l'anell es forma un nou centre quiral al carboni que forma l'hemiacetal. Aquest nou carboni quiral s'anomena carboni anomèric. En funció de si el grup OH queda per sota o per sobre del pla de l'anell es distingeix entre els isòmers α o el β , respectivament, que també reben el nom d'anòmers.

La reacció de ciclació és reversible, de manera que en presència d'un agent oxidant poden actuar com a reductors. Els sucres que tenen un carboni anomèric lliure poden ser oxidats pel Fe^{3+} o el Cu^{2+} , que oxiden el carboni anomèric fins a àcid carboxílic, de manera que el carboni anomèric lliure també s'anomena extrem reductor. En un oligòmer, només un dels monòmers terminals disposa d'aquest grup carbonil lliure. Aquest residu terminal rep el nom d'extrem reductor.

En el cas concret del mètode de Nelson, s'utilitza una dissolució de CuSO_4 , entre d'altres components. Els sucres reductors poden reduir aquest Cu^{2+} a Cu^+ , el qual formarà un precipitat vermell de Cu_2O . Per tal que l'oxidació es dugui a terme, el primer pas és l'obertura de l'anell de sucre per a donar lloc a la forma lineal, mitjançant l'obertura d'aquest. La reacció es mostra a continuació:

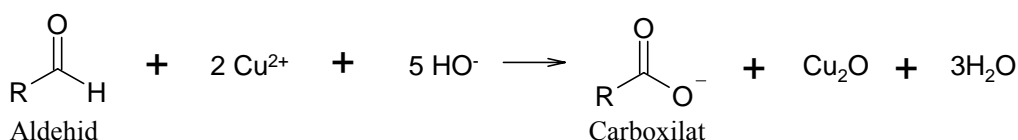


Fig. 2.21. Reacció d'oxidació d'un aldehid a àcid carboxílic.

Determinació de sucres reductors pel mètode de Nelson

Se segueix el procediment descrit al *Sigma Quality Control Test Procedure: Enzymatic Assay of Xylanase*, el qual es fonamenta en el mètode de Nelson, per tal de determinar la

concentració de productes alliberats en la hidròlisi enzimàtica, la qual cosa permetrà, alhora, d'avaluar canvis en l'activitat enzimàtica de l'enzim produïts a conseqüència del procés d'immobilització.

Procediment per als estudis de l'efecte del pH i la temperatura en l'activitat enzimàtica:

En tubs de plàstic es posen 1,9 ml de solució de substrat (*Birchwood xylan*) a una concentració 0,1 % en pes. Aquesta dissolució es prepara a partir de xilà comercial sòlid en una solució reguladora del pH d'àcid acètic/acetat sòdic 0,05M, la qual prèviament s'ha ajustat a diferents valors de pH. En concret, es determina l'activitat enzimàtica de l'enzim en dissolució a diferents pH tot mantenint la temperatura constant, i a diferents temperatures de treball, mantenint el pH fix. Les temperatures estudiades són: 40, 45, 50, 55, 60 i 65 °C a pH 6, i d'altra banda els pH estudiats són: 4; 4,5; 5; 5,5; 6 i 6,5, a temperatura de 50 °C. Així, a les mostres de *Birchwood xylan* amb el pH ajustat s'addicionen 100 µl de dissolució d'enzim de 80 U/ml a cada tub, excepte per al corresponent al blanc, al qual s'hi afegeixen 100 µl d'aigua Milli-Q.

Per a fer les mateixes proves, però amb l'enzim immobilitzat, se substitueixen els 100 µl de solució d'endo-1,4-β-xilanas II per una porció d'1 cm² de la membrana d'acrilat de polisulfona o de polímers monolítics (N25), segons el cas, que conté l'enzim enllaçat. Per als experiments blanc s'empra 1 cm² de cada membrana corresponent, però sense enzim.

Cadascun dels tubs s'incuba en un bany d'aigua a la temperatura corresponent durant 10 minuts. Passat aquest temps es retiren del bany i s'hi afegeixen 2 ml de dissolució de coure[‡] (reactiu E) i les mescles s'homogeneïtzen en un vòrtex (model TT2, IKA, NC, USA). A continuació s'escalfen en un bany d'aigua a 95 °C durant 10 minuts. Passat aquest temps, es deixen refredar fins a temperatura ambient. Llavors s'hi afegeixen 2 ml de solució d'arsènic-molibdè[§] (reactiu F). Finalment es mesura l'absorbància de cada mostra a 540 nm, emprant un colorímetre Novaspec II Pharmacia LKB.

[‡] Reactiu E: dissolució de coure per als assaigs d'activitat enzimàtica: 16mM en sulfat de coure (II) (a partir de sulfat de coure (II) pentahidrat), 1,3M en sulfat sòdic, 226mM en carbonat sòdic, 190mM en bicarbonat sòdic i 43mM en tartrat sòdic potàssic (a partir de tartrat sòdic potàssic tetrahidrat).

[§] Reactiu F: dissolució d'arsènic-molibdè per als assaigs d'activitat enzimàtica: 40 mM en àcid molibdic (a partir de la sal amònica tetrahidratada de l'àcid molibdic), 19mM en àcid arsènic (a partir de la seva sal sòdica) i 756mM en àcid sulfúric.

Procediment per a determinar la concentració de sucres reductors en mostres d'hidròlisi

En el cas de la determinació dels productes d'hidròlisi, el procediment seguit és anàleg al descrit a l'apartat anterior, a partir de l'addició del reactiu de coure. En aquest cas les etapes anteriors no es requereixen, perquè prèviament la hidròlisi del substrat ja ha tingut lloc, bé en dissolució o bé emprant reactors de membranes. D'aquesta manera s'analitzen les mostres de la solució de càrrega i receptora resultants dels experiments, realitzats amb la cel·la UAB així com el filtrat que s'obté del tractament del substrat amb membranes enzimàtiques emprant el mòdul de filtració frontal.

Per a poder dur a terme una determinació quantitativa, cal analitzar uns patrons que permetin obtenir una recta de calibratge. Els patrons es preparen a partir d'un estàndard de xilosa d'1,11 mg/ml, preparat també al mateix medi tamponat que les mostres que s'han d'analitzar, és a dir, en àcid acètic/acetat sòdic 0,05M, amb el pH ajustat al valor corresponent.

2.4.2. Electroforesi capil·lar de zona (CZE)³⁰

L'electroforesi capil·lar és una tècnica que es basa en la migració diferencial de partícules carregades, sotmeses a un camp elèctric. Serveix per a separar tant espècies iòniques com aquelles que es poden ionitzar en certes condicions d'anàlisi.³¹ Presenta avantatges importants, com són l'eficiència i la rapidesa relativa en el procés de separació, i que requereix petits volums de mostra i, per tant, un baix consum de reactius i una baixa generació de residus.

A l'electroforesi capil·lar de zona, el procés de separació té lloc a l'interior d'un capil·lar, que sol ser de sílice fosa. Aquest té un diàmetre intern comprès entre 25 i 100 µm, la qual cosa permet dissipar la calor que es genera a conseqüència del camp elèctric i alhora impedeix els processos de convecció i difusió al seu interior, els quals limitarien la separació dels analits. El medi de separació és una dissolució reguladora de pH (*buffer*) que alhora actua de conductor del corrent elèctric. L'esquema de funcionament és el següent:

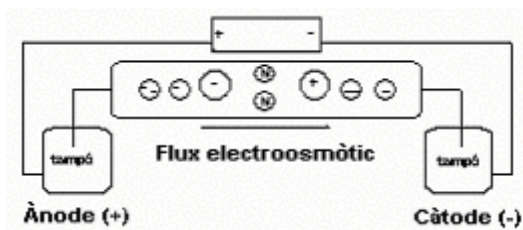


Fig. 2.22. Representació esquemàtica de l'electroforesi capil·lar.

Els extrems del capil·lar i els elèctrodes es troben submergits en la dissolució d'electròlit tamponat. La diferència de potencial que s'estableix entre aquests elèctrodes i els extrems del capil·lar (que sol estar entre 10 i 30 kV) és la que provoca la migració i separació de les espècies al llarg d'aquest. La migració de les substàncies ionitzades és conseqüència de dos fenòmens: l'electromigració i el flux electroosmòtic.

Mobilitat electroforètica: característica de cada espècie i de cada medi, i que es defineix com:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{1}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot \frac{q}{r} \quad (2.10)$$

On v_{ep} és la velocitat de migració de l'espècie, E el camp elèctric, r el radi de l'espècie, q la seva càrrega i η la viscositat del medi. Consisteix en el moviment de partícules carregades sota l'acció d'un camp elèctric, i aquest ve determinat per la relació q/r de l'espècie.

Mobilitat del flux electroosmòtic: és el flux de dissolució d'electròlit tamponat a l'interior del capil·lar, com a conseqüència de la ionització de la paret interna d'aquest. En funció del pH, els grups silanol de la sílice que estan en contacte amb l'electròlit poden estar dissociats en menor o major grau i poden originar, així, càrregues negatives a les parets del capil·lar. Aquesta capa negativa es pot compensar per una doble capa difusa de cations de la dissolució que són arrossegats cap al càtode amb la seva capa de solvatació, de manera que es genera un moviment de tota la dissolució cap a l'elèctrode. En conjunt es pot definir de la manera següent:

$$\mu_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (2.11)$$

En aquest cas, v_{eof} és la velocitat electroosmòtica, ε la constant dielèctrica i ζ és l'anomenat potencial zeta, que és generat per la distribució de càrregues de la paret del capil·lar i proporcional al gruix de la doble capa difusa. Factors com el pH, la força iònica, la temperatura i la presència de modificadors en la composició de l'electròlit determinen la mobilitat electroosmòtica.

A conseqüència d'aquests fenòmens, la mobilitat aparent d'una espècie s'expressa :

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \quad (2.12)$$

Totes les espècies, ja siguin catióniques, neutres o aniòniques, migraran cap al càtode. Els cations s'acceleraran, com a conseqüència del flux electroosmòtic, les espècies neutres avançaran gràcies a aquest i les aniòniques seran les darreres d'avançar, arribant

o no al càtode en funció de la magnitud relativa de les mobilitats electroforètica i electroosmòtica.

Hi ha diferents sistemes de detecció. En aquest cas, el detector emprat és un espectrofotòmetre de díodes en línia (UV-VIS). La detecció es realitza en línia, a través d'una finestra que es troba prop del final del capil·lar, i que en no estar recoberta permet el pas de la radiació a través de la mostra a mida que aquesta avança.

En la present tesi doctoral s'empra l'electroforesi capil·lar per a l'anàlisi d'oligosacàrids. L'equip utilitzat és P/ACE SYSTEM MDQ de Beckman. En concret es consideren tres mètodes de determinació que es detallen a continuació.

2.4.2.1. Determinació directa³²

El primer mètode es basa en la determinació dels sucres a partir de la formació de complexos amb borat a pH alcalí, i la seva detecció per absorció a 195 nm. En aquestes condicions, els grups hidroxil dels carbohidrats reaccionen amb l'ió tetraborat de l'electròlit de fons i donen lloc a complexos aniónics del tipus borat-poliol.³² Les condicions d'anàlisi són les següents :

Tipus de capil·lar	Síllice fosa
Diàmetre intern del capil·lar (μm)	50
Longitud del capil·lar (cm)	60 (50 fins al detector)
Voltatge aplicat (kV)	15 Polaritat directa
Temps de separació (min)	60
Longitud d'ona analítica (nm)	195
Dissolució d'electròlit	100mM en $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9,5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50
Injecció	Hidrodinàmica 0,5 psi 3 segons

Taula 2.5. Condicions d'anàlisi per al mètode de determinació directa per electroforesi capil·lar.

2.4.2.2. Determinació indirecta³³

Un altre mètode de determinació de carbohidrats per electroforesi capil·lar de zona consisteix en la detecció indirecta. En aquest cas, s'incorpora una espècie absorbent a la dissolució electròlit de fons, el triptòfan, i, per tant, en migrar els analits al llarg del capil·lar i arribar a la finestra de detecció es produirà una disminució en l'absorbància de fons, a conseqüència de la disminució de la concentració de l'espècie absorbent en l'electròlit. Aquest electròlit també té un pH alcalí, per a assegurar la ionització del triptòfan. Les condicions d'anàlisi es resumeixen a la taula següent:

Tipus de capil·lar	Sílice fosa
Diàmetre intern del capil·lar (μm)	50
Longitud del capil·lar (cm)	60 (50 fins al detector)
Voltatge aplicat (kV)	10 Polaritat directa
Temps de separació (min)	30
Longitud d'ona analítica (nm)	280
Dissolució d'electròlit	50mM en NaOH, 1,0mM en triptòfan, pH 12
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25
Injecció	Hidrodinàmica 0,5 psi 3 segons

Taula 2.6. Condicions d'anàlisi per al mètode de determinació indirecta per electroforesi capil·lar.

2.4.2.3. Determinació amb derivatització prèvia a l'anàlisi per CZE³⁴

Una altra possibilitat que ha estat emprada en el camp d'anàlisi de carbohidrats per CZE consisteix a derivatitzar els analits, prèviament a la injecció al capil·lar. La derivatització té com a objectiu la incorporació d'un grup cromòfor als oligosacàrids. Concretament, en aquest cas la reacció que té lloc és una aminació reductiva entre el carbohidrat i una amina primària, en presència d'un agent reductor. El corresponent derivat és un catió, ja que el grup imino en medi àcid presenta una càrrega positiva.³⁵ La reacció que té lloc es mostra a continuació (fig. 2.23).

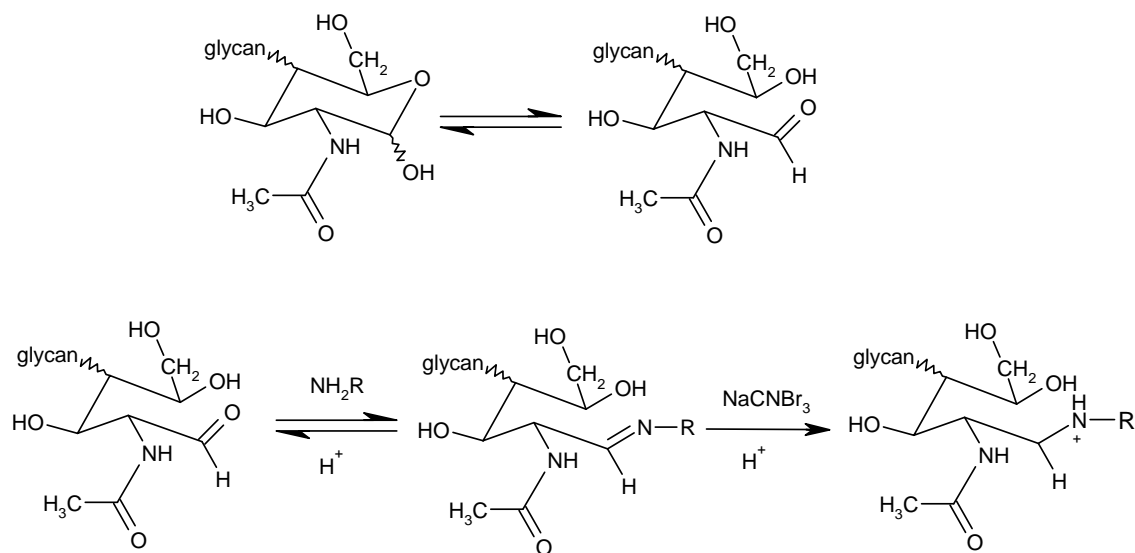


Fig. 2.23. Esquema de l'aminació reductiva de carbohidrats. En dissolució, la forma cíclica està en equilibri amb la forma amb el carbonil lliure. És aquest carbonil el que reacciona amb l'amina en presència de l'agent reductor, per a donar lloc a la imina. En aquest cas, $\text{NH}_2\text{R} = \text{ABEE}$.

En el procés de derivatització, es prenen 400 μl de dissolució de patrons o de mostra que conté oligosacàrids i s'afegeix 480 μl de dissolució de reactiu derivatitzant. El reactiu derivatitzant consisteix en una dissolució de 100 mg/ml de l'èster etílic de l'àcid

4-amino benzoic (ABEE), 100 mg/ml d'àcid acètic i 10 mg/ml de cianoborhidrur de sodi, en medi metanol.³⁴ Es deixa 1h en un bany d'aigua a 80 °C. Passat aquest temps, s'hi addicionen 400 µl de tampó de dilució, que es tracta d'una dissolució d'hidròxic sòdic 0,125M i àcid bòric 0,438M. Les mostres es filtren amb filtres Millipore Millex®-GS de 0,22 µm abans d'injectar. Les condicions d'anàlisi en aquest cas són:

Tipus de capil·lar	Silice fosa
Diàmetre intern del capil·lar (µm)	50
Longitud del capil·lar (cm)	60 (50 fins al detector)
Potència aplicada (W)	2500 Polaritat directa
Temps de separació (min)	20
Longitud d'ona analítica (nm)	306
Dissolució d'electròlit	0,300 M en NaOH, 0,438 M en àcid bòric
Temperatura (°C)	20
Injecció	Hidrodinàmica 0,3 psi 5 segons

Taula 2.7 Condicions d'anàlisi per al mètode de determinació amb derivatització prèvia dels analits per electroforesi capil·lar.

2.4.3. Cromatografia de permeació en gel (GPC)³⁶

La cromatografia, en general, es pot definir a grans trets com una tècnica de separació en la qual els compostos en una fase mòbil passen a través d'una columna (fase estacionària), de manera que uns són més retinguts que d'altres. En el cas de la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), la separació depèn del grau d'interacció de la mostra amb la fase estacionària i la fase mòbil. En una separació cromatogràfica, les substàncies difereixen unes d'altres en el temps de residència a la fase estacionària. Es defineix el temps de retenció total (t_R) com el temps que és necessari perquè un component de la mostra migri des del principi fins al final de la columna (detector). El temps mort (t_0) és el temps que triga un compost inert a avançar des de l'inici de la columna fins al final, sense interaccionar amb la fase estacionària; per tant, és el temps de residència a la fase mòbil. A partir d'aquests dos paràmetres, es defineix el temps de retenció net (t_R') com a:

$$t_R' = t_R - t_0 \quad (2.13)$$

En cromatografia, un paràmetre important és la resolució (R_S)³⁷ dels pics cromatogràfics, de manera que es considera una mesura quantitativa de la capacitat

d'una columna per a separar 2 analits. A partir del temps de residència d'aquests, es pot calcular la resolució de la separació cromatogràfica entre A i B com a:

$$R_s = \frac{t'_{RB} - t'_{RA}}{W} \quad (2.14)$$

On t'_{RA} i t'_{RB} són els temps de retenció nets dels dos compostos considerats i W l'amplada de banda dels pics cromatogràfics (es considera que $W_A = W_B \approx W$, perquè els temps de retenció són propers).

Hi ha diferents mecanismes de separació o interacció amb la fase estacionària, que permeten fer una classificació de les diferents metodologies de treball en HPLC. D'entre aquests destaca, pel seu interès en la present tesi doctoral, la cromatografia per permeació en gel (GPC), també coneguda com cromatografia d'exclusió molecular.

La cromatografia per permeació en gel es basa en la separació de molècules en funció de la seva mida, en concret, del seu volum hidrodinàmic (el volum que ocupen en dissolució). És una tècnica força emprada en l'anàlisi de pes molecular de polímers.

En la GPC, la columna està empaquetada amb un material de tipus porós (normalment sílice o poliestirè). Les molècules presents a la fase mòbil se separen segons si poden o no entrar dins els porus de les partícules de la fase estacionària. Molècules amb mida de partícula inferior a la mida dels porus de la fase estacionària tenen un temps de residència i un camí més llarg que les molècules més grans, que no són retingudes i, per tant, segueixen el flux del solvent. Per a la determinació qualitativa i quantitativa cal emprar mostres de referència de pes molecular conegut.

Anàlisi de mostres d'hidròlisi enzimàtica per GPC

Les mostres s'analitzen amb el cromatògraf líquid Agilent Series 1100 als laboratoris del Grup de Biopolímers Vegetals de la Universitat Rovira i Virgili. S'utilitza una columna G3000PwXL, SS, de 7,8 mm de diàmetre intern i 30 cm de longitud (TosoHaas, Alemanya) i una precolumna PWXL SS, de 12 μ m (TosoHaas, Alemanya), treballant a 25 °C. La detecció es realitza mitjançant mesures d'índex de refracció a 30 °C i emprant una solució 0,05M de KNO_3 com a fase mòbil, a un cabal constant de 1,0 ml/min.

Tant la precolumna com la columna es mantenen a 25 °C. La precolumna s'empra per seguretat, per a atrapar qualsevol contaminant que pugui saturar la columna. El detector es manté a 30 °C perquè la seva resposta és molt sensible a la temperatura.

En aquest cas, s'utilitzen oligòmers de dextrans de pesos moleculars determinats, per tal de realitzar una corba de calibratge de temps de retenció respecte del pes molecular dels analits.

2.4.4. Espectrometria de masses amb ionització induïda per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS)

L'espectrometria de masses amb ionització induïda per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) és una de les tècniques en major desenvolupament aplicada tant en l'anàlisi de molècules com de biomolècules.³⁸ Permet determinar la massa molecular de proteïnes, àcids nucleics, polímers i carbohidrats,³⁹ entre d'altres. El MALDI té 3 components bàsics: la font d'ionització, l'analitzador i el detector. La matriu en MALDI⁴⁰ normalment és un àcid dèbil orgànic (aromàtic), que absorbeix energia a la longitud d'ona del làser. Tant la matriu com la mostra han de ser solubles en el mateix dissolvent, i la matriu no ha de modificar l'analit ni reaccionar amb ell abans d'irradiar la mostra amb el làser. Normalment, l'analit es mescla amb la matriu en una proporció 1:1 i la mescla obtinguda es diposita sobre una placa metàl·lica, tot donant lloc a una estructura cristal·lina. Les funcions de la matriu són:

1. Absorbir l'excés d'energia que se li comunica en irradiar-la amb el làser, la qual cosa protegeix els analits d'una possible descomposició.
2. Incrementar la formació d'ions de la mostra per fotoexcitació o fotoionització de les molècules de la matriu, seguida per una transferència de protons cap a la molècula d'analit.
3. La dilució de la mostra en la matriu minimitza l'associació de molècules de l'analit.

Etapes d'anàlisi per MALDI

1. Preparació de la mostra

Malgrat que la selecció de la matriu és el primer pas en l'anàlisi per MALDI-TOF-MS, la preparació de les mostres pot arribar a ser però una etapa fins i tot més rellevant que la primera.³⁹ S'ha emprat el mètode *dried-droplet* (DD), que consisteix en una premescla de l'analit i de la matriu en una proporció 1:1, i la posterior deposició d'aproximadament 1 µl sobre una superfície metàl·lica, de manera que es deixa assecar i cristal·litzar la mostra durant uns minuts abans de l'anàlisi.

2. Ionització de la mostra

En irradiar la mostra amb un làser, que normalment emet en l'ultraviolat (UV), l'energia és absorbida preferentment per les molècules de la matriu, que són excitées, i la seva posterior relaxació tèrmica porta a l'evaporació de la matriu i, per tant, a la transferència de l'analit a la fase gasosa, sense fragmentar-lo. Si es procedís a irradiar directament la mostra amb el làser (obviant la mescla amb la matriu), es correria el risc de tenir una fragmentació de la majoria de les molècules, de manera que només es podrien analitzar les de baix pes molecular.

3. Analitzador

En els equips que incorporen un analitzador de temps de vol (TOF), els feixos d'ions, que es troben en fase gas, són accelerats amb una energia cinètica fixa, mitjançant una diferència de potencial elèctric. Posteriorment avancen per l'analitzador, un cilindre lliure de camp elèctric on la velocitat dels ions és inversament proporcional a la seva massa, ja que l'energia cinètica per a tots ells era la mateixa.

4. Detector

El detector es troba al final d'aquesta regió no sotmesa a camp elèctric, i s'enregistra un senyal cada cop que arriba un grup d'ions. La massa dels ions es calcula en funció del temps que triguen a arribar al detector, que depèn de la velocitat, i alhora aquesta depèn de la massa, i per tant, de la relació massa/càrrega (m/z).

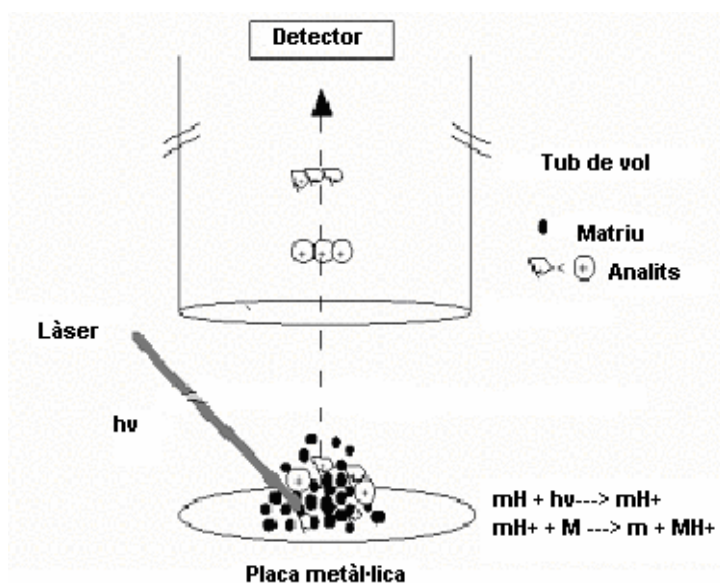


Fig. 2.24. Ionització de la mostra per irradiació amb làser; M es refereix a la mostra i m a la matriu.

Anàlisi de les mostres per MALDI-TOF-MS

Les mostres s'analitzen amb un espectròmetre de masses MALDI-TOF de Bruker (Ultraflex), amb un làser de font de nitrogen que emet a 337 nm, al Servei de Proteòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els espectres s'adquireixen en mode lineal i positiu, amb un voltatge d'acceleració de 25 KV i fent un promig de 5 adquisicions.

El patrons es preparen a partir de les dissolucions de xilooligòmers patró: xilosa (13,25 mg), xilobiosa (6,8 mg), xilotriosa (10,3 mg), xilotetraosa (7,8 mg), xilopentaosa (2,5 mg) i xilohexaosa (2,5 mg), que es dissolen en 1 ml d'aigua Milli Q. També es prepara una barreja de xilooligòmers a partir de 0,5 µl de cada dissolució patró.

Tanmateix, s'analitzen mostres d'hidròlisi enzimàtica, amb enzim en dissolució i immobilitzat, i amb els diferents mòduls de membrana. En tots dos casos, s'estudien mostres procedents del tractament de substrats tipus UAB i URV, tal com s'ha comentat als apartats 2.3.1 i 2.3.2.

Prèviament a l'anàlisi per MALDI, cal mesclar les mostres amb la matriu. En aquest cas, es barregen 2 µl de dissolució de la mostra amb 2 µl de la dissolució de matriu, que és àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB) al 1% en metanol. A continuació, 1 µl d'aquesta mescla es diposita sobre la placa portamostres del MALDI-TOF i es deixa evaporar el dissolvent perquè cristal·litzi la mostra abans de procedir a l'anàlisi.

Referències

-
- ¹Gutiérrez, B.; Cano, A.; Minguillón, C. Synthesis and characterization of polysulfone acrylate: a versatile tool in the derivatization of polysulfone *in preparation*.
- ²Cano, A.; Minguillón, C.; Palet, C. *Journal of Membrane Science* 280 (2006) 383-388.
- ³Bradford, M. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- ⁴Petro, M.; Svec, F.; Gitsov, I.; Fréchet, J. M. J. *Analytical Chemistry* 68 (1996) 315-321.
- ⁵Xie, S.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Chem. Mater* 10 (1998) 4072.
- ⁶Xie, S.; Allington, R.W.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 76 (2002) 87-125.
- ⁷Svec, F. *Journal of Separation Science* 27 (2004) 747-766.
- ⁸Hodge, P.; Sherrington, D. C. *Syntheses and Separations using functional polymers*, Wiley, New York, USA, 1989.
- ⁹Carlson, R. *Design and optimization in Organic synthesis. Vol 8. Data Handling in science and Technology*. Elsevier Publishers, Amsterdam, Països Baixos, 1992
- ¹⁰Shi, N.-Q.; Jeffries, T. W. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1998) 3: 339-345.
- ¹¹La Grange, D.; Pretorius, I. S.; Van Zyl, W. H. *Applied and environmental Microbiology* 62 (1996) 3: 1036-1044
- ¹²Den Haan, R.; Van Zyl, W. H. *Appl microbial Biotechnol* 57 (2001) 521-527.
- ¹³Singh, M. V.; Weil, P. A. *Analytical Biochemistry* 307 (2002) 13-17
- ¹⁴Hill, J.; Donald, G.; Griffiths, D. E.; *Nucleic Acids Research* 19 (1991) 20: 5791.
- ¹⁵Russell, P. *Genetics*. Pearson Education, Inc., San Francisco, USA, 2002.
- ¹⁶Sanger F.; Coulson, A. R. *J Mol Biol.* 94 (1975) 3:441-448.
- ¹⁷Michaelis, L.; Menten, M. *Biochem. Z.* 49 (1913) 333-369.
- ¹⁸Lineaweaver, H.; Burk, D. *Journal of the American Chemical Society* 56 (1934) 658.
- ¹⁹Christensen, H. N; Palmer, G. A. *Cinètica enzimàtica*. Ed Reverté, Barcelona, Catalunya, 1980.
- ²⁰Torras, C.; Garcia-Valls, R. *Journal of Membrane Science* 233 (2004) 119-127.
- ²¹Gumí, T.; Valiente, M.; Khulbe, K. C.; Palet, C.; Matsuura, T. *Journal of Membrane Science* 212 (2003) 123-134.
- ²²Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *Journal American Chemical Society* 73 (1951) 373-380.
- ²³Cuperus, F. P. *Characterization of ultrafiltration membranes: pore structure and top layer thickness*. Tesi doctoral, University of Twente, Països Baixos, setembre 1990.
- ²⁴Smith Sorensen, T. ed. *Surface Chemistry and electrochemistry of membranes, surfactant science series* vol 79 Merce Dekker, Inc., New York, USA, 1999.
- ²⁵Dollimore, D.; Heal, G.R. *J. Appl. Chem.* 14 (1964) p: 109.
- ²⁶Gumí, T.; Valiente, M.; Palet, C. *Journal of Membrane Science* 256 (2005) 150-157.
- ²⁷Garcia-Valls, R.; Muñoz, M.; Valiente, M. *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 77-84.
- ²⁸Somogyi, M. *Journal of Biological Chemistry* 195 (1952) 19-23.
- ²⁹Nelson, N. *Journal of Biological Chemistry* 153 (1944) 375-380.
- ³⁰Baker, D. R. *Capillary electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York, USA, 1995.

-
- ³¹Diez-Masa, J. C.; de Frutos, M.; Cifuentes, A. *Electroforesis capilar: fundamentos, instrumentación, técnicas*. Instituto de Química Orgánica General, Madrid
- ³²Arentoft, A. M.; Michaelsen, S.; Sorensen, H. *Journal of Chromatography A* 652 (1993) 517-524.
- ³³Lu, B.; Westerlund, D. *Electrophoresis* 17 (1996) 325-332.
- ³⁴Dahlman, O.; Jacobs, A.; Liljenberg, A.; Olsson, A.I. *Journal of Chromatography A* 891 (2000) 157-174.
- ³⁵Honda, S. *Journal of Chromatography A* 720 (1996) 337-351.
- ³⁶En línia http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_permeation_chromatography
- ³⁷Skoog, D. A.; Leary, J. J. *Análisis instrumental*. 4º edició. McGraw-Hill, Madrid, Espanya, 1994.
- ³⁸Stahl, B.; Steup, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 1463-1466.
- ³⁹Karas, M.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry* 60 (1988) 2299-2301.
- ⁴⁰Önnerfjord, P. *Mass identify of biomolecules by MALDI-TOF MS. Connective Tissue Biology*. P.O. Box 94,221 00 Lund, Sweden.www.cmb.lu.se/ctb/pdf/Mtof.pdf

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

A continuació, es presenten els resultats obtinguts en la present tesi doctoral i una discussió d'aquests.

3.1. Immobilització per retenció física

En el procés d'immobilització de l'enzim a membranes de polisulfona per retenció física, es posa de manifest la desactivació de l'enzim a conseqüència del contacte amb dissolvents orgànics, els quals s'empren per a preparar la dissolució de membrana. Per a comprovar l'activitat de l'enzim immobilitzat a la membrana s'empra el mètode de Nelson per a la determinació de sucres reductors a diferents intervals de temps. En submergir les membranes preparades en una dissolució de substrat comercial, no s'observa l'alliberament de sucres reductors com a productes de la reacció d'hidròlisi enzimàtica, ni tampoc s'observen canvis en la composició amb el temps.

3.2. Immobilització química

3.2.1. Síntesi de membranes d'acrilat de polisulfona

Derivatització de la polisulfona

Per tal d'ancorar l'endo-1,4- β -xilanasasa II a la polisulfona, cal introduir sobre aquesta darrera grups funcionals susceptibles de reaccionar amb certs grups de la proteïna. Per això, cal tenir present la seqüència i, per tant, la distribució dels aminoàcids dins de la cadena peptídica. Tenint en compte la seqüència de l'endo-1,4- β -xilanasasa II i considerant el procediment descrit per a la fixació de β -galactosidasa sobre membranes de *Nylon*[®] (una poliamida)¹ amb la incorporació prèvia d'un grup epòxid (fig. 3.1), es considera la possibilitat de funcionalitzar la polisulfona introduint-hi els grups epòxid susceptibles de reaccionar amb amines.

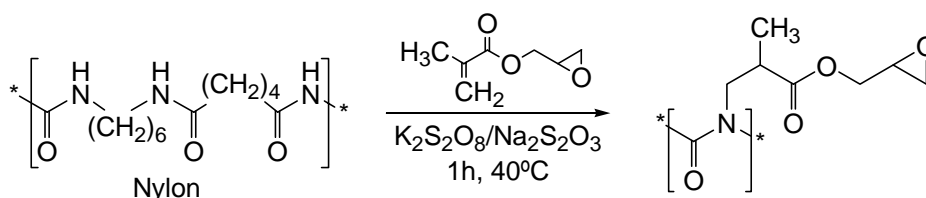


Fig. 3.1. Incorporació el grup epòxid en membranes de Nylon[®]

Al procediment descrit es fa reaccionar el Nylon[®] amb metacrilat de glicidil, cosa que introdueix el grup epòxid, que, posteriorment, es fa reaccionar amb fenilendiamina. Per a la polisulfona, donada la presència de grups hidroxil fenòlics, es va pensar a introduir

aquests epòxids per reacció amb epiclorhidrina. Es pretén que aquest grup posteriorment reaccioni amb una diamina. En aquest punt es prepararia la membrana i, un cop obtinguda, es formaria la sal de diazoni de la diamina anterior. La sal de diazoni hauria de reaccionar amb els anells aromàtics de la fenilalanina i la tirosina de la proteïna.¹ Les reaccions que es van proposar es presenten a continuació:

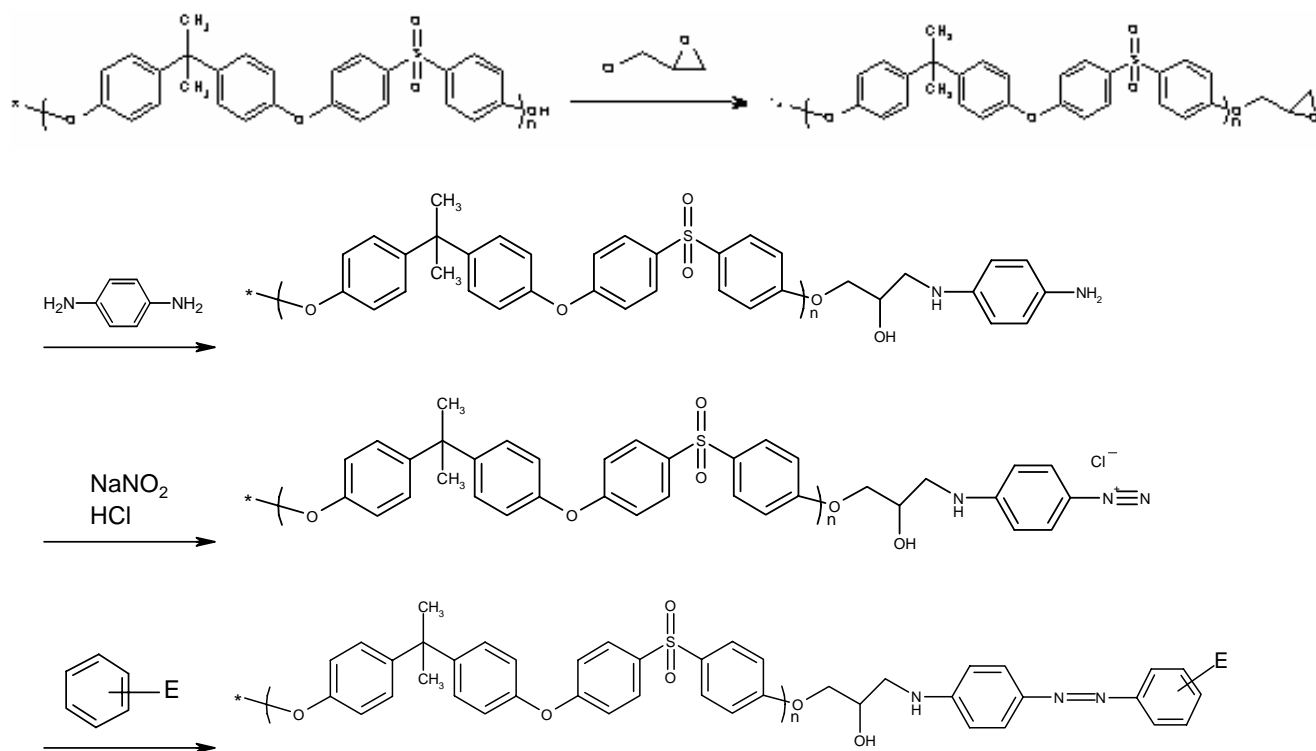
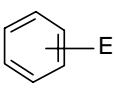


Fig. 3.2. Reaccions de derivatització de la polisulfona per a introduir el grup epòxid i posterior formació de la sal de diazoni per a reaccionar amb grups funcionals de l'enzim.

A la figura anterior,  representa l'anell aromàtic de les cadenes laterals dels aminoàcids fenilalanina i tirosina de l'endo-1,4- β -xilanasasa II.

Per tal de derivatitzar la polisulfona amb l'epiclorhidrina, es proven diverses condicions de reacció. En primer lloc s'utilitza hidròxid potàssic com a base, en el si de DMF anhidre, escalfant a 40 °C durant 48 hores. També s'utilitza hidrur sòdic en les mateixes condicions de temps i temperatura. Paral·lelament es fa la reacció en medi aquós, sense dissoldre la polisulfona, tot utilitzant dissolució d'hidròxid sòdic 1M com a base, a temperatura ambient. De les successives reaccions i proves realitzades per a introduir el grup epòxid a la polisulfona, en general s'observa que no hi ha reproductibilitat en la relació del nombre de grups epòxid introduïts respecte de la unitat monomèrica que es repeteix en l'estructura de la polisulfona. En el cas de les reaccions en les quals s'empra

KOH i NaH com a base en cada cas, i amb DMF com a medi de reacció, els espectres de RMN-¹H dels productes posen de manifest que la quantitat de grups epòxid introduïts és menor que quan s'utilitza NaOH com a base en medi aquós. D'altra banda, el fet d'utilitzar DMF permet fer la reacció en condicions homogènies, amb la polisulfona dissolta, mentre que en utilitzar aigua el polímer resta insoluble. Tanmateix, en transcórrer la reacció la polisulfona es dissol completament i s'origina una fase orgànica, menys densa que l'aigua, juntament amb l'excés d'epiclorhidrina. Per a intentar augmentar la relació de grups epòxid introduïts sobre el polímer, s'augmenta la relació d'epiclorhidrina respecte de la polisulfona i fins i tot s'utilitza un catalitzador de transferència de fase, el Bu₄N⁺ Br⁻. Tot i així, als espectres corresponents no s'observa un increment clar en la quantitat de grups epòxid introduïts ni reproductibilitat. Aquest fet s'atribueix a la manca de solubilitat del polímer original en el medi de reacció. Tot i això, la utilització de NaOH com a base en el si d'aigua és la condició amb què s'obté un millor resultat en la incorporació de grups epòxid al polímer.

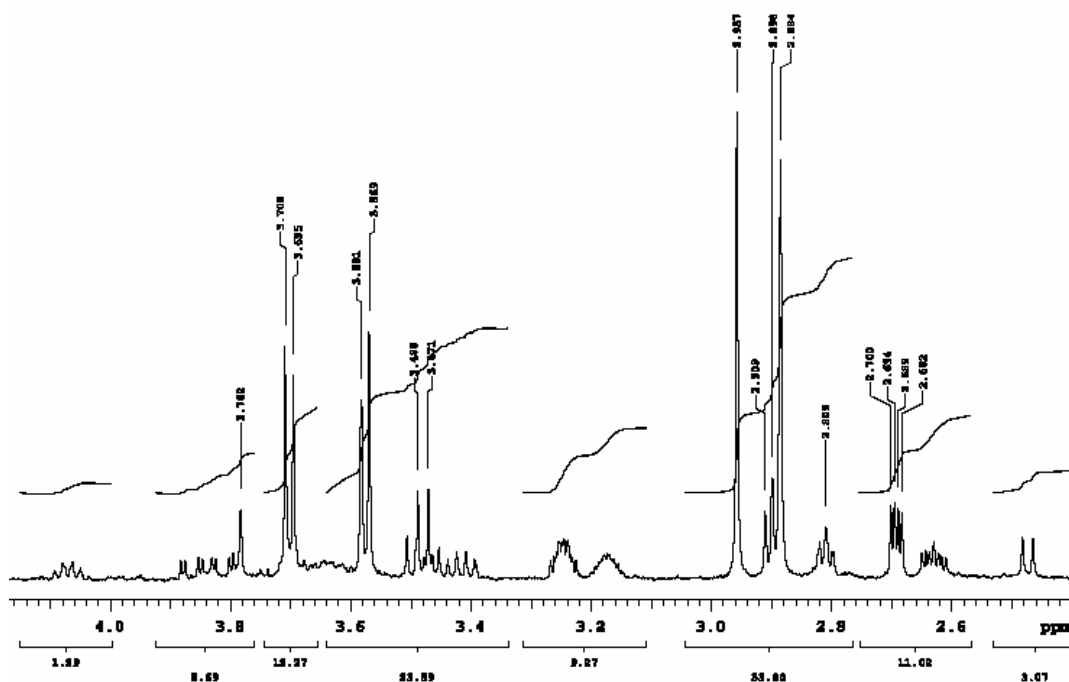


Fig. 3.3. Ampliació de l'espectre RMN-¹H de la glicidilpolisulfona.

Davant d'aquests resultats, es decideix canviar l'estratègia d'enllaç i s'opta per introduir un altre grup reactiu a l'estructura de la polisulfona. El grup escollit és un grup acrilat, amb la idea de fer-lo reaccionar també amb amines. Així, a partir de la polisulfona dissolta en cloroform i en presència de dissolució aquosa de NaOH 2M, s'hi addiciona clorur d'acrilòil. La reacció que té lloc es mostra a la fig. 3.4.

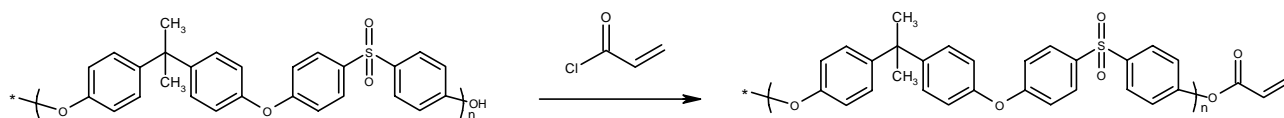


Fig. 3.4. Reacció de derivatització de la polisulfona per a introduir el grup acrilat

S'observa que, en només 4 hores de reacció a temperatura ambient, la relació de grups acrilat respecte de la unitat de polisulfona és quantitativa (absència de grups OH de la polisulfona als espectres RMN-¹H (fig. 3.5) i IR (fig. 1A annex A) del producte) i reproduïble.

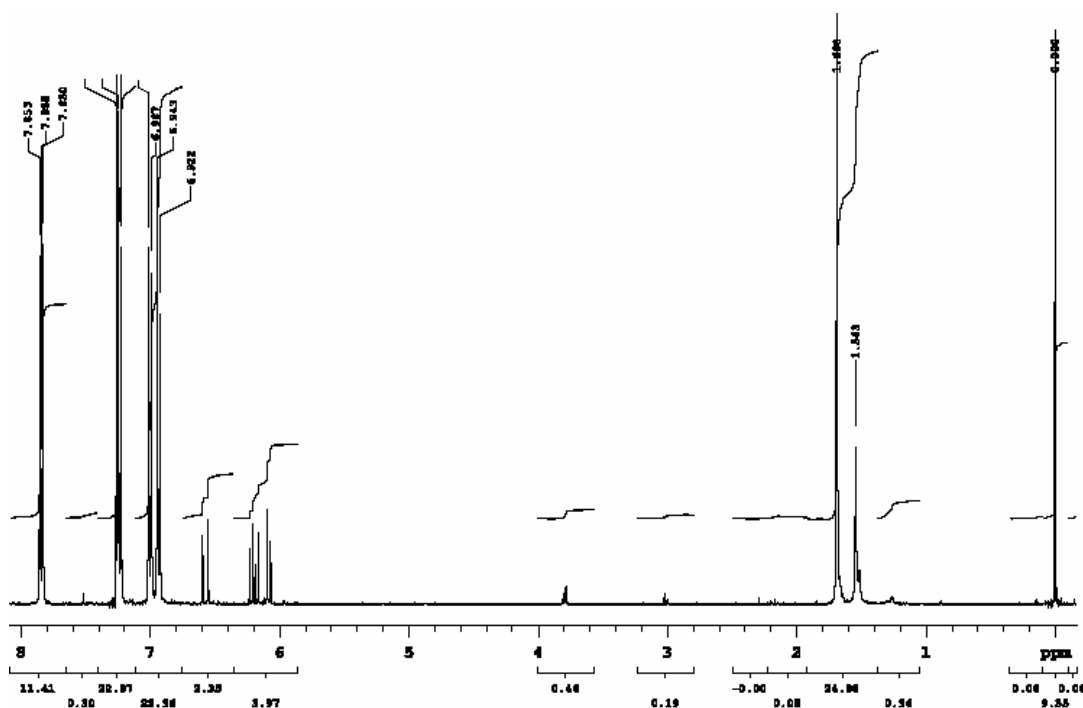


Fig. 3.5. Espectre RMN-¹H de l'acrilat de la polisulfona.

El següent pas consisteix a fer reaccionar el grup acrilat amb una diamina aromàtica (p-fenilendiamina), tal com s'havia previst en l'estratègia anterior, i, un cop format aquest derivat, preparar la corresponent sal de diazoni. Per tal d'incorpora-hi la diamina, es prepara una dissolució de NaHCO₃, a pH 9, amb p-fenilendiamina al 2%. A aquesta dissolució s'hi afegeix el derivat de la polisulfona amb el grup acrilat ja incorporat, i es deixa en agitació i protegit de la llum, a temperatura ambient, durant 12 h. El derivat que s'espera obtenir és el següent (fig. 3.6):

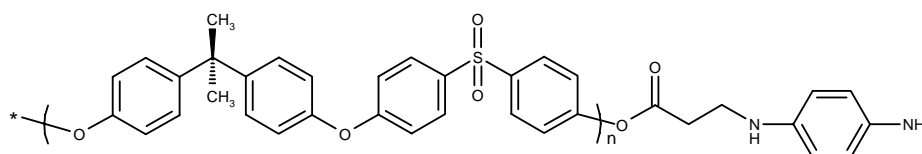


Fig. 3.6. Producte esperat de la reacció entre l'acrilat de polisulfona i p-fenilendiamina.

Tot i així, l'estudi espectroscòpic del material obtingut no permet la identificació inequívoca d'aquest derivat, encara que s'observa la disminució dels senyals corresponents a l'acrilat.

A la vista dels resultats anteriors, s'opta per la reacció de l'acrilat de polisulfona amb una diamina alifàtica, que seria més detectable per RMN-¹H. S'utilitza l'1,12-dodecanodiamina i es realitza l'espectre RMN-¹H del producte obtingut, el qual indica la seva correcta incorporació sobre l'acrilat de polisulfona.

Davant de l'èxit d'aquesta reacció, es pensa a establir l'enllaç directament entre el grup acrilat i la proteïna mateix tenint en compte la presència de grups amino² a les cadenes laterals de certs aminoàcids, en concret de l'arginina i la lisina, cosa que simplifica notablement la preparació sintètica de la membrana desitjada. Per aquest motiu, la derivatització de la polisulfona es finalitza un cop s'incorpora el grup acrilat.

Fixació de la proteïna

L'enzim endo-1,4-β-xilanas II és una proteïna que conté, entre d'altres, una proporció considerable d'aminoàcids arginina i lisina a la seva seqüència. Aquesta seqüència i la distribució d'aminoàcids a l'estructura terciària són conegudes.³ La presència d'arginina i lisina lluny de la localització del centre actiu de l'enzim es considera per a dissenyar un mètode d'immobilització que impliqui els grups funcionals d'aquests aminoàcids. Així, doncs, la immobilització pot tenir lloc entre els grups acrilat de la polisulfona derivatitzada i els grups amino laterals dels aminoàcids anteriors, a través d'una reacció d'addició de tipus Michael (fig. 3.7). La quantitat de grups acrilat per unitat de polisulfona és de 0,5.⁴ Atès que les membranes d'acrilat de polisulfona tenen una estructura superficial uniforme, sense porus que permetin una difusió de l'enzim dins de l'estructura de la membrana, tal com es comentarà amb detall en un apartat posterior d'aquest capítol, esperem que la reacció d'acoblament es limiti només als grups acrilat disponibles a la superfície.

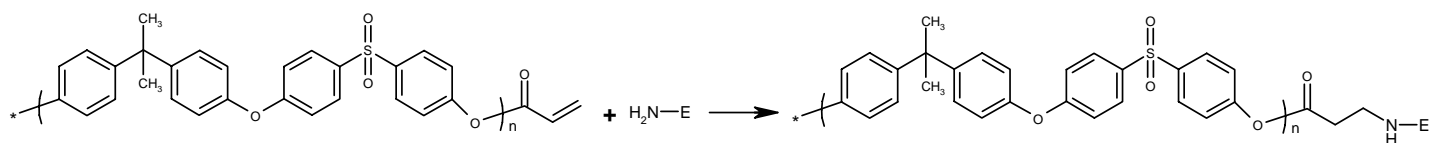


Fig 3.7. Esquema de la reacció d'immobilització de la proteïna.

Els resultats de la microanàlisi elemental per a les mostres de membrana d'acrilat de polisulfona, abans i després d'estar en contacte amb la dissolució tamponada d'enzim, es presenten a les taules següents (com a precontacte i postcontacte, respectivament):

	%N	%C	%H	%S		%N	%C	%H	%S
Rep 1	< 0,1	72,06	5,02	6,96	Rep 1	0,38	71,68	4,89	6,52
Rep 2	< 0,1	72,07	4,95	6,92	Rep 2	0,37	71,56	5,08	6,61
mitjana	< 0,1	72,06	4,99	6,94	mitjana	0,37	71,62	4,98	6,57

Taula 3.1. Resultats de la microanàlisi elemental de la membrana d'ACPS precontacte amb proteïna.

Taula 3.2. Resultats de la microanàlisi elemental de la membrana d'ACPS postcontacte amb proteïna.

S'observa que el contingut de N en el cas de la membrana precontacte amb la proteïna (taula 3.1) està per sota dels límits de quantificació de la tècnica (< 0,1%). En el cas de la membrana que ha estat en contacte durant 24 hores amb la solució d'endo-1,4- β -xilanas II (150 U/ml) a pH 9 (taula 3.2), el contingut de nitrogen és del 0,38%. Si bé aquest valor és relativament baix, cal dir que és un primer indicador de la presència de nitrogen a la membrana respecte de la membrana blanc (membrana d'acrilat de polisulfona). Es pot considerar que el contingut de nitrogen de la membrana podria provenir de la DMF emprada en la preparació de la dissolució de membrana. Tanmateix, el baix percentatge de nitrogen corresponent a la membrana blanc posa de manifest que el nitrogen procedent de la DMF és negligible i, per tant, s'assumeix que el contingut de nitrogen trobat (0,38 %) prové només de la proteïna. Si el percentatge de nitrogen a l'enzim lliure és del 6,24 %, per comparació amb el contingut final de nitrogen a les membranes és possible estimar la quantitat de proteïna immobilitzada per gram de membrana d'acrilat de polisulfona, a partir de la fórmula:

$$g \text{ proteïna/g membrana} = \frac{g \text{ N membrana}}{g \text{ membrana}} * \frac{g \text{ proteïna}}{g \text{ N a la proteïna}} \quad (3.1)$$

La quantitat d'enzim a les membranes d'acrilat de polisulfona és de 61 mg d'enzim per gram de membrana, és a dir, el 6,1 % en pes de proteïna a la membrana.

Anàlisi d'aminoàcids per HPLC

L'anàlisi d'aminoàcids per HPLC també confirma la presència de l'enzim a les membranes enzimàtiques d'acrilat de polisulfona (ACPS), quan es compara el

cromatograma corresponent amb el de la dissolució d'endo-1,4- β -xilanas II comercial. En ambdós casos s'observa el mateix perfil, amb pics corresponents als mateixos aminoàcids i en les mateixes proporcions relatives, cosa que demostra la incorporació de l'enzim (fig. 3.8 i 3.9).

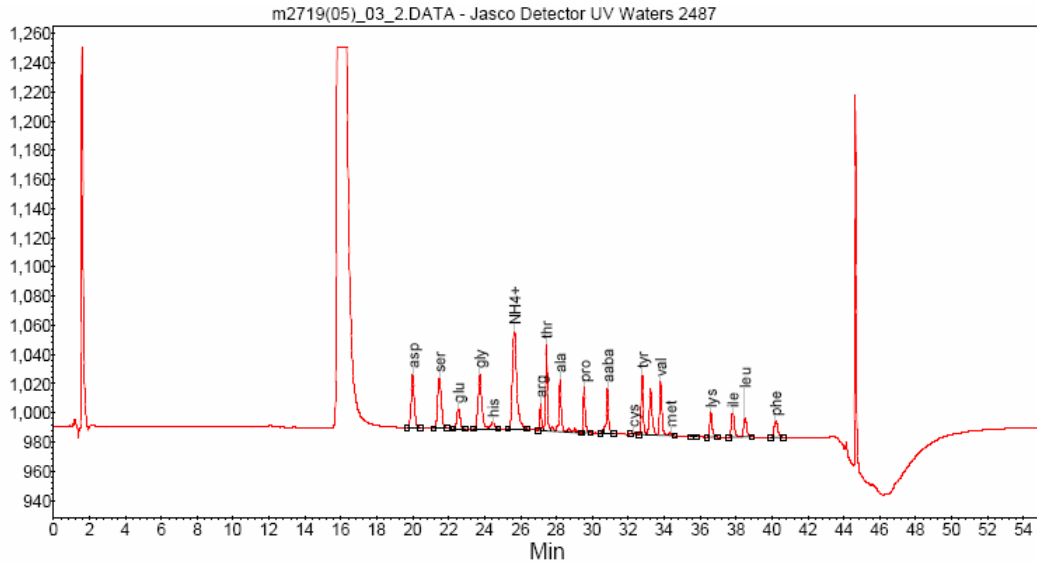


Fig 3.8. Cromatograma d'endo-1,4- β -xilanas II comercial.

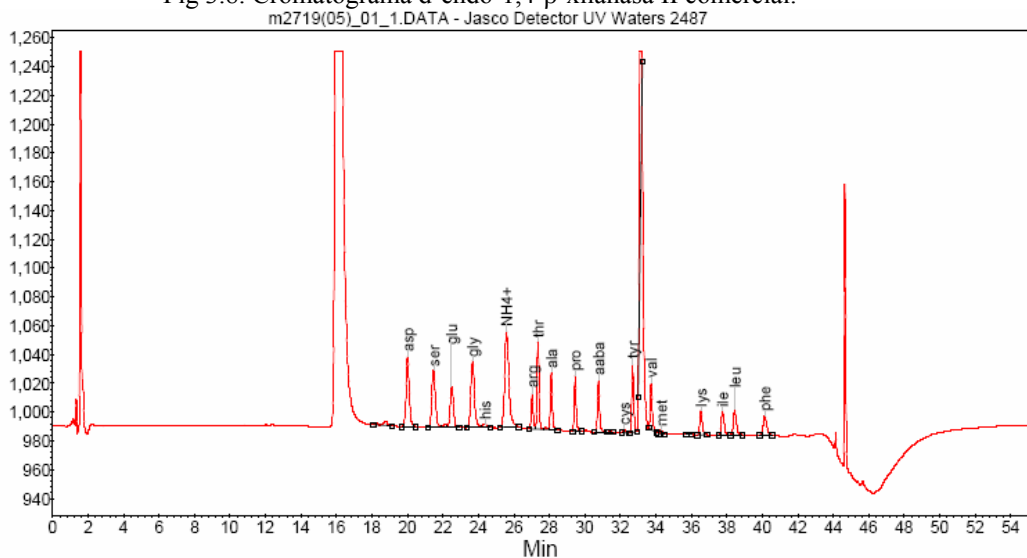


Fig 3.9. Cromatograma de la membrana enzimàtica ACPS.

No s'observen diferències significatives entre els cromatogrames de l'endo-1,4- β -xilanas II lliure i la membrana enzimàtica ACPS. Atès que l'enllaç de l'enzim es duu a terme a través de lisines i arginines, s'esperaria una disminució dels seus senyals cromatogràfics després de la immobilització i l'aparició de nous senyals, corresponents als aminoàcids enllaçats a la membrana. L'absència de senyals diferents o nous pot ser conseqüència del baix nombre de molècules d'enzim immobilitzades (com s'ha vist en el contingut de nitrogen). Tampoc es descarta la possibilitat que algunes molècules

d'enzim s'hagin enllaçat a les membranes d'acrilat de polisulfona a través del grup amino terminal lliure de la proteïna, cosa que pot ser la causa de la manca de diferències en els pics dels aminoàcids arginina i lisina. La possibilitat que es tracti d'adsorció física també es considera, malgrat ha de ser negligible ja que les membranes es renten profundament després de la immobilització i abans dels seu ús.

3.2.2. Disseny de membranes de polímers monolítics

Anàlisi del model obtingut amb el Disseny d'Experiments (DOE)

La composició de les membranes es varia segons s'indica a la taula 2.3 del capítol anterior. La metodologia de superfícies de resposta és una tècnica de modelització empírica que avalua la relació entre factors experimentals controlats i els resultats. A part dels experiments de la taula 2.2, se'n realitzen dos més que són replicats dels valors extrems del disseny d'experiments, és a dir, de la membrana amb els tres factors a nivell baix i una altra amb els tres factors a nivell alt, per a comprovar la precisió als extrems del disseny. Els nous experiments s'anomenen N21 i N22 i equivalen a N1 i N8, respectivament. El model s'obté ajustant les dades a una regressió de mínims quadrats parcials (*partial least squares regression*,⁵ PLS). Els experiments N12 i N14 s'eliminen de la matriu de dades, ja que són *outliers*. Dos factors PLS són suficients per a modelar les dades. A la figura 3.10 es mostra el gràfic d'*scores*^{*},⁶ per a la matriu experimental.

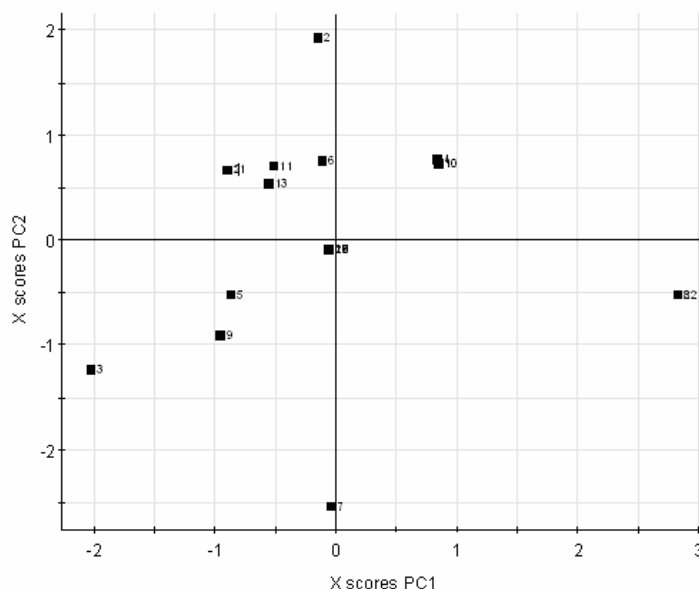


Fig. 3.10. Gràfic dels *scores* PC2 vs PC1 de la matriu experimental. PC1 està relacionat amb l'activitat enzimàtica.

* *Scores*: coordenades de les variables al nou espai definit pels components principals. Aquests components principals són les direccions en les quals la variabilitat de les dades és màxima.

Els valors de $R_{2adj} = 0,882$ i $Q_2 = 0,842$ demostren un bon ajust del model; R_{2adj} és la fracció de la variabilitat de la resposta explicada pel model, ajustada als graus de llibertat i Q_2 és la fracció de la variabilitat de la resposta que pot ser predita pel model.

<i>Activitat</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Quadrat mitjà</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Total	20	1301,930	65,100		
Constant	1	1142,920	1142,920		
Total Corregit	19	159,011	8,369		
Regressió	6	145,899	24,317	24	0,000
Residual	13	13,112	1,009		
Falta d'ajust (error del model)	6	9,244	1,541	2,788	0,103
Error pur (error dels replicats)	7	3,868	0,553		

Taula 3.3. Anàlisi de la regressió de l'activitat enzimàtica de les membranes de polímers monolítics. Ajust de la resposta a un model quadràtic. $N=20$, PLS comp = 2. $Q^2 = 0,807$, $R^2 = 0,918$, $R_{adj}^2 = 0,879$ DSR = 1,004.

L'equació 3.2 expressa l'activitat enzimàtica de les membranes en funció de la seva composició en termes de la relació molar dels dissolvents i el contingut d'EDMA i d'AEM (variables X_1 , X_2 , X_3 , respectivament). La resta de termes no s'hi inclouen, ja que es troba que no són significatius per a un nivell de confiança del 95%.

$$Y = 7,316 + 1,934 X_1 + 0,502 X_2 + 0,658 X_3 + 0,801 X_1X_2 + 0,657 X_2X_3 \quad (3.2)$$

Efecte del contingut d'AEM en l'activitat enzimàtica de les membranes

El gràfics de superfície de resposta de les figures 3.11 a, b i c representen l'activitat enzimàtica de les membranes de polímers monolítics respecte de la relació molar de dissolvents porogènics i el contingut d'EDMA a tres nivells d'AEM.

Per al contingut d'AEM s'observen els millors resultats emprant la màxima quantitat de monòmer que és possible dissoldre en el medi de dissolvents porogènics seleccionat, ja que l'AEM proporciona els grups amino del polímer, i per tant, del suport, que reaccionaran amb l'enzim "activat", que es tracta d'un intermedi actiu que es forma en dissolució i del qual se'n parlarà amb més detall tot seguit.

Fig. 3.11 a

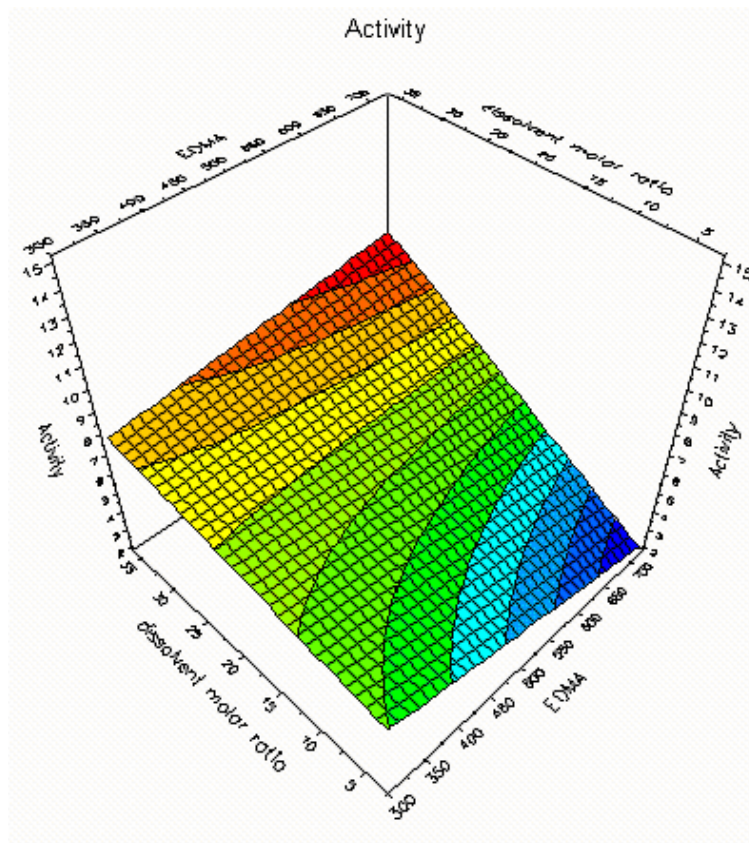


Fig. 3.11 b

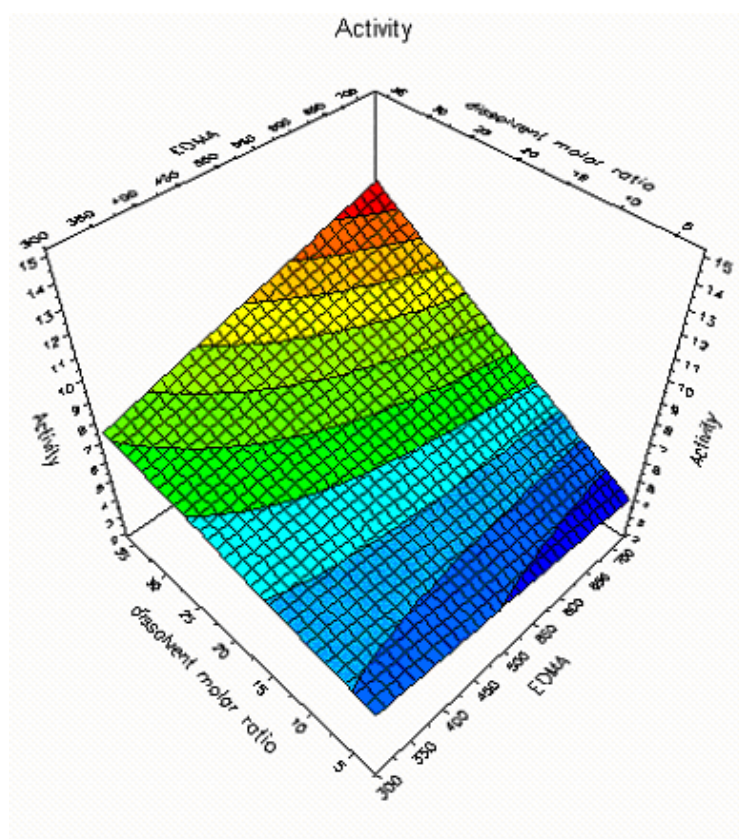


Fig. 3.11 c

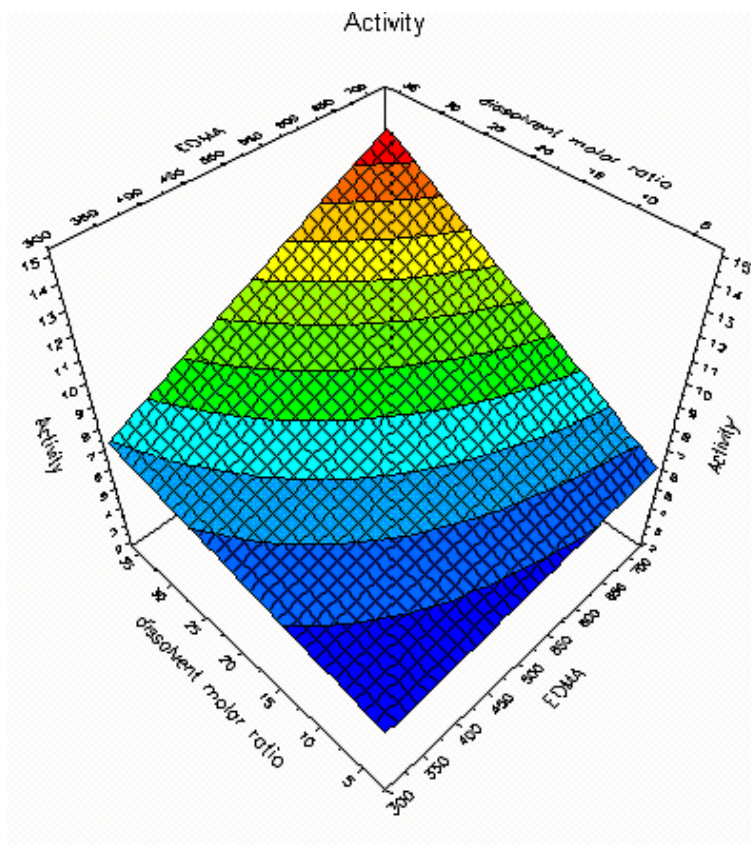


Fig. 3.11. Gràfics de superfície de resposta: activitat enzimàtica de les membranes de polímers monolítics respecte de la relació molar de dissolvents porogènics i el contingut d'EDMA a tres nivells d'AEM (a: 70 mg, b: 85 mg, c: 100 mg).

La immobilització es basa en l'activació de l'endo-1,4- β -xilanas II a través d'una reacció d'acoblament de l'enzim amb 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) hidroclozur, en presència de N-Hidroxisuccinimida (NHS) (fig. 3.12). Concretament, la carbodiimida catalitza la formació dels enllaços amida entre els grups àcid carboxílic (-COOH) i grups amino de la membrana, els quals provenen de l'AEM. Aquesta reacciona amb els grups àcid carboxílic i els activa formant un intermedi actiu O-acilurea, el qual pot acoblar-se a un grup amino i s'allibera un producte secundari per desplaçament. La NHS s'utilitza sovint per a assistir la reacció amb la carbodiimida en presència d'EDC,⁷ ja que n'incrementa l'eficiència. Així doncs es forma un enllaç NHS-éster, que és més estable en dissolució aquosa a pH àcids o neutres,⁸ a diferència dels intermedis O-acilurea que s'obtenen només en presència d'EDC, i que posteriorment reaccionen amb l'amiNa per formar l'enllaç amida. La reacció es mostra a continuació:

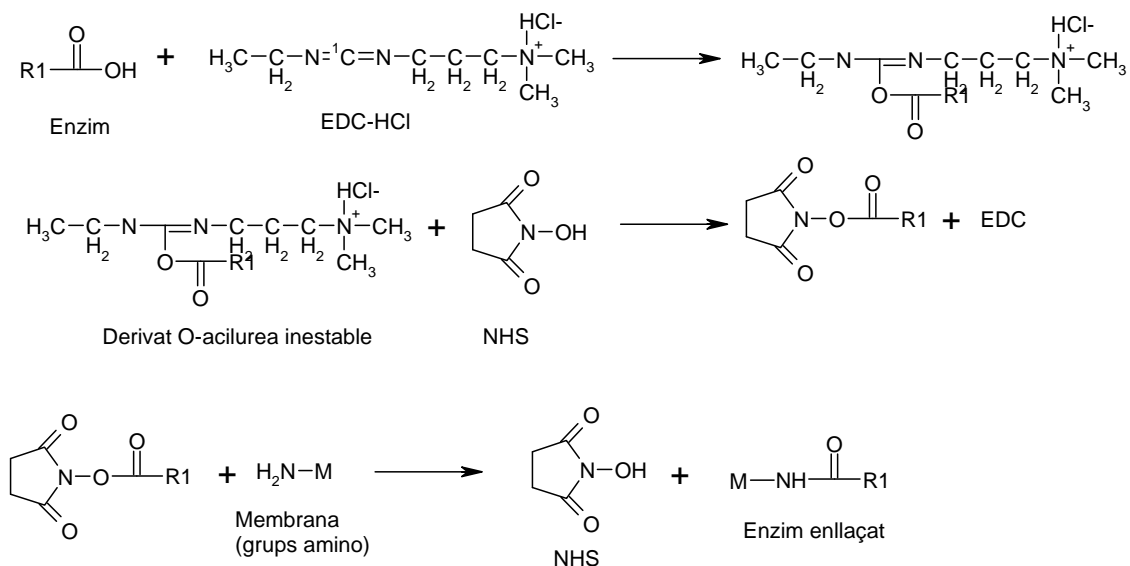


Fig. 3.12. Reacció d'immobilització de l'enzim assistida per EDC i NHS a les membranes de polímers monolítics per a la formació d'un enllaç covalent.

En incrementar la quantitat d'AEM hi ha un increment de grups amino disponibles per a enllaçar-se amb l'endo-1,4- β -xilanasasa II i, per tant, augmenta la quantitat d'enzim immobilitzat a la membrana. Tanmateix també s'observa que, quan es treballa amb concentracions d'AEM inferiors al valor òptim, les línies de contorn de valors d'isoresposta són més properes entre si, de manera que qualsevol canvi en la composició del sistema (per exemple, per errors experimentals) pot resultar en canvis més grans en l'activitat enzimàtica. Aquest comportament posa de manifest que les membranes que tenen continguts baixos d'AEM són també menys robustes enfront de canvis a la composició de la membrana, a conseqüència d'errors experimentals durant el procés de preparació. Per tant, els millors resultats s'obtenen treballant amb 100 mg d'AEM.

Efecte del contingut d'EDMA en l'activitat enzimàtica de les membranes

La variació del contingut d'agent d'entrecreuament o *crosslinker* en la dissolució precursora de membrana afectarà tant la composició com les propietats poroses dels polímers monolítics resultants. S'observa que una quantitat d'EDMA més gran condueix a l'obtenció de membranes que presenten una activitat enzimàtica més alta. Aquest increment es podria explicar pel fet que una estructura més entrecreuada proporciona una àrea superficial més extensa, ja que disminueix de la mida mitjana de porus, a conseqüència de la formació de glòbuls entrecreuats amb menor tendència a aglomerar-se.⁹ Per tant, les membranes de polímers monolítics es caracteritzen per tenir

una superfície reactiva més àmplia que les ACPS, la qual alhora augmenta en incrementar el contingut d'EDMA utilitzat en la seva preparació. Aquesta superfície més gran és la que està disponible per a reaccionar amb els grups funcionals de l'enzim, durant la reacció d'immobilització de l'endo-1,4- β -xilanasasa II. Així, la quantitat d'EDMA òptima és de 714 μ l.

Efecte de la relació molar de dissolvents porogènics en l'activitat enzimàtica

El paper dels dissolvents porogènics en la preparació de les dissolucions precursors de polímers monolítics és el control de la porositat final dels materials obtinguts sense afectar la seva composició, ja que aquests dissolvents són eliminats un cop completada la polimerització i, per tant, no són presents als polímers obtinguts. En diferents estudis s'ha comprovat la importància de l'efecte d'aquests dissolvents en l'estructura porosa dels polímers monolítics.¹⁰ En el present cas, el ciclohexanol i el dodecanol se seleccionen com a parell de dissolvents porogènics per al desenvolupament de les membranes de polímers monolítics. S'observa que un increment de la quantitat de ciclohexanol respecte del dodecanol condueix a un augment de l'activitat enzimàtica de les membranes, la qual cosa pot ser conseqüència d'una major quantitat d'enzim immobilitzat a la membrana. En alguns estudis es verifica que, quan augmenta la relació molar de dodecanol respecte de ciclohexanol, l'estructura dels polímers monolítics es caracteritza per tenir porus més grans, perquè el dodecanol és pitjor dissolvent i evita l'extensió de la polimerització dels monòmers als glòbuls que es formen a les etapes primerenques del procés de polimerització, la qual cosa resulta en la formació de cavitats, conegudes amb el nom de *voids*, grans entre aquests glòbuls.^{9, 11} D'altra banda, quan la quantitat de ciclohexanol és més gran, els polímers monolítics que s'obtenen estan caracteritzats per presentar porus més petits perquè els monòmers continuen polimeritzant entorn dels glòbuls que ja s'han format, de manera que es disminueix la dimensió dels *voids* i dels porus de l'estructura polimèrica. En aquest darrer cas, en el qual es formen porus menors a l'estructura dels polímers monolítics, hi ha una tendència a incrementar l'activitat enzimàtica de la membrana, probablement a conseqüència del fet que hi ha més superfície disponible per a la càrrega d'enzim a les membranes.

Capacitat predictiva del model

En aquest punt es determina també la capacitat predictiva del model. D'acord amb la funció *Optimizer* del programa Modde© 6.0 d'Umetrics© i fixant la quantitat d'EDMA i AEM a un nivell constant, el qual correspon als millors resultats observats a partir dels gràfics de superfície de resposta (és a dir, 714 µl i 100 mg, respectivament), s'optimitza la relació molar de dissolvents. L'activitat enzimàtica s'ajusta entre 14,7 U/ml (el millor resultat obtingut amb el model) i un valor aleatori de 25 U/ml. El límits de la relació molar de dissolvents es fixen entre el valor que conduïa a l'obtenció de la millor membrana del model i un valor de 100. El programa suggereix un valor òptim per a la relació molar de dissolvents de 100. Es prepara una nova membrana amb la composició obtinguda a l'optimització, la qual s'anomena N23, i se'n determina l'activitat enzimàtica realitzant tres replicats. El valor obtingut és $29,13 \pm 0,80$ U/ml, el qual és molt proper al valor predit pel model (29,10). Es prepara una altra membrana, anomenada N24, tot mantenint les mateixes quantitats d'EDMA i AEM que l'anterior, però ajustant la relació molar de dissolvents a un valor superior (748). En aquest cas també es determina l'activitat enzimàtica, que és $28,62 \pm 0,6$ U/ml; és a dir, no difereix significativament del valor d'activitat enzimàtica de la membrana N23. Per tant, aquest resultat demostra que, malgrat s'incrementi la proporció de ciclohexanol (en augmentar la relació molar ciclohexanol:dodecanol), aquest increment no condueix a un augment de l'activitat enzimàtica de les membranes. Probablement, quan es treballa amb continguts molt baixos de dodecanol, tot i l'augment de la superfície activa de la membrana, la major presència de porus tan petits limita la difusió del substrat dins l'estructura de la membrana, de manera que no s'observa un augment del rendiment de la reacció enzimàtica, cosa que justifica el valor d'activitat de la membrana N24. D'aquesta manera, es comprova la capacitat predictiva del model respecte de l'activitat de les membranes enzimàtiques, en relació amb la composició de la dissolució precursora de polímers monolítics.

Tanmateix, la resta d'experiments i proves de caracterització de la present tesi doctoral es duran a terme emprant una nova membrana, que s'anomenarà N25, la composició de la qual serà: EDMA 714 µl, AEM 85 mg i amb una relació molar de dissolvents de 49,15 (i considerant els altres components: HEMA 610 µl i HMPP 215 µl). El valor experimental d'activitat que presenta és de $15,90 \pm 0,50$ U/ml, el qual també coincideix amb el valor predit pel model matemàtic (15,93). La selecció d'aquesta composició de membrana es realitza en funció de criteris econòmics i de disponibilitat de reactius, i

correspon a la relació de dissolvents òptima per a un ajust del contingut d'EDMA de 714 µl i d'AEM 85 mg.

3.3. Caracterització de membranes d'acrilat de polisulfona i membranes de polímers monolítics

3.3.1. Capacitat d'immobilització d'enzims

Immobilització estàtica

Per a calcular la quantitat d'enzim que ha estat immobilitzat a les membranes en condicions estàtiques, es determina la concentració d'enzim a la dissolució abans i després de la immobilització, de manera que la diferència de proteïna és la que ha estat retinguda, a partir de la següent equació:

$$Q = C_0 * (1 - C/C_0) * V \quad (3.2)$$

On Q és la quantitat d'enzim immobilitzat, C_0 la concentració inicial de proteïna a la dissolució (en aquest cas 0,5 mg/ml), C és la concentració de proteïna final, és a dir, al cap de 24 hores que la membrana ha estat submergida a la dissolució, i V és el volum total de dissolució (50 ml).

Tenint en compte que els experiments d'immobilització es realitzen amb 5 membranes alhora per a cada experiment, i que cadascuna té un diàmetre de 2,5 cm i un gruix de 100 µm, es pot calcular la quantitat d'enzim que s'immobilitza per ml de membrana.

Els resultats obtinguts als experiments d'immobilització estàtica de l'endo-1,4-β-xilanasa II (*Multifect Xylanase*®) i lisozim (*Lysozyme from chicken egg white*), en membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) i membranes de polímers monolítics (N25), es mostren a continuació.

<i>Membrana</i>	<i>Enzim</i>	<i>Quantitat enzim immobilitzat (mg)</i>
ACPS	endo-1,4-β-xilanasa II	36,92 ± 0,02
	Lisozim	10,3 ± 0,4
N25	endo-1,4-β-xilanasa II	26 ± 2
	Lisozim	2,5 ± 0,2

Taula 3.5. Resultats d'immobilització estàtica.

A la vista dels resultats, cal destacar en primer lloc que la capacitat de les membranes per a immobilitzar enzims depèn no només del tipus i de les característiques del suport, sinó també de l'enzim que es consideri. Tenint en compte que la immobilització té lloc a través de la formació d'un enllaç covalent, el procés es veurà afectat per les característiques de cada enzim, com per exemple els possibles impediments estèrics propis de cada proteïna, que dependran de la seva conformació i estructura terciària. En aquest cas, estem comparant endo-1,4-β-xilanasa II, que és l'enzim d'interès per al

projecte, amb lisozim, que és una proteïna que s'utilitza habitualment per a realitzar estudis d'immobilització en diferents suports.¹² Addicionalment, tots dos enzims presenten el mateix mecanisme catalític d'hidròlisi,¹³ per la qual cosa es fa encara més adient la seva comparació.

Quan es comparen les membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) amb les membranes de polímers (N25), s'observa que la quantitat d'enzim immobilitzat en les mateixes condicions és superior en el primer cas, i que aquest comportament és comú per als dos enzims considerats. Si es consideren les reaccions entre el suport i els grups funcionals de l'enzim, en el cas de l'acrilat de polisulfona es tracta d'una reacció de Michael entre un doble enllaç conjugat amb un carbonil, que és molt reactiu i grups amino de lisines i arginines de l'enzim. En principi, en aquest cas, tots el grups amino d'aquests aminoàcids de totes les molècules d'enzim presents haurien d'estar disponibles per a reaccionar amb els dobles enllaços de la polisulfona. En la reacció d'immobilització en els polímers monolítics, en canvi, es tracta d'una transesterificació, i les molècules d'enzim, prèviament a l'enllaç amb els grups amino de l'AEM, s'han d'enllaçar amb NHS. Malgrat hi ha un excés de NHS en el medi, no es pot assegurar que totes les molècules d'enzim estiguin enllaçades al NHS i, per tant, que puguin estar disponibles per enllaçar-se al suport. Un altre aspecte és l'accessibilitat dels reactius que intervenen en la reacció. Quan l'enzim està enllaçat a NHS pot tenir menor accessibilitat per a reaccionar amb els grups amino de la membrana. En canvi, en la reacció amb l'acrilat de polisulfona, en tractar-se d'un doble enllaç terminal, l'enzim, que d'altra banda es troba en forma lliure, pot tenir menys impediments estèrics en apropar-se al polímer a l'hora de formar-se l'enllaç covalent. Aquests resultats indicarien que les membranes ACPS presenten unes millors característiques per a la immobilització d'enzims, malgrat que aquesta dada no fa referència a l'activitat de l'enzim immobilitzat, la qual cosa es comentarà més endavant en aquest capítol.

Immobilització dinàmica

Tal com s'ha descrit als apartats 2.1.2.3 i 2.1.2.7, es realitzen experiments d'immobilització en condicions dinàmiques. En aquests casos es representa el gràfic de C_i/C_0 (on C_i és la concentració d'enzim a cada punt i C_0 la concentració d'enzim inicial) respecte del volum total de dissolució d'enzim que es fa passar a través de la membrana. Quan el valor de C_i/C_0 s'aproxima a 1 i es manté constant, indicarà que la membrana ja no està immobilitzant més enzim. Per a determinar la quantitat d'enzim retingut es

realitza una integració numèrica, considerant els punts anteriors a la regió plana constant de C_i/C_0 , utilitzant les fórmules següents:

$$q_i = C_0 * (1 - C_i/C_0) * \Delta V_i \quad (3.3)$$

$$Q = \sum_{i=1}^n q_i \quad (3.4)$$

On C_0 és la concentració inicial de proteïna a la dissolució (0,5 mg/ml), C_i és la concentració de proteïna a cada punt i ΔV_i és la diferència de volums entre cada punt considerat. Els punts que s'hi inclouen comprenen des dels punts inicials fins que s'assoleix la regió plana del gràfic, en què C_i/C_0 és constant i propera a 1. La quantitat total Q és la suma de les integracions parcials i , a partir d'aquest valor, tenint en compte que els experiments també s'han realitzat amb 5 membranes de 2,5 cm de diàmetre i un gruix de 100 μm , es pot calcular la quantitat d'enzim immobilitzat a cada membrana com en el cas de la immobilització estàtica. A continuació, es mostren els gràfics d'immobilització dinàmica:

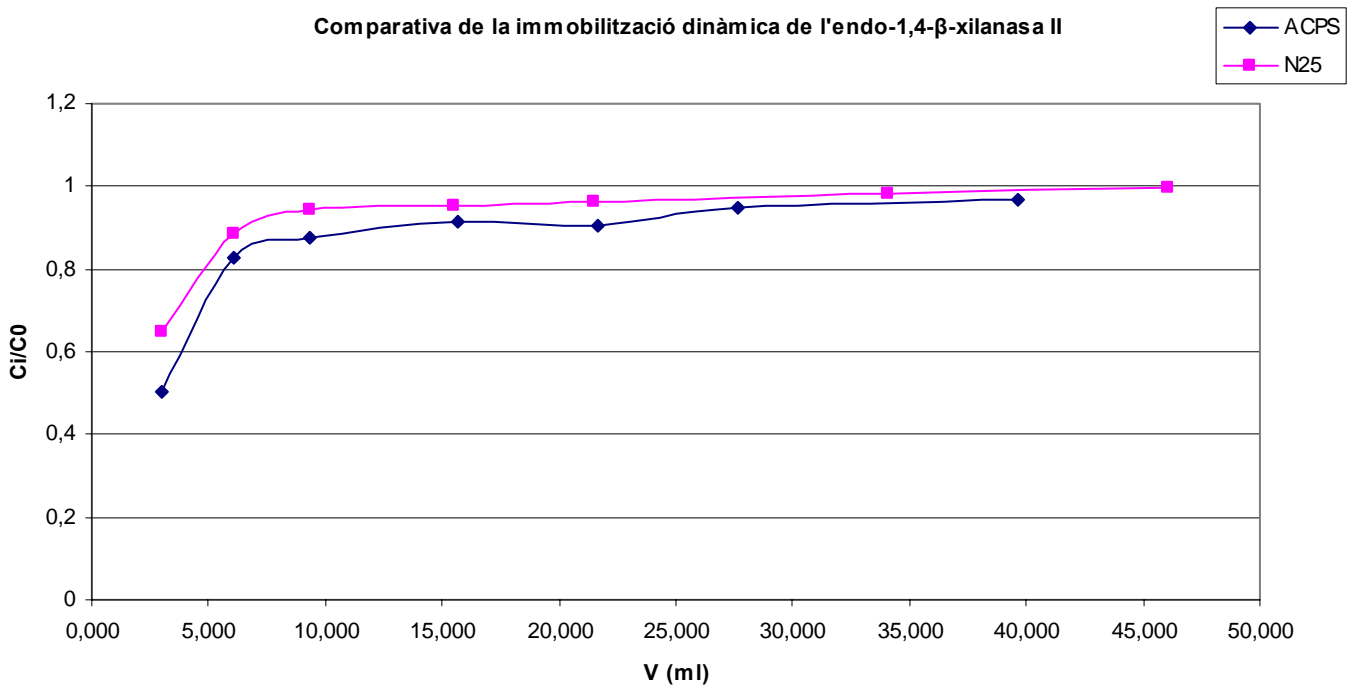


Fig. 3.13. Gràfic del perfil d'immobilització en condicions dinàmiques per a les membranes ACPS.

Comparativa de la immobilització dinàmica del lisozim

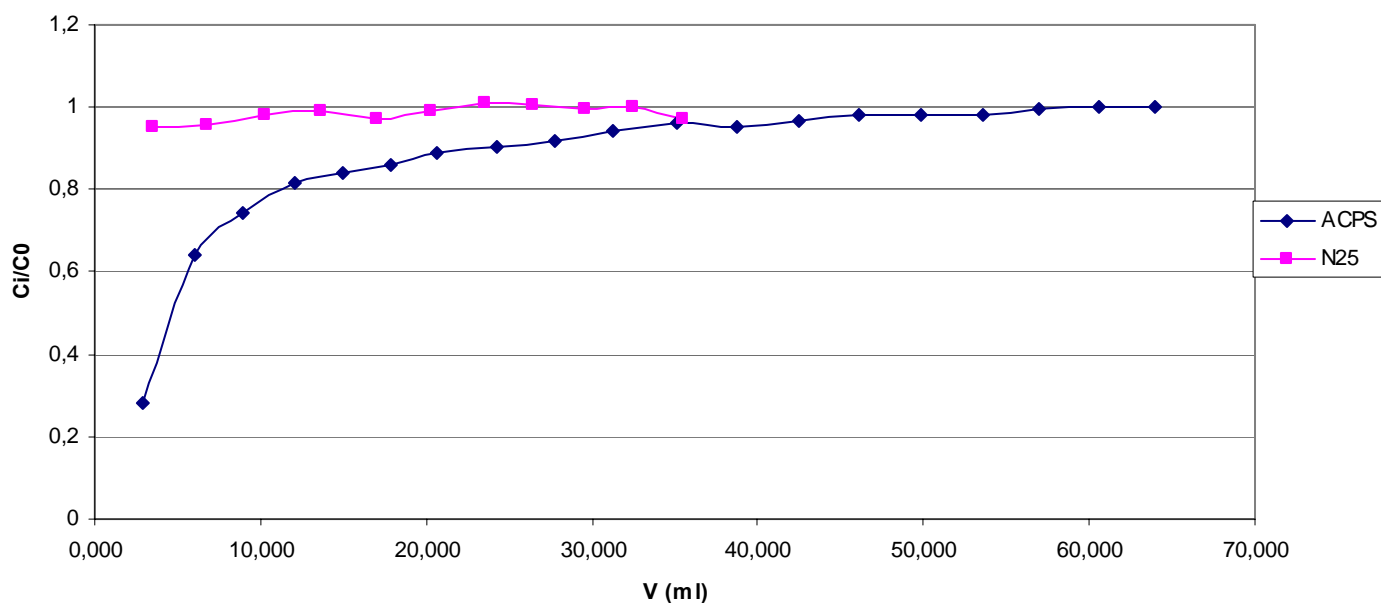


Fig. 3.14. Gràfic del perfil d'immobilització en condicions dinàmiques per a les membranes N25.

S'observa que el perfil d'immobilització dinàmic de lisozim a la membrana N25 és pràcticament constant des del principi de l'experiment, per la qual cosa no s'han pogut realitzar els càlculs corresponents. Respecte dels perfils d'immobilització de l'endo-1,4- β -xilanasasa II amb els dos suports polimèrics, s'han considerat en tots dos casos els 6 primers punts per a realitzar la integració numèrica. Tenint en compte els resultats de C_i/C_0 obtinguts a partir de la concentració d'endo-1,4- β -xilanasasa II determinada per HPLC.

Els resultats numèrics obtinguts en aquest cas es recullen a la taula 3.6.

Membrana	Enzim	Quantitat d'enzim immobilitzat (mg)
ACPS	endo-1,4- β -xilanasasa II	11,2 + 0,3
	Lisozim	10,0 + 0,2
N25	endo-1,4- β -xilanasasa II	11,0 + 0,1
	Lisozim	No calculable

Taula 3.6. Resultats d'immobilització dinàmica.

S'observa que els valors tant per a l'endo-1,4- β -xilanasasa II com per al lisozim, en el cas de les membranes ACPS, són molt propers entre ells, si bé sembla que la capacitat per a immobilitzar l'endo-1,4- β -xilanasasa II és una mica més gran, tot i que s'hauria de comprovar amb més detall amb la realització de més replicats per a poder fer aquesta afirmació. Respecte de la membrana N25, tal com s'ha comentat, no es disposen de valors per a comparar entre els 2 enzims. Sí que s'observa que en condicions

dinàmiques no hi ha pràcticament diferències a l'hora d'immobilitzar l'endo-1,4- β -xilanas II amb qualsevol dels dos suports polimèrics emprats.

Comparant globalment els resultats de la immobilització estàtica amb la dinàmica, es pot afirmar que s'obtenen valors superiors d'immobilització d'enzim en condicions estàtiques, a diferència del que s'esperava *a priori*. Tenint en compte que en el procés dinàmic es fa circular la dissolució d'enzim a través de l'estructura interna de les membranes, i que d'aquesta manera la dissolució d'enzim està en contacte amb els grups funcionals presents a l'interior de l'estructura d'aquestes, és d'esperar que hi hagi més grups funcionals susceptibles de reaccionar amb l'enzim. Així, els resultats obtinguts poden ser conseqüència que el temps de residència fixat per a treballar en condicions dinàmiques (49 segons) no és prou alt perquè tingui lloc la reacció d'immobilització amb prou extensió. Si es té present que en els experiments en estàtic el suport polimèric (membrana) i la dissolució d'enzim han estat en contacte durant 24 hores, malgrat que en els experiments dinàmics s'ha recirculat dissolució nova d'enzim en tot moment, globalment el temps de contacte enzim-membrana és menor en dinàmic que en estàtic, i pot ser la causa d'aquests resultats més baixos en dinàmic respecte dels experiments en estàtic.

3.3.2. Influència del temps d'immobilització en l'activitat enzimàtica de les membranes

Així, doncs, tenint present la consideració de l'apartat anterior, i amb l'objectiu de comprovar l'eficiència de la immobilització, en termes ja no de la quantitat d'enzim retinguda, sinó de l'activitat enzimàtica de les membranes enfront de la hidròlisi de *Birchwood Xylan*, es calcula aquest paràmetre en funció del temps d'immobilització en condicions estàtiques, és a dir, el temps en el qual les membranes estan en contacte amb la dissolució d'enzim. És important que les membranes tinguin capacitat d'immobilitzar enzim, però encara és molt més important que aquest enzim, un cop immobilitzat, presenti activitat enzimàtica, ja que en cas contrari la immobilització no tindria sentit. Podria donar-se el cas que un material presenti molt bones característiques per a immobilitzar enzims i altes capacitats de retenció, però que, en canvi, l'enzim un cop immobilitzat no fos actiu, la qual cosa faria inviable el seu ús per a les aplicacions que ens hem proposat.

S'analitza l'activitat enzimàtica relativa per a cada punt respecte del valor màxim de cada sèrie d'estudis, expressada en U/ml de membrana (definició al capítol 2), que es

calcula a partir de la concentració dels productes alliberats en 10 minuts d'hidròlisi enzimàtica, determinada amb el mètode de Nelson, tenint en compte que s'han estudiat membranes d'1cm² i 100 µm de gruix. Els resultats obtinguts per als dos tipus de membranes es representen al gràfic següent:

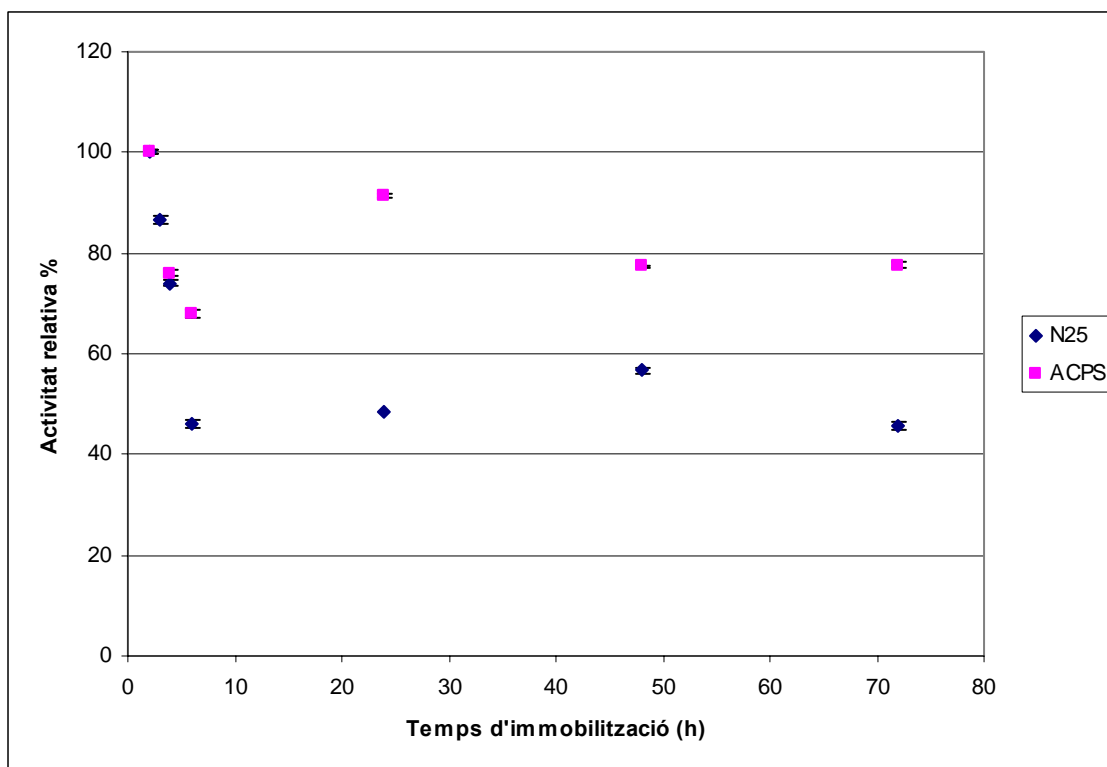


Fig. 3.15. Activitat enzimàtica relativa de les membranes respecte del temps d'immobilització estàtica.

A partir del gràfic, s'observa que a les membranes ACPS el temps d'immobilització que sembla més adequat en condicions estàtiques és de 24 hores,¹⁴ mentre que a les membranes N25 dues hores de reacció són suficients per a obtenir la màxima activitat enzimàtica. En tots dos casos, la reacció té lloc a temperatura ambient i l'enzim es conserva a 4 °C per a evitar pèrdua d'activitat per desactivació tèrmica.

D'altra banda, es pot calcular l'activitat relativa de l'enzim immobilitzat, respecte de l'activitat de l'enzim en forma lliure que correspondria a la quantitat de dissolució d'endo-1,4-β-xilanasa II comercial (concentració 93 mg/ml). Per a cada cm² de membrana s'havia utilitzat 1 ml de medi d'immobilització que conté 0,5 mg enzim/ml; per tant, s'han considerat 0,5 mg d'enzim. Això correspon a una alíquota de dissolució comercial de 5,4 µl (concentració 93 mg/ml) per a tenir també 0,5 mg d'endo-1,4-β-xilanasa II a les mostres. Aquest enzim lliure dona un valor d'activitat de 38,98 U/ml. Si els millors valors d'activitat enzimàtica trobats a l'estudi anterior per a cada membrana són 13,57 i 12,8 per a ACPS i N25 respectivament, això significa que els valors

d'activitat relativa dels enzims immobilitzats respecte de la seva forma lliure són 34,8% i 32,8%. Són valors semblants, de manera que es pot dir que l'eficiència de la immobilització en ambdues membranes és comparable. En cap dels casos no es pot esperar un percentatge d'activitat relativa respecte de la forma lliure proper a 100, ja que sempre en el procés d'immobilització s'ha de considerar que una part de les molècules immobilitzades poden tenir alteracions en la seva estructura o bé es pot produir el bloqueig dels centres actius per enllaç a través dels grups funcionals dels aminoàcids dels centres actius entre d'altres causes, que fan que no siguin efectives des del punt de vista catalític.

3.3.3. Estabilitat temporal de les membranes enzimàtiques

Un cop seleccionat el temps d'immobilització per a cada suport polimèric, es preparen diferents membranes de cada tipus, i un cop incorporat l'enzim es conserven a 4 °C en aigua destil·lada. La seva activitat enzimàtica es determina al cap de 3, 12, 14 i 38 dies d'haver immobilitzat l'enzim. Els resultats obtinguts es recullen a la taula 3.7.

<i>Temps (dies)</i>	<i>ACPS (U/ml)</i>	<i>N25 (U/ml)</i>
3	10,54 ± 0,05	13,6 ± 0,3
12	10,27 ± 0,02	7,8 ± 0,2
14	10,90 ± 0,06	7,7 ± 0,9
38	8,667 ± 0,004	6,7 ± 0,6

Taula 3.7. Estabilitat de l'activitat enzimàtica de les membranes amb el temps.

S'observa en tots dos casos un descens de l'activitat enzimàtica de les membranes a mesura que passa el temps tot i la seva conservació a 4 °C; el descens és més notable i més immediat a les membranes N25. Tot i així, la diferència d'activitat entre el dia 14 i el 38, en tots dos casos, no és considerable, i concretament a la membrana N25 no és significativa. Així, doncs, es pot afirmar que, després de la disminució de l'activitat inicial de totes dues membranes, aquestes mantenen prou bé la seva activitat enzimàtica almenys durant un mes després de la seva preparació, fet que afavoreix la seva aplicació.

3.3.4. Efecte de la immobilització en l'activitat enzimàtica respecte del pH i la temperatura

L'activitat de les membranes enzimàtiques preparades es caracteritza en termes de la influència del pH de la dissolució aquosa i de la temperatura de treball, i se'n comparen els resultats amb el comportament de l'enzim lliure (dissolució comercial). Es troben els mateixos valors de pH i temperatura òptims, tant per a les membranes ACPS com per a

l'enzim lliure (pH 6,0; 50 °C), tal com s'observa a les fig. 3.16 i 3.17. En canvi, en el cas de les membranes de polímers monolítics (N25) s'observa que el pH òptim s'ha desplaçat cap a pH = 5,0, mentre que la temperatura òptima coincideix a 50 °C, com en els casos anteriors.

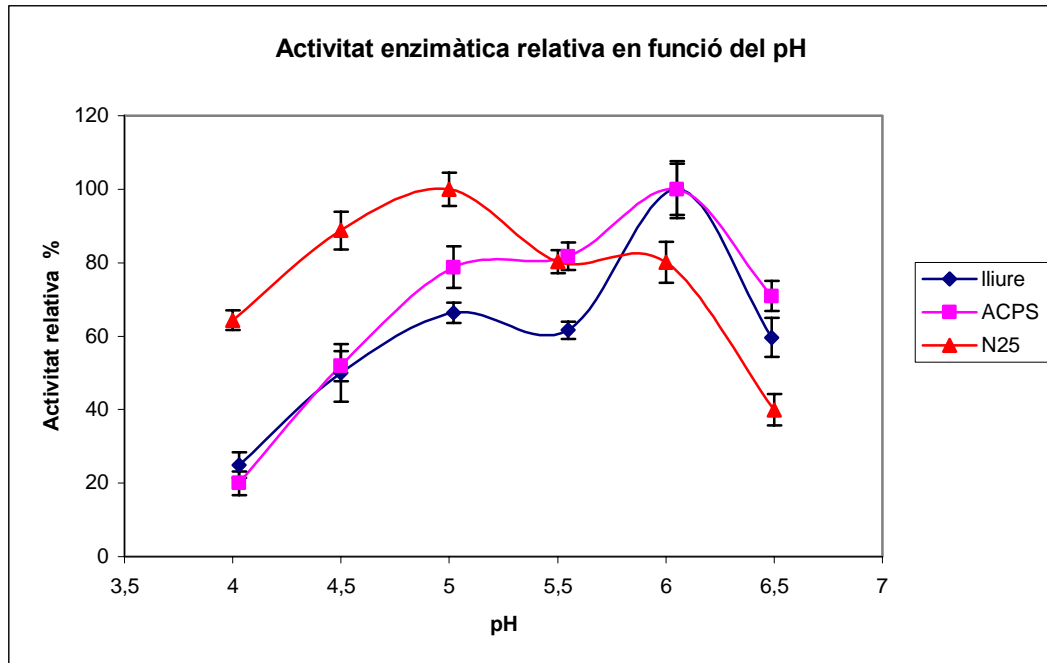


Fig. 3.16. Perfil d'activitat enzimàtica relativa de l'enzim lliure (◆) i immobilitzat, en membranes ACPS (■) i N25 (▲), en funció del pH del medi.

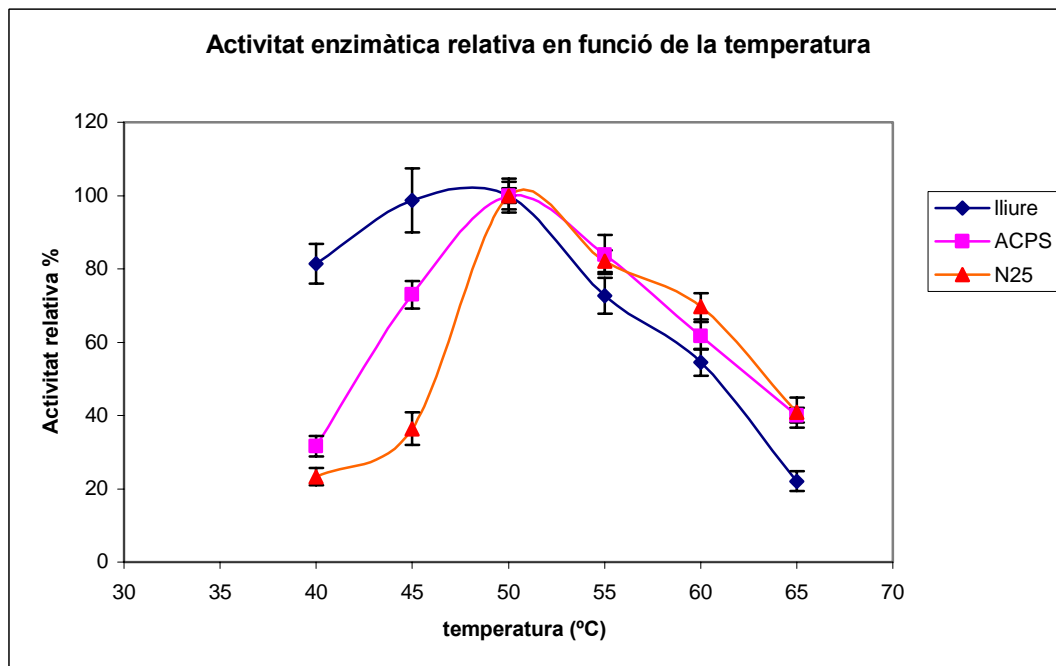


Fig. 3.17. Perfil d'activitat enzimàtica relativa de l'enzim lliure (◆) i immobilitzat en membranes ACPS (■) i N25 (▲), en funció de la temperatura.

D'acord amb aquestes observacions, es pot afirmar que l'estructura del lloc actiu de l'endo-1,4- β -xilanasas II i les característiques del microentorn de l'enzim lliure i immobilitzat a les membranes ACPS són iguals.¹⁵ Addicionalment, també s'observa una menor variació de l'activitat enzimàtica de l'endo-1,4- β -xilanasas II quan aquesta es troba immobilitzada a les membranes ACPS enfront de canvis de pH i de temperatura, especialment a temperatures superiors a l'òptima.¹⁴ Els resultats mostren que, en el rang de pH considerat, l'activitat relativa és superior per a l'enzim immobilitzat a les membranes ACPS que per a l'enzim en dissolució. Això significa que la forma immobilitzada està més protegida que la lliure.¹⁵ Normalment, els enzims immobilitzats presenten major resistència a la desactivació. L'enzim es troba confinat en una regió que no està tan exposada al medi com en el cas de l'enzim lliure. A conseqüència d'aquesta restricció, el microentorn al voltant de l'enzim no estarà afectat en la mateixa extensió que el conjunt de la dissolució pels canvis de les característiques del medi. Per al cas de l'enzim immobilitzat a les membranes N25, hi ha un desplaçament del pH òptim cap a pH més àcid, pH = 5. També a pH inferiors, l'activitat relativa en aquest cas és més alta que per a l'enzim lliure i que per a les membranes ACPS. El desplaçament cap a pH inferiors pot ser interessant des del punt de vista de les aplicacions de les membranes, si es vol combinar la hidròlisi enzimàtica amb la hidròlisi àcida dels materials lignocel·lulòsics, ja que aquesta té lloc en medi àcid i en aquest cas el medi seria adequat per a la hidròlisi enzimàtica emprant membranes.

En el rang de temperatures estudiat, tal com es veu a la fig. 3.17, l'activitat relativa, tant de les membranes ACPS com N25, a temperatures per sobre de l'òptima, és més alta que l'activitat relativa de l'enzim lliure (per exemple, a 55 °C, 83,9%, 82,1% i 72,7%, respecte del màxim per a ACPS, N25 i endo-1,4- β -xilanasas II lliure, respectivament). Aquests resultats probablement signifiquen una resistència més gran a la desactivació tèrmica com a conseqüència d'un reforçament del lloc catalític causat pel procés d'immobilització, el qual crea enllaços forts entre la macromolècula i el suport.¹⁶ Així, doncs, s'ha trobat un increment de la resistència de l'enzim enfront de la desactivació tèrmica quan s'immobilitza, la qual cosa és important per a obtenir membranes eficaces per a les seves corresponents aplicacions posteriors.

3.3.5. Paràmetres cinètics de les membranes enzimàtiques

Per tal d'entendre la importància de la determinació dels paràmetres cinètics i com es calculen, cal prèviament tenir presents algunes consideracions teòriques.

Com ja s'ha comentat al llarg d'aquesta tesi, l'activitat d'un enzim reflecteix la capacitat que té per a transformar un substrat en un determinat producte per unitat de temps i es quantifica en les anomenades unitats internacionals (U), que mesuren els μmols de substrat transformats en producte o els μmols de producte formats per minut. Per tant, l'activitat enzimàtica es pot mesurar si es disposa d'un mètode que permeti avaluar l'aparició de producte en funció del temps de la reacció enzimàtica.

L'endo-1,4- β -xilanasa II és un enzim que presenta una cinètica de Michaelis-Menten.¹⁷ Aquest model cinètic és vàlid tenint en compte dues premisses: la concentració d'enzim és molt inferior a la concentració de substrat (és a dir, la concentració d'enzim és el factor limitant) i en el cas particular de l'estat estacionari, en el qual la concentració del complex enzim-substrat és constant (per tant $d[\text{ES}]/dt \sim 0$ en comparació a $d[\text{S}]/dt$ i $d[\text{P}]/dt$). Aquest és un exemple de l'aplicació de la consideració de l'estat quasi estacionari, en el qual s'assumeix que $d[\text{ES}]/dt \ll (d[\text{S}]/dt \text{ i } d[\text{P}]/dt)$.

Els enzims poden catalitzar moltes reaccions per segon. Per calcular la velocitat màxima d'una reacció enzimàtica, la concentració de substrat s'incrementa fins a arribar al punt en el qual s'assoleix una velocitat de formació de producte constant. Aquest valor correspon a la velocitat màxima de l'enzim (V_{max}). En aquest punt, tots els llocs actius de l'enzim estan saturats amb molècules de substrat. També es pot determinar la quantitat de substrat necessària per a aconseguir una determinada velocitat de reacció. Concretament, la concentració a la qual la velocitat de la reacció enzimàtica és la meitat de la velocitat màxima es coneix amb el nom de constant de Michaelis-Menten (K_m). Incrementant la concentració de substrat [S], la velocitat de la reacció s'acosta asimptòticament al seu valor màxim V_{max} , però en realitat mai no s'arriba a aquest valor; per tant, no es pot determinar [S] per a tenir V_{max} . Per això es determina la K_m com un paràmetre característic de l'enzim per a un substrat determinat. La K_m representa la constant de dissociació del complex enzim substrat (ES). Valors baixos de K_m indiquen que el complex ES és estable i, per tant, amb poca probabilitat es dissociarà abans de completar-se la transformació de substrat cap a producte. Per tant K_m dóna una idea de l'afinitat de l'enzim envers el substrat; d'aquí que sigui un paràmetre característic del parell enzim-substrat.

La deducció de les equacions cinètiques es presenta a continuació. En primer lloc es considera que la reacció enzimàtica és irreversible i, per tant, el producte no tornarà a unir-se amb l'enzim per a regenerar el substrat.



On E: enzim, S: substrat i P: producte.

Tenint en compte l'aproximació de l'estat estacionari s'ha de complir:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (3.6)$$

D'on s'arriba a:

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (3.7)$$

En aquest punt es defineix K_m com:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.8)$$

L'equació quedarà de la manera següent:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (3.9)$$

Si la velocitat de la reacció és:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (3.10)$$

I per balanç de masses de la concentració total d'enzim, tenim que $[E] = [E_0] - [ES]$, si se substitueix a l'equació 3.9, reordenant i aïllant $[ES]$ arribem a l'expressió següent:

$$[ES] = [E_0] \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (3.11)$$

I un cop reordenant i substituint a l'equació 3.10 s'obté l'anomenada equació de Michelis-Menten:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3.12)$$

Per a determinar gràficament els valors de K_m i V_{max} se sol utilitzar la representació doble recíproca ($1/V_0$ respecte a $1/[S]_0$), que rep el nom de representació de Lineweaver-Burk;¹⁸ V_0 és la velocitat de reacció inicial i $[S]_0$ la concentració de substrat

inicial. És una recta en la qual el pendent és K_m/V_{max} , l'abscissa a l'origen és $-1/K_m$ i l'ordenada a l'origen és $1/V_{max}$. Per tant, si es representa $1/V_0$ respecte de $1/[S_0]$, a partir d'una sèrie d'experiments amb $[E_0]$ (concentració d'enzim inicial) constant i diferents concentracions inicials de substrat es pot determinar V_{max} i K_m .

Per a cada membrana es representen els valors de concentració de producte amb el temps, a diferents concentracions de substrat. A partir d'aquestes representacions gràfiques es calcula V_0 , que és el pendent del tram lineal en els temps inicials de reacció. L'avantatge de mesurar velocitats inicials és que a l'inici de la reacció els canvis en la concentració de substrat són menyspreables, de manera que es pot considerar constant. Per tal de poder comparar els resultats de K_m amb els valors corresponents a l'enzim lliure, es calculen els valors de velocitat inicial en funció de la formació de producte per unitat de temps (nmol/s) i les concentracions de substrat com a mg de *Birchwood xylan*/ml. Els gràfics es mostren a continuació:

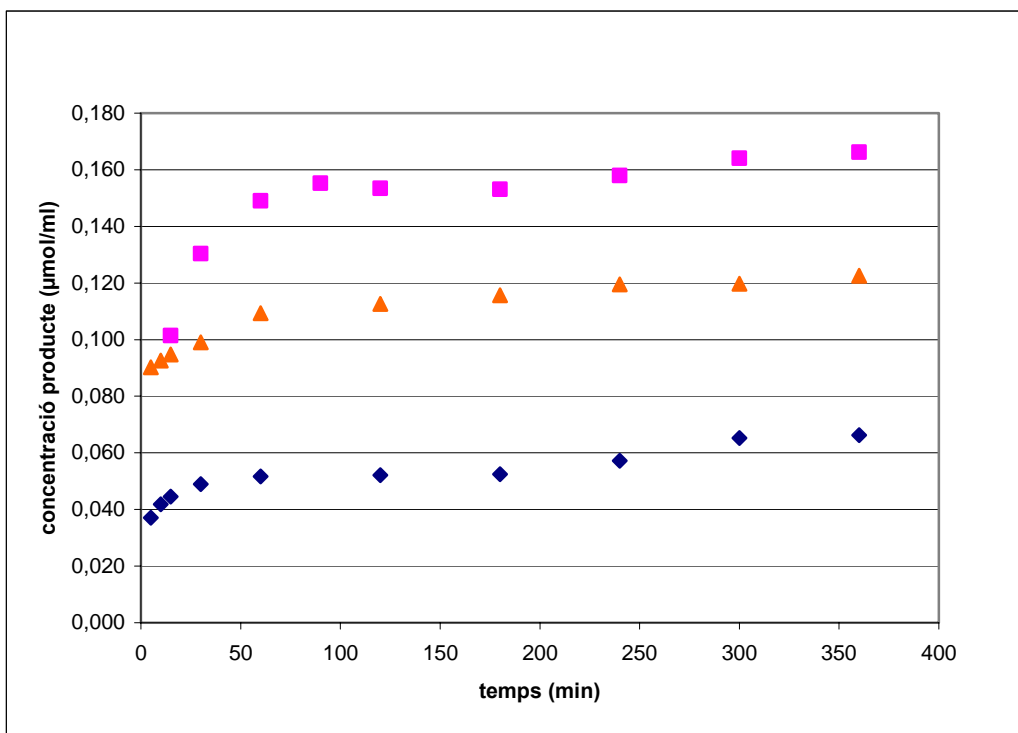


Fig. 3.18. Concentració de producte (xilosa) respecte del temps, a diferents concentracions de substrat en membranes ACPS. Concentracions de substrat: 0,1% (■); 0,05% (▲) i 0,025% (◆).

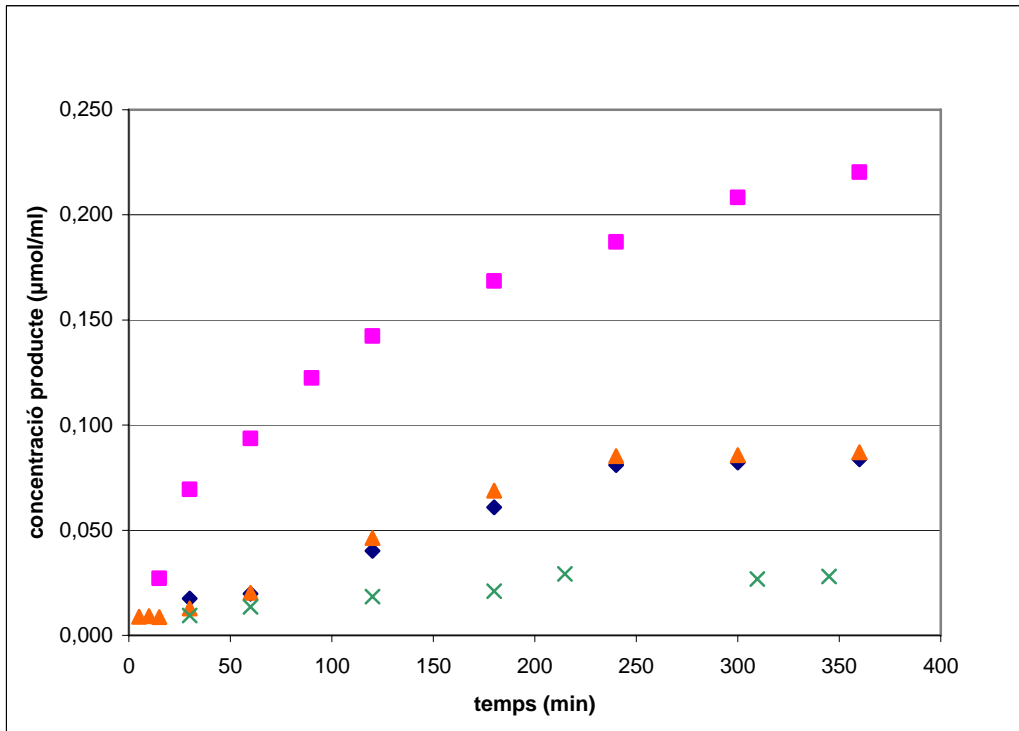


Fig. 3.19. Concentració de producte (xilosa) respecte del temps a diferents concentracions de substrat en membranes N25. Concentracions de substrat 0,1% (■); 0,05% (▲) i 0,025% (◆).

Les representacions gràfiques de dobles recíprocs i les velocitats inicials obtingudes per a cada membrana són:

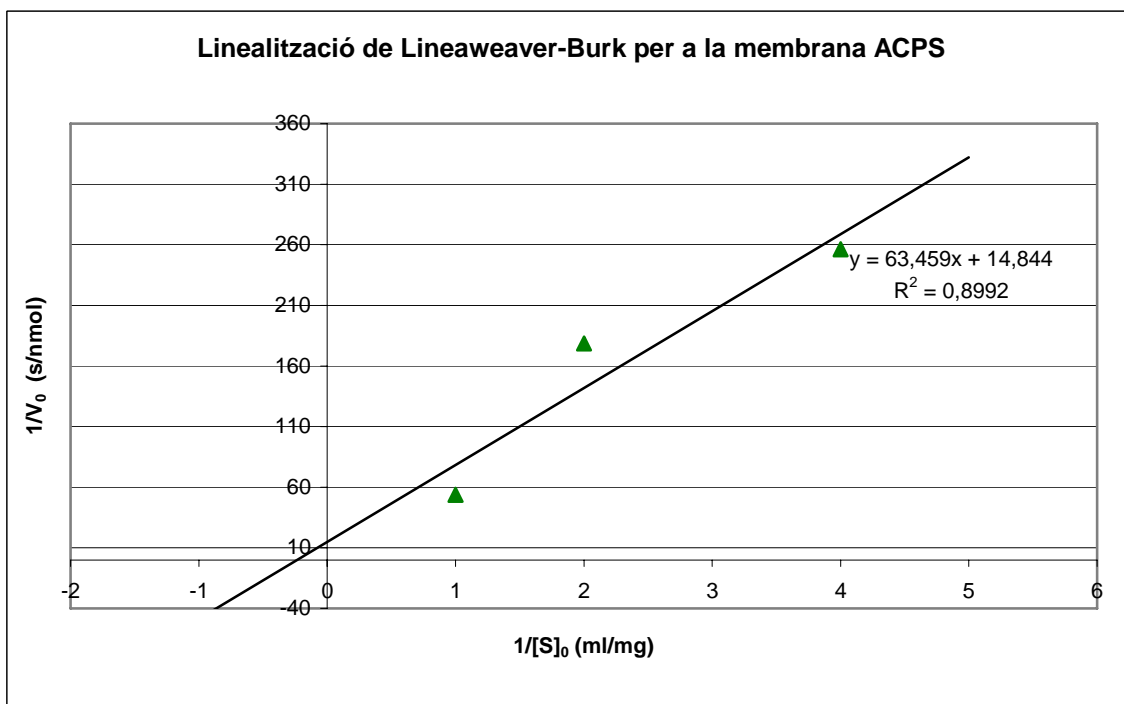


Fig. 3.20. Representació de dobles recíprocs per a les membranes ACPS.

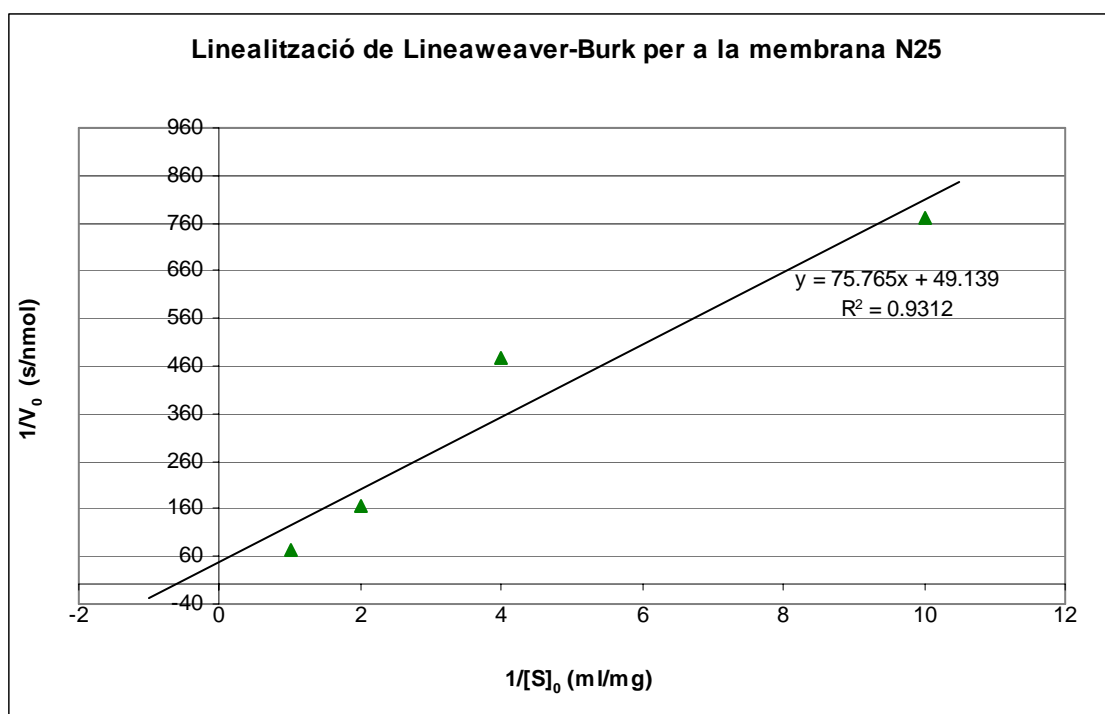


Fig. 3.21. Representació de dobles recíprocs per a les membranes N25.

A la taula 3.8 es recullen els valors numèrics considerats en la linealització, obtinguts per a cada membrana i per a cada concentració de substrat.

ACPS			N25		
$1/[S]_0$ (ml/mg)	$1/V_0$ (s/nmol)	V_0 (nmol/s)	$1/[S]_0$ (ml/mg)	$1/V_0$ (s/nmol)	V_0 (nmol/s)
1	53,76	0,0186	1	72,46	0,0138
2	178,57	0,0056	2	166,67	0,0060
4	256,41	0,0039	4	476,19	0,0021
			10	769,23	0,0013

Taula 3.8 Valors de velocitats inicials per a membranes ACPS i N25

A la membrana ACPS es realitza l'experiment també a $1/[S]_0=10$, però no s'observa el perfil asimptòtic que s'esperaria de la cinètica de Michelis-Menten. Malgrat que es realitzen replicats, els resultats són poc coherents, per la qual cosa no s'han considerat en el càlcul de K_m . Els valors de K_m obtinguts són $0,23 \pm 2$ mg/ml (membrana ACPS) i $1,54 \pm 5$ mg/ml (N25). Tenint en compte que els valors de K_m per a l'endo-1,4- β -xilanasas II lliure enfront de *Birchwood xylan* estan compresos entre 0,24 mg/ml¹⁹ i 1,8 mg/ml^{20,21} s'observa que els valors trobats per a l'endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzada a les diferents membranes són del mateix ordre de magnitud, si bé tenen uns errors d'incertesa molt grans respecte dels valors en si. Aquests errors s'han calculat a partir dels errors dels paràmetres de la regressió lineal.

En aquestes condicions, no s'observa un efecte en els paràmetres cinètics a conseqüència del procés d'immobilització i, per tant, no es pot saber si l'enzim té una menor o major afinitat pel substrat un cop immobilitzat. S'esperaria una disminució de l'afinitat de l'enzim immobilitzat pel substrat, a conseqüència de les restriccions estèriques, cosa que es traduiria en una K_m superior a la K_m per a l'enzim lliure. Cal tenir en compte que en la determinació de K_m hi intervenen altres fonts d'error: tant l'associada al mètode de Nelson, que és un mètode colorimètric, que s'ha utilitzat per a determinar les concentracions de producte, com també la possibilitat que les concentracions de les dissolucions de substrat no siguin exactament les considerades, ja que el *Birchwood Xylan* és força insoluble i pot ser que no s'hagi dissolt completament, fet que contribueix així a l'error d'exactitud del valor final. Es podria continuar valorant una millor determinació de K_m de l'enzim immobilitzat, tot i que comportaria una dedicació temporal que malauradament no s'ha pogut considerar en aquests moments.

3.3.6. Caracterització física

Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)

Les imatges SEM de la superfície de les membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) es mostren a la següent figura:

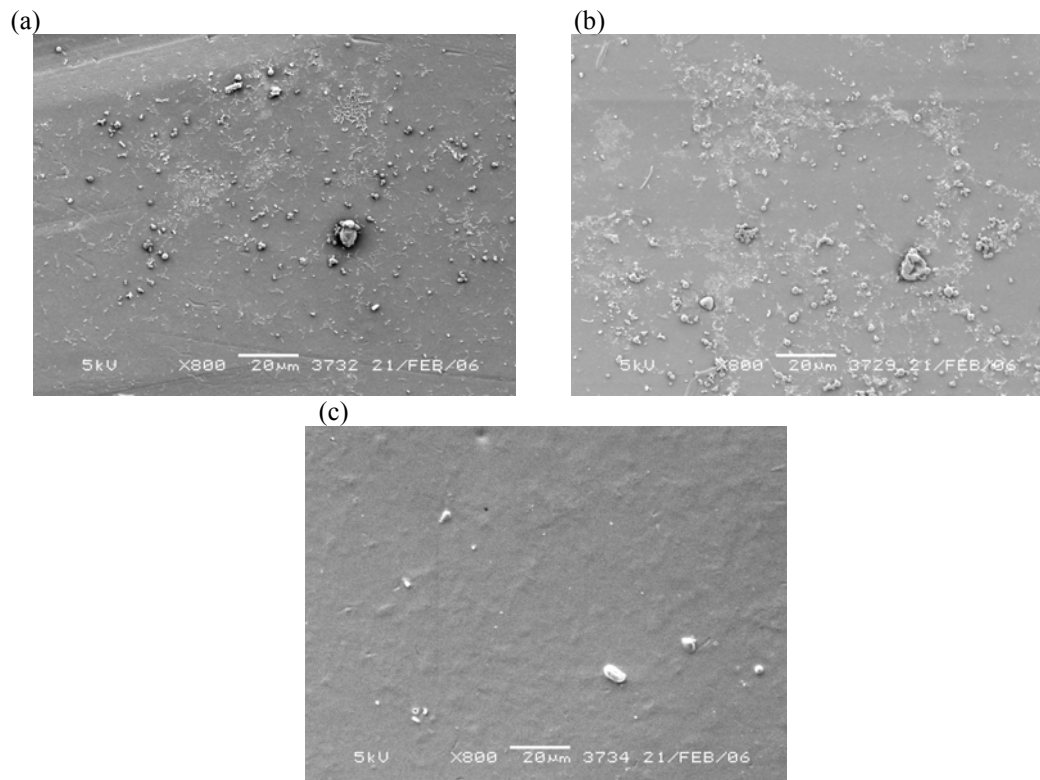


Fig. 3.22. Imatges SEM de la superfície de membranes ACPS (a) blanc (sense enzim) (b) amb endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada i (c) després d'usar-la en la reacció d'hidròlisi.

La primera (a) correspon a una membrana ACPS que no ha estat en contacte amb la dissolució d'endo-1,4- β -xilanasa II o membrana blanc, la segona (b) és la mateixa membrana després d'estar 24 hores en contacte amb la dissolució d'enzim. No s'observen diferències significatives entre elles. Les taques blanques són brutícia i contaminació superficial i no s'atribueixen a cap canvi induït per la presència de l'enzim. La fotografia 3.23 c mostra la membrana després d'haver-se utilitzat en un experiment d'hidròlisi enzimàtica de *Birchwood xylan*. En aquest cas sembla que la superfície presenta un aspecte més llis. De l'observació directa de la membrana després del seu ús, es veu que s'ha dipositat una capa de color marró que prové de la pròpia dissolució de substrat que probablement fa que en l'observació per microscopi s'aprecii una superfície més uniforme que recobreix les irregularitats pròpies de la membrana. De les mateixes membranes ACPS s'obtenen fotos SEM de talls transversals (fig. 3.23 a i b).

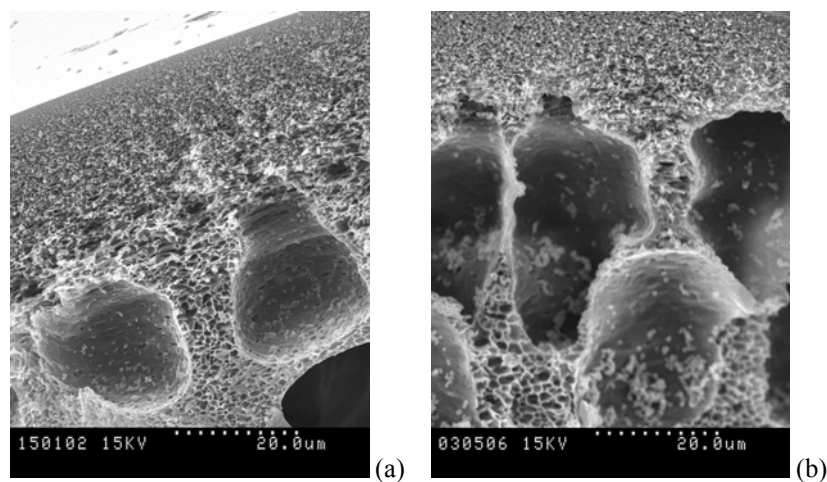


Fig. 3.23. Imatges SEM de talls transversals de membranes ACPS: (a) blanc i (b) amb endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada.

Com s'observa, es tracta de membranes asimètriques amb una estructura amb porus propera a la de tipus dit (*finger-like substructure*)²² i *macrovoids*, característica de membranes preparades per inversió de fase (fig. 3.24).

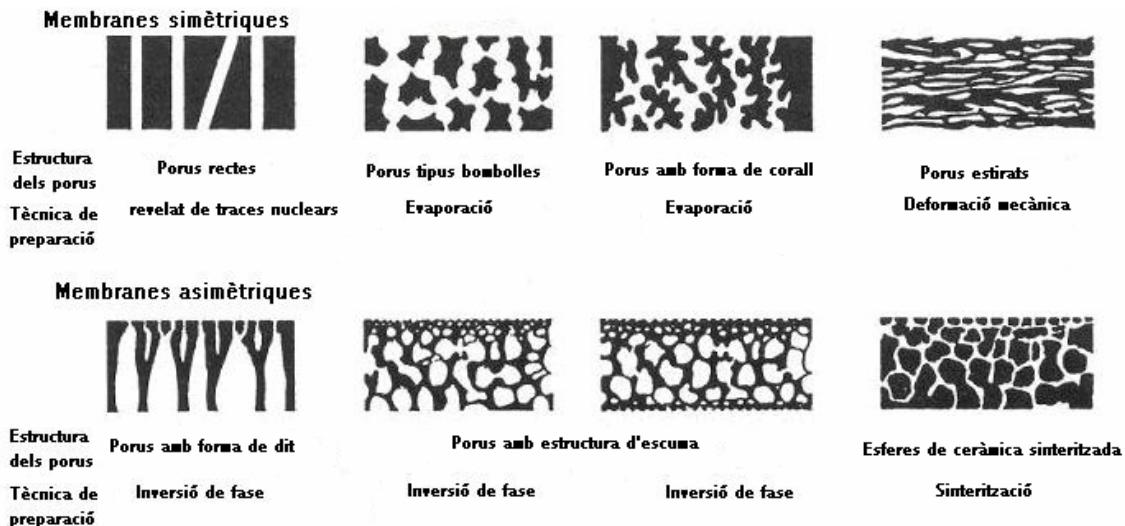


Fig. 3.24. Estructura dels porus en funció de la tècnica de preparació de membranes.²²

D'altra banda, les imatges SEM de talls transversals de les membranes es tracten amb el software IFME ® (Torras, C., Registered software n° 02/2003/3395, Spain). A partir de la interpretació d'aquestes ens permet obtenir dades de la irregularitat en la direcció perpendicular al flux, porositat (expressada com a nombre de porus/ μm^2), així com el diàmetre de porus mitjà (μm). Els valors numèrics d'algun dels paràmetres esmentats obtinguts per IFME ® (fig. 3. 25 a i b), es resumeixen a la taula 3.9.

Els resultats gràfics del tractament de les imatges SEM amb el programa IFME ® són:

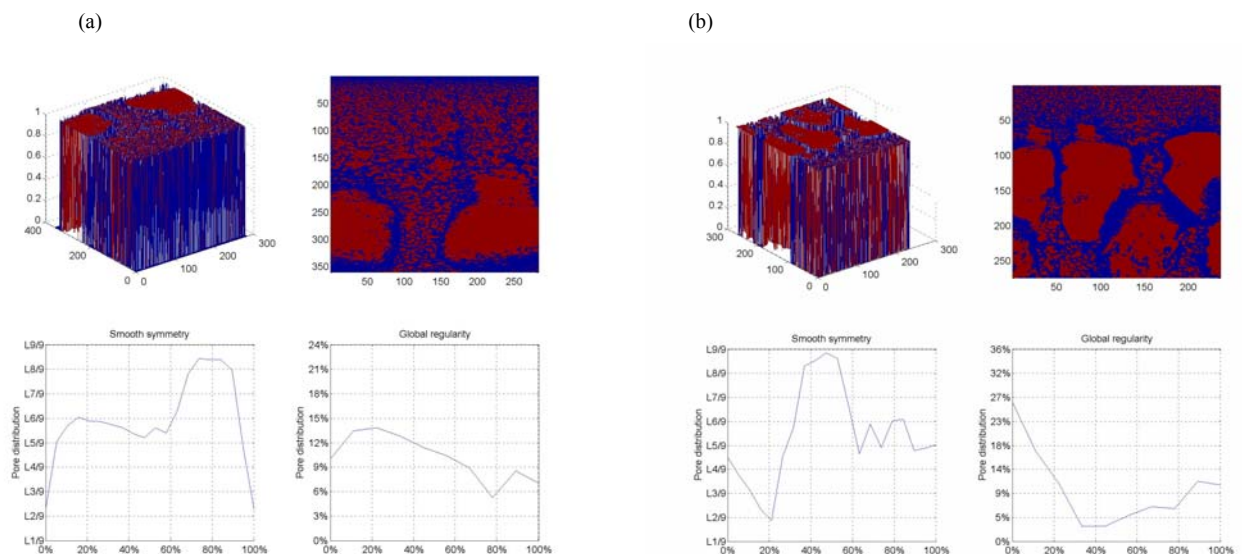


Fig. 3.25. Resultats gràfics del tractament de les imatges SEM de les figures 3.24 (a) i 3.24 (b) amb el programa IFME®.

	<i>Irregularitat global</i>	<i>Porositat (porus/μm^2)</i>	<i>Mida nominal de porus (μm)</i>	<i>Desv estàndard</i>
Fig. 3.25(a)	0,0076	0,398	1,1	0,3
Fig. 3.25(b)	0,0052	0,191	1,7	0,5

Taula 3.9. Resultats numèrics dels paràmetres obtinguts a partir del tractament de les imatges SEM de les figures 3.24(a) i 3.24(b) amb el programa IFME ®.

S'observa que els valors de la irregularitat global per a la membrana pre i postcontacte amb la proteïna respectivament, no són significativament diferents. De tota manera, observant directament les fotografies si es veuen diferències, ja que a la fotografia precontacte amb la proteïna hi ha una línia de *macrovoids* mentre que a la post n'hi ha dues d'intercalades. Aquest fet però té a veure amb la reproduïbilitat del procés de preparació de la membrana de polisulfona. La irregularitat descriu la distribució de porus en la direcció perpendicular al flux. En la primera fotografia (precontacte) és més gran ja que hi ha porus a l'espai entre *macrovoids*, mentre que a la post pràcticament no. D'altra banda s'observa una important diferència en el valor numèric de la porositat, sent més alt en el cas de la membrana precontacte amb l'enzim. A la imatge postcontacte la porositat és menor perquè el volum que ocupen els *macrovoids* deixa d'estar ocupat per porus i, per tant, el nombre total de porus és inferior, i en conseqüència també ho és el valor de la porositat. Respecte de la mida mitjana de porus, és més gran en la imatge postcontacte, probablement a conseqüència de la presència de més *macrovoids*. En resum, la diferència entre les dues imatges ve donada per les característiques i la mida dels *macrovoids*, però a banda d'aquesta observació no hi ha altres diferències significatives. Per tant, la presència de proteïna no afecta significativament a la morfologia de la membrana. L'existència de més macroporus no es pot atribuir a la proteïna, sinó que és del tot probable que aquestes diferències s'hagin produït en el procés de preparació de la membrana (per inversió de fase).

Les imatges SEM de la superfície de les membranes de polímers monolítics (N25) es presenten a les figures 3.26 (a), (b) i (c).

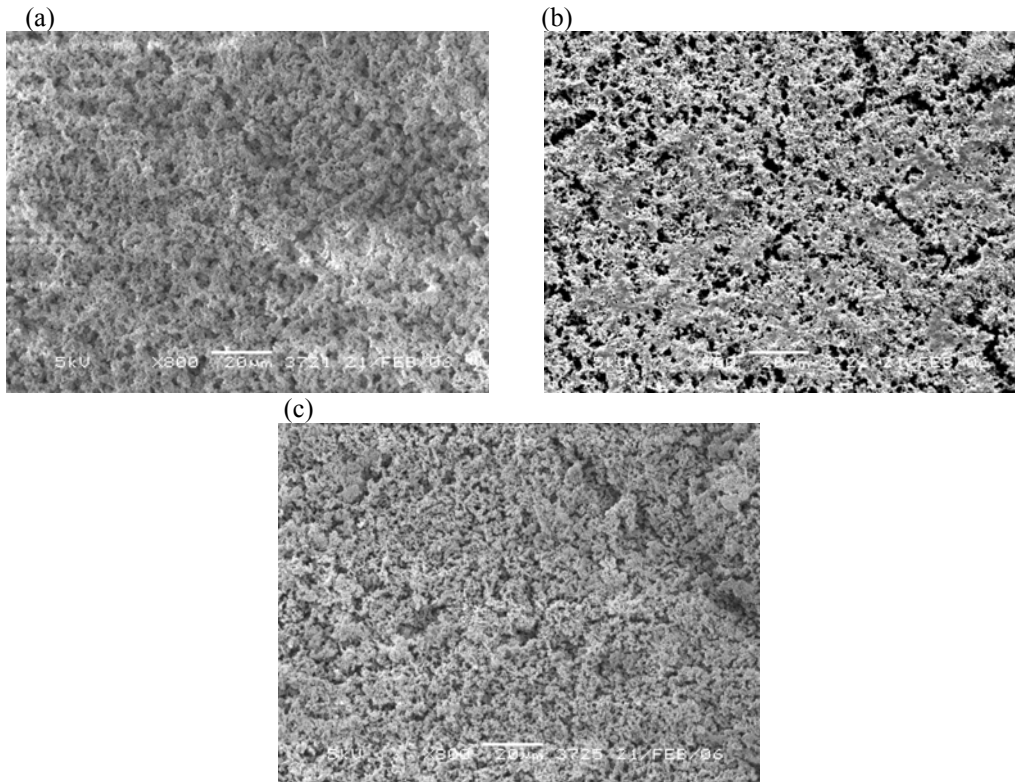


Fig. 3.26. Imatges SEM de la superfície de membranes de polímers monolítics (N25) (a) blanc, (b) amb endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada, i (c) després d'usar-la en la reacció d'hidròlisi.

Com es pot observar, els polímers monolítics estan constituïts per partícules esfèriques (microglòbuls) que formen agregats polimèrics interconnectats²³ en estructures anomenades de grapat de raïm o *cluster*. Els porus estan constituïts pel conjunt d'espais buits (*voids*) irregulars que hi ha entre aquests agregats (macroporus), entre els microglòbuls individuals (mesoporus) i dins dels propis microglòbuls (microporus).²⁴ En primera aproximació no s'aprecien diferències entre la membrana blanc i la membrana enzimàtica, tot i que en observar fotografies a més augments (fig. 3.27) si que es veu que després d'immobilitzar la proteïna, la superfície de la membrana presenta un tipus de recobriment sobre l'estructura típica dels polímers monolítics.

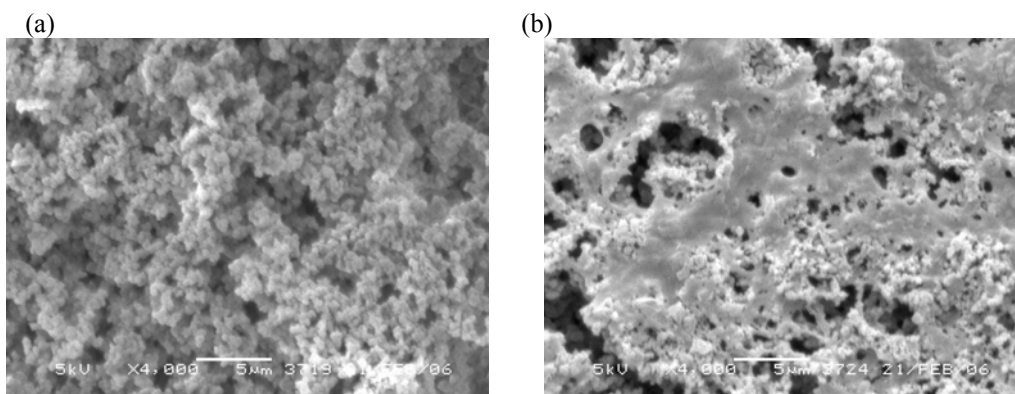


Fig. 3.27 Imatges SEM de la superfície de membranes de polímers monolítics (N25) (a) blanc, i (b) amb endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada.

Les imatges del tall transversal de les membranes de polímers monolítics (N25), també a 5 μm , mostren que aquestes membranes tenen la mateixa estructura que a la seva superfície, que és simètrica, i que es pot comparar amb un conjunt d'artells (*rod-like structure*),²⁵ a diferència de la morfologia de les membranes ACPS. Aquesta estructura porosa rep el nom de porus tipus corall,²² i és característica de membranes obtingudes per formació d'una pel·licula (*casting*) i posterior evaporació dels dissolvent. El procés de preparació de les membranes de polímers monolítics implica l'etapa de *casting* i la posterior polimerització d'aquesta, en la qual hi ha una evaporació parcial dels dissolvents porogènics, que són volàtils, i una separació de la fase sòlida originada (que constituirà la membrana) de la fase líquida (dissolvents), la qual cosa explicaria la formació de porus amb aquesta morfologia. L'estructura es pot observar amb més detall a les fotografies de les fig. 3.28 (a) i (b).

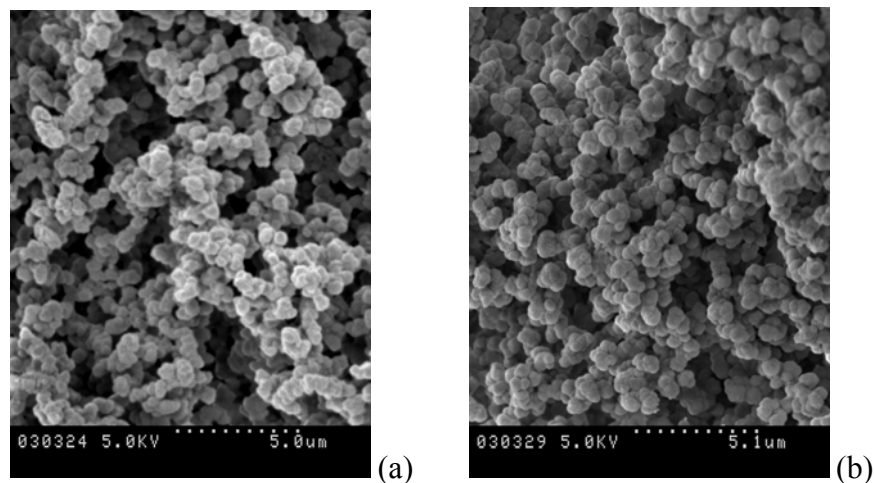


Fig. 3.28. Imatges SEM del tall transversal de membranes de polímers monolítics (N25): (a) blanc i (b) amb endo-1,4- β -xilanasasa II immobilitzada.

Tal com era d'esperar tampoc s'observen diferències significatives entre elles, ja que la immobilització en condicions estàtiques té lloc a nivell superficial. En aquest cas també s'analitzen les imatges amb el programa IFME® .

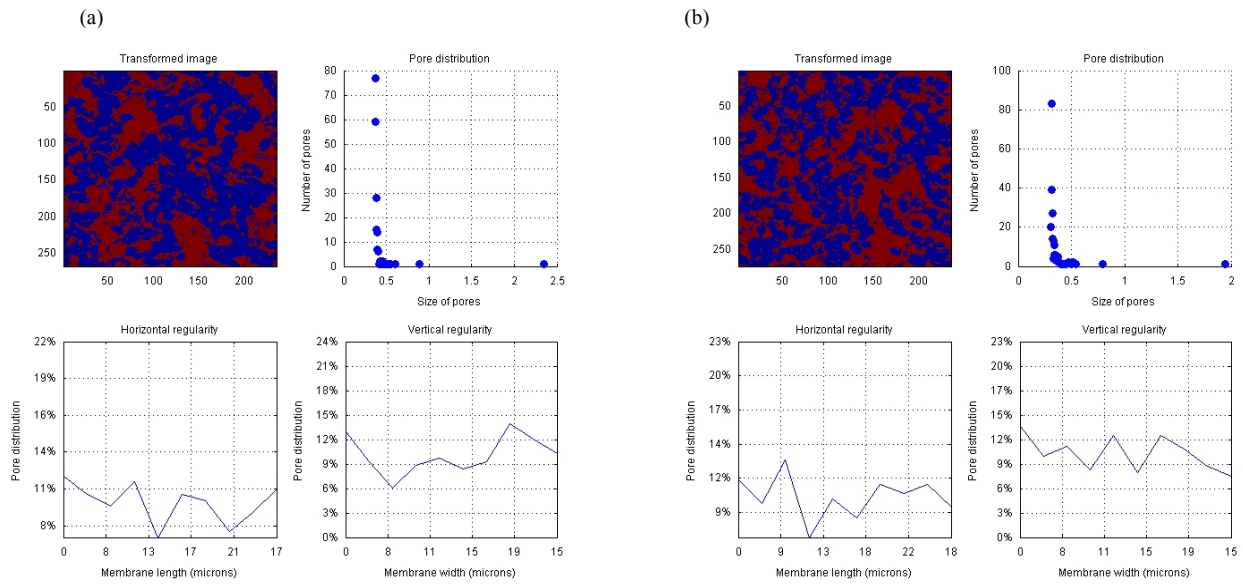


Fig. 3.29. Resultats gràfics del tractament de les imatges SEM de les figures 3.28 (a) i 3.28 (b) amb el programa IFME®.

	<i>Irregularitat global</i>	<i>Porositat (porus/μm²)</i>	<i>Mida nominal de porus (μm)</i>	<i>Desv estàndard</i>
Fig. 3.29(a)	0,00038	0,874	0,7	0,3
Fig. 3.29(b)	0,00039	0,922	0,7	0,2

Taula 3.10. Resultats numèrics dels paràmetres obtinguts a partir del tractament de les imatges SEM de les figures 3.28(a) i 3.28(b) amb el programa IFME®.

Comparant els resultats numèrics de les dues membranes es veu que tant en termes d'irregularitat global, com de porositat i mida nominal de porus no hi ha diferències significatives entre la membrana de polímers monolítics blanc (sense enzim immobilitzat) com la membrana amb endo-1,4-β-xilanas II immobilitzada. Respecte de la mida nominal de porus determinada per IFME®, és més alta de la que s'obté per altres tècniques de caracterització, com es presentarà a l'apartat corresponent a adsorció/desorció de gasos. Tenint en compte que el programa IFME® considera l'anàlisi de color de la imatge per a detectar la presència dels porus, els valors que s'obtenen per a la mida de porus fan referència als espais entre els agregats polimèrics mentre que pot ser que la imatge no tingui prou resolució com perquè el programa consideri els espais entre els glòbuls dins de l'estructura dels agregats perquè són molt petits, i per això els valors de mida nominal de porus són superiors comparant amb els valors obtinguts per la tècnica adsorció/desorció de gasos. El mateix efecte s'observa en les dades de mida nominal de porus per a les membranes ACPS obtinguts de l'anàlisi amb IFME®, que també són més grans que els determinats per adsorció/desorció de gasos.

En conclusió, de l'observació de les imatges SEM es pot apreciar la diferència estructural i superficial entre els dos tipus de membranes enzimàtiques estudiades. Aquestes característiques no només depenen de la naturalesa del material, sinó que també estan relacionades amb la tècnica de preparació de les membranes. A nivell superficial, les membranes ACPS presenten un aspecte uniforme típic de les membranes preparades per inversió de fase (com és el cas), i les membranes de polímers monolítics estan constituïdes per partícules esfèriques (microglòbuls). A nivell transversal, les fotografies SEM posen de manifest que les membranes ACPS tenen una estructura asimètrica amb porus i cavitats (*macrovoids*), mentre que les membranes de polímers monolítics són simètriques i presenten un conjunt d'espais intersticials entre els glòbuls de polímer que confereixen una estructura altament porosa i amb un alt grau d'entrecreuament, i per tant amb major superfície. D'altra banda s'aprecien algunes diferències a nivell superficial entre membranes blanc i enzimàtiques, sobretot pel cas de les membranes de polímers monolítics i per a les membranes ACPS després del seu ús, malgrat amb aquesta tècnica (SEM) no és possible d'obtenir informació més detallada sobre els canvis observats a nivell superficial, que es puguin atribuir a la presència d'enzim a la membrana.

Microscòpia de força atòmica (AFM)

A continuació es presenten les fotografies obtingudes per AFM en mode *tapping*, tant de la membrana d'acrilat de polisulfona sense enzim (blanc) com amb endo-1,4- β -xilanas II immobilitzada (24 h, en condicions estàtiques), fig. 3.30 i 3.31, respectivament.

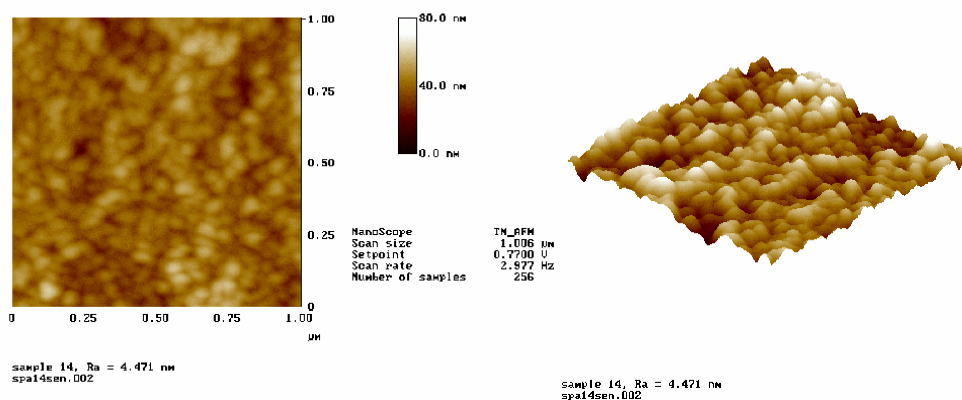


Fig. 3.30. Fotografies AFM de la membrana d'acrilat de polisulfona (blanc).

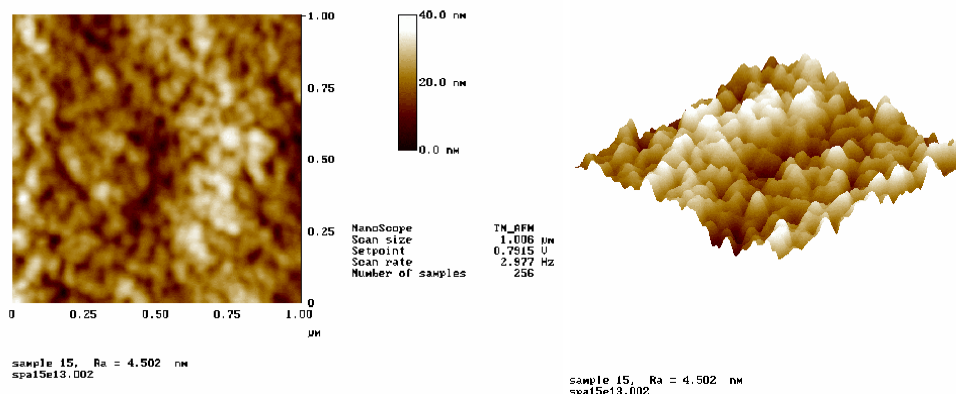


Fig. 3.31. Fotografies AFM de la membrana d'acrilat de polisulfona amb endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada.

A més de la informació visual de tipus qualitatiu que es pot obtenir de l'observació de les imatges AFM, s'obté informació quantitativa sobre l'alçada relativa de cada punt analitzat de la superfície de la mostra. Fent un tractament estadístic s'obté la mitjana d'aquest valor, que es representa per Z_m . A partir d'aquesta dada es pot calcular el paràmetre de rugositat (R_a), que es defineix segons l'equació (3.13), on n és el nombre de punts de la imatge i Z_i l'alçada de cada punt considerat:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n |Z_i - Z_m| \quad (3.13)$$

Els valors de R_a obtinguts en les dues membranes analitzades per AFM són 4,471 nm per a la membrana blanc (sense enzim) i 4,502 nm per a la que si que ha estat en contacte amb la proteïna. Aquests valors no són significativament diferents,²⁶ de manera que aquesta tècnica no permet diferenciar entre les dues membranes.

Si bé l'enllaç de la proteïna es produeix a través dels grups acrilat de la superfície, tal com ja s'ha proposat, també se sap que la quantitat de molècules d'enzim immobilitzades és molt baixa, d'acord amb els resultats de microanàlisi elemental del contingut de nitrogen a la membrana provinent de l'enzim on ja es troba que aquest és baix. Per tant, hi ha poques molècules d'enzim a la superfície de les membranes, de manera que no comporta diferències prou significatives en la rugositat com per ser detectades en aquestes condicions per AFM.

Les imatges AFM de membranes de polímers monolítics (N25) blanc i amb endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada es presenten a les figures 3.32 i 3.33 respectivament.

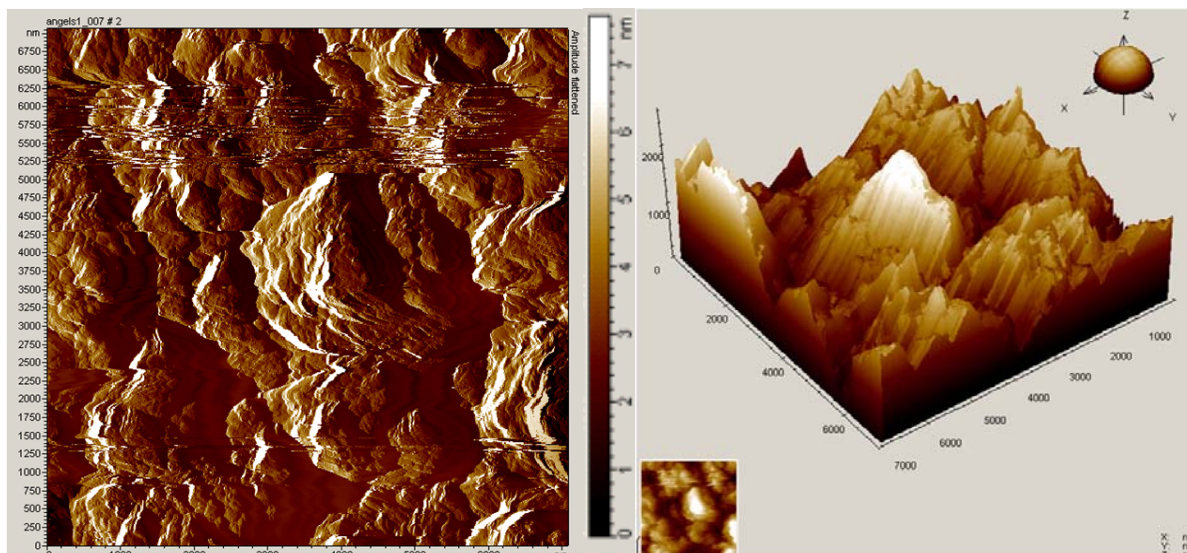


Fig. 3.32. Fotografies AFM de la membrana de polimers monolítics N25 (blanc).

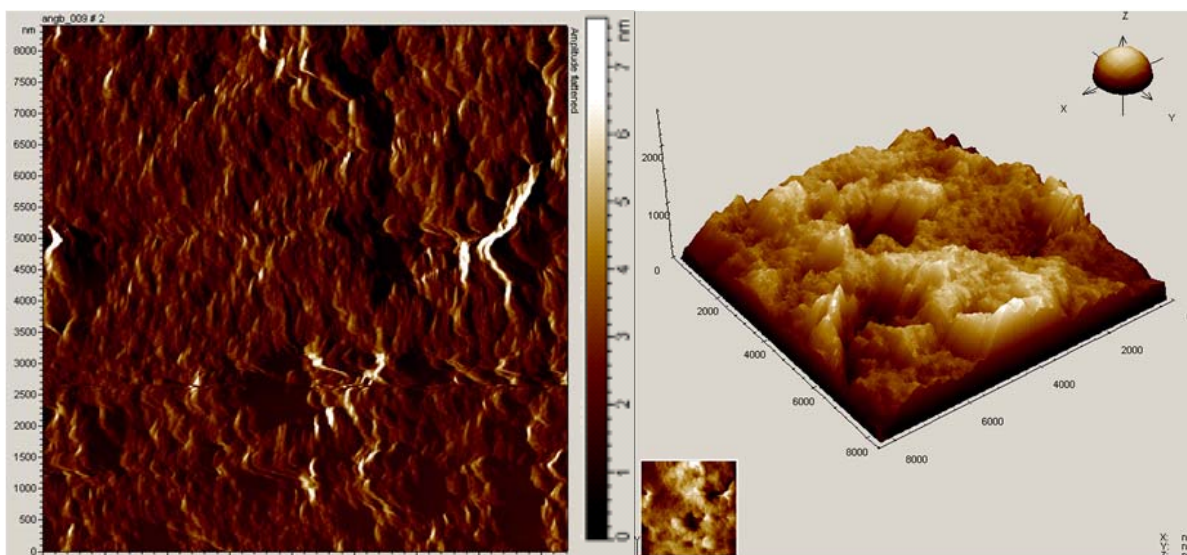


Fig. 3.33. Fotografies AFM de la membrana de polimers monolítics N25 amb endo-1,4- β -xilanas II immobilitzada.

La primera característica de les membranes N25, que es detecta de la observació visual de la representació tridimensional de les figures 3.32 i 3.33, és que són més rugoses i alhora presenten punts d'alçada i profunditats superiors que les membranes ACPS. Per aquest motiu en el cas de les membranes N25 s'adquireixen senyals en rastrejar una superfície d'aproximadament $7 \mu\text{m} * 7 \mu\text{m}$, ja que en fragments menors no és possible detectar el relleu superficial, a diferència de les membranes d'acrilat de polisulfona, en les quals es consideren superfícies de $1 \mu\text{m} * 1 \mu\text{m}$. En calcular el paràmetre de rugositat (R_a), segons l'equació (3.13), els valors obtinguts són 685,38 nm per a la membrana N25 blanc i 278,98 nm per a la membrana enzimàtica N25. La distància màxima entre un cim i una vall és de 3857,24 nm en el primer cas i 2372,43 nm en el segon. Aquestes dades mostren diferències entre les membranes abans i després de la immobilització de

l'enzim. La presència de l'enzim redueix la rugositat superficial de les membranes de polímers monolítics. És possible que les molècules d'enzim que es troben a nivell superficial ocupin parcialment les cavitats i redueixin la profunditat d'aquestes i, per tant, les diferències d'alçada entre punts, la qual cosa afecta el paràmetre de rugositat. Per aquest motiu el valor de R_a és més baix que en el cas de les membranes blanc.

Flux d'aigua pura

D'acord amb l'apartat 2.2.4 del capítol anterior, es mesuren els cabals d'aigua Milli-Q a través de membranes d'acrilat de polisulfona (ACPS) i de polímers monolítics (N25), a partir del volum d'aigua filtrada per unitat de temps, a diferents pressions aplicades.

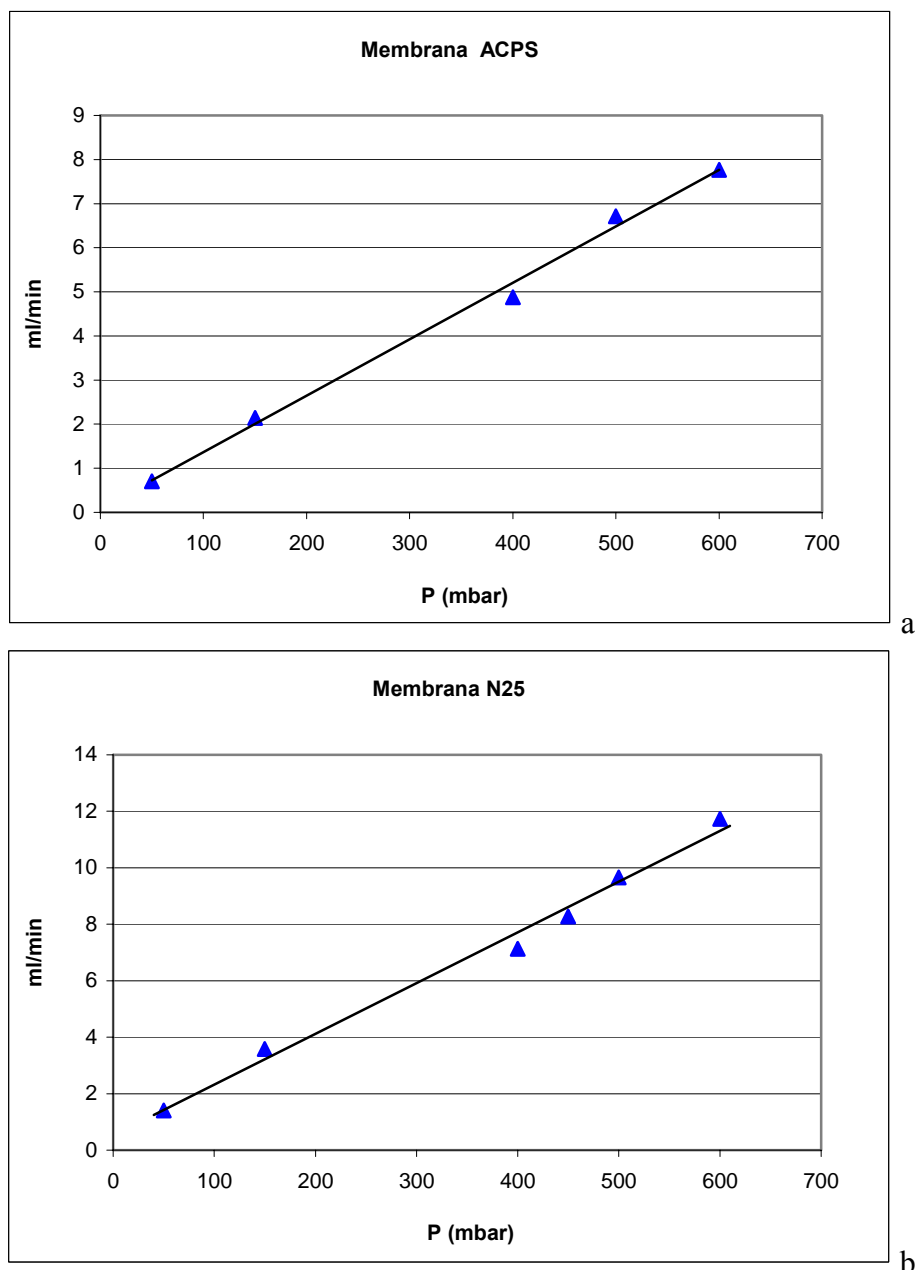


Fig. 3.34. Cabal d'aigua pura a través de membranes ACPS (a) i N25 (b).

S'estableix una relació lineal entre la pressió aplicada (en mbar) i el cabal d'aigua a través de la membrana (ml/min). Els resultats numèrics, en cada cas, són:

$$\text{Membrana ACPS} \quad \text{Cabal (ml/min)} = 0,0128 P \text{ (mbar)} + 0,0894 \quad r^2 = 0,9931$$

$$\text{Membrana N25} \quad \text{Cabal (ml/min)} = 0,018 P \text{ (mbar)} + 0,5226 \quad r^2 = 0,9894$$

Per comparació de les rectes de regressió de les dues membranes, i d'acord amb les observacions experimentals, s'observa que el cabal volumètric, en les mateixes condicions de pressió, a través de les membranes de polímers monolítics (N25) és més alt que a través de les membranes ACPS. Aquesta dada s'ha de tenir en compte a l'hora de realitzar experiments de filtració amb aquestes membranes als quals s'hagi d'aplicar pressió, ja que s'ha de mantenir el mateix temps de residència de l'enzim a les membranes per tal de poder comparar-les entre si.

El temps de residència es defineix com el temps que està en contacte la dissolució d'enzim amb la membrana (en el cas de la immobilització en dinàmic) o bé de la dissolució de substrat amb la membrana enzimàtica (en les reaccions d'hidròlisi). Aquest temps és un paràmetre que es fixa com a constant i està relacionat amb la pressió a través de l'equació:

$$T_r = Q / V$$

On Q és el cabal volumètric, T_r és el temps de residència i V és el volum que ocupen les membranes i que, per tant, ha d'estar en contacte amb la dissolució. Un cop seleccionat el temps de residència i coneixent el volum que ocupen les membranes (tenint en compte el seu diàmetre, gruix i el nombre de membranes considerat en cada experiment) es pot seleccionar el cabal amb el qual hem de treballar per tal de conèixer la pressió que s'ha d'aplicar per a cada membrana.

El concepte de flux, en l'estudi de fenòmens de transport, fa referència a la quantitat d'una determinada magnitud que travessa una àrea per unitat de superfície i de temps.²⁷

El flux d'aigua pura és, de fet, una mesura de la permeabilitat hidràulica de la membrana, i dependrà d'una sèrie de característiques pròpies de la membrana, com són la distribució de porus i el seu gruix, entre d'altres, com també de fenòmens de polarització per concentració a conseqüència de la presència de components minoritaris en "l'aigua pura". El flux a través de membranes poroses es pot descriure amb l'equació de *Hagen-Poiseuille*,²⁸ si es considera una membrana porosa com un conjunt de porus cilíndrics perpendiculars o oblics a la superfície de la membrana.

$$J = [(\pi n r^4 \Delta P) / (8 \eta \tau \Delta x)] \quad (3.14)$$

On ΔP (Pa) és el gradient de pressió entre els dos costats de la membrana i el factor de proporcionalitat inclou el nombre de porus, n ($1/m^2$), el radi de porus, r (m), la viscositat, η (kg/ms), la tortuositat, τ , i el gruix de la membrana, Δx (m). A partir del pendent de les rectes de regressió anteriors, aplicant els factors de conversió corresponents i dividint-los per l'àrea de la membrana ($4,9 \text{ cm}^2$) es determinen els fluxos d'aigua pura, que es poden considerar com el cabal d'aigua (volum que passa per un determinat element per unitat de temps) per unitat de superfície. Els valors obtinguts són $1.567,35 \text{ l}/(\text{m}^2\text{hbar})$ i $2.204,08 \text{ l}/(\text{m}^2\text{hbar})$ per a les membranes ACPS i N25 respectivament. S'observa que amb les membranes de polímers monolítics es pot treballar a pressions inferiors que amb les membranes d'acrilat de polisulfona per a assolir el mateix flux d'aigua. Els polímers monolítics són polímers altament porosos caracteritzats per un sistema de porus interconnectats amb una doble distribució (com ja s'ha esmentat anteriorment): els porus petits proporcionen l'àrea superficial requerida per a les interaccions específiques (en el nostre cas serà superfície activa amb grups funcionals reactius per a immobilitzar l'enzim), mentre que els porus de mides superiors permeten assolir fluxos alts a pressions moderades.²⁴ Així, doncs, a conseqüència de la seva estructura, les membranes de polímers monolítics (N25) ofereixen una menor resistència al pas de fluids, en comparació amb l'estructura superficial densa que s'ha observat a través de les imatges SEM per a les membranes ACPS.

Adsorció/desorció de gasos

A partir dels resultats obtinguts amb la tècnica d'adsorció/desorció de gasos és possible representar les isoterms d'adsorció i desorció per a cada membrana, les quals expressen la relació entre el volum de gas adsorbit o desorbit respecte de la pressió relativa aplicada. Alhora, permet estudiar la distribució de porus dins del rang de radis compresos entre 2 i 50 nm.²⁹ Així, doncs, l'adsorció/desorció de gasos dona informació de porus petits, els quals contribueixen majoritàriament a l'àrea superficial de les membranes.²⁴

A la fig. 3.35 es representen les isoterms corresponents a la membrana d'acrilat de polisulfona (ACPS). La isoterma obtinguda és de tipus V,²⁹ segons la classificació de la IUPAC. Aquest tipus d'isoterma és característica de materials amb mesoporus (porus compresos en el rang de 2 a 50 nm),²⁹ en els quals l'equació de Kelvin és aplicable (equació 2.3), concretament per a materials en els quals la interacció entre l'adsorbent (en aquest cas el polímer de membrana) i l'adsorbat (N_2) és dèbil, ja que a pressions relatives baixes l'adsorció de nitrogen a les ACPS és baixa. La isoterma presenta un

cicle d'histeresi de tipus C, segons la IUPAC,³⁰ la qual és conseqüència bé d'una estructura laminar o bé d'una distribució heterogènia de porus, com és realment el cas de les ACPS (membranes asimètriques).

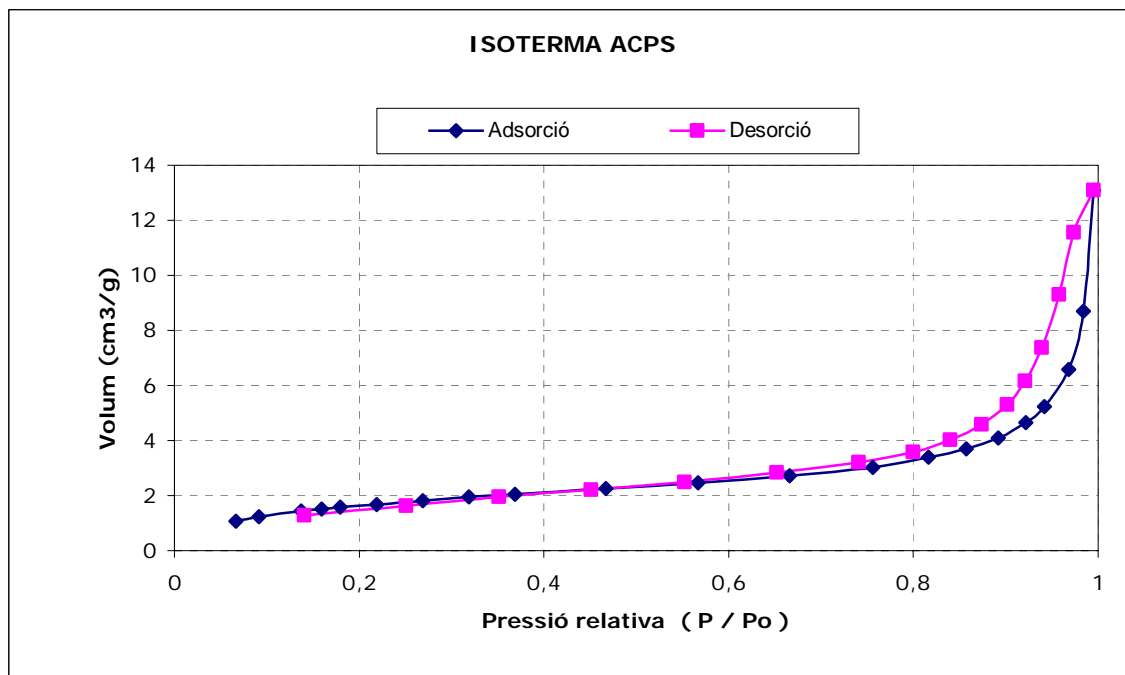


Fig. 3.35. Isoterma d'adsorció/desorció per a membranes ACPS.

Als materials amb mesoporus el mecanisme d'adsorció té lloc segons fenòmens de condensació capil·lar, tal com s'ha explicat al capítol 2, de manera que les molècules adsorbides es comporten com un líquid. La histèresi és conseqüència de la condensació capil·lar i de l'anomenat efecte de xarxa o *network effect*.³¹ Aquest fenomen té lloc quan les cavitats (*voids*) i els porus estan interconnectats entre si de manera que donen lloc a cavitats grans, però amb entrades estretes.³¹ Com ja s'ha vist a partir de les imatges SEM, les membranes d'acrilat de polisufona presenten una estructura asimètrica amb *macrovoids* i porus de tipus dit (*finger*) o tinter (*ink bottle*), com s'han mostrat a la fig. 3.24. En aquests casos, a diferència del que s'observa en estructures simples, es pot produir un bloqueig dels porus a causa de la possible condensació de l'adsorbat al coll de porus (és a dir, a la seva part superior), a conseqüència directa de l'estructura entrecreuada i interconnectada. Per tant, el procés de desorció es veu obstaculitzat, ja que el gas que està contingut als porus més grans ha de sortir pels porus més petits amb els quals estan interconnectats i que alhora es troben més propers a la superfície. Els porus més grans estan connectats a la superfície externa a través dels porus petits. Aquests porus grans s'omplen de gas a pressions relatives altes però no podran buidar-

se totalment fins que no s'arribin a pressions relatives menors, corresponents a valors d'equilibri per a porus menors.³² Així, doncs, cal arribar a pressions relatives més baixes del que es podria esperar si el procés fos invers a l'adsorció, per a afavorir la sortida del gas; heus aquí la raó que justifica les diferències dels perfils d'adsorció i desorció.

Les diferències de les distribucions de porus calculades per a l'adsorció i la desorció (fig. 3.36) també posen de manifest aquest efecte. Com es pot observar, la distribució de porus per a l'adsorció i la desorció no és igual. El perfil de distribució d'adsorció indica que la mida de porus de la membrana s'incrementa gradualment des de la superfície cap a l'interior.³² La grandària mitjana del diàmetre de porus, calculada amb les dades d'adsorció és de 142 Å (per tant 7,1 nm de radi), mentre que la calculada amb les dades de desorció és de 104 Å (5,2 nm de radi). Aquesta diferència s'explica altra vegada pel *network effect*, ja que el fenomen de desorció està regulat en gran part pel paper dels porus de mida menor. Normalment es prefereixen les dades d'adsorció per a calcular les distribucions de porus ja que aquestes no estan afectades per aquest fenomen. En qualsevol cas, estem parlant de radis de porus de 5 nm, la qual cosa confirma que es tracta d'un material amb mesoporus, tal com indica la seva isoterma.

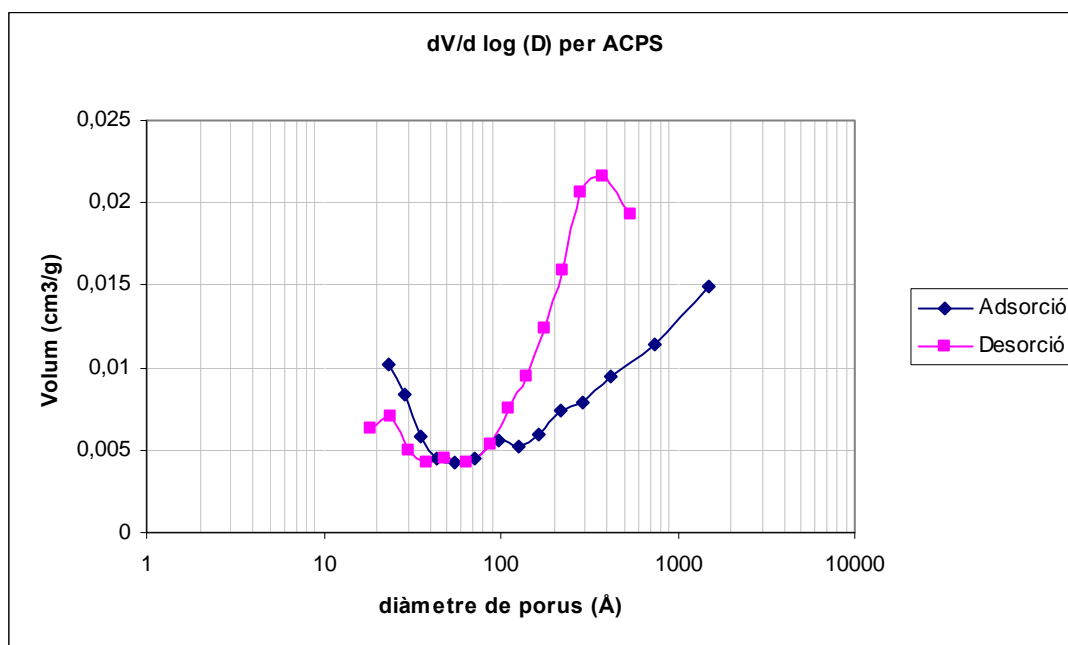


Fig. 3.36. Distribucions de mida de porus per a l'adsorció i desorció per a les membranes ACPS.

Respecte dels resultats per a la membrana de polímers monolítics (N25), la isoterma es presenta a la fig. 3.37 i també es classifica dins del tipus V, segons la IUPAC. S'observa un cicle d'histeresi de tipus C però, en aquest cas, el cicle d'histeresi indica la presència

d'agregats de partícules en forma laminar o de plaques i porus en forma de corall, com ja s'havia observat a les imatges SEM.³³ Tot i que la histèresi no és tan accentuada com en el cas de les membranes ACPS, també es pot atribuir al *network effect*.

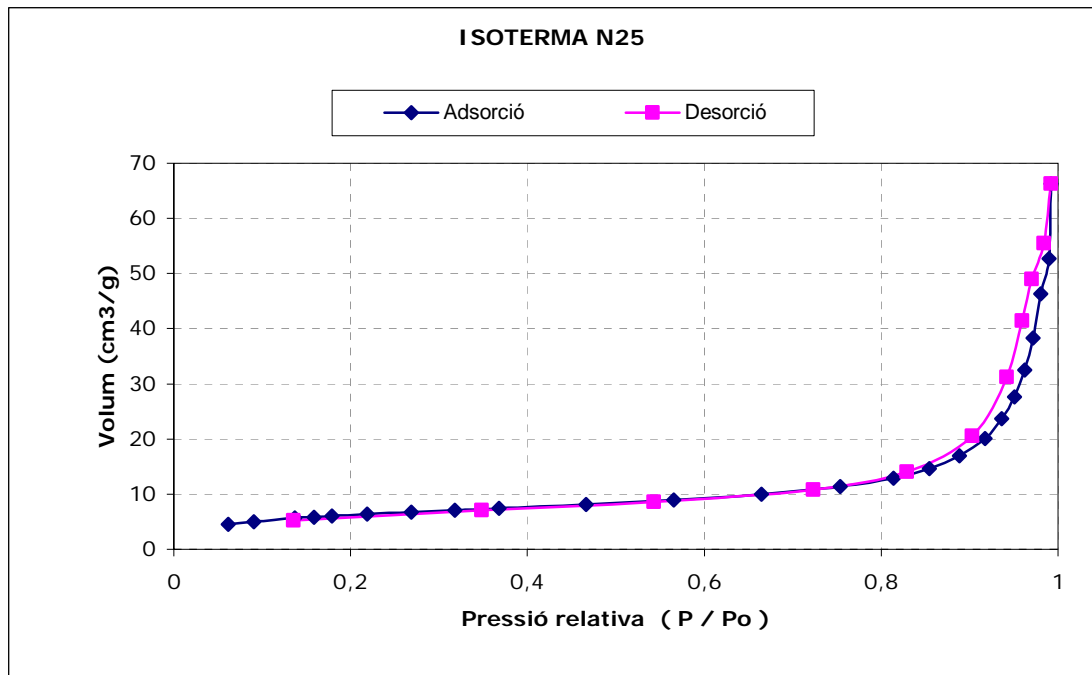


Fig. 3.37. Isoterma d'adsorció/desorció per a membranes N25.

La distribució de porus per a la desorció és més estreta que per a l'adsorció, com es veu a la fig. 3.38. El diàmetre mitjà de porus per a l'adsorció és de 171 Å, mentre que per a la desorció és de 151 Å. Les membranes de polímers monolítics presenten mesoporus i les diferències entre adsorció i desorció també estarien explicades pel *network effect*.

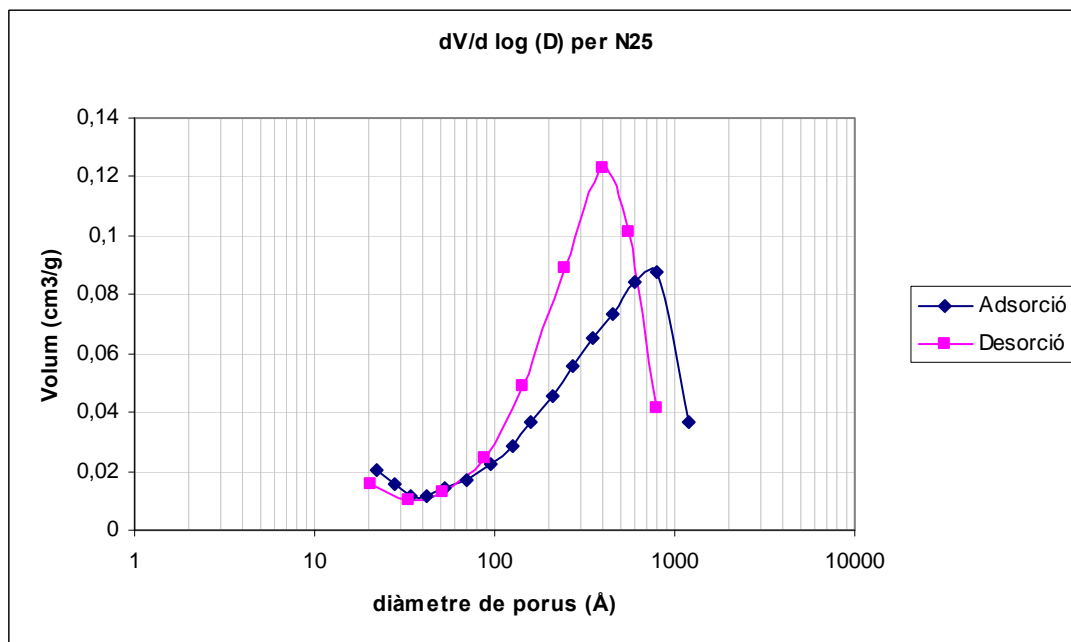


Fig. 3.38. Distribucions de mida de porus per a l'adsorció i desorció per a les membranes N25.

Les mesures d'adsorció/desorció de gasos permeten obtenir dades sobre l'àrea BET per a ambdues membranes. Els valors obtinguts són de $6,24 \pm 0,12 \text{ m}^2/\text{g}$ per a ACPS i $23,17 \pm 0,27 \text{ m}^2/\text{g}$ per a N25. Els valors del paràmetre C són 30,9 i 62,4, respectivament. Aquest valor s'obté de la linealització de l'equació BET. Un valor alt de C (> 200) està associat, normalment, amb la presència de microporus (diàmetre de porus inferior a 2 nm) i pot indicar un falsejament en el valor del BET, ja que només es vàlid per al rang de mesoporus (radis entre 2 i 50 nm). Un valor baix de C (< 20) fa imprecís el punt B de les isoterms de tipus II i IV, punt en el qual es considera recoberta la monocapa i comença l'adsorció de la multicapa. Per tant, és aconsellable tenir valors entre 20 i 200.³⁴ Comparant les dades per a les dues membranes, es pot afirmar, tal com s'esperava, que les membranes basades en polímers monolítics presenten una àrea superficial més gran que les d'acrilat de polisulfona. Això s'explica tenint en compte les característiques d'aquests materials i que estan estretament relacionades amb la seva composició i procés de polimerització, tal com s'ha explicat als capítols anteriors.

Paral·lelament, es determina l'àrea BET d'algunes de les membranes considerades en el disseny d'experiments per a l'optimització de la composició de les membranes de polímers monolítics (apartat 2.1.2.5), a fi d'estudiar la influència entre la quantitat de l'agent d'entrecruament o *crosslinker* (EDMA) i la relació de dissolvents en aquest paràmetre. Concretament, s'analitzen les membranes N3, N4, N12 i els resultats es comparen amb els de la membrana N25.

El gràfic de la fig. 3.39 representa l'àrea BET respecte de la relació molar de dissolvents (mols ciclohexanol/mols dodecanol) i la quantitat del monòmer AEM (mg), fixant com a constant la quantitat d'EDMA (agent d'entrecruament) a 714 μl .

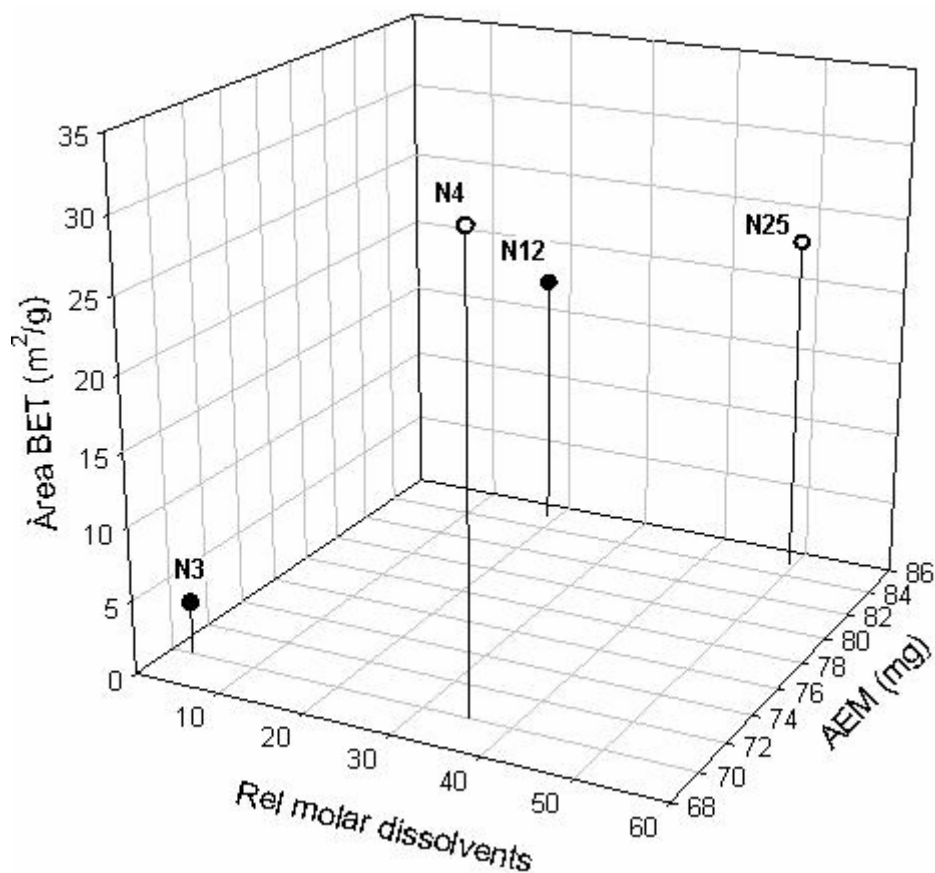


Fig. 3.39. Representació de l'àrea BET de membranes de polímers monolítics respecte del contingut d'AEM i de la relació molar de dissolvents porogènics (mols ciclohexanol/mols dodecanol). En tots els punts la quantitat d'agent d'entrecruament (EDMA) es manté constant (714 μ l).

S'observa que per a una mateixa quantitat d'AEM, en augmentar la proporció de ciclohexanol en la relació molar de dissolvents, l'àrea BET augmenta. Aquests resultats són conseqüència d'una quantitat de ciclohexanol més alta, fet que confirma les conclusions exposades a l'apartat 3.2.2 d'aquest capítol. El ciclohexanol és millor dissolvent que el dodecanol, cosa que fa que la separació de fases durant la polimerització sigui més lenta i condueixi a la formació d'agregats de mida menor, i per tant, espai intersticial més gran entre ells. Aquesta disminució de la mida de partícules es tradueix en una superfície més gran i, en conseqüència, en una major disponibilitat de grups funcionals per a enllaçar amb l'enzim, cosa que justifica valors superiors d'activitat enzimàtica. D'altra banda, el valor més alt dels considerats correspon a la membrana N4, la qual cosa és comprensible si es té en compte que malgrat que la relació molar de dissolvents és menor que per a N25, com que el contingut d'AEM també és menor, presenta una composició diferent, ja que s'ha d'ajustar per a mantenir un 15% en pes total de monòmers constant per a totes les membranes.

A la fig. 3.40 es representen els valors mitjans del diàmetre de porus per al procés d'adsorció (en Å) respecte de la relació molar de dissolvents a dos nivells d'AEM i mantenint constant l'EDMA. Comparant els resultats obtinguts als dos nivells d'AEM, s'observa que en augmentar la relació molar de dissolvents els valors del diàmetre de porus augmenten, quan l'efecte esperat seria l'invers, tenint el compte que el dodecanol és pitjor dissolvent; per tant, durant la polimerització la separació de fases serà més ràpida, fet que conduirà a la formació de porus més grans i a una menor àrea superficial. Cal tenir en compte, que amb aquest mètode, els valors de radi de porus r , per tant, del diàmetre, es calculen realitzant una aproximació en la qual es considera que els porus són cilíndrics, i se sap, per resultats d'altres proves de caracterització (SEM), que aquest no és el cas dels porus a les membranes de polímers monolítics. El radi es calcula a partir d'una relació entre la variació del volum i la variació de l'àrea ($4\Delta V/\Delta A$), on V = volum, i A = àrea de porus. Per tant, hi pot haver una variació en el volum dels porus més gran que en l'àrea d'aquests, cosa que pot conduir a l'obtenció de radis de porus més grans que en realitat, quan, de fet, podria tractar-se d'un increment del volum de porus, però a conseqüència d'un augment del nombre de porus petits. Aquest és el resultat que esperariem, per a les membranes N12 respecte de la membrana N3, i de la N25 respecte de la N4. En els casos de la N12 i la N25, la relació molar de dissolvents és major, per tant el contingut de ciclohexanol és més gran. Com s'ha comentat en altres apartats al llarg d'aquest capítol (3.2.2), se sap que un increment del contingut de ciclohexanol condueix a la formació d'estructures més poroses i amb un diàmetre de porus menors. Així doncs, hi ha un augment del volum total de porus però en canvi són més petits i, per tant, l'àrea no augmentarà proporcionalment al volum. Per això s'obtenen valors anòmals de diàmetres de porus per a aquestes membranes de polímers monolítics. Aquest resultats demostren que el mètode BET no és el millor per a la determinació de mida de porus per a aquest tipus de membranes, tot i que sí permet realitzar una aproximació de l'ordre de magnitud de la grandària i de les distribucions dels porus dels materials.

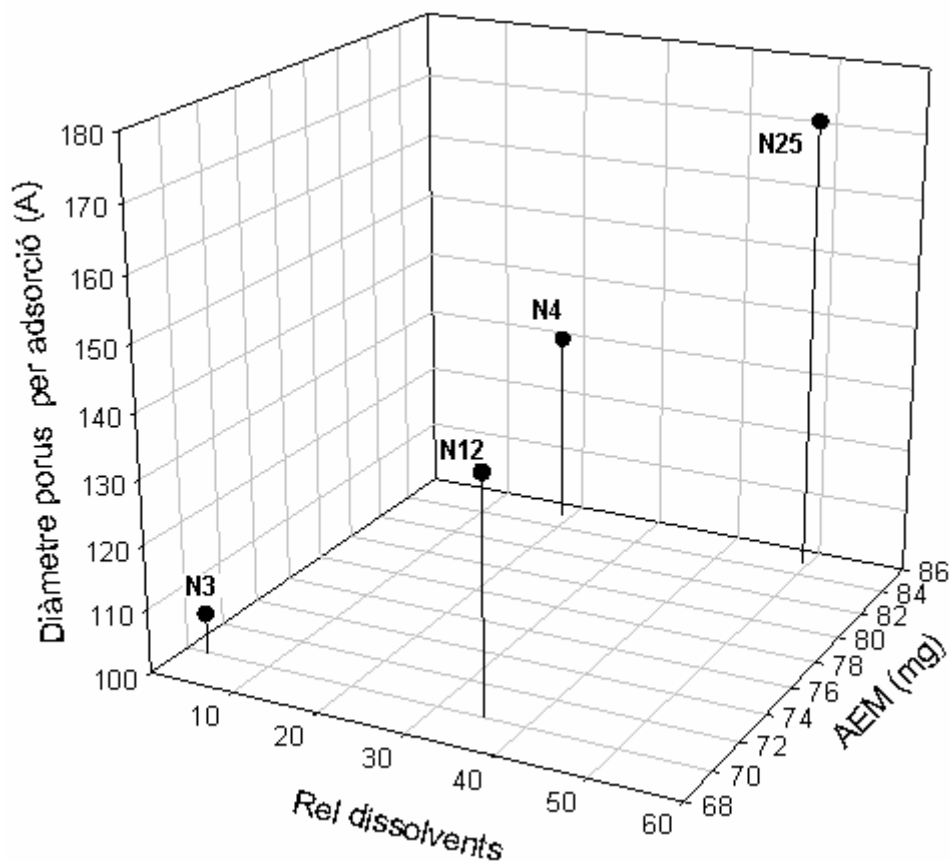


Fig. 3.40. Representació del diàmetre de porus de membranes de polímers monolítics respecte del contingut d'AEM i la relació molar de dissolvents porogènics (mols ciclohexanol/mols dodecanol), tot mantenint la quantitat d'EDMA constant (714 μ l).

Permporosimetria

En mesurar els fluxos d'oxigen a diferents pressions relatives, tant per al procés de desorció com per a l'adsorció, no es pot determinar la mida de porus de les membranes, a conseqüència de problemes experimentals, tant associats a l'equip com a la naturalesa pròpia dels polímers. En el cas de les membranes d'acrilat de polisulfona, s'observa que s'adhereixen al mòdul de membrana, cosa que condueix la seva destrucció. Quant a les membranes de polímers monolítics (N25), les mesures del flux d'oxigen són poc reproduïbles, de manera que no es pot donar un resultat numèric per a la determinació del radi de porus. No s'han obtingut resultats fiables que es puguin considerar.

Angle de contacte

Els resultats de les mesures d'angle de contacte per a membranes d'acrilat de polisulfona es presenten a la taula següent:

<i>Membrana</i>	<i>Angle de contacte (°)</i>	<i>Observacions</i>
ACPS1	87 ± 2	sense modificar
ACPS2	53 ± 3	immobilització estàtica
ACPS3	84 ± 2	immobilització dinàmica
ACPS4	16 ± 1	utilitzada en hidròlisi

Taula 3.11. Mesures d'angle de contacte per a diferents membranes ACPS.

S'observa que el caràcter hidrofílic de l'acrilat de polisulfona és afectat per la presència d'enzim immobilitzat. A més quantitat de proteïna immobilitzada s'observa un increment més gran en el caràcter hidrofílic, que es tradueix en una disminució de l'angle de contacte. En el cas de les membranes en les quals s'ha dut a terme la immobilització en condicions estàtiques, l'angle de contacte és menor, ja que segons s'exposa a l'apartat 3.3.1 la quantitat de proteïna retinguda en condicions d'immobilització estàtica és superior. En el cas de la membrana enzimàtica que ja ha estat emprada en experiments d'hidròlisi l'angle de contacte disminueix considerablement, la qual cosa es pot entendre tenint en compte la presència d'una capa de substrat (polímer de xilà) que ha quedat adherida a la membrana després del seu ús.

Per al cas de les membranes de polímers monolítics, és impossible adquirir cap dada relativa a l'angle de contacte, ja que s'observa que la gota d'aigua s'espargeix instantàniament després de la seva aplicació sobre la superfície. Per tant, no ha estat possible estudiar les diferències en el caràcter de les membranes a conseqüència del procés d'immobilització de l'enzim, ja que, si hi ha algun efecte, aquest no és mesurable en aquestes condicions i per a aquest cas particular de membranes. Aquest comportament confirma que els polímers monolítics són materials altament hidrofílics.

3.4. Mutagènesi dirigida de l'enzim endo-1,4-β-xilanasa II

Tal com es presenta a l'apartat 2.1.3 d'aquesta tesi, el primer pas del procediment experimental fou l'expressió recombinant de l'enzim endo-1,4-β-xilanasa II de *T. reesei* en *S. cerevisiae*. Un cop expressat s'ha de purificar. En primer lloc, cal separar les cèl·lules de la proteïna per centrifugació a 5.200 r.p.m. i a 4 °C. S'obté un agregat (*pellet*) corresponent a la massa cel·lular i un líquid sobrenedant transparent d'un color lleugerament groc, el qual conté l'endo-1,4-β-xilanasa II. Un cop separat, aquest líquid sobrenedant es filtra per a eliminar possibles residus cel·lulars i a continuació s'hi addiciona un volum d'acetona a 4 °C equivalent al volum de líquid sobrenedant i es deixa a aquesta temperatura durant 1 hora. D'aquesta manera es fa precipitar la proteïna, tal com s'observa per l'aparició d'un color marró fosc als tubs, passat aquest temps. Se centrifuguen a 9.400 r.p.m. durant 10 minuts a 4 °C i un cop descartat el líquid

sobrenedant s'obté un *pellet* petit al fons de color marró, que conté, entre d'altres proteïnes minoritàries, l'endo-1,4- β - xilanasa II. La proteïna es resuspèn en un volum de 100 μ l d'una dissolució tampó 20mM en HEPES (àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ethanesulfònic), 5mM en EDTA i 7mM en β -mercaptoetanol a pH 8,0. El resultat és una dissolució viscosa marró fosc.

Un cop purificat l'enzim, es realitza l'assaig d'activitat enzimàtica de la xilanasa aïllada i l'anàlisi per electroforesi SDS-PAGE.

A l'assaig de l'activitat enzimàtica s'utilitza el protocol de *Sigma*, que es basa en el mètode de Nelson, descrit a l'apartat 2.4.1 del procediment experimental. S'analitza una alíquota d'una dilució 1:10 de la proteïna aïllada. De la incubació de 100 μ l d'aquesta dilució en un volum total de 2 ml de substrat *Birchwood xylan* al 0,1% en pes en una dissolució tampó d'àcid acètic/acetat sòdic 0,05M a pH 5, durant 10 minuts a 50 °C, s'obté una concentració de sucres que, expressada com a xilosa, és de 0,122 μ mol/ml per interpolació de l'absorbància a 540 nm en una recta de calibratge amb patrons de xilosa. Considerant el factor de dilució (1:10) i el volum total (2 ml), i que la reacció enzimàtica ha tingut lloc durant 10 minuts, s'obté una activitat enzimàtica de 2,44 U/ml. Aquest valor és baix, ja que la dissolució comercial d'endo-1,4- β - xilanasa II sol tenir valors d'activitat de 7.250 U/ml. Per tant si bé aquest valor indica que la xilanasa II expressada en *S. cerevisiae* presenta activitat enzimàtica, també pot indicar que la concentració de la proteïna aïllada és molt baixa, o bé que s'haurien de considerar etapes posteriors de purificació.

Respecte de l'electroforesi SDS-PAGE, a la tinció del gel no s'observen les bandes corresponents a l'endo-1,4- β -xilanasa II, que s'haurien de veure a 27 Kda.³⁵ Malgrat que l'endo-1,4- β -xilanasa II té una mida de 21 Kda, l'augment de massa molecular és conseqüència dels processos de glicosidació posttranslacional. Per aquest motiu, posteriorment es decideix treballar amb *P. stipitis* tant en l'etapa de creixement i producció del plàsmid com per a una posterior expressió de la proteïna mutant, en cas que s'hagués realitzat un cop obtinguda la mutació desitjada. Certs estudis anteriors han posat de manifest que *P. stipitis* és un llevat més adequat per a l'expressió de l'endo-1,4- β -xilanasa II.³⁶ Tot i que *S. cerevisiae* és un llevat que s'utilitza normalment en l'expressió de proteïnes eucariotes, com és el cas de l'endo-1,4- β -xilanasa II, presenta alguns desavantatges, com per exemple una hiperglicosidació durant la modificació posttranslacional.³⁶ En canvi, l'endo-1,4- β -xilanasa II expressada en *P. stipitis* té una mida de 20,7 Kda, que és molt semblant a la mida de l'endo-1,4- β -xilanasa II silvestre o

wild type, la qual cosa indica que en l'expressió d'aquesta proteïna recombinant els processos de glicosidació són mínims.³⁶

D'altra banda, un cop s'obté el plàsmid recombinant, es realitza una seqüenciació d'aquest per a confirmar la incorporació de la mutació. En comparar la seqüència de bases de l'ADN de l'endo-1,4- β -xilanasasa II silvestre (*wild type*) amb la de la cadena recombinant, s'observa que no s'havia aconseguit introduir la mutació desitjada a l'extrem 3'-terminal de la seqüència d'aminoàcids de l'endo-1,4- β -xilanasasa II, ja que a la regió on esperàvem la mutació Ser190Cys (on Ser és serina i Cys és cisteïna) no hi va haver cap alteració. L'ampliació de la seqüència de bases corresponents a les proximitats de la regió on es volia introduir la mutació es mostra a continuació:

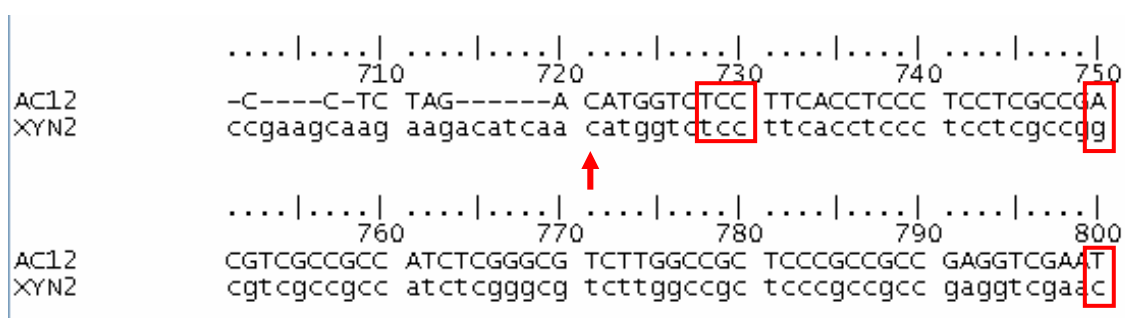


Fig. 3.41. Detall de la seqüència de bases nitrogenades del plàsmid recombinant obtingut (AC12) i comparació amb la seqüència de l'endo-1,4- β -xilanasasa II (XYN2). En vermell se senyala la part on s'esperava introduir la mutació i les regions on es van introduir mutacions aleatòries.

La seqüència AC12 és la que correspon al plàsmid que hem modificat mentre que la XYN2 és la seqüència de bases de l'ADN de l'endo-1,4- β -xilanasasa II original. S'han marcat els triplets TCC, els quals corresponen a l'aminoàcid Ser, mentre esperàvem el canvi d'una de les bases per a tenir el triplet TGC, que és el que correspondria a la Cys. S'han marcat també amb requadres altres bases de la seqüència que, en canvi, sí que han sofert una mutació. En aquest cas, les mutacions corresponen al canvi d'àcid aspàrtic (Asp) per glicina (Gly), es a dir, el canvi de GAC per GCC a la seqüència de bases. En el segon cas hi ha hagut un canvi de serina (Ser) per prolina (Pro) en la seqüència, TCC per CCC. Una possible raó per la qual no es va produir la mutació podria ser que els encebadors emprats no tinguessin una llargada suficient de la regió d'hibridació, de manera que no hibridessin a la regió d'interès, sinó en una altra zona. En qualsevol cas, s'hauria de procedir a començar de nou el procediment experimental, ja que no s'han obtingut els resultats desitjats. El procediment implicaria repetir les etapes des de l'extracció plasmídica en *P. stipitis*, perquè no es va poder obtenir la seqüència del

plàsmid aïllat abans d'introduir la mutació, ja que la tècnica de seqüenciació no ho va permetre.

Les etapes posteriors que s'haurien de realitzar després d'obtenir el clon amb la mutació específica Ser190Cys serien l'expressió i purificació del corresponent enzim recombinant (amb la mutació) utilitzant com a cèl·lula d'expressió *P.stipitis*, i la comprovació de la seva activitat d'acord amb el mètode d'assaig de l'activitat enzimàtica. Un cop hagués tingut lloc tot aquest procediment, es podria realitzar la immobilització dirigida de la proteïna, amb un suport reactiu a tiols i, per tant, es podria utilitzar per a les aplicacions corresponents. Es tractaria d'un suport basat en polímers monolítics en el qual se seleccionaria el monòmer amb la funcionalització adequada; també caldria la selecció d'uns altres reactius enllaçants, en lloc de NHS i EDC, ja que ara l'enllaç covalent no tindria lloc a través dels grups àcid carboxílic de l'enzim, sinó dels grups tiol. Hi ha diferents agents que són reactius amb grups sulfhidril (tiol), com per exemple N-Succinimidil S-acetiltioacetat (SATA)³⁷ o N-Succinimidil iodoacetat (SIA),³⁸ entre d'altres. La continuació d'aquests estudis es podria considerar en el desenvolupament d'una altra tesi doctoral.

3.5. Experiments d'hidròlisi enzimàtica emprant mòduls de membrana

Els resultats obtinguts als experiments d'hidròlisi amb membranes enzimàtiques es presenten en dues parts. La primera fa referència al funcionament de les dues membranes (ACPS i N25) en el tractament del substrat *Birchwood xylan*, utilitzant la cel·la UAB. La segona part comprèn els resultats obtinguts en la hidròlisi enzimàtica aplicada al tractament de dos tipus diferents de substrats, *Birchwood xylan* i els substrats de tipus URV, emprant el mòdul de filtració frontal i també els dos tipus de membrana. Totes les sèries són la mitja de tres experiments i les barres d'error corresponen a la desviació estàndard dels replicats.

3.5.1. Experiments amb la cel·la UAB

Influència de la temperatura

Tenint en compte els resultats obtinguts prèviament en els estudis de caracterització del funcionament i de l'activitat catalítica de les membranes enzimàtiques, com s'ha presentat a l'apartat 3.3.4 d'aquest capítol, s'observa que la temperatura és un paràmetre que influeix notablement en l'activitat enzimàtica. La temperatura òptima per a l'enzim endo-1,4- β -xilanasa II, tant en la seva forma lliure com immobilitzada, als dos suport polimèrics considerats, és 50 °C.¹⁴ Es realitzen experiments d'hidròlisi a diferents

temperatures amb les dues membranes (ACPS i N25) els quals mostren aquesta dependència. En tots els casos, tal com es mostra a la fig. 3.42, la concentració de productes alliberats a conseqüència de la reacció enzimàtica és més elevada quan es treballa a 50 °C. Al gràfic es mostren només els resultats corresponents a l'anàlisi de les mostres del compartiment de la dissolució de càrrega (*feed*). La concentració de sucres reductors en aquesta dissolució incrementa amb el temps, la qual cosa s'espera de la progressió de la reacció d'hidròlisi. Quan es comparen ambdues membranes (ACPS i N25) no hi ha diferències en els seu comportament catalític respecte del substrat *Birchwood xylan*, ja que en tots dos casos la concentració de sucres reductors, expressada com a quantitat equivalent de xilosa, és al voltant de 0,200 $\mu\text{mol/ml}$ a 50 °C. En canvi, en analitzar el compartiment de la dissolució receptora (*stripping*), no s'observa la presència d'aquests productes, ja que el senyal de les mostres no difereix del senyal corresponent al blanc. Aquesta observació posa de manifest que la configuració d'aquest mòdul de membrana no permet el transport dels productes a través de les membranes cap a la dissolució receptora o de recuperació.

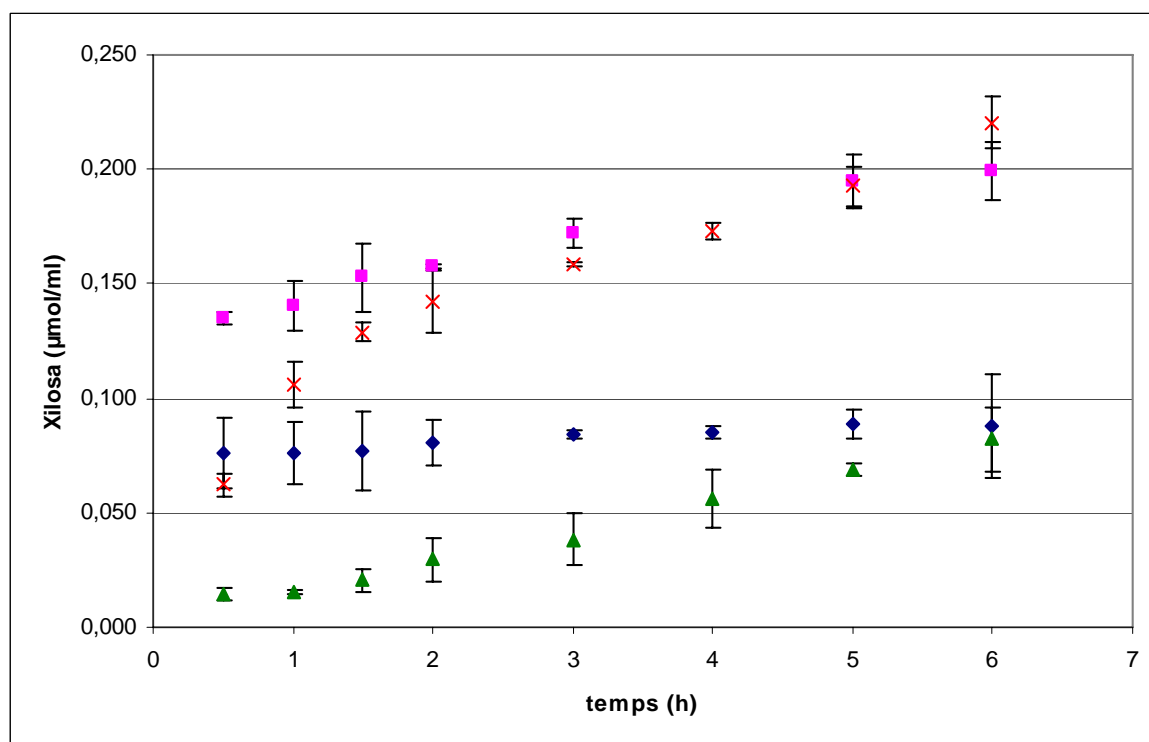


Fig. 3.42. Experiments d'hidròlisi enzimàtica amb la cel·la UAB. Es representa la concentració de xilosa a la dissolució de càrrega (*feed*) en funció del temps, tant per a les membranes ACPS a 23 °C (◆) i 50 °C (■), com per a les membranes N25 a 23 °C (▲) i 50 °C (×).

En experiments realitzats a temps més llargs, s'observa la presència de sucres reductors al compartiment de la dissolució receptora, la qual cosa indica un cert transport. Tanmateix, la concentració de productes a aquesta dissolució no és tan alta com la

concentració corresponent al mateix temps per a la dissolució de càrrega, cosa que sembla indicar que es tracta de difusió passiva. Els resultats es mostren a la fig. 3.43.

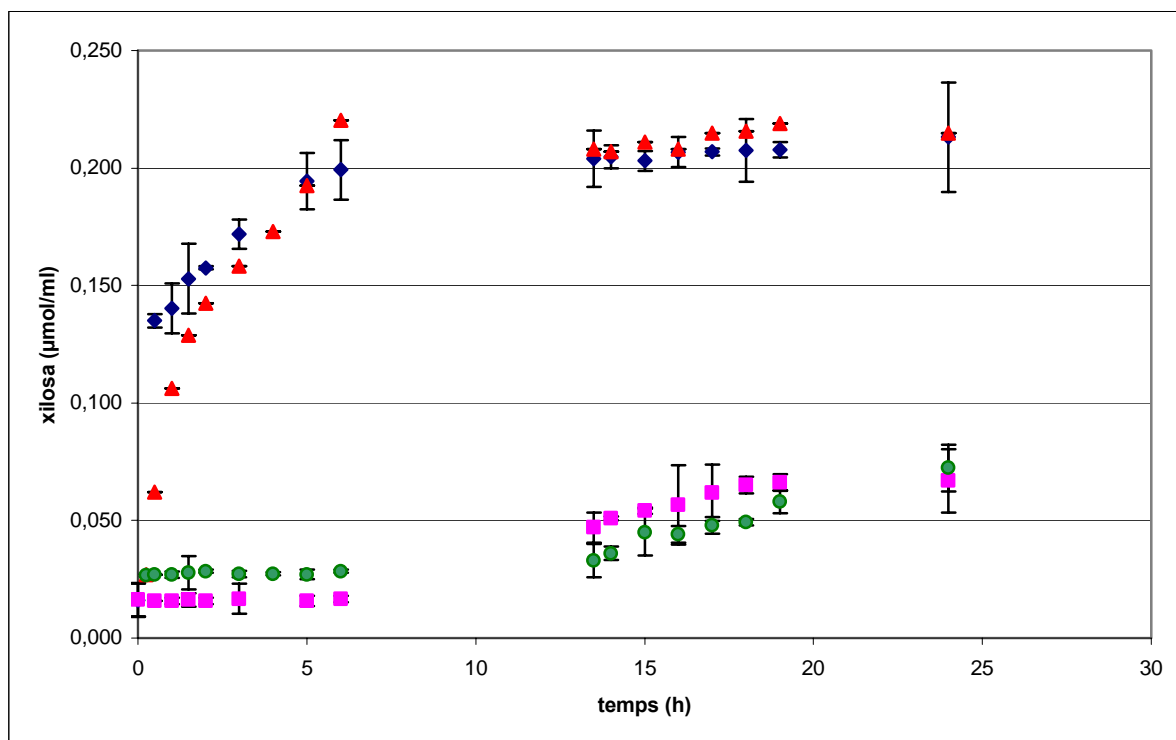


Fig. 3.43. Experiments d'hidròlisi enzimàtica amb la cel·la UAB a 50 °C i temps llargs. Concentració de xilosa en funció del temps, per a les membranes ACPS a la dissolució de càrrega o *feed* (◆) i receptora o *stripping* (■), i per a les membranes N25, també al *feed* (▲) i *stripping* (●).

Influència de diferències de pH entre els dos compartiments

S'estudia la influència d'una diferència de pH entre la dissolució de càrrega i la dissolució receptora. Es duen a terme experiments canviant el pH de la dissolució receptora, però mantenint el pH de la dissolució de càrrega constant a 6, perquè aquest és el valor òptim per al funcionament de l'enzim immobilitzat en ACPS. Només es realitzen experiments amb una de les membranes, ja que d'acord amb l'apartat anterior no s'observen diferències entre membranes als resultats d'hidròlisi obtinguts, i es tria la membrana ACPS per motius de disponibilitat. Els tres valors de pH per a la dissolució receptora són 4, 6 i 7,5. Tal com es pot observar a la fig. 3.44, l'absència de senyals a la dissolució receptora indica, novament, que aquest mòdul probablement no és adequat per a la separació dels productes del substrat. La concentració de sucres a les mostres de la dissolució receptora no difereix del senyal obtingut per al blanc (experiments realitzats amb membranes sense enzim) almenys durant les 6 primeres hores de reacció d'hidròlisi. Per tant, en aquestes condicions la diferència del pH entre els dos

compartiments de la cel·la no afavoreix un increment del transport dels productes a través de la membrana.

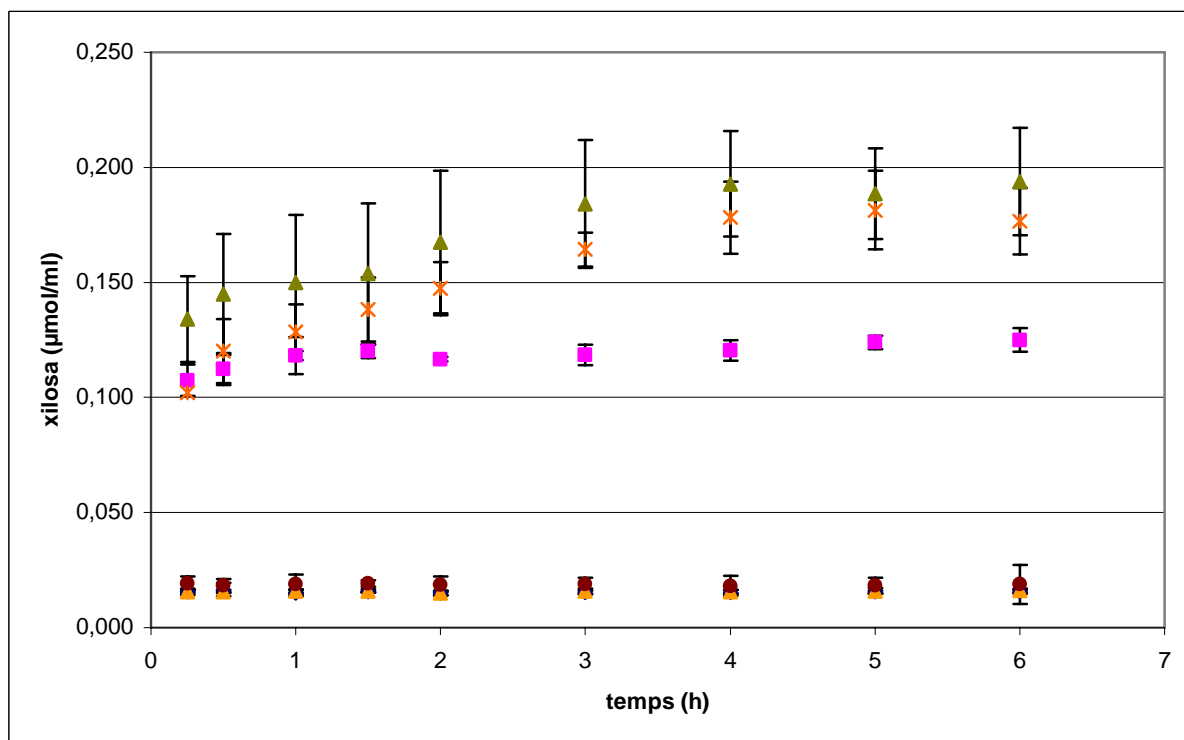


Fig. 3.44. Experiments d'hidròlisi enzimàtica amb membranes ACPS, emprant la cel·la UAB a 50 °C amb una dissolució de càrrega a pH 6. Concentració de xilosa en funció del temps per a les membranes ACPS present tant a la dissolució de càrrega o *feed* (a diferents pH de dissolució receptora) pH 4 (■), pH 6 (×) i pH 7,5 (▲), com a la dissolució receptora o *stripping*: pH 4 (◆), pH 6 (●) i pH 7,5 (*).

S'observa que no hi ha diferències significatives en la concentració de productes a la dissolució de càrrega (*feed*), entre els experiments en els quals el pH de la dissolució receptora és 6 o 7,5, i aquesta concentració és més alta que quan es treballa a pH 4 a la dissolució receptora. Se sap que a pH superiors a l'òptim els valors d'activitat enzimàtica són més alts que per sota de l'òptim, tenint en compte el perfil d'activitat relativa per a l'enzim immobilitzat (apartat 3.3.4). Si es considera que el pH de la dissolució receptora pot arribar a afectar, en part, l'entorn de l'enzim immobilitzat per contacte de la membrana amb les dues fases aquoses, es pot justificar que la concentració de productes a la dissolució de càrrega és més alta a pH 6 i 7,5 (i comparable entre ells) que a pH 4 (inferior a l'òptim). D'altra banda, en analitzar la concentració de productes a la dissolució receptora, no hi ha diferències entre els experiments realitzats a diferents valors de pH. En tot cas, no hi ha cap increment de la recuperació dels productes d'hidròlisi enzimàtica cap a la fase receptora, com a conseqüència d'un canvi en el valor del pH d'aquesta.

Reutilització de les membranes enzimàtiques

La possibilitat de reutilitzar les membranes enzimàtiques s'estudia realitzant experiments consecutius a 50 °C (a pH 6, tant a la dissolució de càrrega com a la receptora quan es treballa amb membranes ACPS, i pH 5 a ambdós compartiments en experiments realitzats amb membranes N25), emprant la mateixa membrana amb dissolució de càrrega i receptores noves. Els resultats per a les membranes ACPS, juntament amb els resultats dels experiments blanc corresponents (membrana ACPS sense l'endo-1,4- β -xilanasa II immobilitzada), es presenten a la fig. 3.45.

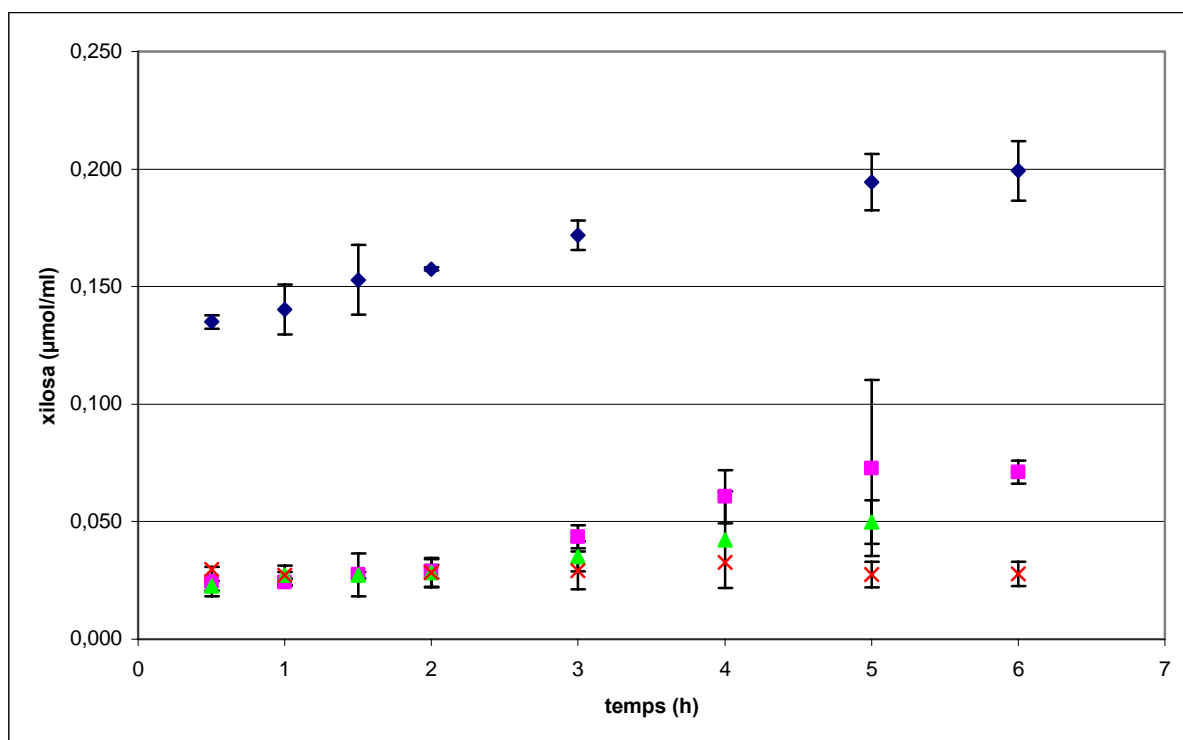


Fig. 3.45. Experiments de reutilització de les membranes ACPS amb la cel·la UAB: primer cicle (◇), segon cicle (■), tercer cicle (▲) i blanc (×).

S'observa que durant el segon cicle, després d'un experiment d'hidròlisi de 6 hores, la concentració d'oligosacàrids, expressada en termes de concentració de xilosa, ha disminuït considerablement respecte de la concentració obtinguda durant el primer cicle. Considerant el segon i tercer experiment d'hidròlisi, i tenint en compte les barres d'error, s'observa que els resultats en aquests casos no són estadísticament diferents dels resultats de l'experiment realitzat amb una membrana blanc, la qual cosa indica que no és possible reutilitzar aquestes membranes en aquestes condicions més enllà d'un experiment de 6 hores. Aquest efecte s'atribueix a una pèrdua d'activitat enzimàtica, tenint en compte que aquests experiments tenen lloc a 50 °C, i que se sap que les temperatures altes indueixen a la desnaturalització de proteïnes. L'endo-1,4- β -xilanasa

II manté la seva activitat catalítica a 4 °C durant un any,³⁹ però la velocitat de desactivació s'incrementa amb la temperatura.

També es considera la reutilització de les membranes N25 en experiments consecutius a 50 °C amb dissolucions aquoses noves de *feed* i *stripping*. Tal com es presenta a la fig. 3.46, els resultats de la concentració de sucres reductors originats als segons experiments d'hidròlisi són diferents dels senyals dels experiments amb la membrana blanc, tot i que és força baixa comparant-la amb la concentració del primer cicle. En aquest cas, també es planteja la hipòtesi de la possible desactivació tèrmica de l'enzim a conseqüència de treballar a 50 °C.

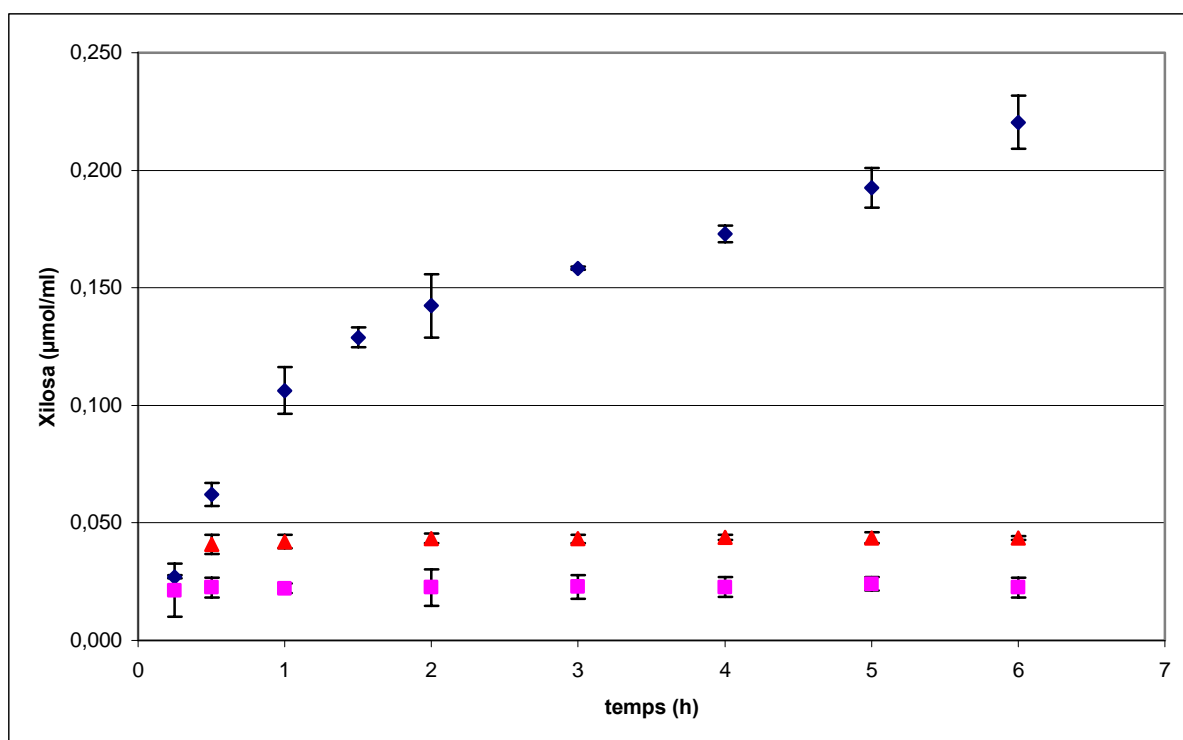


Fig. 3.46. Reutilització de la membrana N25 en experiments d'hidròlisi enzimàtica de *Birchwood xylan* consecutius, a 50 °C, amb la cel·la UAB: primer cicle (◇), segon cicle (▲) i experiments amb membrana blanca (■).

3.5.2. Experiments amb el mòdul de filtració frontal

Els resultats obtinguts en experiments realitzats amb aquest mòdul fan referència al tractament de dos tipus diferents de substrats, el substrat de tipus UAB (*Birchwood xylan*) i els substrat de tipus URV, obtingut directament del tractament de residus vegetals als laboratoris del Grup de Biopolímers Vegetals de la Universitat Rovira i Virgili (URV). En aquests experiments s'han emprat tant les membranes enzimàtiques ACPS com les N25.

Experiments amb *Birchwood xylan* com a substrat

Les mostres analitzades corresponen a fraccions del filtrat obtingut del pas de la dissolució inicial de substrat (que és la mateixa que la dissolució de càrrega o *feed* als experiments realitzats amb la cel·la UAB) a través de la membrana, aplicant una pressió d'1 bar. Aquesta dissolució de filtrat presenta una aparença incolora, a diferència del color marró de la dissolució inicial de substrat.

En comparar els resultats obtinguts amb els dos tipus de membrana en la hidròlisi del substrat comercial, *Birchwood xylan*, quan s'utilitza la membrana N25, la concentració de productes (sucres reductors, expressats com a xilosa) a la dissolució de filtrat és superior a l'obtinguda del tractament hidrolític del mateix substrat amb la membrana ACPS i equival a 0,600 $\mu\text{mol/ml}$ de xilosa, aproximadament. En canvi, amb la membrana ACPS només s'obtenen 0,150 $\mu\text{mol/ml}$ de xilosa, tal com es pot observar al gràfic de la fig. 3.47.

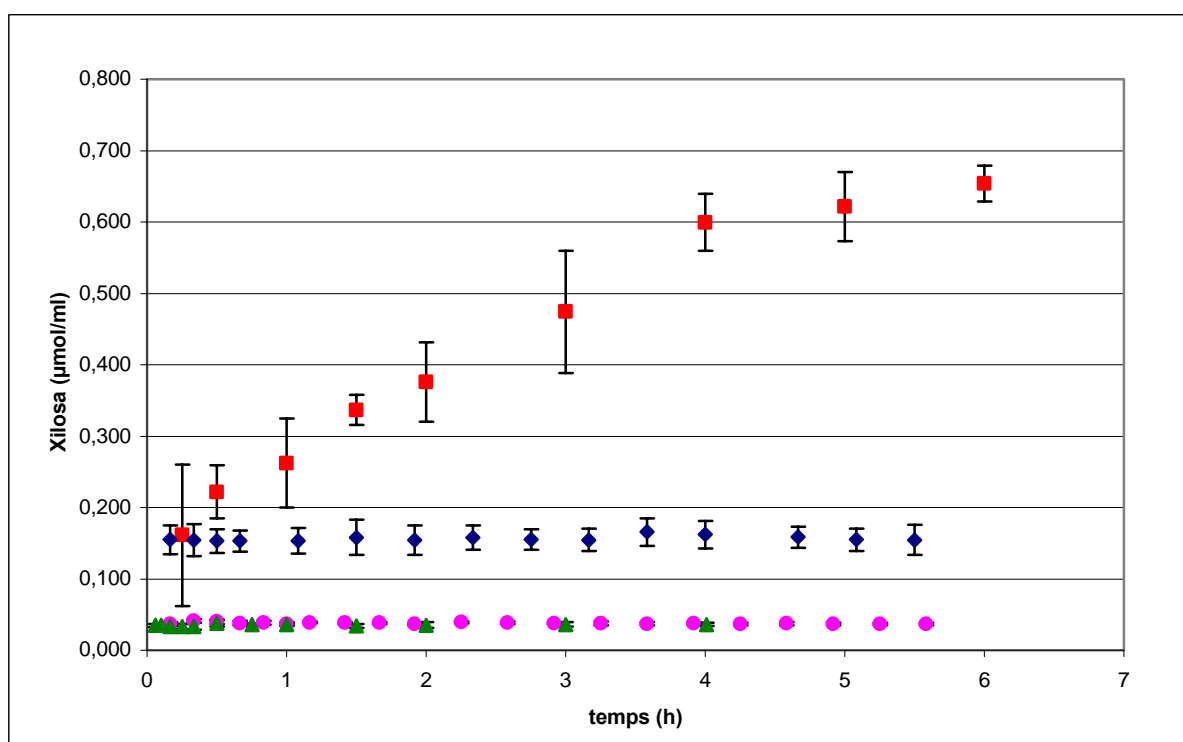


Fig. 3.47. Hidròlisi de *Birchwood xylan* amb el mòdul de filtració frontal amb membranes ACPS (◆) i N25 (■), amb el mòdul de filtració frontal. També es presenten els resultats per als experiments blanc corresponents membrana: ACPS blanc (●) i N25 blanc (▲).

Aquesta diferència es pot explicar tenint en compte les diferències entre aquestes membranes. Les membranes de tipus ACPS estan basades en un polímer derivat de la polisulfona el qual incorpora grups acrilat per a establir un enllaç covalent amb l'endo-1,4- β -xilanasas II.⁴ En aquest cas la quantitat d'enzim immobilitzat és baixa, a

conseqüència de les característiques físiques i de l'estructura final de la membrana polimèrica. Tenint en compte la morfologia d'aquest tipus de membranes i la informació obtinguda durant la seva caracterització (SEM, adsorció/desorció de gasos, flux d'aigua pura), aquesta quantitat d'endo-1,4- β -xilanasasa II immobilitzada és baixa¹⁴ i pot ser conseqüència del fet que la immobilització hagi estat només a nivell superficial. Les membranes d'acrilat de polisulfona són asimètriques i tenen una estructura més densa a la superfície, sense porus que permetin la difusió de la proteïna a dins durant el procés d'immobilització, per la qual cosa només podrà reaccionar amb els grups acrilat més externs, els que es troben a nivell superficial. D'altra banda, les membranes N25 estan constituïdes per polímers monolítics, els quals són materials més hidrofílics que la polisulfona i els seus derivats. Per tant, aquests proporcionen un entorn més favorable per a la immobilització d'enzims i biomolècules en general, la qual cosa es traduirà en un millor comportament catalític. Les membranes N25 ofereixen un entorn per a una millor estabilització de l'enzim. Les mateixes característiques d'aquests materials, amb estructures polimèriques amb una elevada superfície i grau d'entrecruament,⁴⁰ i, per tant, amb un alt nombre de grups funcionals disponibles per a enllaçar amb les molècules d'enzim,⁴¹ permeten el desenvolupament de suports amb una capacitat relativament alta de càrrega d'enzim, en un entorn favorable. Tenint en compte aquestes observacions, es pot explicar que amb les membranes N25 s'obtingui rendiment més alt d'hidròlisi en les mateixes condicions experimentals que amb les ACPS. En realitzar experiments amb la cel·la UAB no s'observen diferències entre les membranes, ja que la reacció d'hidròlisi enzimàtica té lloc només a nivell superficial, a la part en què la membrana està en contacte amb la dissolució de substrat, ja que aquesta no es força a passar dins de l'estructura interna de la membrana. En canvi, amb el mòdul de filtració frontal, s'està forçant el pas de la dissolució de substrat a l'interior de l'estructura interna de les membranes, per la qual cosa s'espera un contacte entre l'enzim immobilitzat dins de l'estructura polimèrica de la membrana N25, a diferència de les membranes ACPS.

Tenint en compte que els millors resultats s'obtenen amb les membranes del tipus N25 s'estudien les possibilitats de reutilització d'aquestes darreres. Tal com es mostra a la fig. 3.48, al segon experiment o cicle no es detecta la presència de productes d'hidròlisi en la dissolució de filtrat. Després del primer cicle s'observa una capa marró sòlida dipositada sobre la superfície de la membrana que ha estat en contacte amb la dissolució

de càrrega. Aquesta capa ofereix una resistència a la filtració⁴² en un segon experiment consecutiu d'hidròlisi, ja que s'observa que cal un increment de la pressió aplicada al llarg dels experiments per tal de mantenir el flux i, per tant, el temps de residència del substrat en contacte amb l'enzim immobilitzat constant, la qual cosa és imprescindible si es vol tenir resultats reproduïbles i comparables. D'altra banda, el descens del flux està habitualment relacionat amb fenòmens d'embrutament i de polarització per concentració, malgrat que en els experiments s'ha mantingut en agitació la dissolució de càrrega, per tal de minimitzar aquest efecte.²⁸

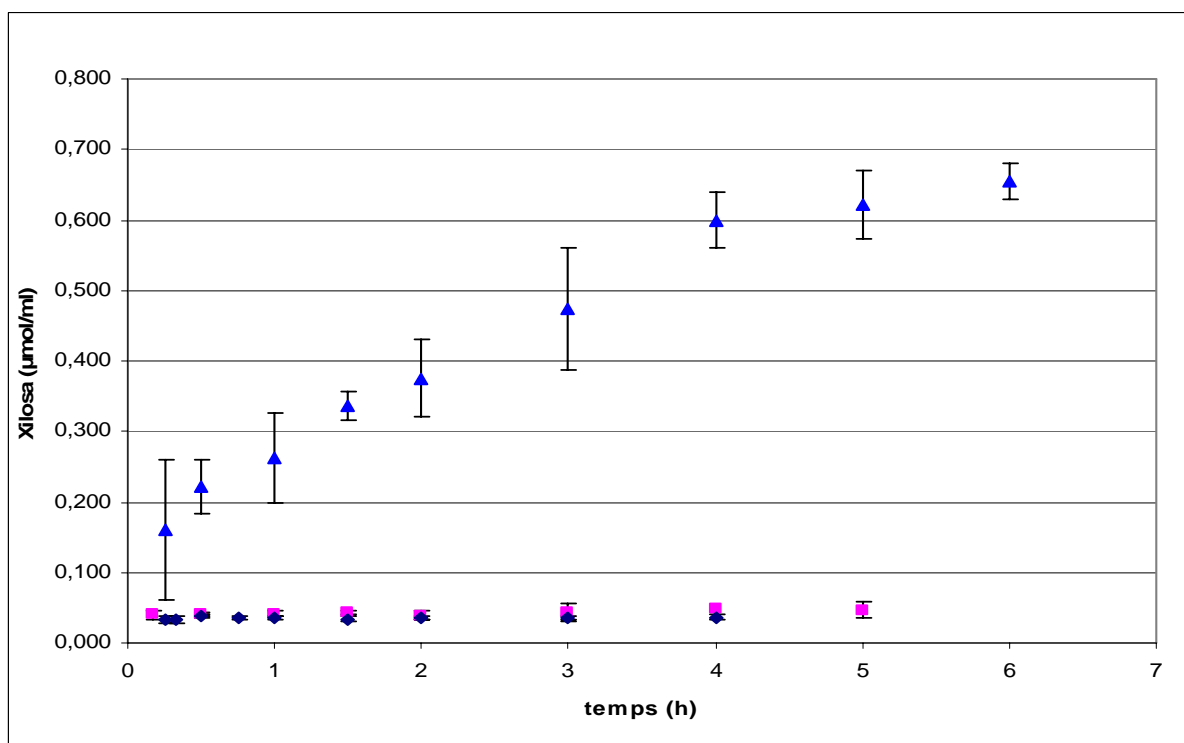


Fig. 3.48. Reutilització de les membranes N25 en experiments consecutius d'hidròlisi de *Birchwood xylan* amb el mòdul de filtració frontal: primer cicle (▲), segon (■) i experiment amb membrana blanca (◆).

Experiments amb el substrat del tipus URV

Ambdós tipus de membranes s'apliquen al tractament del substrat del tipus URV, provinent de la hidròlisi química de closca de morenc. A la fig. 3.49 es presenten els resultats corresponents a la reutilització de les membranes ACPS en dos experiments d'hidròlisi consecutius, és a dir, emprant la mateixa membrana amb dissolució de substrat nova. En aquest cas, la concentració de productes al filtrat equival a 0,090 µmol/ml de xilosa al primer cicle i 0,060 µmol/ml de xilosa al segon. Malgrat que s'obté menor quantitat de producte que en el tractament del substrat del tipus UAB (*Birchwood xylan*), la possibilitat de reutilització de les membranes en experiments

d'hidròlisi enzimàtica successius és interessant des del punt de vista de la seva aplicació en casos reals. Cal tenir present que l'afinitat dels enzims depèn del substrat (i, per tant, de la seva naturalesa i estructura polimèrica, possibles grups substituents i ramificacions), la qual cosa explica la diferència en els rendiments de les reaccions d'hidròlisi en cada cas. De tota manera, tal com es pot observar al gràfic, és possible utilitzar la mateixa membrana ACPS en un segon experiment d'hidròlisi consecutiu.

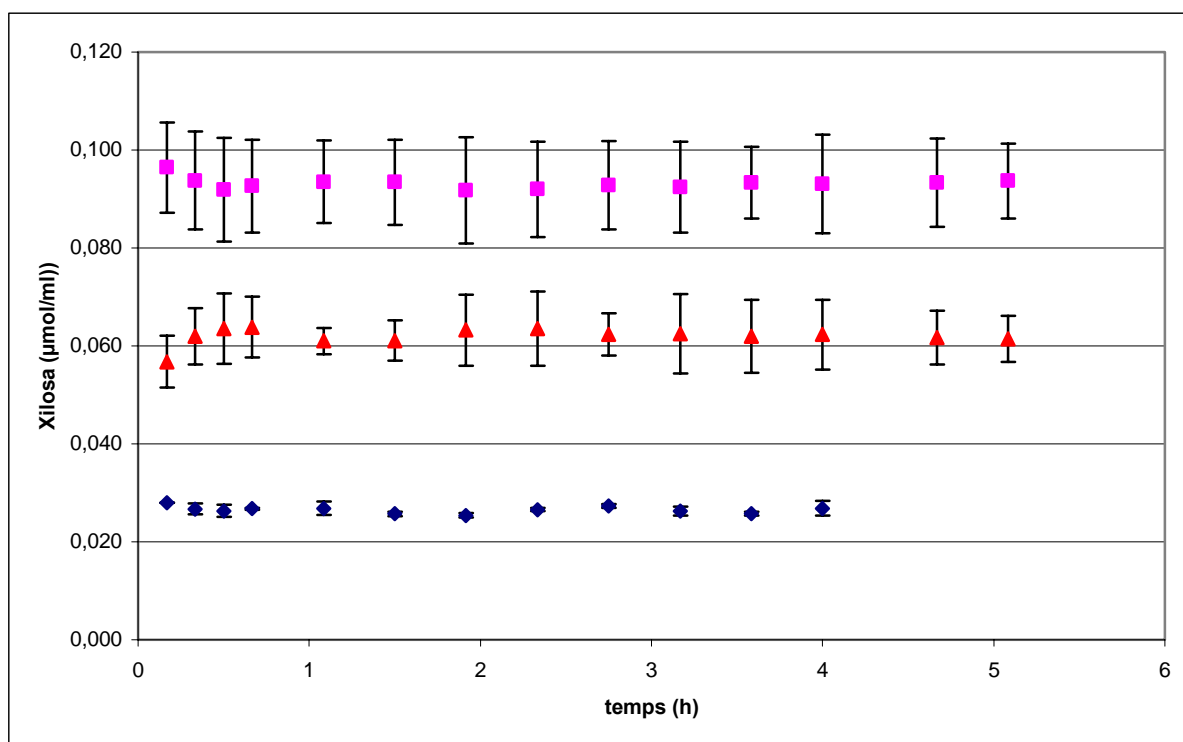


Fig. 3.49. Reutilització de les membranes ACPS en experiments consecutius d'hidròlisi de substrats tipus URV, amb el mòdul de filtració frontal: primer cicle (■), segon cicle (▲) i experiment blanc (◆).

Respecte de la reutilització de les membranes N25 en el tractament de substrats del tipus URV, al primer experiment d'hidròlisi la concentració mitja d'oligosacàrids en el filtrat és de 0,065 µmol/ml de xilosa, i al segon cicle la concentració obtinguda es redueix a 0,045 µmol/ml de xilosa (fig. 3.50). Malgrat que les dades corresponents al segon cicle d'hidròlisi enzimàtica són diferents dels resultats obtinguts per a una membrana blanc (en absència d'enzim), des del punt de vista estadístic, a partir de la observació de les barres d'error, el rendiment de la reacció d'hidròlisi enzimàtica al segon experiment successiu amb la mateixa membrana no és prou alt en aquest segon cicle per a acceptar la reutilització de la membrana. Atès que l'afinitat de l'enzim depèn del substrat amb el qual interacciona, la reutilització del sistema de membrana dependrà de la naturalesa de les mostres que cal tractar. Per tant, s'hauria d'estudiar la reutilització de les membranes per a cada cas particular de substrat considerat.

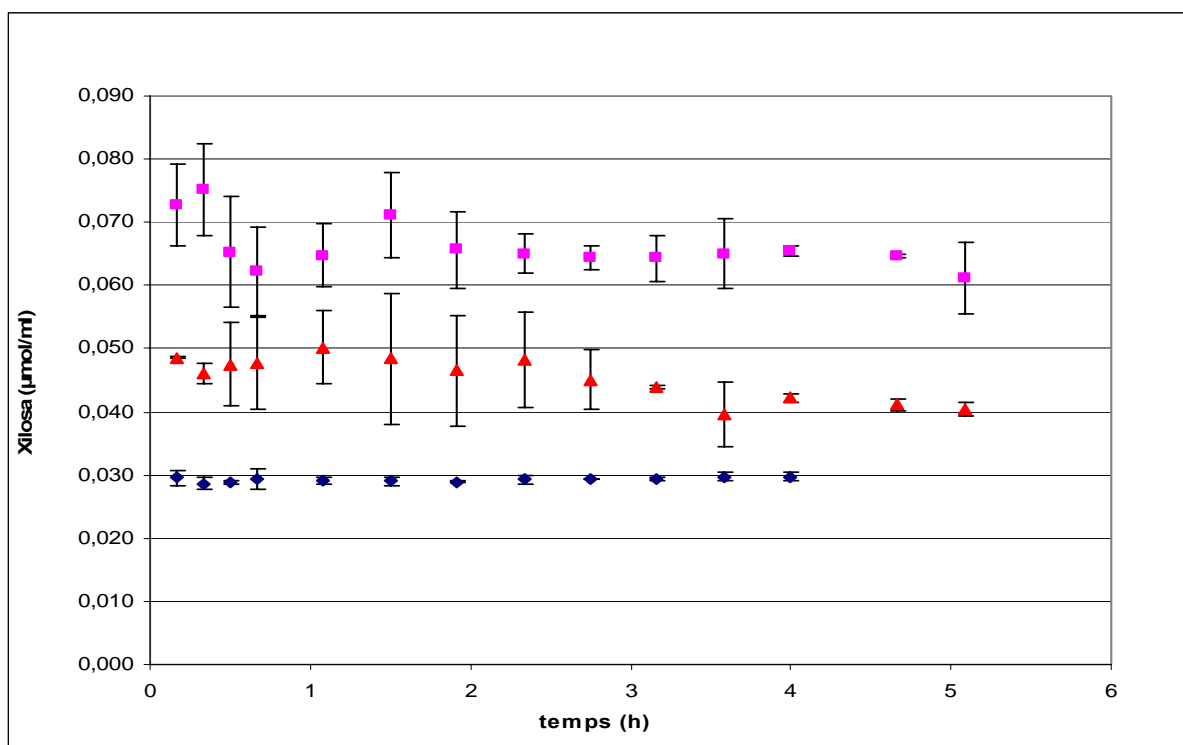


Fig. 3.50. Reutilització de les membranes N25 en experiments consecutius d'hidròlisi de substrats tipus URV, amb el mòdul de filtració frontal: primer cicle (■), segon cicle (▲) i experiment blanc (◆).

A tall de resum, en general, s'observa que per a tots dos tipus de membranes enzimàtiques es pot considerar la seva aplicació com a catalitzadors en la hidròlisi de polímers de tipus xilà, ja que l'enzim endo-1,4- β -xilanasas II manté la seva activitat catalítica un cop immobilitzat a través d'enllaços covalents. Per tant, l'acrilat de polisulfona i els polímers monolítics són adequats, no només com a materials per a la preparació de membranes, sinó també com a suports per a la immobilització.

Amb la **cel·la UAB**, a partir de l'anàlisi de sucres reductors s'observa que la reacció d'hidròlisi enzimàtica progressa, ja que es detecta la presència de xilooligosacàrids a la dissolució de càrrega, els quals no estaven presents a la dissolució inicial de substrat. No hi ha diferències significatives entre les membranes ACPS i N25 en el tractament de *Birchwood xylan* en aquestes condicions, tal com es veu del valor de la concentració de xilooligosacàrids. Tot i així, no és possible separar els productes d'hidròlisi del substrat a través del transport d'aquests cap a la dissolució receptora. D'altra banda, un canvi de pH en aquesta dissolució receptora tampoc no afavoreix el transport. Tenint en compte que els experiments d'hidròlisi enzimàtica tenen lloc a 50 °C, per tal de treballar en les condicions de temperatura òptimes per a tenir la màxima activitat enzimàtica, quan s'estudien les possibilitats de reutilització de les membranes s'observa que no és

possible emprar-les en experiments consecutius, malgrat que encara s'alliberen alguns xilooligosacàrids. Tenint en compte la baixa concentració d'aquests productes formats i l'error experimental associat a la concentració, aquesta pèrdua d'activitat enzimàtica, probablement pot ser conseqüència de la desnaturalització i la desactivació de la proteïna, afavorida per la temperatura.

Quan s'utilitza el **mòdul de filtració frontal**, en aplicar pressió és possible separar parcialment els productes del substrat inicial. Del tractament del substrat comercial *Birchwood xylan* amb les membranes N25 s'obtenen concentracions de productes d'hidròlisi més altes que amb les membranes ACPS, en les mateixes condicions experimentals. De tota manera, no és possible reutilitzar les membranes N25 en experiments consecutius per a hidrolitzar *Birchwood xylan*. D'altra banda, però, les membranes ACPS sí que es poden reutilitzar almenys a dos experiments consecutius de 6 hores, en el tractament de materials lignocel·lulòsics procedents del tractament previ d'hidròlisi química de residus de biomassa vegetal (substrat del tipus URV), malgrat que la concentració de productes és inferior a l'obtinguda amb el substrat comercial.

3.6. Caracterització dels productes d'hidròlisi enzimàtica

3.6.1. Caracterització per electroforesi capil·lar de zona (CZE)

Mètode directe

L'anàlisi de monosacàrids (D-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa i D-xilosa) i d'oligosacàrids (per exemple, rafinosa i sacarosa) pel mètode directe per CZE, en un rang de concentracions entre 6 i 10 μM , no permet observar els pics corresponents a la formació de complexos entre els sucres i l'ió tetraborat⁴³ present a la dissolució reguladora del pH, els quals, teòricament, presenten absorció a 195 nm. Aquest efecte és freqüent en la detecció directa d'oligosacàrids per electroforesi capil·lar, ja que els carbohidrats presenten baixa absortivitat molar a longituds d'ona inferiors a 200 nm⁴⁴ i presenten, per tant, problemes de sensibilitat.⁴⁵ Per tant, la detecció en aquestes longituds d'ona en alguns casos presenta dificultats amb els detectors fotomètrics convencionals,⁴⁴ malgrat que s'esperava que amb l'addició de l'ió tetraborat s'observés un increment de l'absorbància. Tenint presents aquests resultats, no es realitzen més anàlisis amb aquest mètode ja que en aquest cas no permet detectar els analits.

Mètode indirecte

D'acord amb la conclusió derivada de l'apartat anterior, s'analitzen els mateixos compostos emprant un mètode indirecte.⁴⁴ A conseqüència de la presència d'una espècie absorbent, en aquest cas triptòfan, a l'electròlit de fons, s'obtenen senyals com pics negatius en arribar els analits al detector. Per als monosacàrids analitzats (els mateixos que a l'apartat anterior) s'obtenen electroferogrames reproduïbles, però en canvi, en analitzar una mescla d'aquests no s'aconsegueix resoldre. Tanmateix, en analitzar mostres d'hidròlisi de xilà, en aquest cas també s'observen problemes de sensibilitat per la qual cosa aquest mètode tampoc no es considera per a anàlisis posteriors.

Mètode amb derivatització prèvia

En aquest cas es requereix una derivatització prèvia dels xilooligòmers considerats (amb grau de polimerització entre 2 i 6) i també del monòmer de xilosa, tal com s'ha descrit al capítol del procediment experimental. Tant els electroferogrames dels compostos individuals com els de les mescles de xilooligòmers són força reproduïbles.

A la fig. 3.51 es presenta l'electroferograma corresponent a la mescla de xilooligòmers. El primer pic correspon al flux electroosmòtic. Els altres corresponen als analits. Ja que es treballa en mode de polaritat directa, i que els xilooligòmers tenen càrrega negativa, els primers d'arribar al detector són els de grau de polimerització superior (perquè la seva mobilitat electroforètica és menor i, com que la mobilitat del flux electroosmòtic cap al càtode és la mateixa, la seva mobilitat neta és més gran). L'ordre d'elució és: xilohexaosa, xilopentaosa, xilotetraosa, xilotriosa, xilobiosa i xilosa.

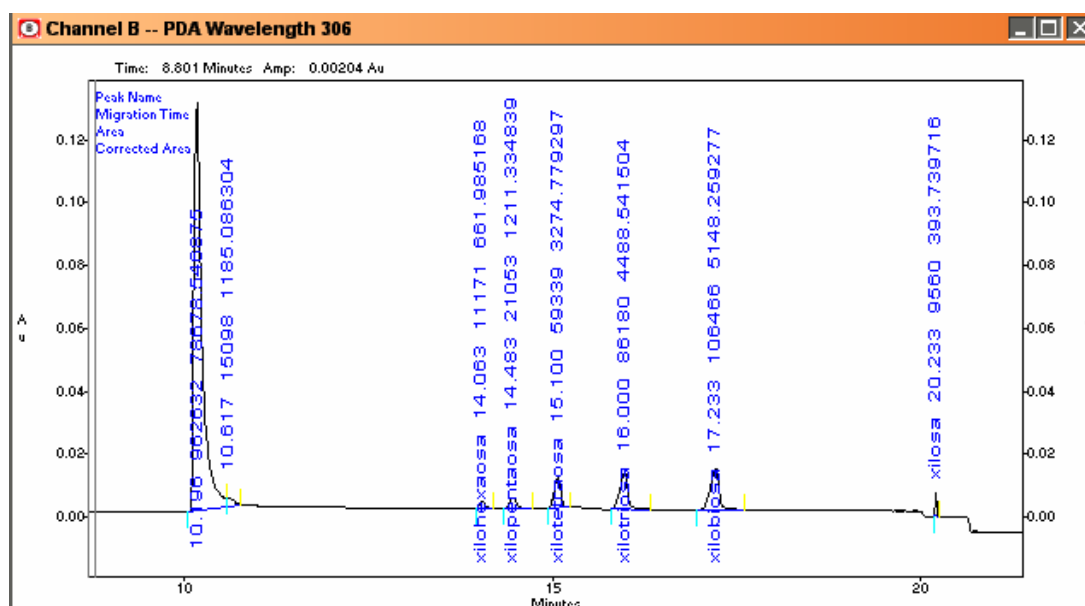


Fig. 3.51. Identificació dels xilooligòmers al cromatograma de la mescla de patrons.

Tanmateix, també s'analitzen amb aquest mètode mostres d'hidròlisi, tant de substrat del tipus URV (d'origen natural) com del tipus UAB (*Birchwood xylan*, substrat comercial) amb l'enzim endo-1,4- β -xilanas II en dissolució, d'acord al procediment descrit a l'apartat 2.3.1. Als electroferogrames corresponents (fig. 3.52 i 3.53), s'observen senyals que posen de manifest la formació de xilooligòmers de baix grau de polimerització, a partir de substrats de polisacàrids complexos.

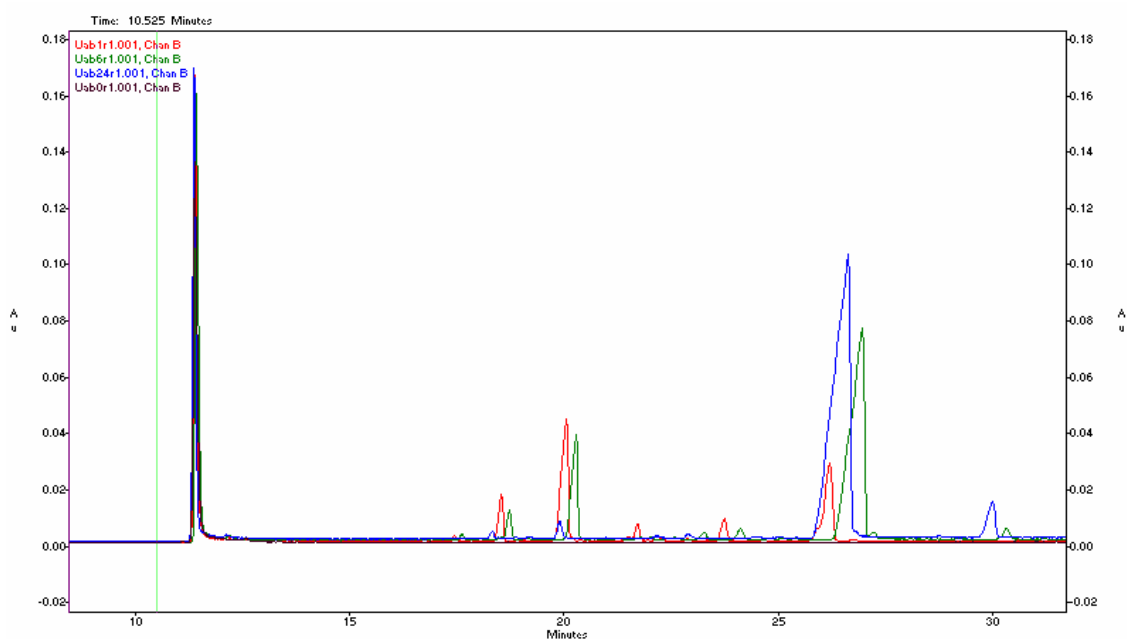


Fig. 3.52. Electroferogrames de la injecció de les mostres d'hidròlisi enzimàtica de *Birchwood xylan*. Es representa la mostra a temps inicial (UAB0), en marró, al cap d'una hora (UAB1), en vermell, a les 6 hores (UAB6), en verd, i a les 24 hores (UAB24) de reacció, en blau.

A la fig. 3.52 es presenta l'electroferograma de la mostra d'hidròlisi de *Birchwood xylan*. L'àrea del pic a 28 minuts augmenta amb el temps d'hidròlisi. L'àrea dels pics que apareixen a temps de migració menors disminueix a mesura que la reacció progressa, indicant que es formen productes de menor massa, i que els xilooligòmers de major grau de polimerització desapareixen. A l'anàlisi de la hidròlisi de la mostra subministrada per la URV, s'observa el mateix comportament en el cas de la mostra de *Birchwood xylan*. Els electroferogrames es presenten a la fig. 3.53.

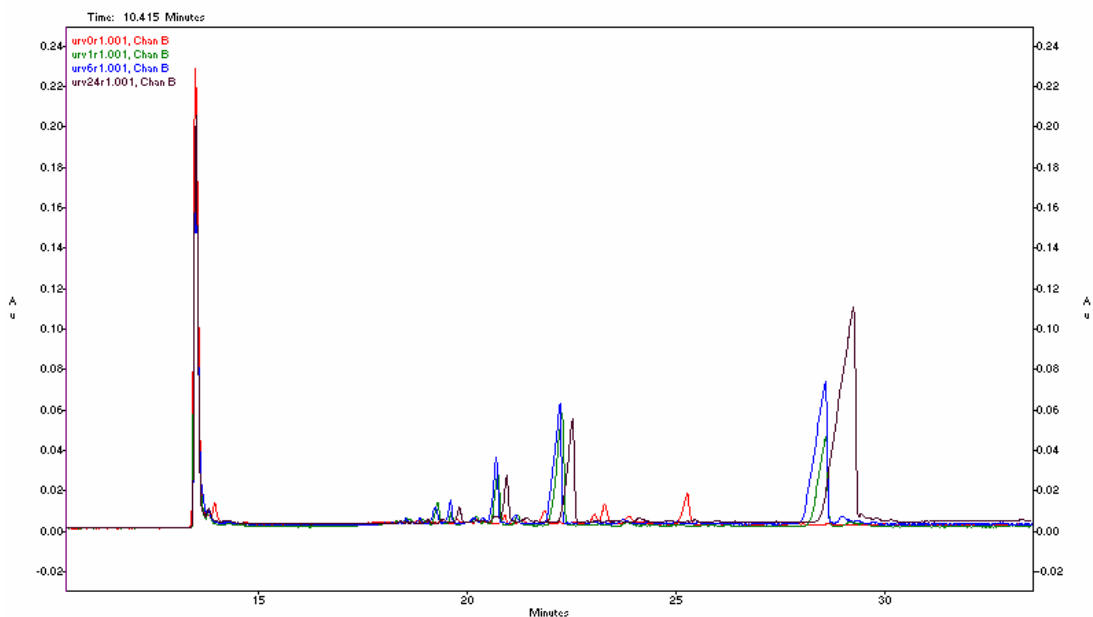


Fig. 3.53. Electroferogrames corresponents a les mostres d'hidròlisi del substrat URV. Es representa la mostra a temps inicial (URV0, en marró), al cap d'una hora (URV1, en vermell), a les 6 hores (URV6, en verd) i a les 24 hores de reacció (URV24, en blau).

Es realitza la quantificació del monòmer amb un calibratge amb xilosa, emprant ribosa com a patró intern, segons el procediment descrit a la bibliografia.⁴⁶ Per a la resta de xilooligòmers se suposa un comportament semblant.⁴⁶ S'analitza també una mostra de control (de concentració coneguda) que s'interpol·la a la recta de calibratge i es compara el resultat predit per la recta obtinguda amb el resultat obtingut experimentalment. Com es veu a la fig. 3.54 s'observa un bon ajust d'ambdós valors, l'experimental (en rosa) i el teòric (recta de calibratge).

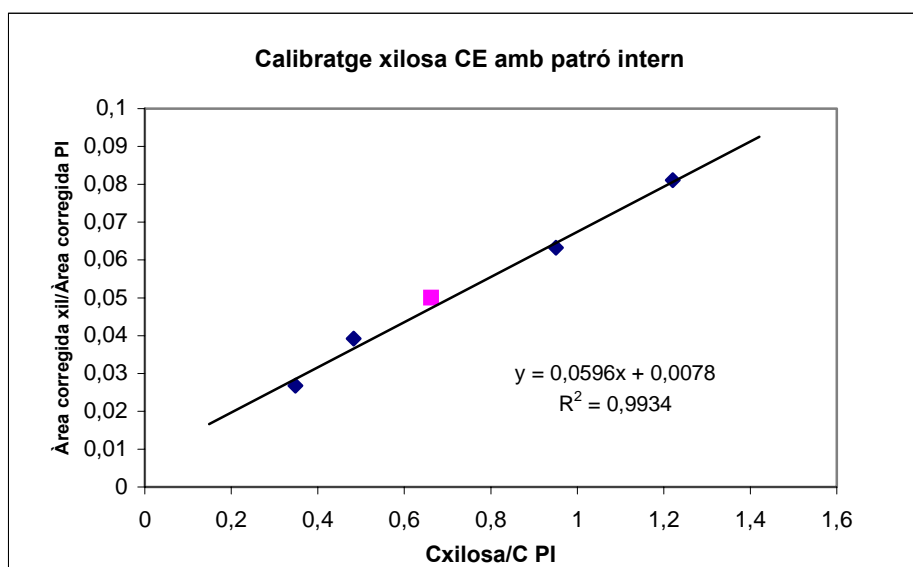


Fig. 3.54. Recta de calibratge obtinguda per a la xilosa emprant ribosa com a patró intern. En lila s'indica la mostra de control.

En general, es pot afirmar que aquest mètode de derivatització de carbohidrats previ a l'anàlisi per electroforesi capil·lar permet la seva detecció, tant individualment com en mescles d'aquests. Alhora, permet quantificar el monosacàrid (xilosa) si s'utilitza ribosa com a patró intern, com es comprova de l'anàlisi d'una mostra coneguda i per interpolació a la recta de calibratge. Tot i així, no es realitza un estudi d'aplicació d'aquest mètode de quantificació per als xilooligosacàrids de grau de polimerització entre 2 i 6, ja que el cost associat a la preparació de patrons purs per a la recta de calibratge el fa inviable com a mètode de determinació de rutina. Per aquest motiu, es consideren altres tècniques per a l'anàlisi d'oligosacàrids.

3.6.2. Resultats de la cromatografia de permeació en gel (GPC)

En el cas de la cromatografia de permeació en gel (GPC), s'analitza tant les mostres d'hidròlisi dels tipus UAB i URV com alguns dels xilooligòmers patró. El mètode d'anàlisi per a GPC ja havia estat desenvolupat i validat prèviament tal com s'ha descrit a l'apartat 2.4.3. Atès que la tècnica GPC s'utilitza per a analitzar mostres d'oligosacàrids als laboratoris de la URV, aquests resultats es comparen els obtinguts amb la tècnica CZE amb el mètode amb derivatització prèvia, que s'ha utilitzat als laboratoris de la UAB i que s'ha comentat a l'apartat anterior. De cada anàlisi s'obté el cromatograma corresponent.

Per al cas de les mostres d'hidròlisi, a part dels cromatogrames, també s'obtenen les anomenades corbes GPC. La corba GPC correspon a la corba de distribució d'oligosacàrids en funció de la mida de la seva cadena polimèrica. A l'eix d'abscisses es representa la massa molecular. Com més gran és el polímer, més es desplaça la corba cap a la dreta. A l'eix d'ordenades es representa $W(\log M_w)$, que correspon a la fracció de la massa total del polímer d'un determinat pes molecular. Com en tota funció de distribució, l'àrea total sota la corba és 1. Així, doncs, de l'obtenció i observació de les corbes GPC per a diferents temps d'hidròlisi, es pot veure com varia la distribució de pes molecular de les mostres; a mesura que la reacció avança s'obtenen productes de massa menor, és a dir, oligòmers de menor grau de polimerització. Aquesta informació completa la que s'extreu de l'observació dels cromatogrames.

S'enregistren els cromatogrames corresponents als patrons de xilosa, xilobiosa i xilotriosa (fig. 2A, 3A i 4A de l'annex A) per a determinar el temps de retenció que correspon a cada xilooligòmer. Per tal de veure l'efecte del tampó d'acètic/acetat a les mostres, s'obté el cromatograma del corresponent blanc (fig. 5A de l'annex A). S'hi observa un pic negatiu a 11,097 minuts, que és comú a tots els cromatogrames, i que és un pic de sistema, així com el pic positiu a 9,2 minuts, que també és un pic de sistema.

En general, als cromatogrames de les mostres s'observen un conjunt de pics, a diferents temps de retenció, cosa que indica que tenim una barreja de xilooligòmers. A mesura que el temps de reacció avança, el nombre de pics a temps de retenció menors disminueix (corresponents a xilooligòmers de pes molecular més gran i, per tant, grau de polimerització més alt). D'altra banda, augmenta la concentració de xilooligòmers de grau de polimerització més baix i, en conseqüència, l'àrea dels pics corresponents, la qual cosa és una evidència de l'avanç de la reacció d'hidròlisi.

Respecte dels cromatogrames de les mostres UAB, a la mostra inicial (temps 0, UAB0), a part dels pics corresponents al blanc s'observa la presència d'unes bandes amples a 5,482 i 6,763 minuts, que poden indicar la presència d'oligòmers de massa molecular alta procedents de la fracció soluble de xilà que tenim inicialment (fig. 3.55). A mesura que la reacció d'hidròlisi enzimàtica progressa, es continua observant el pic negatiu de sistema (després del pic de màxima intensitat dels cromatogrames). La intensitat relativa d'aquest pic de sistema respecte dels altres pics dels cromatogrames és molt baixa en tots els casos (fig. 3.56, 3.57 i 3.58). Entre 8,194 i 10,337 minuts apareixen tot un seguit de pics superposats. Aquests corresponen a oligòmers de menor pes molecular i són producte de la hidròlisi enzimàtica del substrat inicial. Amb el temps, l'àrea dels pics a temps de retenció més llargs incrementa, cosa que significa que augmenta la proporció de xilooligòmers de pes molecular menor i grau de polimerització menor, tal com es podia preveure. L'àrea relativa del pic a 10,384 minuts cada vegada és més gran. Comparant-la amb el cromatograma de la injecció del patró de xilosa pur, es pot assignar el pic a 10 minuts a la xilosa.

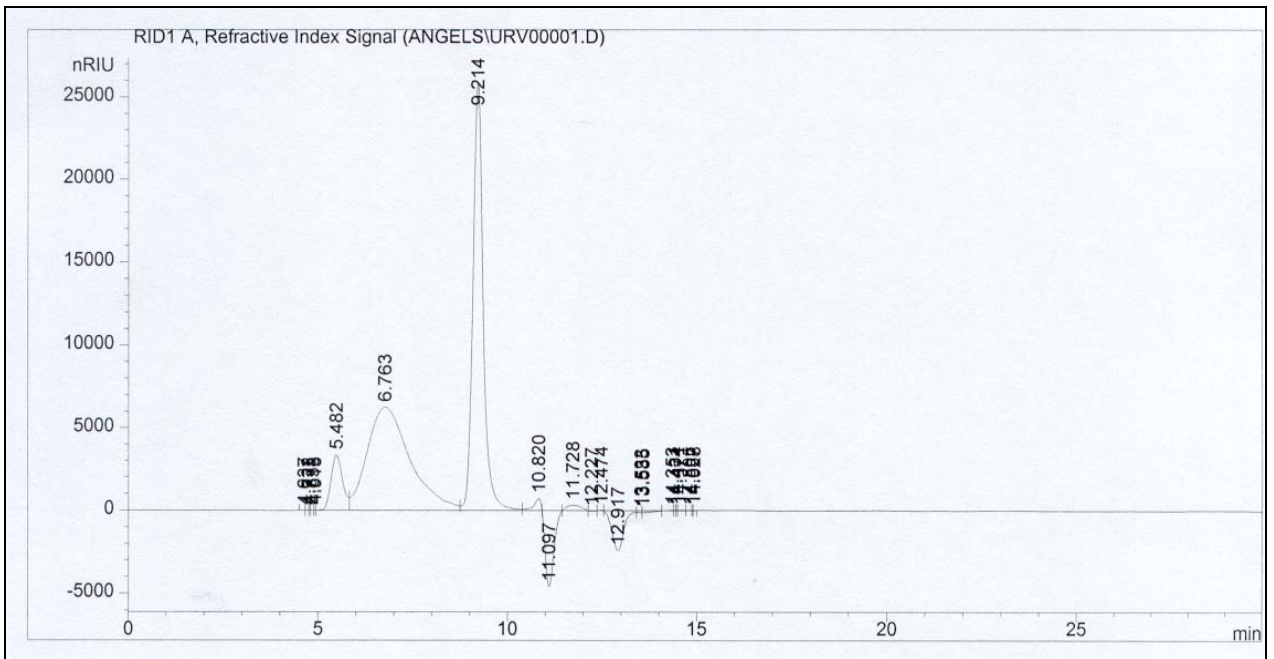


Fig. 3.55. Cromatograma UAB 0.

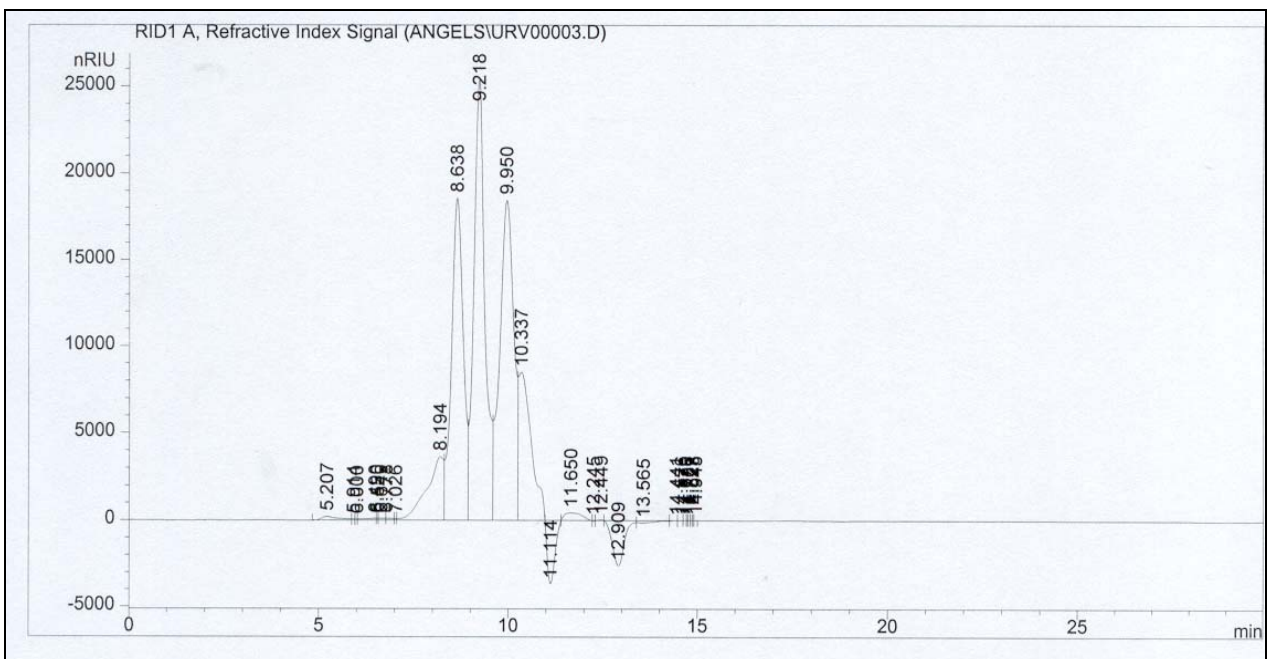


Fig. 3.56. Cromatograma UAB 1.

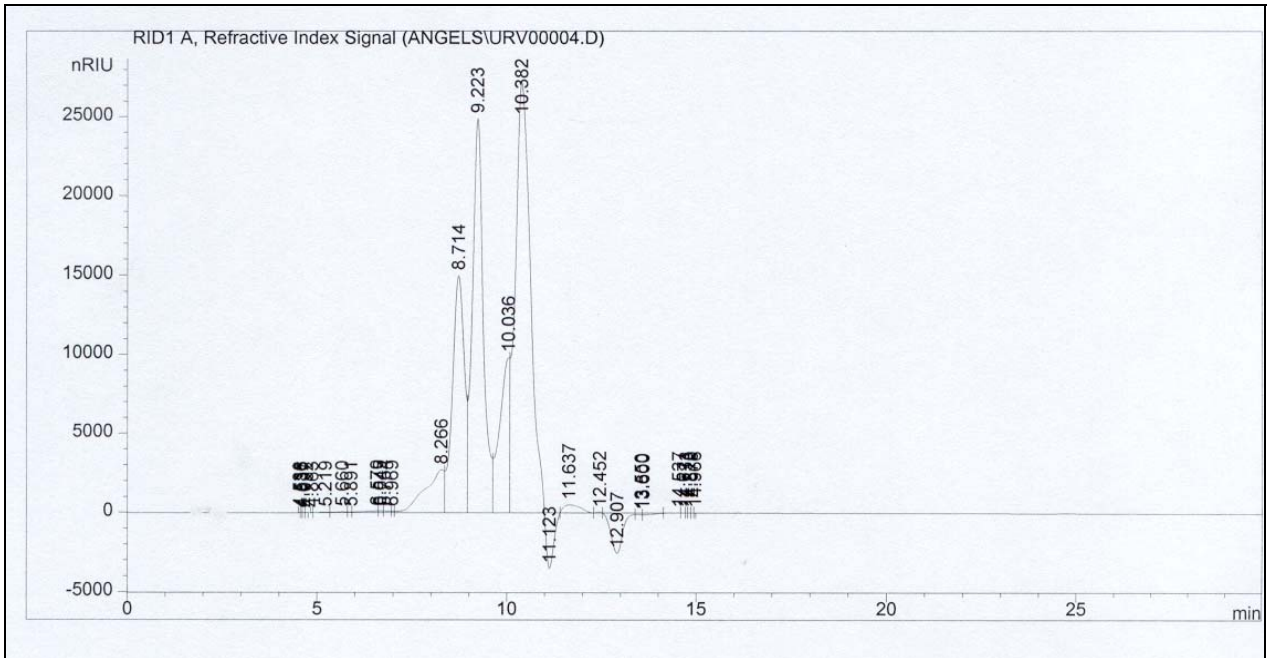


Fig. 3.57. Cromatograma UAB 6.

Per tant, a partir dels cromatogrames de les mostres d'hidròlisi del substrat comercial (UAB), es veu com el xilà es despolimeritza per a donar xilooligòmers de menor pes molecular (per tant, cadenes més curtes). D'altra banda, a mesura que augmenta el temps, l'espècie majoritària observada és el monòmer. A la fig. 3.58 es mostra el cromatograma corresponent a la mostra, després de 24 hores d'hidròlisi enzimàtica.

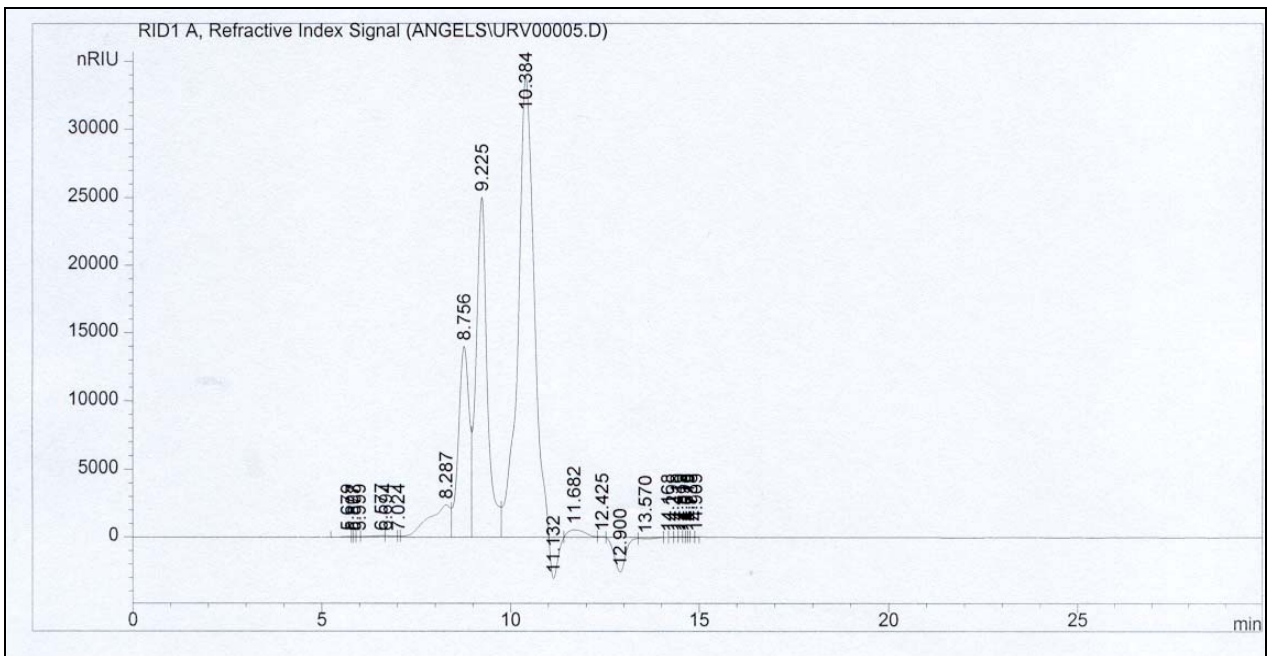


Fig. 3.58. Cromatograma UAB 24.

A la hidròlisi de mostres del tipus URV inicialment a temps 0 (URV0), a part del pic negatiu a 11,048 minuts, que com ja s'ha comentat, és un pic de sistema, hi ha un

conjunt de pics amples entre 8,538 i 10,220 minuts (fig. 3.59). Això indica que inicialment el monòmer i xilooligòmers de baix grau de polimerització estan presents a la mostra. Cal recordar que aquesta mostra ja prové d'una etapa d'hidròlisi (no enzimàtica) de biomassa vegetal, concretament de closca de moresc.

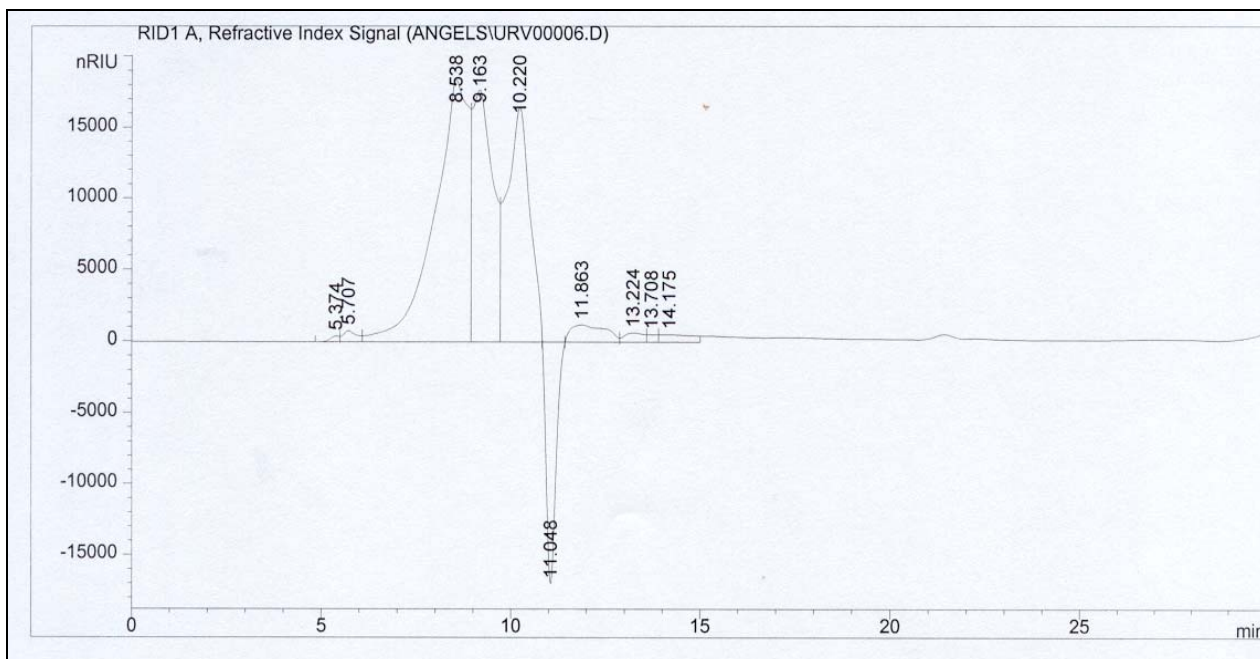


Fig. 3.59. Cromatograma URV 0.

A mesura que la reacció d'hidròlisi progressa amb el temps, l'àrea relativa dels mateixos pics augmenta, és a dir, incrementa la quantitat de xilooligòmers de baix grau de polimerització de la mostra. Al cap d'una hora de reacció (URV 1, fig. 3.60), el pic més alt és el de 9,977 minuts, que correspon al temps de retenció de la xilobiosa.

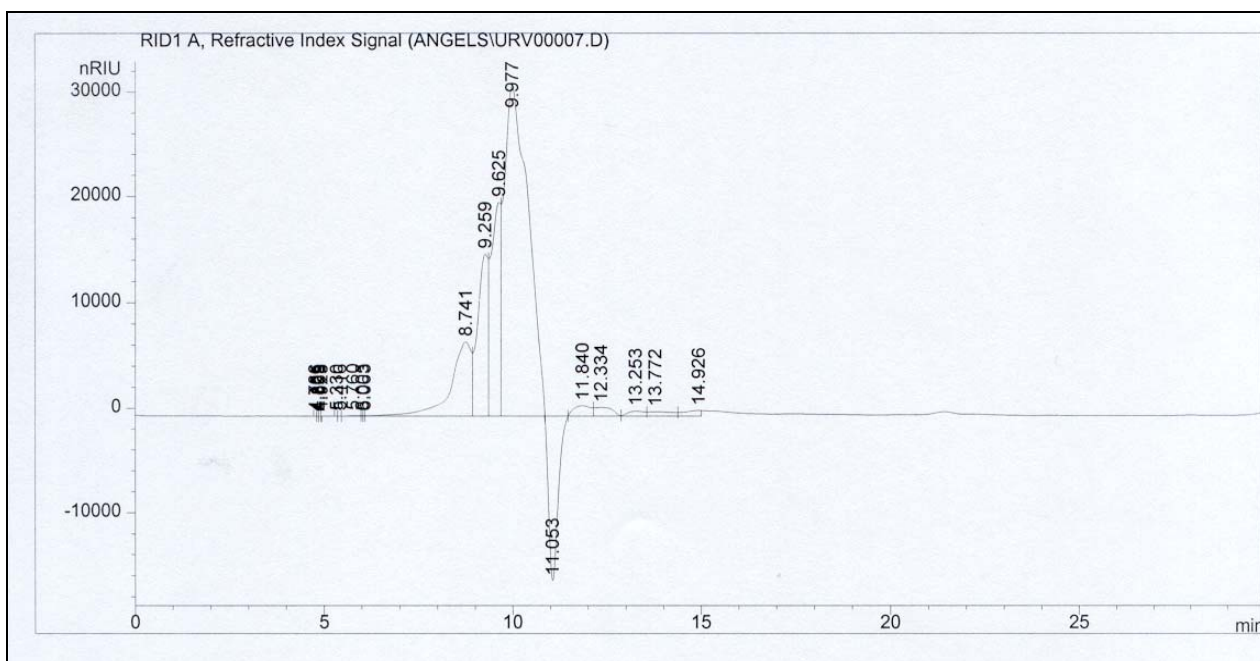


Fig. 3.60. Cromatograma URV 1.

A les 6 hores de reacció (fig. 3.61) s'observa que el pic majoritari és el de 10,332 minuts (xilosa, monòmer), si bé encara hi ha d'altres pics corresponents a xilooligòmers de pes molecular més gran, la seva àrea és relativament menor que al cromatograma de la mostra.

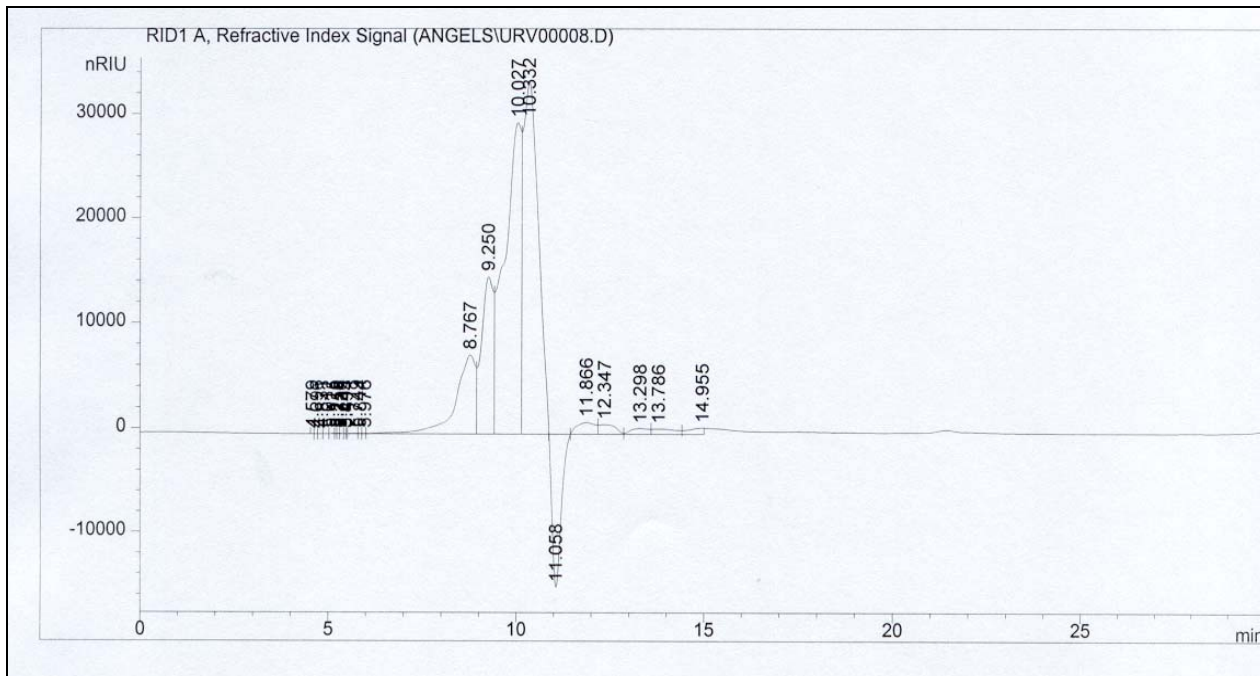


Fig. 3.61. Cromatograma URV 6.

A les 24 hores (fig. 3.62), l'àrea relativa del pic a 10,367 minuts és molt més gran que la de la resta de pics. L'espècie majoritària és el monòmer. Per tant, 24 hores de reacció amb l'enzim en dissolució condueixen a l'obtenció d'una espècie que no és la d'interès.

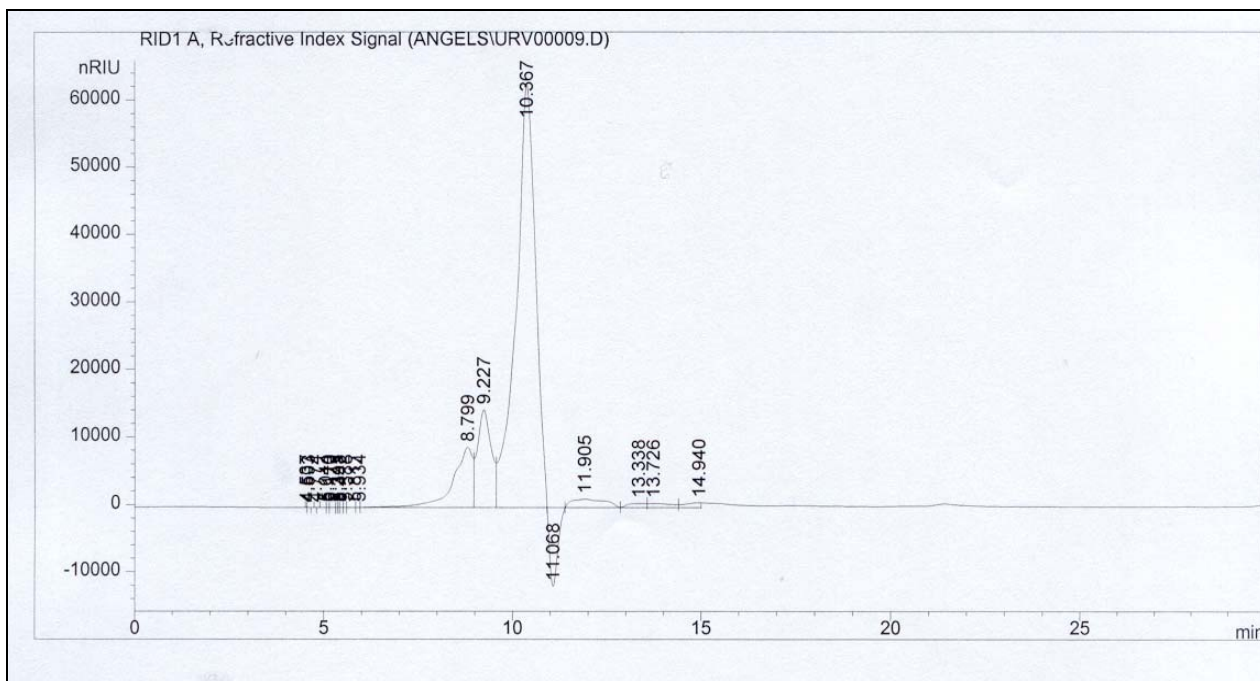


Fig. 3.62 Cromatograma URV 24.

Comentaris sobre les corbes GPC de les mostres d'hidròlisi UAB

A la corba GPC de la mostra inicial UAB 0 (fig. 3.63), s'observen senyals a la regió de massa molecular de 1.000 Daltons* (D), malgrat que no s'espera observar senyals de xilooligòmers, ja que es tracta d'una mostra comercial de xilà. Segons el que s'observa al cromatograma de la mateixa mostra, aquest senyal indica la presència d'oligòmers de massa molecular alta presents a la mostra comercial. A la mostra UAB 1 (fig. 3.64) la major proporció del producte té masses moleculars superiors a 1.000 D. (*) 1D=1 u.m.a.

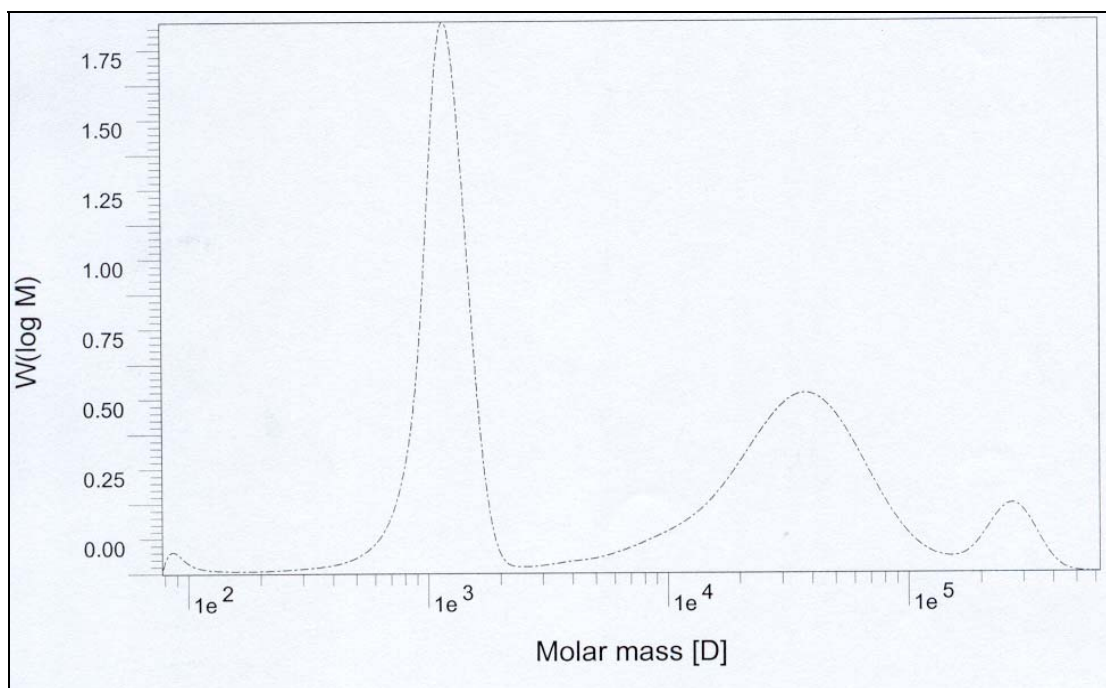


Fig. 3.63. Corba GPC corresponent a la mostra UAB 0.

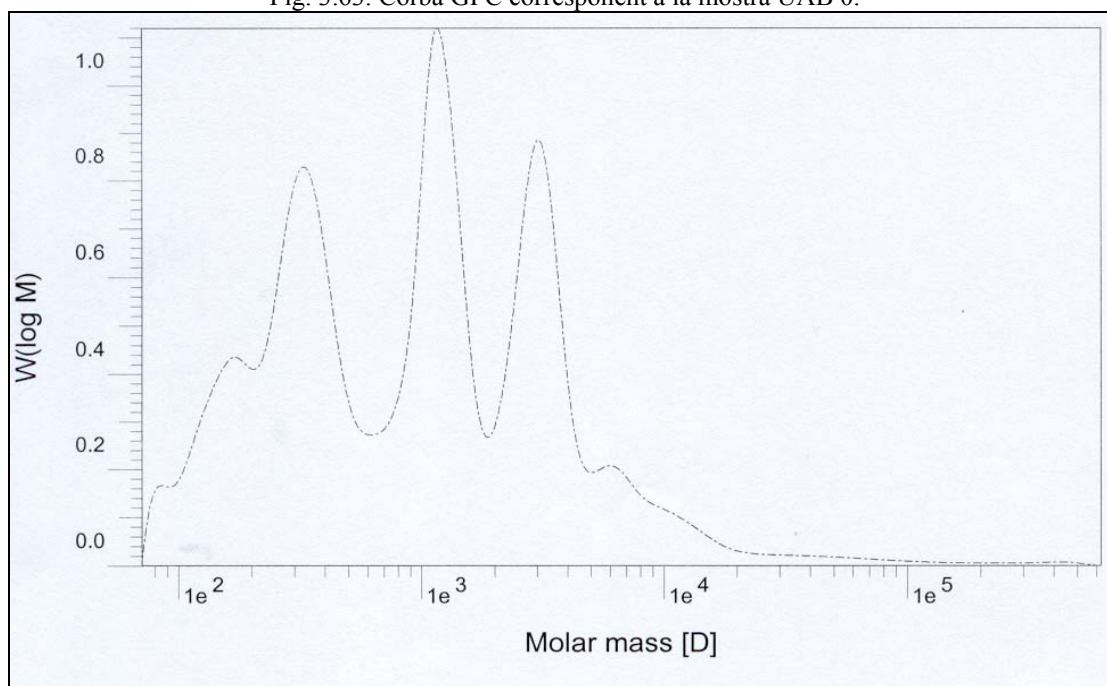


Fig. 3.64. Corba GPC corresponent a la mostra UAB 1.

A la mostra UAB 6 (fig. 3.65) s'observa que la major part del polímer té una massa molecular entre 100 i 1.000 D, a conseqüència del progrés de la reacció d'hidròlisi, tot i que encara hi ha una fracció important que té una massa molecular superior a 1.000 D.

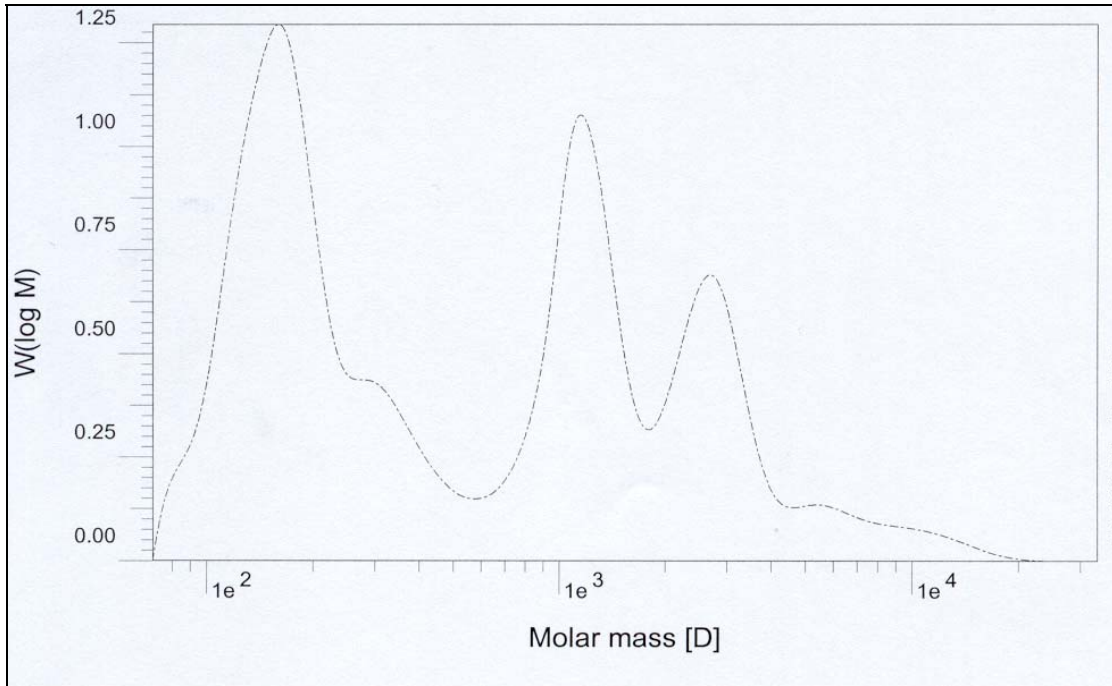


Fig. 3.65. Corba GPC corresponent a la mostra UAB 6.

En canvi, per a la mostra UAB 24 (fig. 3.66) el perfil és molt semblant a l'anterior, però la proporció relativa de la fracció de massa molecular al voltant de 100 D és superior, fet que confirma novament la hidròlisi del xilà en unitats oligomèriques de mida menor.

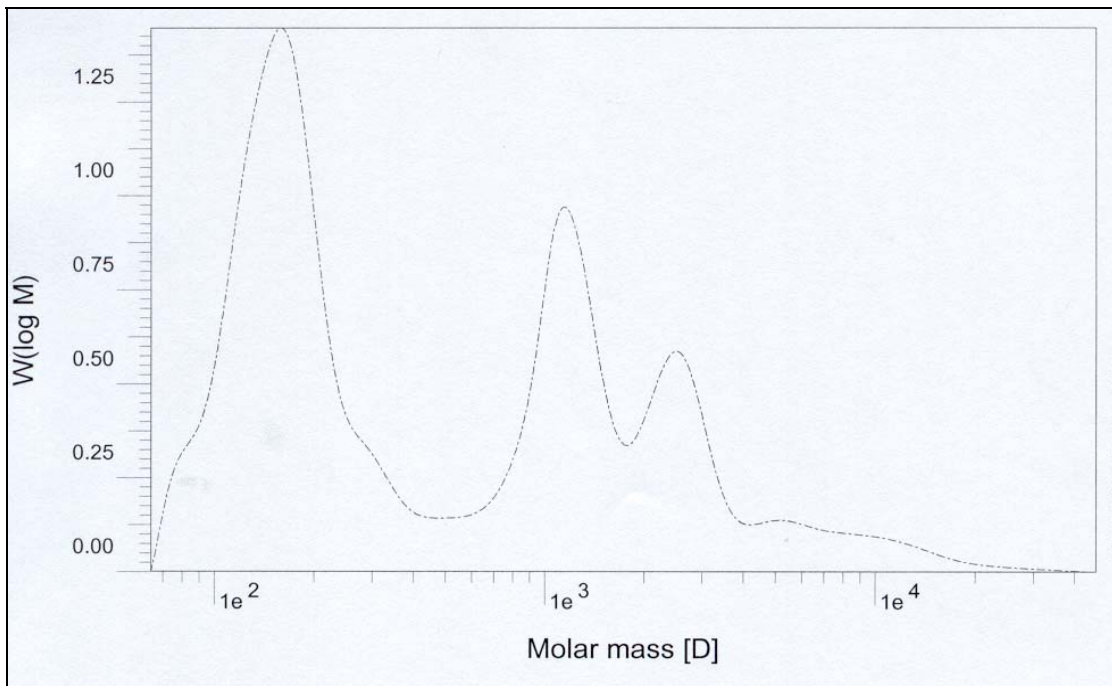


Fig. 3.66. Corba GPC corresponent a la mostra UAB 24.

Comentaris sobre les corbes GPC de les mostres d'hidròlisi URV

La corba GPC de la mostra URV 0 (fig. 3.67) mostra que la fracció de polímer amb massa molecular baixa (entre 100 i 1.000 D) i la fracció amb massa molecular més gran (1.000-10.000 D) estan presents aproximadament en la mateixa proporció. A la resta de corbes GPC (URV 1, URV 6 i URV 24, fig. 3.68, 3.69 i 3.70, respectivament), a mesura que avança la reacció d'hidròlisi, la proporció de fracció de massa molecular baixa també augmenta i arriba a ser pràcticament el total de la mostra.

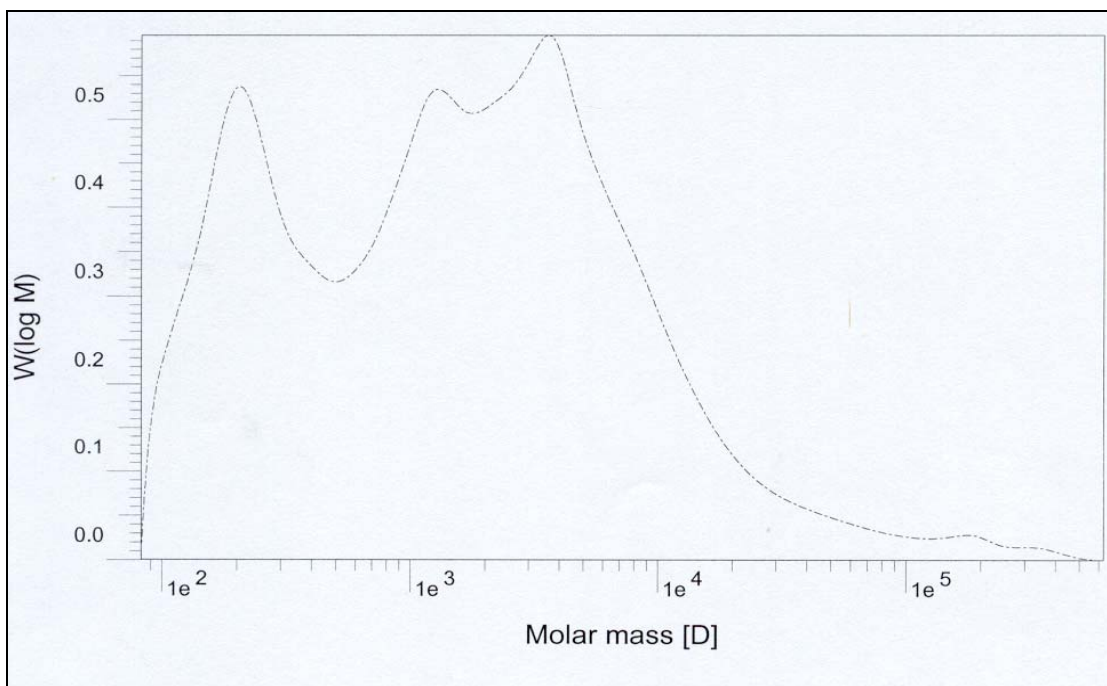


Fig. 3.67. Corba GPC corresponent a la mostra URV 0.

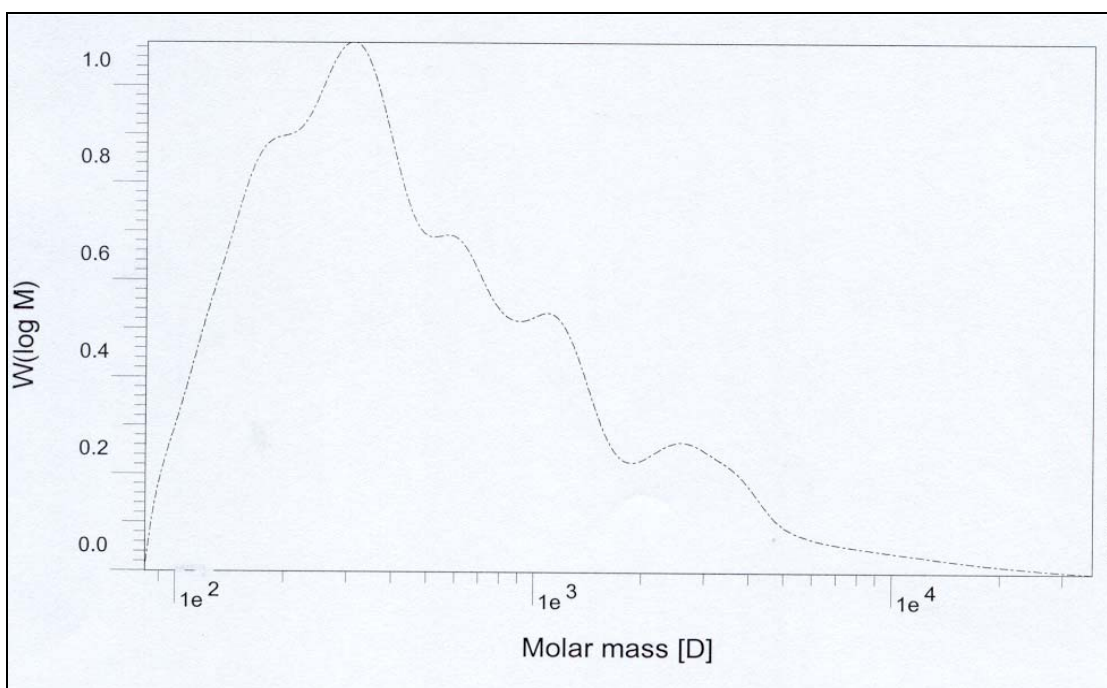


Fig. 3.68. Corba GPC corresponent a la mostra URV 1.

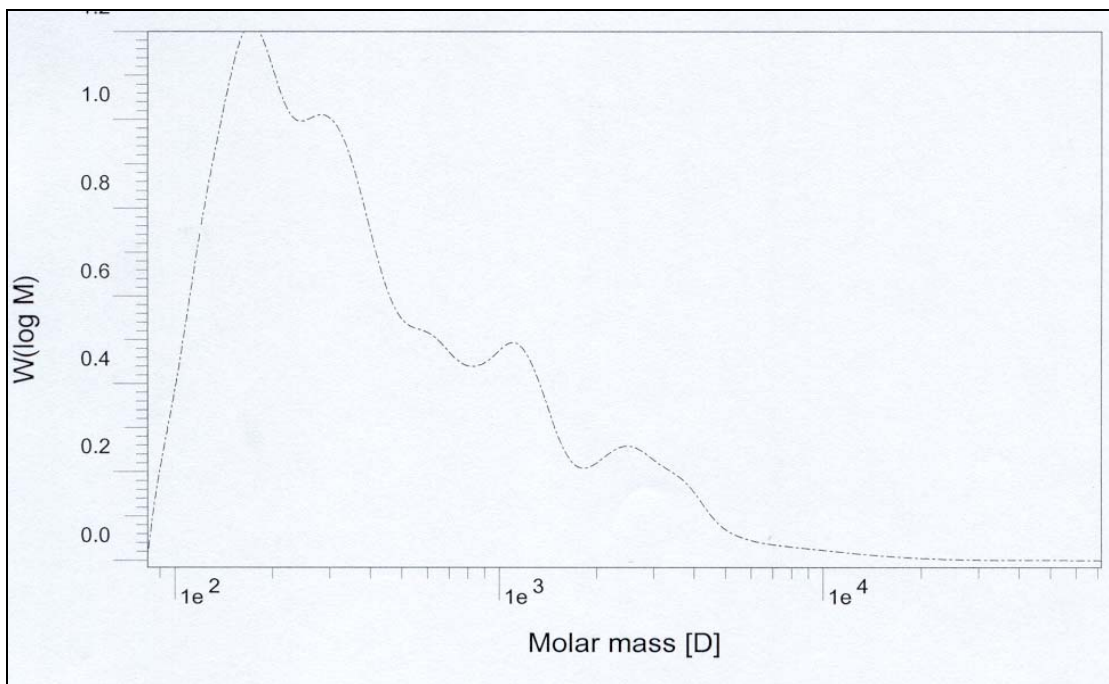


Fig. 3.69. Corba GPC corresponent a la mostra URV 6.

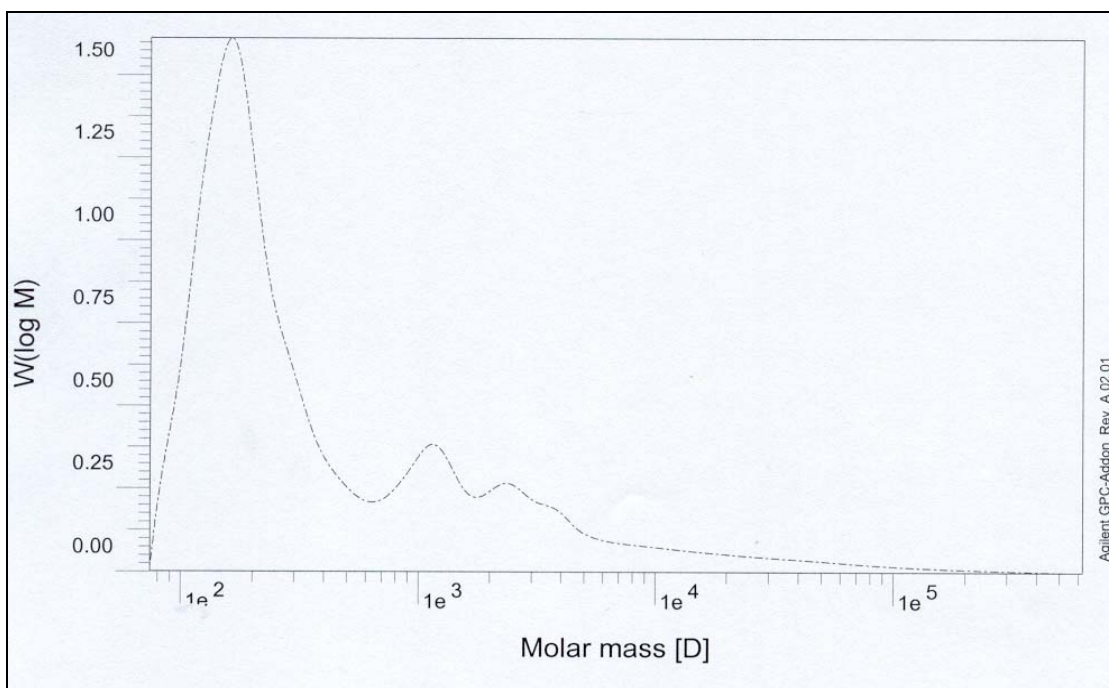


Fig. 3.70. Corba GPC corresponent a la mostra URV 24.

Tenint en compte els resultats obtinguts, es pot afirmar que la GPC permet caracteritzar els productes d'hidròlisi enzimàtica de substrats tipus xilà. Tanmateix, no es realitza la caracterització dels productes d'hidròlisi enzimàtica emprant l'enzim immobilitzat en membranes, principalment a conseqüència de la no disponibilitat de la tècnica. D'altra banda, d'acord amb el que es comentarà l'apartat següent, la caracterització per

MALDI-TOF-MS permet obtenir informació semiquantitativa, amb menor inversió de temps i consum de mostra.

3.6.3. Resultats obtinguts per espectrometria de masses amb ionització induïda per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS)

S'adquireixen els espectres MALDI-TOF-MS de la xilosa i dels xilooligòmers patró amb grau de polimerització entre 2 i 6, per tal d'identificar els pics corresponents a la seva relació massa/càrrega (m/z). S'observa que els pics dels espectres corresponen als adductes dels xilooligòmers amb un àtom de sodi, la qual cosa és comprensible tenint en compte que es troben en un medi en presència d'ions sodi. El pic corresponent al senyal de 172,05 unitats de massa (fig. 6A annex A) correspon a la xilosa. Aquesta té un pes de 150,13 unitats de massa, però si es té en compte que en els processos de ionització de la mostra en l'anàlisi per MALDI molt sovint es formen adductes del tipus $M + Na^+$, el pes de 172,05 es correspon a xilosa + Na^+ , ja que s'aproxima força a la suma de les masses d'aquests ($150,13 + 22,99 = 173,12$). De la mateixa manera, s'assigna la resta de xilooligòmers (fig. 7-11A annex). Així, doncs, per al cas de l'espectre corresponent a la xilobiosa, si es fa el mateix raonament s'hauria d'esperar un pic a massa 305,25 (i el que s'observa a l'espectre és a 305,00 unitats de massa), si es considera que el disacàrid està constituït per dues unitats de xilosa, que es perd una molècula d'aigua en la formació de l'enllaç glicosídic i tenint en compte la massa d'un àtom de sodi en la formació de l'adducte corresponent (és a dir $150,13 * 2 - 18 + 22,99 = 305,25$). El resum de pics observats i la seva correspondència amb els xilooligòmers es recull a la taula 3.12.

	<i>Massa teòria (u.m.)</i>	<i>Massa observada</i>
Xilosa	173,12 (150,13+ 22,99)	172,05
Xilobiosa	305,25 (150,13*2-18 + 22,99)	305,00
Xilotriosa	437,38 (150,13*3 -2*18+ 22,99)	436,60
Xilotetraosa	569,51 (150,13*4-3*18 + 22,99)	568,80
Xilopentaosa	701,64 (150,13*5-4*18 + 22,99)	701,06
Xilohexaosa	833,77 (150,13*6-5*18 + 22,99)	833,10

Taula 3.12. Resum de les masses dels pics observats als espectres MALDI dels xilooligòmers patró i comparació amb la massa teòrica dels adductes formats amb l'ió sodi.

També s'enregistra l'espectre d'una mescla dels xilooligosacàrids anteriors (fig. 3.71). L'espectre de masses permet la identificació dels pics corresponents a cadascun dels oligòmers, per comparació amb els senyals dels espectres dels compostos patró.

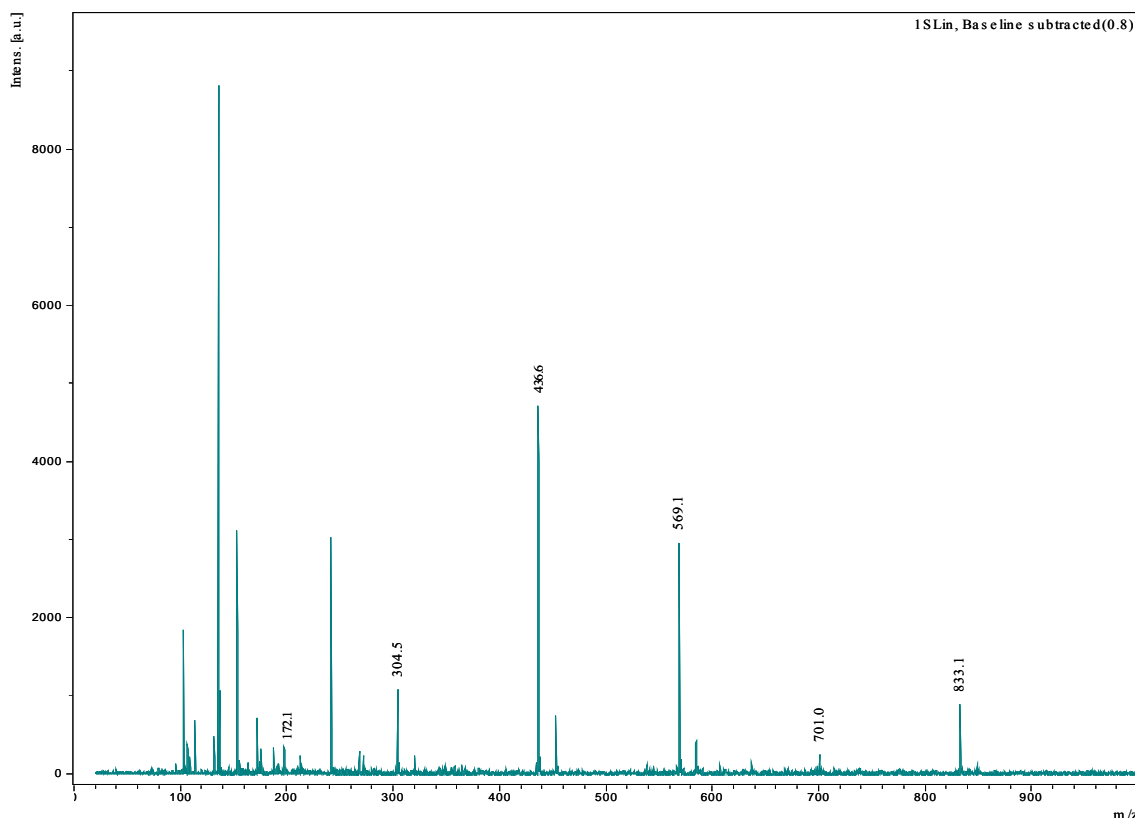


Fig. 3.71. Espectre de masses de la mescla de xilooligòmers.

Consideracions generals de l'anàlisi de mostres per MALDI-TOF-MS

La intensitat dels pics dels espectres de masses en MALDI no depèn només de la concentració de l'analit considerat, sinó que també està relacionada amb la capacitat de ionització de la mostra. Aquesta capacitat de ionització depèn de la cristal·lització de la mescla entre mostra i matriu, factor que afectarà la intensitat dels pics. La intensitat dels pics en MALDI és un paràmetre que no es pot considerar a l'hora de realitzar anàlisis quantitatives. Per aquest motiu amb les dades dels espectres MALDI només es pot realitzar una estimació semiquantitativa, sempre a partir dels valors d'intensitat relativa del pic de l'analit respecte de la intensitat d'algun pic de referència. D'aquesta manera, considerant el pic de referència com si es tractés d'un "patró intern", s'assumeix que l'efecte de la cristal·lització en la intensitat del pic d'analit afecta de la mateixa manera el pic de referència. D'altra banda, en els espectres MALDI, la regió de l'espectre de masses baixes, aproximadament fins a valors de 150-200 m/z, en alguns casos no se sol considerar atès que es tracta d'una regió on apareixen molts pics que provenen tant de la mateixa ionització de la matriu àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB) com dels adductes que forma aquesta. Per tant, només es tindrà en compte aquesta zona de l'espectre de masses si la intensitat dels pics que esperariem observar en aquesta zona (per exemple el pic de

xilosa, a m/z 172,5) és prou gran i realment permet distingir-los dels senyals de la matriu mateix.

Hidròlisi amb enzim en dissolució:

En enregistrar els espectres de les mostres d'hidròlisi del substrat del tipus UAB (*Birchwood xylan*) emprant una concentració d'enzim en dissolució de 0,5 mg/ml, s'aprecia un pic a massa 172,5 (corresponent a la xilosa). La intensitat relativa d'aquest pic respecte d'un pic que és comú a tots els espectres (176,5), considerat com a referència, augmenta a mesura que la reacció d'hidròlisi avança. Aquest fet confirma la conclusió que s'extreu dels resultats obtinguts per electroforesi capil·lar i per GPC: que a conseqüència de l'activitat enzimàtica s'allibera xilosa a partir del xilà. De tota manera, la intensitat d'aquest pic és baixa, i apareix en una regió on els senyals de la matriu són força intensos.

A continuació, a la fig. 3.72 es mostra la superposició de l'ampliació dels espectres MALDI corresponents a la hidròlisi del substrat tipus UAB. Només es considera la regió de 200 a 800 unitats de massa, ja que a masses inferiors hi ha, tal com s'ha comentat, molts pics amb intensitats elevades que corresponen a la ionització de la matriu i que no són rellevants.

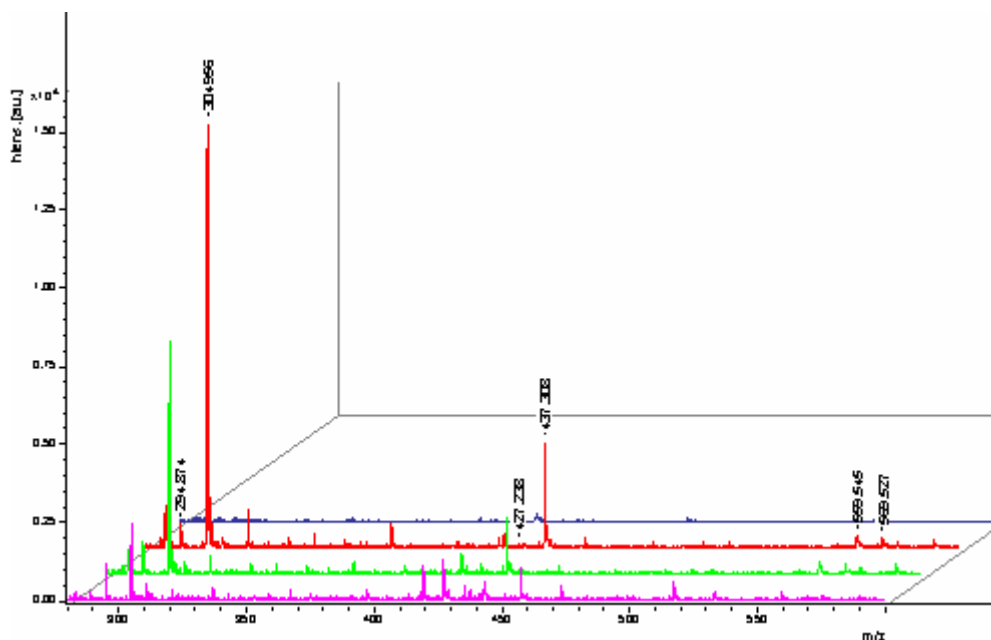


Fig. 3.72. Superposició dels espectres MALDI de la hidròlisi de *Birchwood xylan* (substrat tipus UAB) amb enzim en dissolució. (blau: UAB 0; vermell: UAB 1; verd: UAB 6; lila: UAB 24).

A l'espectre MALDI s'observa també un pic a 305,01 la intensitat relativa del qual respecte d'un pic comú a tots els espectres (294,9) disminueix a mesura que la reacció

avança. Per comparació amb l'espectre MALDI de la xilobiosa patró, es pot afirmar que es tracta d'aquesta espècie, que s'allibera durant primeres hores de reacció però que a temps llargs va disminuint, probablement per a donar lloc al monòmer. El mateix comportament s'observa per al pic a 437,39 (que correspon a la xilotriosa) en mesurar la seva intensitat respecte del pic a 427,3 així com per al pic de la xilotetraosa (569,6) respecte del pic de referència a 559,6 malgrat que els valors són baixos, ja que es forma poca quantitat d'aquest producte. Els valors es presenten a la taula 3.13.

	<i>Intensitat relativa pics 172/176</i>	<i>Intensitat relativa pics 305/294</i>	<i>Intensitat relativa pics 437/427</i>	<i>Intensitat relativa pics 569/579</i>
UAB 0	0,06	0	0	0
UAB 1	0,57	18,31	24,28	0,82
UAB 6	1,41	7,12	6,00	0,73
UAB 24	5,39	2,11	0,28	0,53

Taula 3.13. Intensitat relativa de pics per a les mostres d'hidròlisi del substrat del tipus UAB.

Observant els espectres MALDI de les mostres d'hidròlisi del substrat tipus URV (fig. 3.73) amb la mateixa concentració d'enzim en dissolució que en el cas anterior, la intensitat relativa del pic corresponent a la xilosa (172,5) respecte del mateix pic de referència a 176,5 generalment augmenta amb el temps. Això indica que, a mesura que té lloc la hidròlisi enzimàtica, es forma xilosa. Alhora, la intensitat relativa del pic de la xilotriosa (437,5) respecte del pic de referència a 479,6 augmenta amb el temps. Per tant, també es forma més xilotriosa a mesura que avança la reacció enzimàtica.

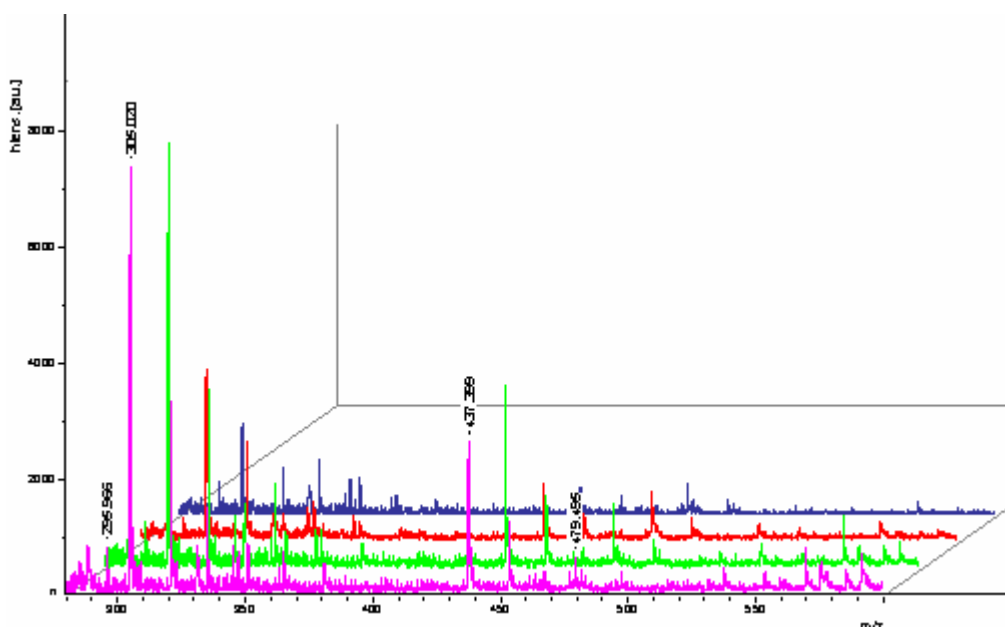


Fig. 3.73. Espectres MALDI d'hidròlisi del substrat tipus URV amb enzim en dissolució (blau: URV 0, vermell: URV 1; verd: URV 6; lila: URV 24).

La taula 3.14 recull la relació d'intensitats relatives dels pics dels analits respecte dels senyals de referència.

	<i>Intensitat relativa pics 172/176</i>	<i>Intensitat relativa pics 437/479</i>
URV 0	0,41	0,80
URV 1	0,15	1,31
URV 6	0,43	2,38
URV 24	0,97	3,36

Taula 3.14. Intensitat relativa de pics per a les mostres d'hidròlisi de la URV.

Dels resultats de les taules anteriors, s'observa que la hidròlisi enzimàtica del substrat del tipus URV és més lenta que la del substrat del tipus UAB. A les mostres UAB la intensitat relativa de la xilosa 172/176 a les 24 hores arriba a 5:1, mentre que a les mostres URV només s'arriba a una relació 1:1 en 24 hores. Això indica la presència de monòmer a la mostra inicial (amb un augment relativament petit), la qual cosa és probable tenint en compte que aquest tipus de mostres prové d'una hidròlisi prèvia. També la proporció de trisacàrid a les mostres UAB augmenta molt ràpid al principi (UAB 1) i després disminueix, ja que s'hidrolitza per a originar disacàrid i monosacàrid. En canvi, a les mostres URV la proporció de trímer continua augmentant al cap de 24 hores de reacció.

Hidròlisi enzimàtica del substrat tipus UAB amb enzim immobilitzat en membranes

S'analitzen mostres del compartiment de la dissolució de càrrega o *feed* dels experiments amb el mòdul UAB, considerant el substrat del tipus UAB (producte comercial *Birchwood xylan*) i membranes ACPS i N25 (fig. 3.74 i 3.75 respectivament).

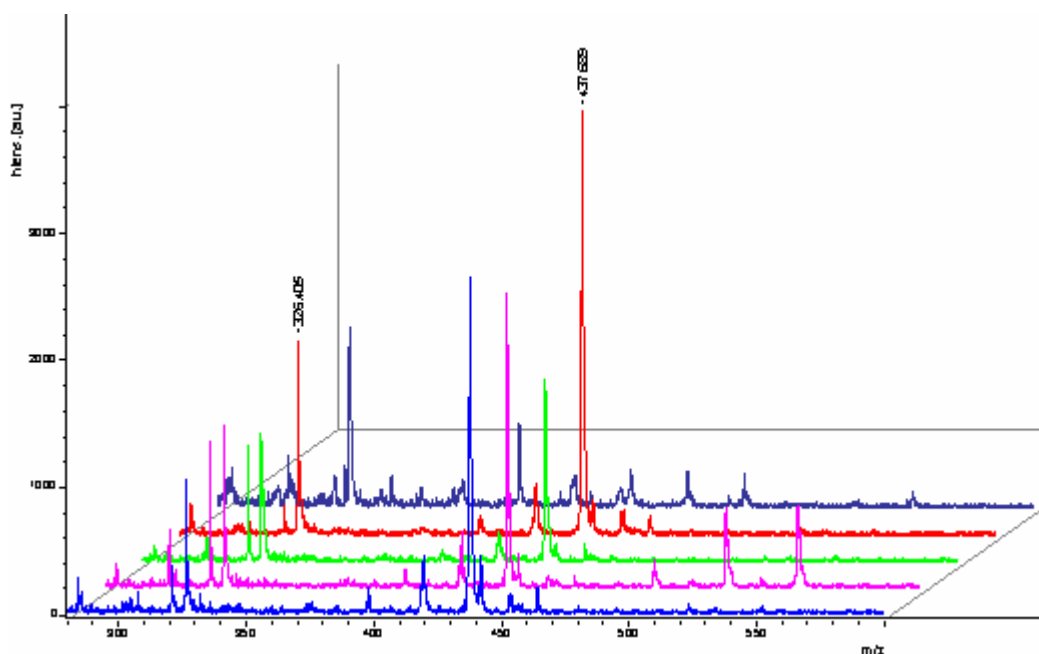


Fig. 3.74. Espectres MALDI de la hidròlisi del substrat del tipus UAB i amb el mòdul UAB i enzim immobilitzat a membranes ACPS. Anàlisi de la dissolució de càrrega a diferents temps de reacció (vermell: 1 h; verd 2 h; lila 4 h i blau clar 6 h.). L'espectre blau fosc correspon a la mostra inicial (temps = 0).

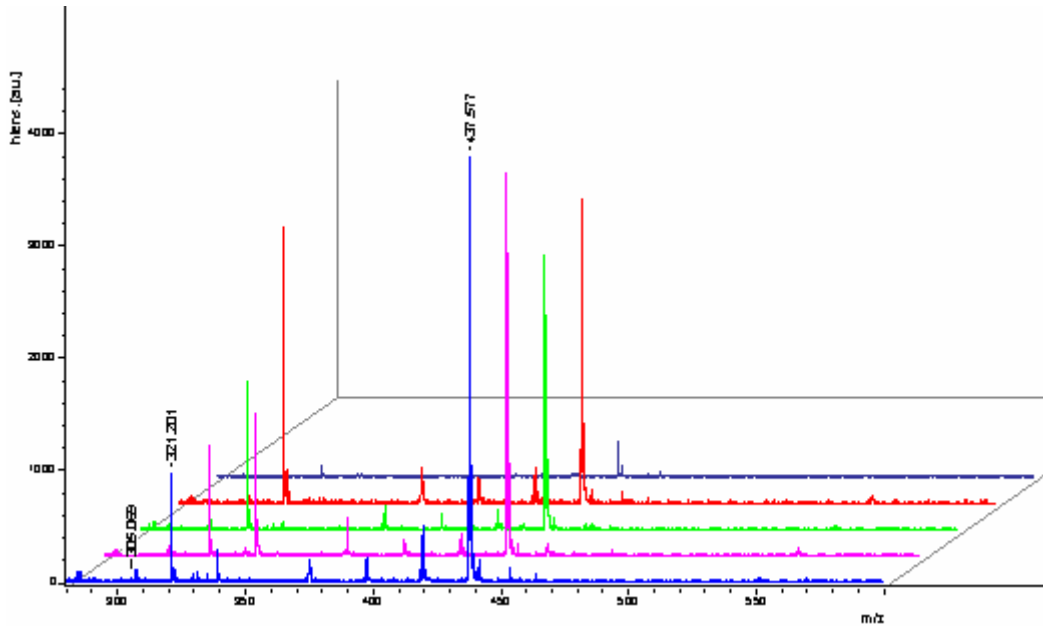


Fig. 3.75 Espectres MALDI de la hidròlisi de substrat del tipus UAB amb el mòdul UAB amb l'enzim immobilitzat a membranes N25. S'analitza la dissolució de càrrega a diferents temps (vermell: 1h, verd 2 h, lila 4 h i blau clar 6 h). L'espectre blau fosc correspon a la mostra inicial (temps = 0).

Tanmateix, també s'analitzen mostres obtingudes en experiments amb el mòdul de filtració frontal amb *Birchwood xylan* per a ambdues membranes. Els espectres es mostren a les fig. 3.76 i 3.77.

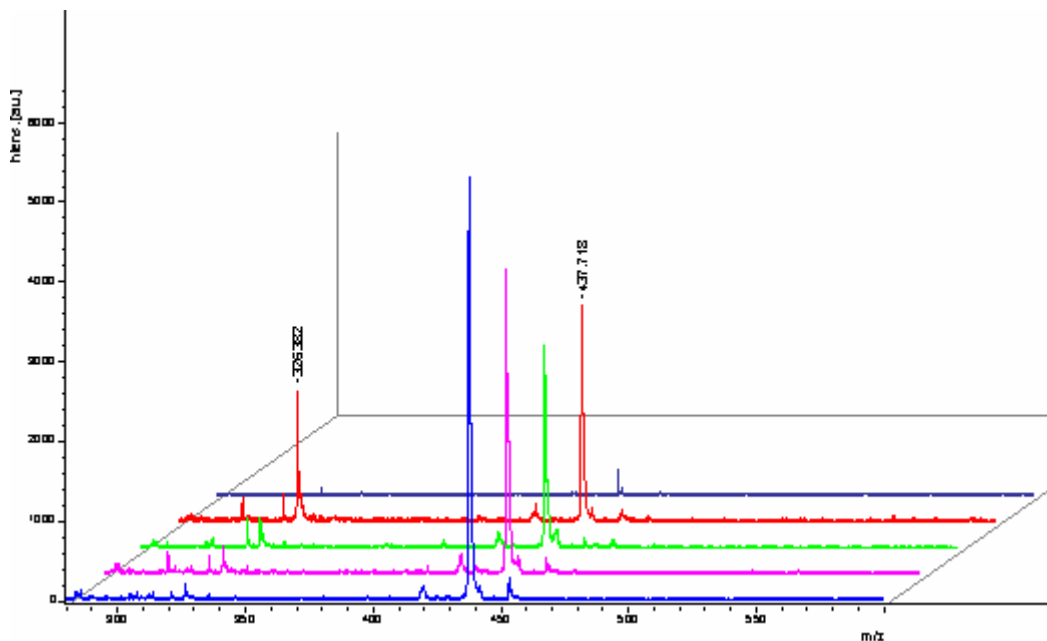


Fig. 3.76. Espectres MALDI de la hidròlisi del substrat del tipus UAB amb el mòdul de filtració frontal i enzim immobilitzat en membranes ACPS. Anàlisi de la dissolució de càrrega a diferents temps de reacció: (vermell: 1 h, verd 2 h, lila 4 h i blau clar 6 h). L'espectre blau fosc correspon a la mostra inicial (temps = 0).

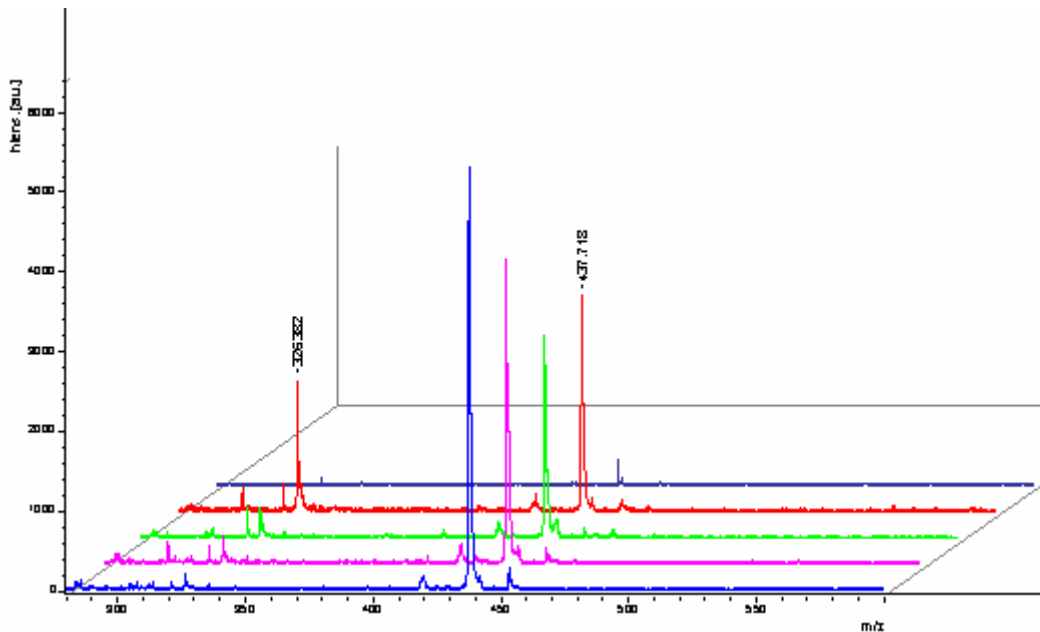


Fig. 3.77. Espectres MALDI de la hidròlisi de substrat del tipus UAB amb l'enzim immobilitzat en membranes N25 i emprant el mòdul de filtració frontal. (vermell: 1 h, verd 2 h, lila 4 h i blau clar 6 h). L'espectre blau fosc correspon a la mostra inicial (temps = 0).

En tots els casos s'observa la presència del pic de xilotriosa, fet comprensible tenint en compte l'estructura del centre actiu de l'endo-1,4- β -xilanasasa II,⁴⁷ que afavoreix la hidròlisi del xilà, principalment cap a l'obtenció de cadenes de tres residus de xilosa. La intensitat relativa d'aquests pics respecte del pic de referència a 326 unitats de massa s'incrementa amb el progrés de la hidròlisi enzimàtica, com es mostra a la fig. 3.78, amb els dos tipus de membrana i emprant qualsevol dels dos mòduls proposats.

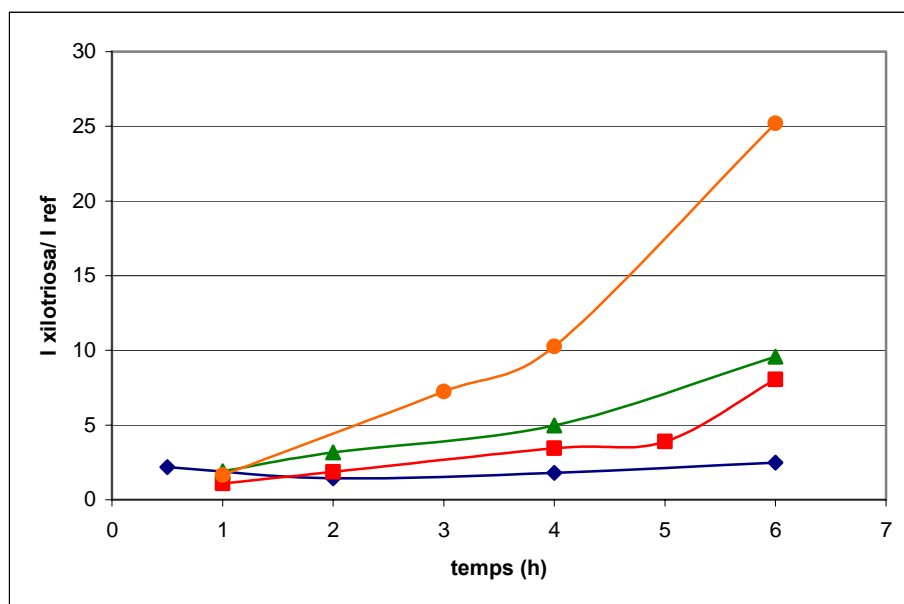


Fig. 3.78. Intensitat relativa del pic de xilotriosa respecte del pic de referència a 326 unitats de massa en funció del temps. S'analitzen mostres de la dissolució de càrrega del mòdul UAB tant per experiments amb la membrana ACPS (◆) com per a la N25 (■). S'analitza la dissolució del filtrat del mòdul de filtració frontal dels experiments amb ACPS (▲) i N25 (●).

El principal increment d'intensitat relativa s'observa per a l'experiment corresponent a la membrana N25 amb el mòdul de filtració frontal. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en la determinació del contingut total de sucres reductors amb el mètode colorimètric descrit anteriorment. Alhora, la tendència que l'increment de la producció de xilotriosa sigui més alt amb el mòdul de filtració frontal és coherent si es té en compte que amb aquest mòdul es pot aconseguir una conversió més alta. En aplicar pressió al mòdul de filtració frontal s'afavoreix el contacte entre el substrat i l'enzim immobilitzat a l'interior de la membrana amb la membrana N25. Amb la membrana ACPS no hi ha grans diferències en comparar els dos mòduls de membrana, ja que com s'ha esmentat al llarg d'aquest capítol s'espera que la immobilització de l'enzim tingui lloc a nivell superficial, tenint en compte la morfologia d'aquestes membranes.

Només en el cas de les mostres de dissolució de càrrega (*feed*) de l'experiment d'hidròlisi del substrat del tipus UAB amb la membrana N25, emprant el mòdul UAB a temps de reacció llargs (5 i 6 hores), s'observen pics corresponents al disacàrid (xilobiosa) malgrat que la seva intensitat relativa és molt baixa (0,05 i 0,08).

Una altra observació interessant és que en cap dels casos no s'observa el pic corresponent a la xilosa (monòmer), la qual cosa és molt interessant, ja que l'objectiu és la recuperació d'oligosacàrids i no pas de monòmer.

Hidròlisi enzimàtica del substrat del tipus URV amb enzim immobilitzat en membranes

En el cas d'experiments d'hidròlisi del substrat tipus URV, només s'empren membranes amb enzim immobilitzat ACPS amb el mòdul de filtració frontal, tal com s'explica a l'apartat 3.5. A partir de l'observació dels espectres de massa MALDI (fig. 3.79) no és possible establir la relació d'intensitats del pic d'analit respecte del pic de referència, a conseqüència de la presència de força pics a la línia base i de soroll de fons. Alhora, les intensitats dels pics no són tan altes com als experiments d'hidròlisi amb el substrat del tipus UAB (*Birchwood xylan*). Aquesta observació pot ser conseqüència del fet que la hidròlisi del substrat del tipus URV pot ésser més lenta o estar menys afavorida que la del substrat UAB, perquè potser la mateixa estructura polimèrica del primer és més complexa que el xilà de tipus comercial, o bé que, en provenir del tractament directe de residus vegetals, hi ha algun interferent a la dissolució. Els espectres de massa es presenten a la fig. 3.79.

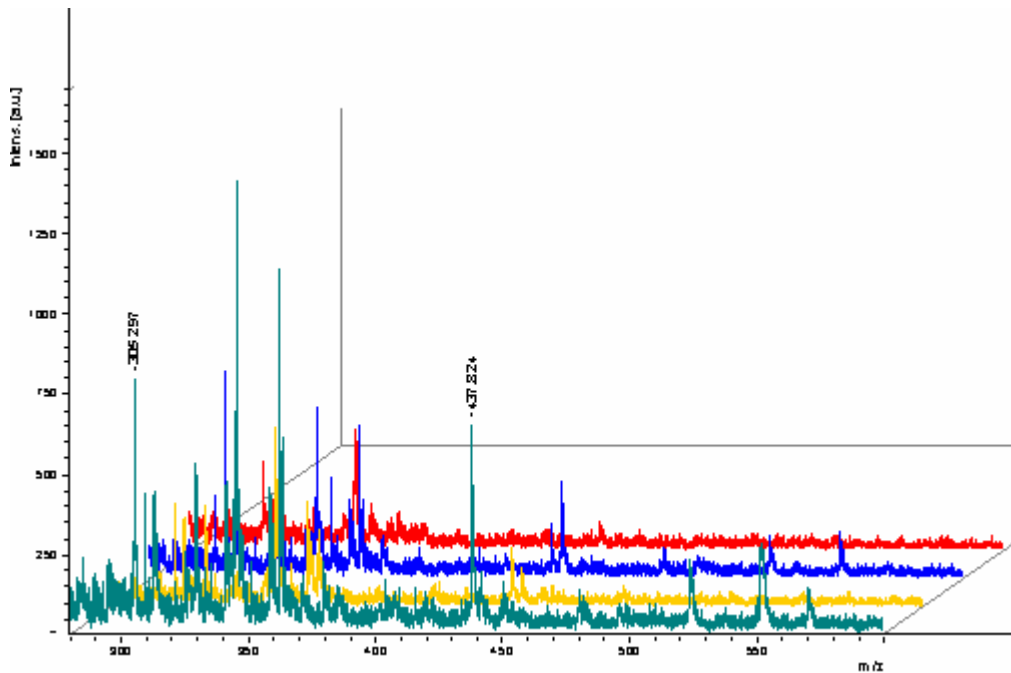


Fig. 3.79. Espectres MALDI de la hidròlisi del substrat del tipus URV, emprant l'enzim immobilitzat en membranes ACPS amb el mòdul de filtració frontal. S'analitza la dissolució de càrrega a diferents temps: (vermell: temps inicial, blau: 1 h, groc: 2 h, verd: 6 h).

A la vista dels resultats obtinguts, es pot afirmar que el MALDI-TOF-MS és una tècnica que ofereix un alt potencial d'anàlisi, amb un baix consum de mostra i d'inversió de temps, malgrat que es tracti només d'una tècnica semiquantitativa. A l'estudi de la hidròlisi enzimàtica de substrats del tipus *Birchwood xylan* amb enzim en dissolució, els resultats que s'obtenen estan d'acord amb els obtinguts amb electroforesi capil·lar i amb GPC. Quan es realitza la hidròlisi amb enzim immobilitzat als diferents tipus de membranes i mòduls considerats, ha estat possible identificar el grau de polimerització dels productes d'hidròlisi obtinguts de manera ràpida i senzilla. En el cas d'aplicar-la a la caracterització dels productes d'hidròlisi de mostres reals (substrat del tipus URV) caldria realitzar alguna etapa de purificació prèvia per a eliminar possibles interferents presents a la dissolució de partida a fi d'eliminar la presència de pics no significatius i de reduir els senyals de la línia base, com també el soroll de fons.

Referències

- ¹El-Masry, M. M.; De Maio A.; Martelli P. L. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16 (2001) 175-189.
- ²Mozingo, R.; McCracken, J. H. *Organic Syntheses Coll.* Vol. 3 (1955) p.258.
- ³Törrönen, A.; Rouvinen, J. *Biochemistry* 24 (1995) 847-856.
- ⁴Gutiérrez, B.; Cano, A.; Minguillón, C. Synthesis and characterization of polysulfone acrylate: a versatile tool in the derivatization of polysulfone, *in preparation*.
- ⁵Wold, H. *Soft modeling, The basic design and some extensions*, In Vol. II of Jöreskog, K. G. and Wold, H. Ed.s. *Systems under indirect observation*, Vol. I and II, North-Holland, Amsterdam, Països Baixos, 1982.
- ⁶Montoliu, I. *Aplicació i desenvolupament de tècniques quimiomètriques a l'anàlisi agroalimentària*, Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalunya, 2001.
- ⁷Sehgal, D.; Vijay, I. K. *Anal. Biochem.* 218 (1994) 87.
- ⁸Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M. *Anal. Biochem.* 156 (1986) 220.
- ⁹Santora, B. P.; Gagne, M. R.; Moloy, K.G.; Radu, N. S. *Macromolecules* 34 (2001) 658.
- ¹⁰Sáfrany, A.; Beiler, B.; Lászlo, K.; Svec, F. *Polymer* 46 (2005) 2862-2871.
- ¹¹Viklund, C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Mater* 8 (1996) 3: 744-745.
- ¹²Avramescu, M. E.; Borneman, Z.; Wessling, M. *Biotechnology and Bioengineering* 84 (2003) 5: 564-572.
- ¹³Solomons T. W. G. *Organic Chemistry sixth edition*. John Wiley and Sons, New York, USA, 1996.
- ¹⁴Cano, A.; Minguillón, C.; Palet, C. *Journal of Membrane Science* 280 (2006) 383-388.
- ¹⁵Mohy Eldin, M. S.; Portaccio, M.; Diano, N.; Rossi, S.; Bencivenga, U.; D'Uva, A.; Canciglia, P.; Gaeta, F. S.; Mita, D. G. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7 (1999) 251-261.
- ¹⁶Ogawa, K.; Wang, B.; Kokufuta, E. *Langmuir* 17 (2001) 4704-4707.
- ¹⁷Michaelis, L.; Menten, M. *Die Kinetik der Invertinwirkung*, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333-369.
- ¹⁸Lineaweaver, H.; Burk, D. *Journal of the American Chemical Society* 56 (1934) 658.
- ¹⁹Sunna, A.; Puls, J.; Antranikian, G. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 24 (1996) 2: 177-185.
- ²⁰Sunna, A.; Gibbs, M. D; Bergquist, P. L. *Microbiology* 146 (2000) 2947-2955.
- ²¹Sunna, A.; Antranikian, G. *Crit Rev Biotechnology* 17 (1997) 39-67.
- ²²Scott, K. *Handbook of industrial membranes, 1st edition*. Section 2 *Membrane materials, preparation and characterization*. Elsevier, Oxford, UK, 1995.
- ²³Xie, S.; Allington, R. W.; Svec, F.; Fréchet, J.M. J. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 76 (2002) 87-125.
- ²⁴Sáfrany, A.; Beiler, B.; Lászlo, K.; Svec, F. *Polymer* 46 (2005) 2862-2871.
- ²⁵Colón, L. A.; Burgos, G.; Maloney, T. D.; Cintrón, J. M.; Rodríguez, R. L. *Electrophoresis* 21 (2000) 3965-3993.
- ²⁶Gumí, T.; Valiente, M.; Khulbe, K. C.; Palet, C.; Matsuura, T. *Journal of Membrane Science* 212 (2003) 123-134.
- ²⁷Bird, R. B.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. *Transport Phenomena*. Wiley, New York, USA, 1960.

-
- ²⁸ Mulder, M. *Basic principles of membrane Technology*, 2nd Ed, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Baixos, 2000.
- ²⁹ Hernández, A; Calvo, J.I.; Prádanos, P.; Palacio, L. *A Multidisciplinary Approach Towards Pore size distributions of Microporous and Mesoporous Membranes* in Smith Sorensen, T ed. *Surface Chemistry and Electrochemistry of Membranes*. Surfactant Science Series vol 79 Merceel Dekker, Inc. New York, USA, 1999.
- ³⁰ Allen, T. *Particle size measurement* 4th Ed. Chapman and Hall, London, UK, 1990, p: 629-630.
- ³¹ Gregg, S.J.; Sing, K.S.W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2nd edition, Academic Press, London, UK, 1982.
- ³² Cuperus, F.P. *Characterization of ultrafiltration membranes: pore structure and top layer thickness*. Tesi doctoral. University of Twente, Países Baixos, setembre 1990.
- ³³ Palacio, L. *Caracterización estructural y superficial de membranas microporosas*. Tesi doctoral, Universidad de Valladolid, Espanya, octubre 1998.
- ³⁴ Ruiz Paniego, A. *Anales de Química de la Real Sociedad Española de Química*, vol. 85 (1989) 3:386-389.
- ³⁵ La Grange, D.; Pretorius, I. S.; Van Zyl, W. H. *Applied and environmental Microbiology* 62 (1996) 3: 1036-1044.
- ³⁶ Den Haan, R.; Van Zyl, W. H. *Appl microbial Biotechnol* 57 (2001) 521-527.
- ³⁷ Julian, R.; Duncan, S.; Weston, P. D.; Wrigglesworth, R. *Analytical Biochemistry* 132 (1983) 62-73.
- ³⁸ Thorpe, P. E.; Ross, W. C.; Brown, A. N.; Myers, C. D.; Cumber, A. J.; Foxwell, B. M.; Forrester, J. T. *European Journal of Biochemistry* 140 (1984) 63-71.
- ³⁹ *Multifect Xylanase product information datasheet* from Genencor International Inc., Leiden, Países Baixos, 2001.
- ⁴⁰ Hodge, P.; Sherrington, D. C. *Syntheses and Separations using functional polymers*, Wiley, New York, USA, 1989
- ⁴¹ Cano, A.; Moschou, E. A.; Daunert, S.; Coello, J.; Palet, C. *Bioprocess and Biosystem Engineering* (accepted June 2006) in press.
- ⁴² Burhanettin, F.; Keskinler, B. *Journal of Membrane Science* 279 (2006) 578-587.
- ⁴³ Arentoft, A. M.; Michaelsen, S.; Sorensen, H. *Journal of Chromatography A* 652 (1993), 517-524.
- ⁴⁴ Lu, B.; Westerlund, D. *Electrophoresis* 17 (1996) 325-332.
- ⁴⁵ Suzuki, S.; Honda, S.; *Chromatography*, 22 (2001) 3: 171-179.
- ⁴⁶ Dahlman, O.; Jacobs, A. ; Liljenberg, A.; Olsson, A.I. *Journal of Chromatography A* 891 (2000)157-174.
- ⁴⁷ Biely, P. *Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases*, in Coughan, M. P; Hazlewood, G. P. *Hemicelluloses and hemicellulases* Portland Press, London, UK, 1993, p: 29-51.

4. VALORACIÓ DEL PROCÉS

Possibilitats d'aplicació i perspectives de millora

4. VALORACIÓ DEL PROCÉS. Possibilitats d'aplicació i perspectives de millora

4.1. Estimació dels costos de recuperació d'oligosacàrids

En aquesta tesi doctoral s'ha presentat l'ús de sistemes de membranes enzimàtiques amb l'objectiu de dissenyar un procediment per al tractament de residus procedents de biomassa vegetal, a partir dels quals es pot recuperar oligosacàrids derivats del xilà. L'interès de la recuperació d'aquests productes està justificat en l'ampli ventall d'actuals i potencials aplicacions que tenen en diferents sectors, tal com s'ha presentat al capítol 1.

Actualment és possible adquirir xilooligòmers comercials de grau de polimerització entre 2 i 6, Tanmateix, el seu cost és força elevat. A la taula 4.1 se'n mostren els preus, d'acord amb el catàleg del subministrador (Megazyme®) per a l'any 2006.

<i>Producte</i>	<i>Quantitat (mg)</i>	<i>Preu (€)</i>
xilobiosa	50	134,00
xilotriosa	50	134,00
xilotetraosa	10	109,00
xilopentaosa	30	134,00
xilohexaosa	10	146,00

Taula 4.1. Preus de l'any 2006, corresponents als 1,4-β-D-xiloligosacàrids. Font: catàleg Megazyme®.

Per a tenir una idea de si els processos de membrana que s'han presentat en aquesta tesi doctoral poden representar una alternativa a l'adquisició comercial dels oligosacàrids anteriors, es presenta una avaluació econòmica aproximada de les despeses associades a la seva obtenció a partir del tractament de biomassa vegetal amb els sistemes de membrana proposats. És té en compte tant el cost associat a la preparació de les membranes com l'amortització del mòdul de membrana, els recursos energètics i l'ús d'una dissolució de partida. Per tal de fer una estimació simplificada, es considerarà que la mostra que se sotmet a la hidròlisi enzimàtica és tant el substrat de *Birchwood xylan* (producte comercial) com la mostra de sortida del reactor de la URV, que, per tant, procedeix directament de la hidròlisi química de residus de closca de morenc. En aquest darrer cas, la mostra de substrat mateix no comporta un cost d'adquisició associat. D'altra banda, només considerem l'aplicació del mòdul *dead-end*, ja que en el cas del mòdul UAB no és possible separar els productes obtinguts de la dissolució inicial de substrat.

A continuació es presenten els paràmetres que cal tenir en compte i la seva estimació econòmica a fi de realitzar una avaluació dels costos dels experiments de membrana:

Membrana ACPS

1. Preparació de l'acrilat de polisulfona

<i>ACPS</i>	<i>€</i>	<i>Preu</i>	<i>Referència</i>
Polisulfona 8,3g	10,71	20 g; 25,8 €	Aldrich 374296
Clorur d'acrilòil 10 ml	2,82	100 ml; 28,20 €	Fluka 01780
Cloroform 200ml	6,54	1000 ml; 32,7 €	Sigma 319988
Cost total per a 6.6 g Acrilat PS	20,07		

Taula 4.2. Resum dels costos de la derivatització de la polisulfona.

Cost acrilat de polisulfona: 3,04 €/g

2. Preparació de la membrana

<i>Preparació de membranes</i>	<i>€</i>	<i>Preu</i>	<i>Referència</i>
DMF 10 ml	0,93	1000 ml, 93 €	Aldrich 227056
Acrilat PS 1,6 g	4,86	3,04 €/g	Taula 4.1
Suport no teixit 0,03m ²	0,16	109,6 m ² ; 594 €	Hollytex 3329
Cost total per a 0,03 m ² de membrana	5,95		

Taula 4.3. Resum dels costos de preparació de les membranes ACPS.

Cost de la membrana d'ACPS: 0,50 €/membrana, considerant que amb 10 ml de dissolució de membrana es pot dipositar una pel·lícula de polímer d'aproximadament 0,03 m² de superfície (mig full DIN-A4) i a partir de la qual es poden obtenir 12 membranes de 3 cm de diàmetre).

3. Immobilització de l'enzim

<i>Immobilització</i>	<i>€</i>	<i>Preu</i>	<i>Referència</i>
Enzim 25 mg	0,01	1000 g; 15 €	Genencor International
Tampó bicarbonat/carbonat 50 ml 0,1M	0,01	1000 g; 35,4 €	Sigma S6014
Cost total d'immobilització per membrana	0,02		

Taula 4.4. Resum dels costos d'immobilització de l'enzim.

Les quantitats d'enzim i dissolució tampó són relatives a les indicades al capítol 2. Per a realitzar la immobilització en una membrana de 3 cm de diàmetre (àrea 7 cm²) s'utilitza 50 ml de dissolució tampó amb una concentració d'enzim de 0,5 mg/ml. El cost total de la membrana enzimàtica (polímer i immobilització) és de 0,52 €/membrana.

4. Cost operatiu: mòdul, nitrogen gas i electricitat

<i>Cost operatiu</i>	<i>€</i>	<i>Preu</i>	<i>Referència</i>
Mòdul dead-end 6 hores	0,01(*)	885 €	Adquirit a la <i>University of Ottawa</i>
Nitrogen gas 2,592 m ³ /experiment	16,8	6,48 €/m ³	Nitrogen sec, Abelló Linde
Electricitat 6 hores	0,01	0,08 €/KWh	Endesa, tram 1 (maig 2006)
Total	16,82		

Taula 4.5. Resum dels costos operatius.

Per a realitzar els càlculs de l'amortització del mòdul es considera que té un temps de vida de 10 anys, ja que es tracta d'acer inoxidable i està en contacte amb dissolució aquosa, de manera que no es preveu la seva deterioració en un temps menor. (*) Per a calcular el cost associat a 6 hores d'experiment es necessita conèixer el cost d'amortització del mòdul per hora, dividint el cost total entre les hores que corresponen a 10 anys, 365 dies per any i 24 hores per dia. Quant a l'electricitat, es compta l'ús d'un agitador magnètic de 30 W durant 6 hores, per tant es consumeixen 0,18 KWh.

Els costos operatius totals per experiment són de 16,82 €/experiment.

5. Costos de substrat (només cal considerar-los en alguns experiments)

Substrat <i>Birchwood xylan</i>		€	Preu	Referència
Tampó acètic/acetat sòdic	80 ml 0,05 M	0,03	1000 g; 86,4€	Sigma S2889
<i>Birchwood xylan</i>	0,1% (en pes)	0,21	10 g; 26,4€	Sigma X0502
Suma costos substrat		0,24		

Taula 4.6. Resum dels costos de la dissolució de *Birchwood xylan*.

Cost d'utilitzar substrat comercial (*Birchwood xylan*): 0,24 €/experiment.

6. Recuperació de xilooligosacàrids

<i>Xilooligòmers recuperats en experiments d'hidròlisi enzimàtica</i>	mg	[xilooligosacàrids] al filtrat $\mu\text{mol/ml}$	Vol(ml)
A partir de <i>Birchwood xylan</i>	4,35	0,150	70
A partir de substrat URV	2,75	0,095	70
Segon cicle URV	1,74	0,060	70
Suma cicles URV	4,49		

Taula 4.7. Resum de la quantitat de xilooligosacàrids recuperada a partir de la hidròlisi enzimàtica amb membranes ACPS.

Per a poder comparar el preu dels productes que hem recuperat amb el preu dels productes comercials, es considera que s'obté majoritàriament xilotriosa, tal com s'ha pogut comprovar de l'anàlisi de les mostres per MALDI-TOF-MS. També es considera que dels 80 ml que es filtren a cada experiment se'n recuperen 70 ml, ja que es descarta una part del volum filtrat tant al principi de l'experiment, i al final, ja que queda un volum mort a l'interior del mòdul.

El total de xilooligòmers (xilotriosa; pes molecular: 414,39 g/mol) per a cada experiment d'hidròlisi enzimàtica és:

A partir de *Birchwood xylan*, s'obtenen 4,35 mg de xilotriosa.

A partir del substrat del tipus URV, s'obté 2,75 mg de xilotriosa al primer experiment o cicle i 1,74 mg al segon cicle. El total de xilotriosa recuperada en dos cicles consecutius és de 4,49 g.

7. Estimació econòmica del cost d'obtenció de xilooligosacàrids

<i>Preu per mg de xilotriosa</i>	<i>€/mg</i>
A partir de <i>Birchwood xylan</i>	4,04
A partir d'URV 1 experiment	6,28
A partir d'URV 2 experiments	7,59
Xilotriosa comercial	2,68

Taula 4.8. Resum del cost d'obtenció de xilooligosacàrids amb processos de membrana i comparació amb el preu de xilotriosa comercial.

En el càlcul del cost als experiments d'hidròlisi de *Birchwood xylan*, es divideix el nombre de mg de xilotriosa obtinguts (4,35 mg) entre la suma de costos de preparació de membrana enzimàtica (0,52 €/experiment), els costos operatius (16,81 €/experiment) i el cost del substrat (0,24 €/experiment). Per tant, el cost total per experiment és de 17,57 €. Als experiments realitzats a partir de substrats del tipus URV, es considera, d'una banda, la recuperació en un sol experiment (o cicle) d'hidròlisi, i els costos corresponents comprenen només la preparació de la membrana enzimàtica (0,52 €/experiment) i els costos operatius (16,82 €/experiment); per tant, el cost total és de 17,34 €. D'altra banda s'avalua la recuperació aconseguida en dos experiments consecutius. A l'hora de calcular els costos, al segon experiment només es compten els costos associats al procés (16,82 €/experiment), de manera que a la suma de dos cicles d'hidròlisi el cost total serà de 34,15 € (17,33 € + 16,82 €), ja que la membrana es reutilitza, i se suma la quantitat de xilooligòmers de tots dos experiments d'hidròlisi consecutius (4,49 mg).

Membrana N25

1. Preparació de la membrana

<i>N25</i>		<i>€</i>	<i>Preu</i>	<i>Referència</i>
HEMA	610 µl	1,26	25 ml; 48,3 €	Aldrich 477028
EDMA	715 µl	0,16	100 ml; 21 €	Aldrich 335681
AEM	85 mg	0,56	5 g; 32,9 €	Aldrich 516155
HMPP	215 µl	0,14	50 ml; 32,5 €	Aldrich 405655
Ciclohexanol	8550 µl	0,16	1000 ml; 18,2 €	Sigma 105899
Dodecanol	50 µl	0,01	100 g; 17,6 €	Fluka 44100
Llum	0,128 KWh	0,01	0,081 € KWh	Tram 1 Endesa
Suport no teixit	0,03m ²	0,16	109,6 m ² ; 594 €	Hollytex 3329
Cost total per 0,03 m ²		2,45		

Taula 4.9. Resum dels costos de preparació de les membranes N25.

El cost de la membrana de polímers monolítics (N25) és de 0,21 €/membrana (també en aquest cas es considera que amb 10 ml de dissolució precursora de membrana es

diposita una pel·lícula de polímer de superfície de 0,03 m² i que es poden obtenir 12 membranes de 3 cm de diàmetre)

2. Immobilització de l'enzim

<i>Immobilització</i>	<i>€</i>	<i>Preu</i>	<i>Referència</i>
Enzim 25 mg	0,01	1000 g; 15 €	Genencor International
Tampó fosfat 50 ml; 0,1M	0,11	100 g; 15,9 €	Sigma S9763
NaCl 500 mg	0,02	1000 g; 45,4 €	Sigma S7653
EDC 20 mg	0,57	1 g; 28,5 €	Fluka 3451
NHS 31 mg	0,03	25 g; 24,6 €	Aldrich 130672
Costos d'immobilització	0,74		

Taula 4.10. Resum dels costos d'immobilització de l'enzim.

Sumant els costos de preparació de la membrana i el d'immobilització de l'enzim s'obté un cost total de 0,95 €/membrana enzimàtica N25.

3. Cost operatiu: mòdul i nitrogen gas

El cost és igual tant si es duu a terme l'experiment d'hidròlisi amb un tipus de membrana com amb un altre; per tant, els costos operatius totals per experiment també són de 16,82 €/experiment igual que per als experiments amb les membranes ACPS.

4. Costos de substrat (només en alguns experiments)

Igual que al cas anterior, el cost d'utilitzar el substrat *Birchwood xylan* és de 0,24 €/experiment, que cal considerar en els experiments en els quals es realitzi la hidròlisi d'aquest.

5. Recuperació de xilooligosacàrids

<i>Xilooligòmers recuperats en experiments d'hidròlisi enzimàtica</i>	<i>mg</i>	<i>[xilooligosacàrids] al filtrat μmol/ml</i>	<i>Vol(ml)</i>
A partir de <i>Birchwood xylan</i>	18,85	0,650	70
A partir de substrat URV	1,89	0,065	70
Segon cicle URV	1,16	0,040	70
Suma cicles URV	3,05		

Taula 4.11. Resum de quantitat de xilooligosacàrids recuperats a partir de la hidròlisi enzimàtica amb membranes N25.

En aquest cas, també, d'acord amb les anàlisis per MALDI-TOF-MS, es considera que el xilooligòmer obtingut en experiments d'hidròlisi enzimàtica amb membranes és la xilotriosa. El total de xilooligòmers (expressats com a contingut de xilotriosa, pes molecular: 414,39 g/mol) a cada experiment, a partir del substrat *Birchwood xylan* és de 18,85 mg. En canvi, a partir del substrat del tipus URV s'obtenen 1,89 mg al primer cicle i 1,16 mg al segon cicle.

6. Estimació econòmica del cost d'obtenció de xilooligosacàrids

<i>Preu per mg de xilotriosa</i>	<i>€/mg</i>
A partir de <i>Birchwood xylan</i>	0,95
A partir d'URV 1 experiment	9,41
A partir d'URV 2 experiments	11,33
Xilotriosa comercial	2,68

Taula 4.12. Resum del cost d'obtenció de xilooligosacàrids amb processos de membrana i comparació amb el preu de xilotriosa comercial.

En la hidròlisi de *Birchwood xylan* la suma de costos comprèn la preparació de la membrana enzimàtica (0,95 €/experiment), els costos operatius, és a dir, l'amortització del mòdul i el consum de nitrogen, (16,82 €/experiment), i el cost del substrat (0,24 €/experiment). El cost total és de 18,17 €/experiment. En la hidròlisi de substrats del tipus URV, igual que en el cas de les membranes ACPS, es considera la recuperació en un sol cicle, a més de la suma de productes de recuperació aconseguida a dos experiments consecutius. En el càlcul dels costos del primer cicle se sumen els costos de preparació de la membrana i els costos operatius (total 17,76 €), mentre que per al segon només es compten els costos operatius. El cost total de la suma de dos experiments o cicles d'hidròlisi és, per tant, 34,58 € (17,76 € + 16,82 €).

Observant els valors calculats del cost de l'obtenció de cada mil·ligram de xilotriosa, i per comparació amb el preu de la xilotriosa comercial, es pot afirmar que en aquestes condicions l'únic procés realment rendible és el tractament del substrat *Birchwood xylan* amb membranes de polímers monolítics N25, ja que el preu és inferior al de l'obtenció de la xilotriosa comercial, en el cas de la seva recuperació a partir del tractament dels residus de biomassa vegetal. Tot i així, es podrien introduir millores en el procés, algunes de les quals es proposen a continuació.

4.2. Propostes de millora del procés

Immobilització dirigida de l'enzim endo-1,4- β -xilanasasa II

Per tal d'incrementar el rendiment de la hidròlisi enzimàtica s'hauria de millorar el procés dissenyat en aquesta tesi doctoral. Una possibilitat comprèn la continuació de la mutagènesi de l'enzim endo-1,4- β -xilanasasa II per a dur a terme la immobilització dirigida, la qual milloraria l'eficiència de la immobilització, amb l'objectiu de tenir més molècules d'enzim immobilitzades "efectives", és a dir, amb el seu centre actiu disponible per a interaccionar amb els substrats. El mètode d'immobilització que s'ha fet servir en aquesta tesi doctoral consisteix a establir un enllaç covalent entre grups

funcionals de l'enzim i del suport. Els grups funcionals de l'enzim implicats són, en el cas de la immobilització en membranes d'acrilat de polisulfona, els grups amino de cadenes laterals de lisina o arginina, presents a diferents regions de la seqüència d'aminoàcids de l'endo-1,4- β -xilanasasa II, incloent-hi el centre actiu. En el cas de les membranes de polímers monolítics, hi intervenen els grups àcid carboxílic de l'àcid glutàmic i aspàrtic de l'enzim, majoritàriament. Se sap, tal com s'ha comentat a la introducció, que l'àcid glutàmic està implicat en el mecanisme catalític d'hidròlisi dels substrats. Pot donar-se el cas que en algunes molècules d'enzim la immobilització es produeixi a través dels grups d'àcid glutàmic situats al centre actiu de l'enzim. D'aquesta manera, malgrat que estem immobilitzant l'enzim, aquelles molècules en les quals es dona aquesta situació no es podran considerar actives des del punt de vista catalític.

Tanmateix, quan es produeix l'enllaç covalent de l'enzim al suport de membrana ACPS a través dels grups amino, alguns dels aminoàcids implicats es troben prop de la regió del centre actiu, de manera que, tot i que no es produís directament l'enllaç covalent a través d'aquests, podria ser que es bloquegés el centre actiu perquè l'orientació de l'enzim un cop immobilitzat no permetés la interacció amb les molècules de substrat (fig. 4.1).



Fig. 4.1. Representació de la immobilització a l'atzar i la immobilització dirigida.

En canvi, en una immobilització dirigida se selecciona la regió de la proteïna a través de la qual es vol enllaçar al suport, lluny de la regió del centre actiu, per a disminuir aquesta immobilització “no efectiva”. Tal com es va presentar a la introducció, hi ha diferents estratègies per a orientar la immobilització. En el cas de l'endo-1,4- β -xilanasasa II, se selecciona la mutagènesi dirigida per a introduir una cisteïna, ja que aquest aminoàcid no es troba present a la seqüència de l'endo-1,4- β -xilanasasa II. D'aquesta manera, en introduir-lo a l'extrem terminal i seleccionant el suport i les condicions

adients, el que es pot aconseguir és la unió de l'enzim a la membrana a través d'una regió llunyana al centre actiu, de manera que se n'impedeix el bloqueig. Així, doncs, la continuació d'aquest estudi és una de les propostes de millora del procés actual.

Ús d'altres mòduls de membrana

Una altra estratègia consistiria a utilitzar d'altres tipus de mòduls de membrana. Concretament, es disposa d'un mòdul de membrana de configuració rectangular (dissenyat a la *Universidade Nova de Lisboa*, Portugal) amb dos canals separats per una membrana d'una superfície de $34,5 \text{ cm}^2$ i en què la fase de càrrega i la receptora es bombegen a ambdós costats d'aquesta (pels canals esmentats). La configuració d'aquest mòdul permet una bona circulació hidrodinàmica, d'acord amb experiments prèviament realitzats per a d'altres aplicacions.¹ L'esquema es mostra a la figura següent:

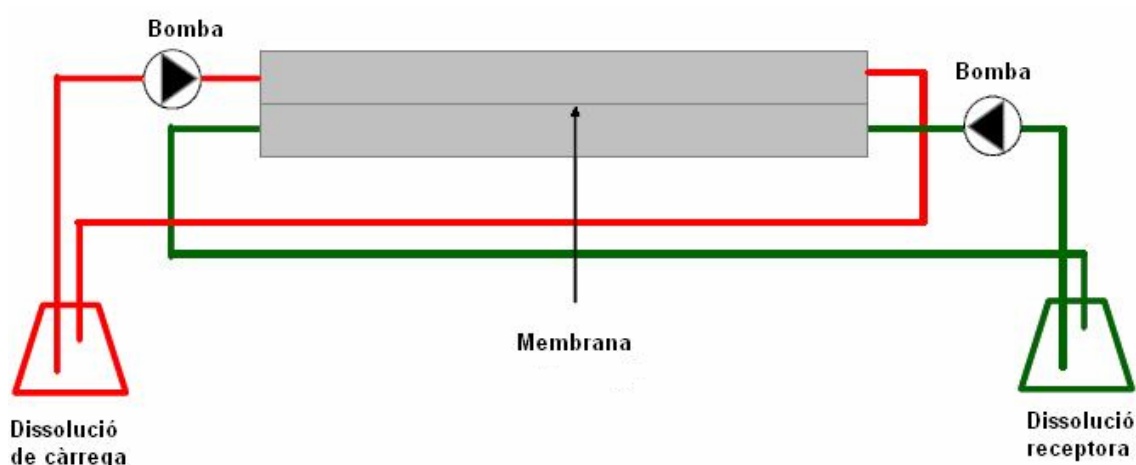


Fig. 4.2. Esquema del mòdul de membrana de configuració rectangular.

L'avantatge que presenta aquest mòdul respecte del mòdul de filtració frontal és que en aquest cas no caldria subministrar nitrogen, ja que no es treballa aplicant pressió, sinó que la circulació de les fases aquoses es fa a través de bombes peristàltiques, de manera que s'haurien de considerar els costos del consum elèctric, que serien força inferiors als costos del consum de nitrogen. D'altra banda, en aquest cas el cost de la membrana és superior, ja que l'àrea és més gran, però alhora també ofereix la possibilitat de tractar un volum de dissolució de càrrega major.

Tenint en compte aquestes consideracions, es pot estimar el cost de realitzar experiments amb el mòdul de la *Universidade Nova de Lisboa*.

1. Estimació del cost de preparació de les membranes enzimàtiques

Tenint en compte els costos calculats per a la preparació de 0,03 m² de membranes ACPS i N25, es pot calcular el cost de preparar les membranes enzimàtiques anteriors, amb una superfície de 34,5 cm².

ACPS	€ per 0,03 m ²	€ per m ²	N25	€ per 0,03 m ²	€ per m ²
Preparació membrana	5,95	198,33	Preparació membrana	2,45	81,67
Immobilització*	0,24	8,00	Immobilització*	8,88	296
Total	6,19	206,33	Tota	11,33	377,67

Taula 4.13. Dades del cost total de preparació de membranes enzimàtiques ACPS i N25 per m² de membrana. (*) S'ha considerat el cost per a la immobilització en una membrana del mòdul de filtració frontal i, per a realitzar l'equivalència amb la superfície de 0,03 m², s'ha multiplicat per 12, perquè tal com s'ha comentat es poden obtenir 12 membranes d'aquestes de cada superfície de 0,03 m².

Per tant, d'acord amb aquests càlculs, el cost de preparar una membrana ACPS de 34,5 cm² és de 0,71 € mentre que el cost per a una membrana N25 és d'1,30 €.

2. Cost operatiu

En aquest cas, el cost inclou l'amortització del mòdul i l'ús de l'electricitat per al funcionament de les bombes peristàltiques. Per a comparar els experiments amb els del mòdul de filtració frontal, es considera una durada de 6 hores per a cada cicle o experiment d'hidròlisi i també s'estima un temps de vida del mòdul de 10 anys. El cost del mòdul és una dada coneguda, ja que se'n va construir un als tallers de la UAB, d'acord amb el model del mòdul de la *Universidade Nova de Lisboa*.

Si la potència de les bombes és de 330 W (1,5 A, 220 V, Cole-Parmer Instruments Co, IL, USA), i n'estem utilitzant una a cada experiment durant 6 hores, estarem consumint un total d'1,98 KWh.

El resum dels costos operatius es recull a la taula 4.13.

	Cost operatiu	€	Preu	Referència
Mòdul	6 hores	0,07	1023 €	Cost de construcció al taller de la UAB
Electricitat	1,98 KWh	0,16	0,08 €/KWh	Endesa, tram 1 (maig 2006)
Total		0,23		

Taula 4.14. Resum dels costos operatius de treballar amb el mòdul de configuració rectangular.

3. Costos de substrat (només per considerar en alguns experiments)

Respecte del cost de dissolució de substrat, es considera també el tractament de 80 ml de dissolució inicial. Cal tenir present que es pot recircular tant la dissolució de càrrega com la receptora, de manera que, per una banda, es poden aprofitar més bé el substrat i, de l'altra, s'està concentrant la dissolució receptora, ja que s'hi acumulen els oligosacàrids que es van recuperant. Als experiments d'hidròlisi del substrat *Birchwood*

xylan s'hi ha de sumar un cost de 0,24 €/experiment, mentre que a la hidròlisi de substrats del tipus URV no caldrà sumar aquesta contribució.

Així, doncs, tenint en compte totes aquestes dades, s'estima un cost de 0,87 €/experiment si s'utilitzen membranes ACPS i d'1,46 €/experiment si es fan servir membranes N25. En cada cas cal considerar 0,24 € addicionals si es realitza la hidròlisi del substrat *Birchwood xylan*.

4. Recuperació dels xilooligosacàrids

<i>Xilooligòmers recuperats</i>	<i>mg</i>	<i>[xilooligosacàrids] a la dissolució receptora</i> <i>μmol/ml</i>	<i>Vol</i> <i>(ml)</i>
ACPS, a partir de <i>Birchwood xylan</i>	4,35	0,150	70
ACPS, a partir de substrat URV	2,75	0,095	70
N25, a partir de <i>Birchwood xylan</i>	18,85	0,650	70
N25, a partir de substrat URV	1,89	0,065	70

Taula 4.15. Quantitats hipotètiques de xilooligosacàrids recuperats a partir de la hidròlisi enzimàtica amb membranes ACPS i N25 i el mòdul de configuració rectangular.

S'està assumint que es pot arribar a recuperar un volum de 70 ml, ja que també s'ha de tenir present el volum mort de líquid que pot romandre al mòdul, per a simplificar els càlculs i així comparar-los amb els dels experiments del mòdul de filtració frontal. També es considera que, hipotèticament, les concentracions de productes obtingudes són comparables a les obtingudes amb el mòdul de filtració frontal, tot i que s'hauria de comprovar experimentalment, ja que no es pot assegurar que sense l'aplicació de pressió aquesta hipòtesi sigui realista. Per tant, són només aproximacions a nivell teòric. Per a simplificar càlculs, només es considera un sol ús de les membranes.

5. Estimació econòmica hipotètica del cost d'obtenció de xilooligosacàrids

<i>Preu per mg de xilotriosa</i>	<i>€/mg</i>
ACPS, a partir de <i>Birchwood xylan</i>	0,27
ACPS, a partir de substrat URV	0,34
N25, a partir de <i>Birchwood xylan</i>	0,09
N25, a partir de substrat URV	0,81

Taula 4.16. Resum del cost d'obtenció de xilooligosacàrids amb les dues membranes i els dos substrats amb el mòdul de configuració rectangular.

Quan es comparen amb el preu de la xilotriosa comercial (2,68 €/mg), ara sí que tant el tractament del substrat *Birchwood xylan* com del substrat tipus URV es podrien considerar rendibles. De tota manera es recorda que aquests resultats són *només* uns càlculs aproximats i, per tant, una estimació assumint uns resultats comparables als obtinguts amb l'altre tipus d'experiments (amb el mòdul de filtració frontal o *dead-end*), amb la qual cosa no es pot assegurar la rendibilitat del procés alternatiu presentat. Amb

aquesta estimació econòmica hipotètica només es pretén oferir una alternativa per a millorar els resultats obtinguts fins al moment. En aquest punt, es proposa la realització d'experiments en aquestes noves condicions (mòdul de configuració rectangular), per tal de comprovar les hipòtesis plantejades. Malauradament, en el desenvolupament d'aquesta tesi no ha estat possible realitzar aquests experiments, amb la qual cosa queda oberta una possible continuació de la recerca en aquest aspecte, a nivell postdoctoral.

Etapes de purificació posteriors: dessalinització

En el tractament hidrolític dels materials lignocel·lulòsics, s'ha aconseguit la recuperació de xilooligosacàrids de grau de polimerització dins del rang que ens proposàvem com a objectiu (entre 2 i 10 unitats de monòmer). Aquests oligosacàrids, com s'ha comentat al capítol anterior, es troben en una dissolució tampó d'àcid acètic/acetat sòdic 0,05M a pH 5 o 6, segons el cas, és a dir, no s'obtenen de forma aïllada, sinó conjuntament amb sals, majoritàriament acetat sòdic.

Les principals aplicacions potencials dels xilooligosacàrids, tal com s'hi ha fet referència a la introducció d'aquesta tesi doctoral, s'emmarquen dins del camp de la indústria farmacèutica i alimentària, per la qual cosa cal disposar de sucres amb el major grau de puresa possible. D'aquesta manera, es considera necessari realitzar alguna etapa posterior de purificació dels productes obtinguts abans de destinar-los a les aplicacions finals. A partir d'aquest punt, i amb aquest objectiu, es proposen diferents possibilitats de tractament de les mostres.

El sistema de bescanvi d'ions (cations) és una de les tècniques proposades per a l'eliminació d'ions Na^+ . Concretament, els anomenats *Carbohydrate Membrane Desalters* (CMD) permeten el bescanvi d'un 99,5% dels ions Na^+ de la dissolució aquosa (procedents majoritàriament d'hidròxid sòdic o acetat de sodi) per ions H_3O^+ de manera que es genera àcid acètic *in situ*, el qual pot ésser eliminat per posterior evaporació al buit o liofilització. Aquests processos permeten dessalinitzar fins a obtenir concentracions de Na^+ residual $\leq 350 \mu\text{M}$ quan els oligosacàrids es troben en una dissolució de partida amb una concentració inicial d'acetat sòdic de 300 mM. Aquests resultats representen una eficiència de dessalinització superior al 99,8%.² Un exemple d'aplicació d'aquest procediment és el seu ús com a etapa posterior a la cromatografia de bescanvi d'anions amb detecció amperomètrica (*High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection*, HPAEC/PAD). Aquesta es fa servir com a tècnica de rutina per a la separació d'oligosacàrids neutres i carregats en

funció de les seves diferències estructurals (cadena lateral de ramificació i isomerisme). Els CMD s'utilitzen en línia abans de la caracterització dels oligosacàrids, ja que la dessalinització és necessària si es volen dur a terme anàlisis posteriors per MALDI-TOF-MS. La detecció amperomètrica dels sistemes HPAEC/PAD requereix pH molt alts (≥ 12), la qual cosa implica l'ús de dissolucions concentrades de NaOH. Amb els CMD, tal com es mostra a la fig. 4.3, s'aconsegueix fer disminuir el contingut de sodi de les mostres. El procés ha estat estudiat per una casa comercial (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) i es presenta com una etapa necessària després de la separació cromatogràfica. Tot i així, aquest procés de dessalinització presenta el desavantatge d'una possible pèrdua de sucres amb càrrega durant el procés de bescanvi catiònic.

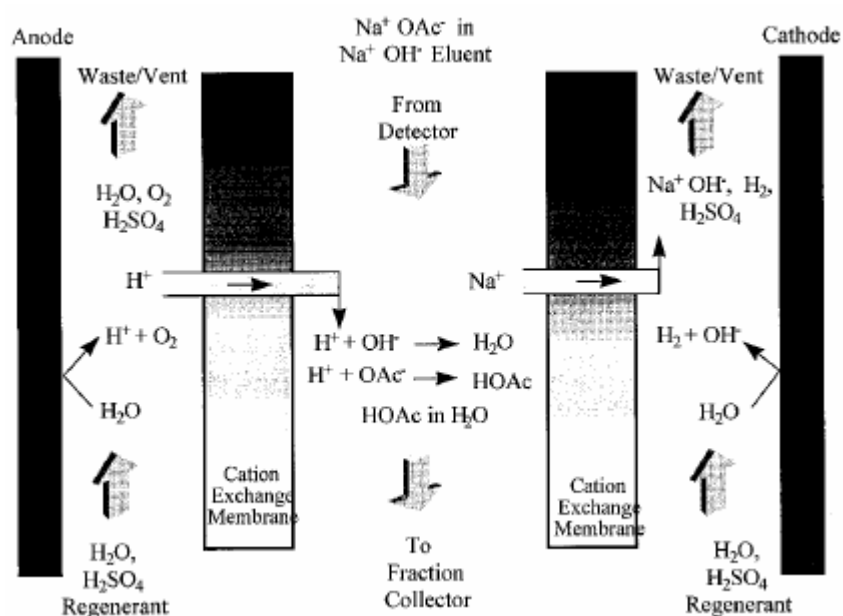


Fig. 4.3. Representació del procés de dessalinització mitjançant un sistema CMD.

El cost d'un *Carbohydrate Membrane Desalter* (Dionex®, ref 059090) és de 1.402,5 €. Malgrat que el sistema es pot regenerar, caldria estudiar la viabilitat econòmica del seu ús i les possibilitats d'acoblar-lo a la sortida del mòdul de filtració frontal.

Una altra alternativa de dessalinització de les mostres consistiria en l'ús de carboni grafit, en processos d'extracció en fase sòlida³. S'ha posat de manifest que aquest procediment permet separar els oligosacàrids i/o els seus derivats de possibles contaminants, que en el present cas serien sals (acetat) i restes de proteïnes (enzims), o bé d'altres com detergents i reactius (hidrazina i borhidrur de sodi, els quals s'utilitzen en processos d'alliberament d'oligosacàrids de glicoproteïnes). Aquest mètode presenta l'avantatge, respecte de l'estratègia anterior de bescanvi d'ions, que s'evita el risc de

pèrdua de sucres amb càrrega. D'altra banda, també ofereix avantatges respecte de processos de precipitació de sals en dissolvents no aquosos, ja que aquests dissolvents es consideren inviabilitats tenint en compte la presència de traces de dissolvents orgànics i la possible coprecipitació dels oligosacàrids.

A tall de conclusió, un cop presentades les propostes que es recullen en aquest capítol, es pot afirmar que l'estudi del tractament de residus de biomassa vegetal per a la recuperació d'oligosacàrids és una línia de recerca en la qual es poden continuar treballant amb l'objectiu d'aplicar els processos actuals a un nivell industrial i a escala real.

Referències

¹ Gumi, T.; Ferreira, Q.; Viegas, R. M. C.; Crespo, J. G.; Coelho, I. M.; Palet, C. *Separation Science and Technology* 40 (2005) 4: 773-789.

² Thayer, J. R.; Rohrer, J. S.; Avdalovic, N.; Gearing, R. P. *Analytical Biochemistry* 256 (1998) 2: 207-216.

³ Nicolle H.; Lawson, M. A.; Jardine, D. R.; Redmond, J. W. *Glycoconjugate Journal* 15 (1998) 8: 737-747.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

A continuació, es presenten les conclusions més rellevants derivades dels resultats obtinguts d'acord amb els objectius inicials i un cop desenvolupat el treball experimental presentat en aquesta memòria.

En relació amb el disseny i la caracterització de membranes polimèriques enzimàtiques, es pot afirmar que:

- La immobilització física de l'enzim endo-1,4- β -xilanasas II en membranes de polisulfona comporta la pèrdua d'activitat enzimàtica de la proteïna a conseqüència de la seva desnaturalització per contacte amb dissolvents orgànics, els quals són necessaris per a la preparació de les membranes. Així, aquest procediment és inviable per a la preparació de membranes enzimàtiques, que és el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral.
- La derivatització de la polisulfona amb clorur d'acrilòil permet obtenir, a través d'una reacció senzilla, acrilat de polisulfona. La immobilització de l'endo-1,4- β -xilanasas II és possible mitjançant un enllaç covalent entre els grups acrilat del suport i els grups amino de les cadenes laterals d'arginina i lisina de l'enzim. Aquestes membranes enzimàtiques d'acrilat de polisulfona presenten activitat catalítica.
- Els polímers monolítics són materials que permeten la preparació de membranes polimèriques i la immobilització de l'endo-1,4- β -xilanasas II a través d'un enllaç covalent entre el monòmer AEM de la membrana i les molècules d'enzim. Aquest, un cop immobilitzat, manté les seves propietats catalítiques.
- El disseny d'experiments (DOE) permet optimitzar la composició de la dissolució precursora de les membranes de polímers monolítics, tot avaluant l'efecte de la variació en el contingut de tres components de la dissolució precursora de les membranes de polímers monolítics: el contingut del monòmer AEM el de l'agent d'entrecruament (EDMA), i la relació molar dels dissolvents porogènics, ciclohexanol i dodecanol. Els millors resultats d'activitat enzimàtica estan associats a un increment de la superfície del polímer (que correspon a una major quantitat d'EDMA i de la relació molar de dissolvents), així com a un augment del nombre de grups funcionals disponibles per a enllaçar amb l'enzim (relacionat amb la quantitat d'AEM). Malgrat tot, un contingut de ciclohexanol

massa alt, no millora l'activitat enzimàtica, ja que l'estructura porosa esdevé massa estreta i, per tant, hi ha impediments estèrics per a la interacció entre el substrat i l'enzim immobilitzat a l'interior de l'estructura polimèrica de la membrana..

- El model matemàtic obtingut de l'ajust dels resultats del DOE permet la predicció de l'activitat enzimàtica de noves membranes enzimàtiques de polímers monolítics, en funció de la seva composició, respecte dels tres paràmetres anteriors (AEM, EDMA i relació de dissolvents porogènics).
- En comparar la immobilització covalent d'endo-1,4- β -xilanasas II en condicions estàtiques als dos tipus de membranes, s'observa que les membranes enzimàtiques d'acrilat de polisulfona (ACPS) tenen més capacitat de retenir aquest enzim que les homòlogues de polímers monolítics (N25). La quantitat de proteïna immobilitzada depèn del tipus de suport que es consideri, ja que en cada cas la reacció de formació de l'enllaç covalent amb l'enzim és diferent.
- Els resultats d'immobilització d'endo-1,4- β -xilanasas II en condicions dinàmiques no mostren diferències significatives entre els dos tipus de membranes considerats. La quantitat d'enzim immobilitzat és inferior en tots dos casos a l'obtinguda en condicions estàtiques, ja que el temps de contacte enzim-membrana és menor.
- En determinar l'activitat enzimàtica de l'endo-1,4- β -xilanasas II immobilitzades, els resultats de les membranes N25 són millors que els de les membranes ACPS en les mateixes condicions. Per tant, una major capacitat d'immobilització no està directament relacionada amb una major activitat de l'enzim immobilitzat, ja que no implica que totes les molècules siguin accessibles.
- Tant les membranes ACPS com les N25 mantenen l'activitat enzimàtica almenys durant un mes després de la seva preparació, tot afavorint així les seves possibilitats d'aplicació real a diferents processos.
- L'enzim immobilitzat, tant en les membranes ACPS com en les N25, és més resistent a la desactivació enfront de canvis de pH i de canvis de temperatures superiors a l'òptim que l'enzim lliure. Per tant, la immobilització condueix a l'obtenció de formes insolubles de l'enzim que són més estables, i així permet la seva aplicació en un rang de valors de pH i temperatures més ampli que quan s'usa la proteïna lliure.

- No s'observen diferències significatives en el valor de la constant de Michaelis-Menten entre l'enzim lliure i l'enzim immobilitzat en cap dels casos, de manera que en aquestes condicions no es pot dir si l'enzim té una menor o major afinitat pel substrat, un cop immobilitzat.
- Per tècniques microscòpiques SEM i AFM, així com l'adsorció/desorció de gasos, s'han posat de manifest les diferències morfològiques i estructurals entre tots dos polímers (ACPS i N25). Concretament, les diferències així obtingudes en la mida, distribució i forma de porus afecten el flux d'aigua pura, i permeten explicar el comportament diferencial dels dos tipus de membranes.

Respecte de l'aplicació de les membranes enzimàtiques en la hidròlisi de substrats lignocel·lulòsics, emprant diferents mòduls de membrana, les conclusions que s'obtenen són les següents:

- La possibilitat d'aplicació de les membranes com a tècnica de separació depèn del sistema experimental considerat.
- En l'ús del mòdul "cel·la UAB" amb qualsevol de les dues membranes (ACPS i N25) no és possible recuperar els productes d'hidròlisi a la dissolució receptora, ni tampoc es pot afavorir aquest transport a conseqüència de canvis en el pH d'aquesta dissolució receptora. Per tant, les característiques operatives d'aquest mòdul de membrana no són les adequades per a l'objectiu proposat.
- Respecte del mòdul de filtració frontal, en aquest cas sí que és possible la recuperació dels productes d'hidròlisi alhora que se separen parcialment del substrat inicial.
- El grau d'hidròlisi i la possibilitat de reutilització de la membrana depenen tant del tipus de membrana emprada com de la naturalesa del substrat que cal hidrolitzar.

De la hidròlisi enzimàtica dels substrats de xilà considerats emprant aquestes membranes enzimàtiques, s'ha obtingut quasi exclusivament xilotriosa, és a dir, el trisacàrid (identificat per MALDI-TOF-MS), la qual cosa és dins dels objectius que ens havíem proposat inicialment.

ANNEX A

Estructures i figures

ANNEX A

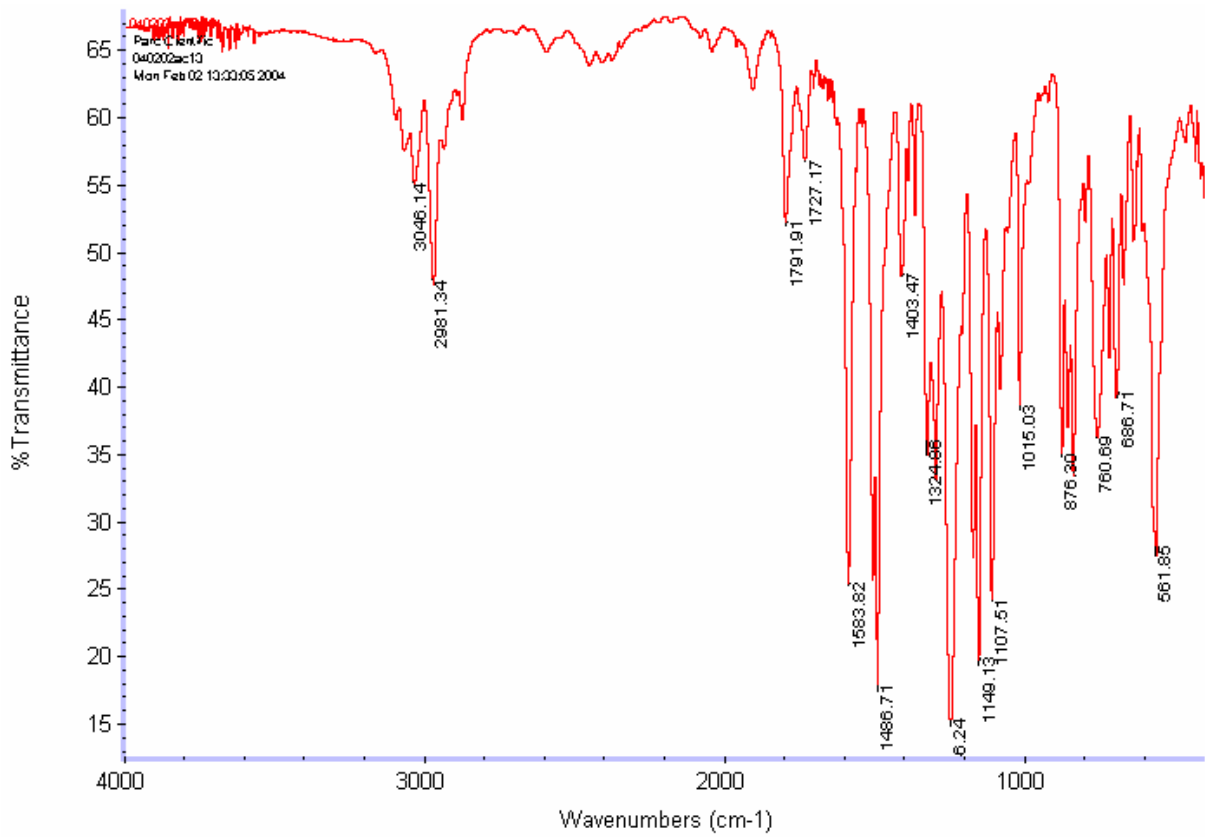


Fig. 1A. Espectre IR de l'acrilat de polisulfona.

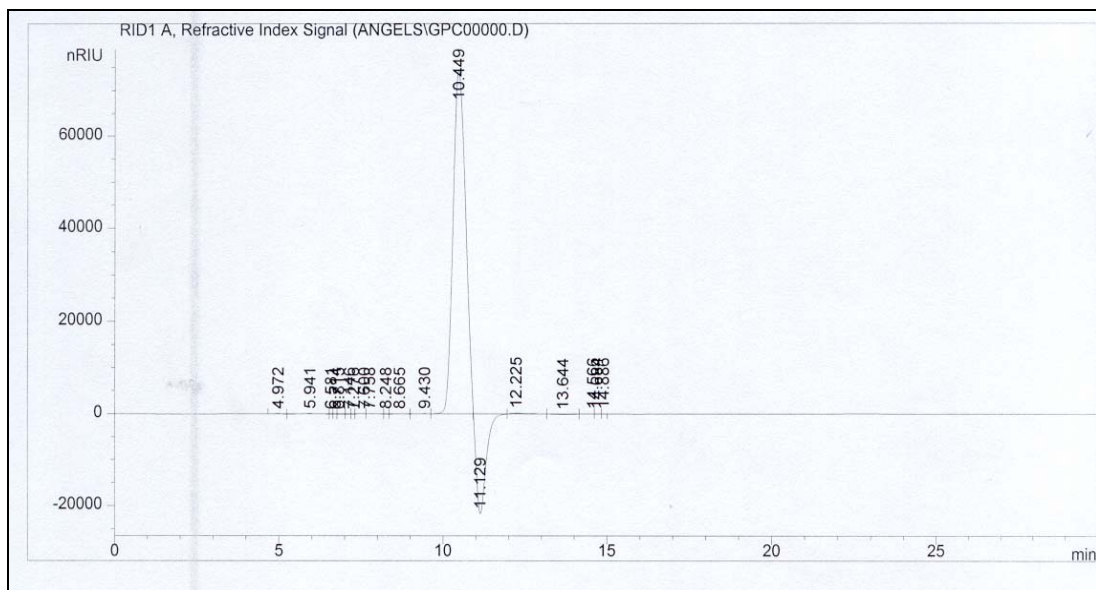


Fig. 2A. Cromatograma de la xilosa patró.

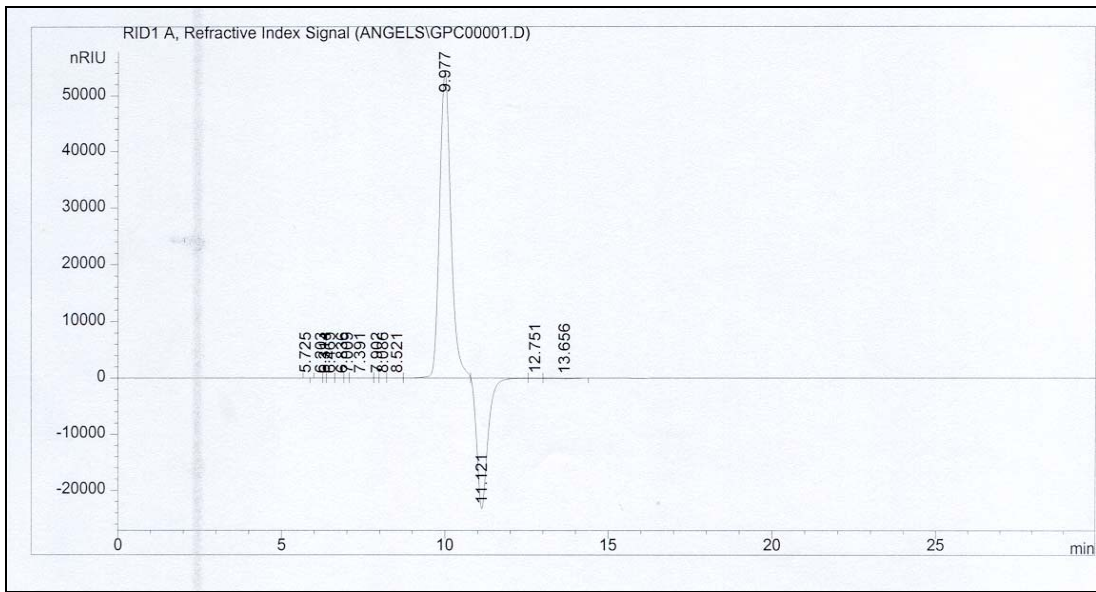


Fig. 3A. Cromatograma de la xilobiosa patró.

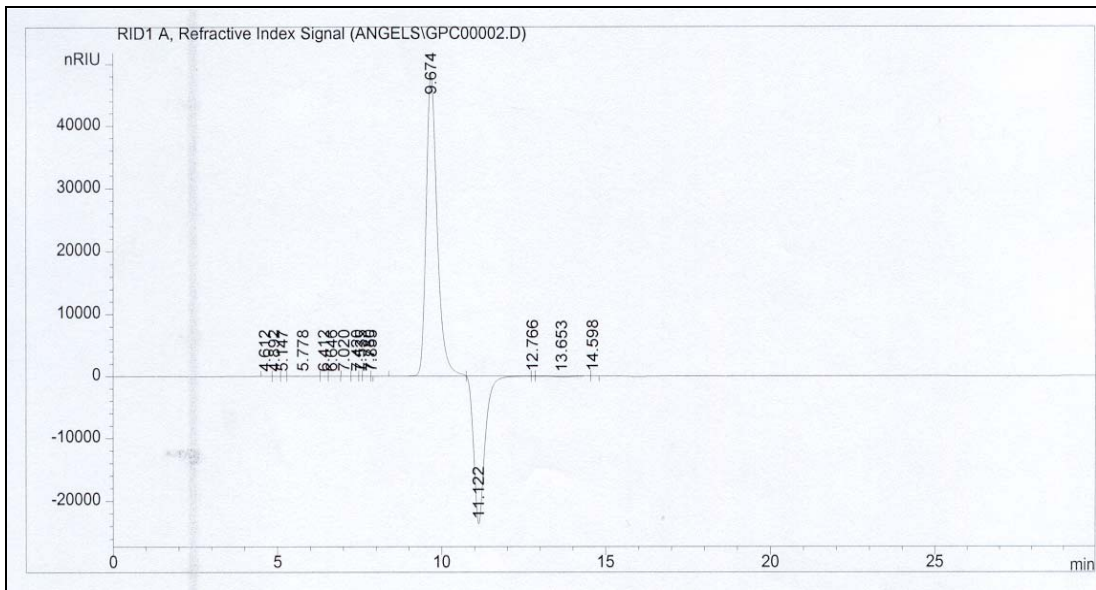


Fig. 4A. Cromatograma de la xilotriosa patró.

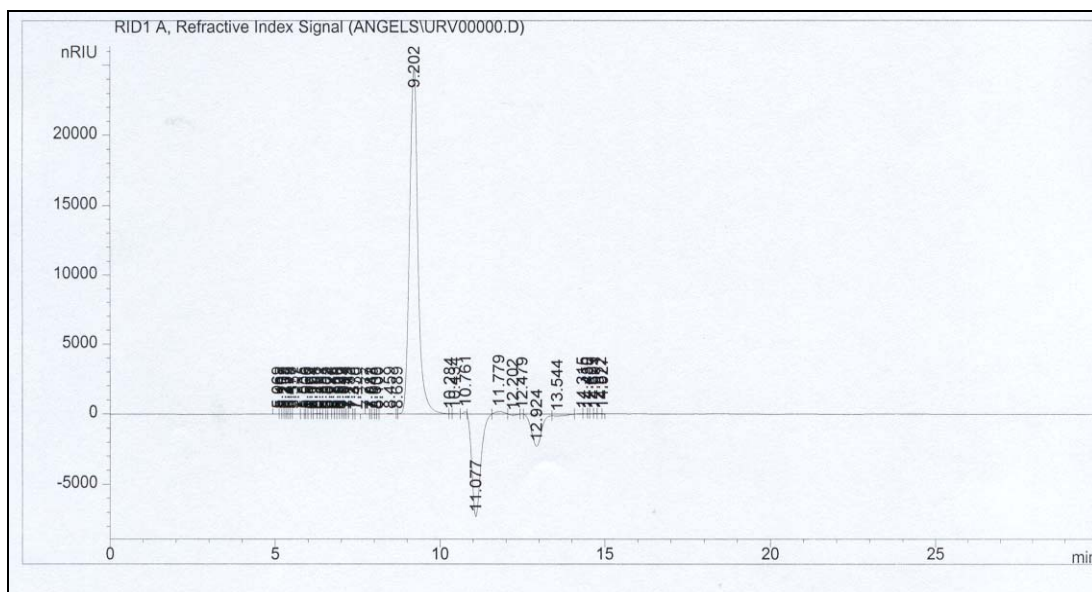


Fig. 5A. Cromatograma del blanc (dissolució tampó d'acid acètic/acetat sòdic 0,05 M).

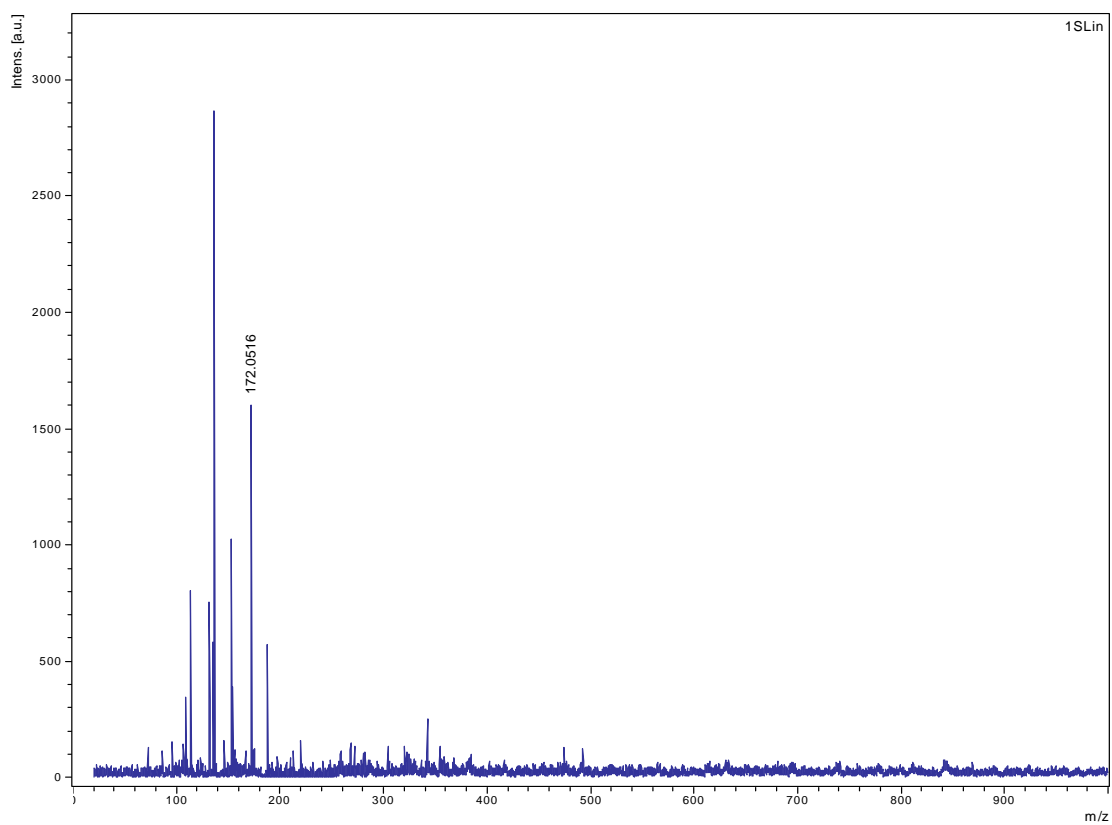


Fig. 6A. Espectre MALDI de la xilosa patró.

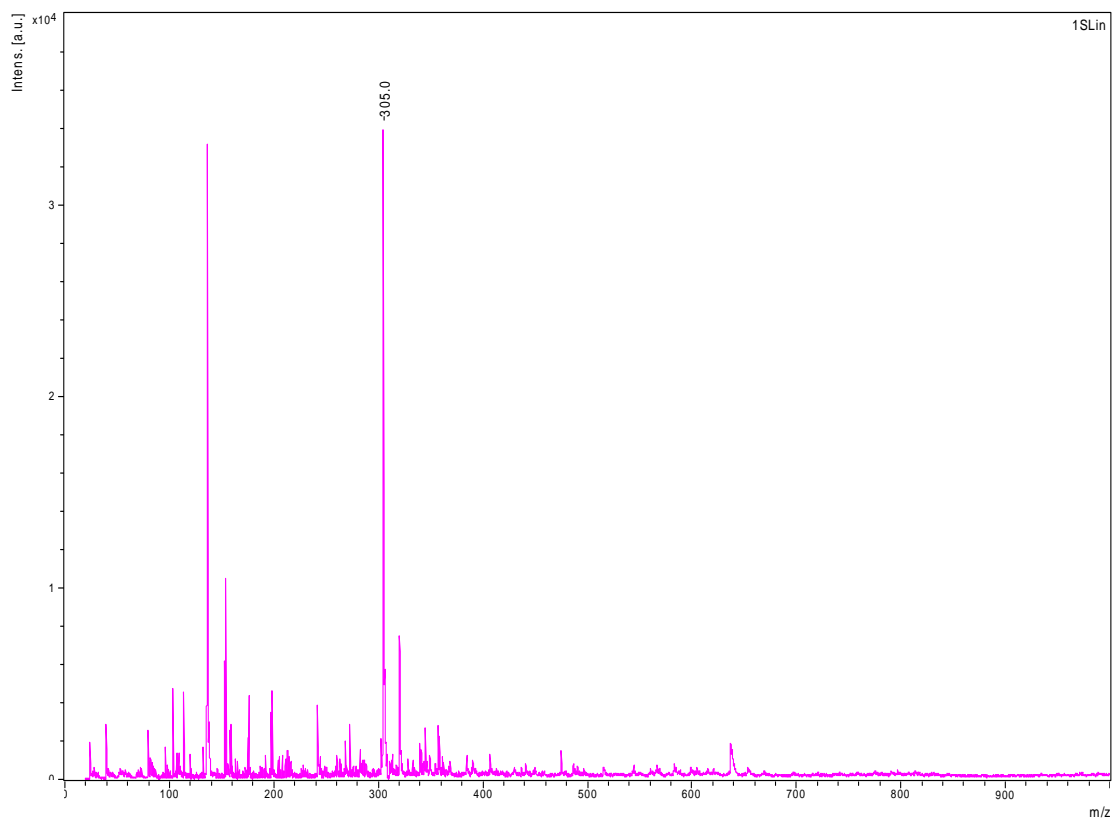


Fig. 7A. Espectre MALDI de la xilobiosa patró.

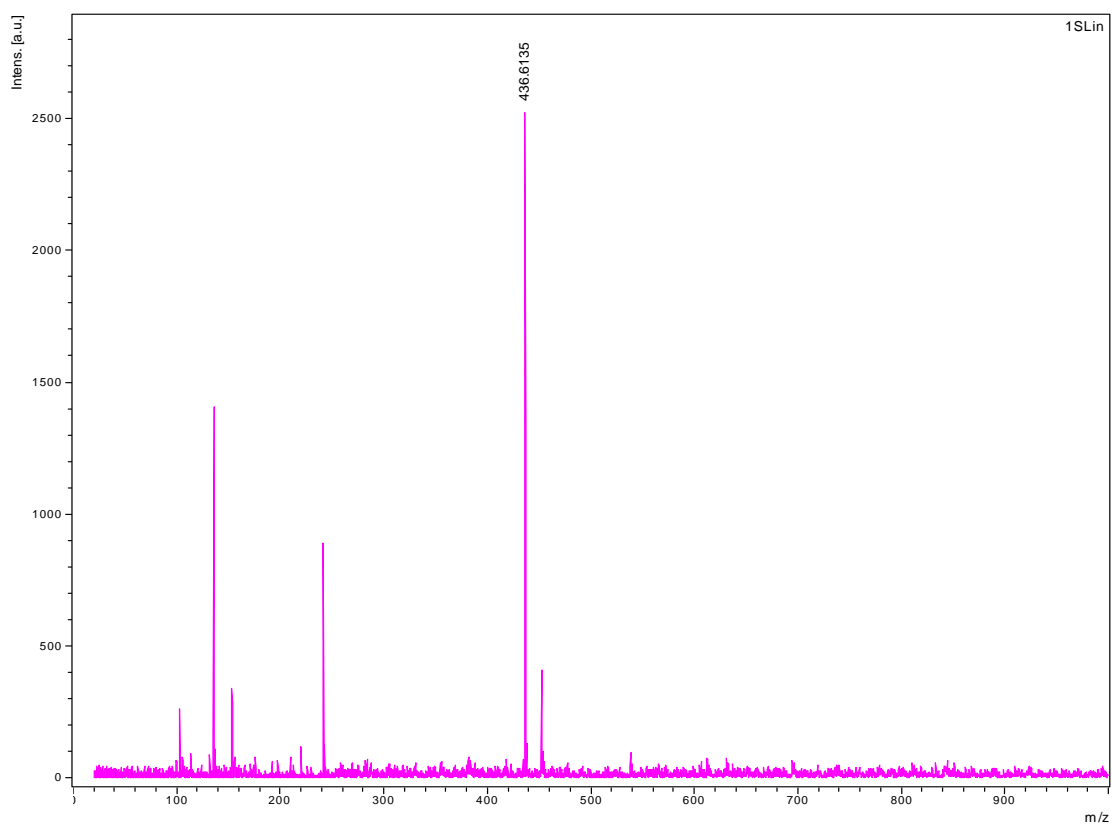


Fig. 8A. Espectre MALDI de la xilotriosa patró.

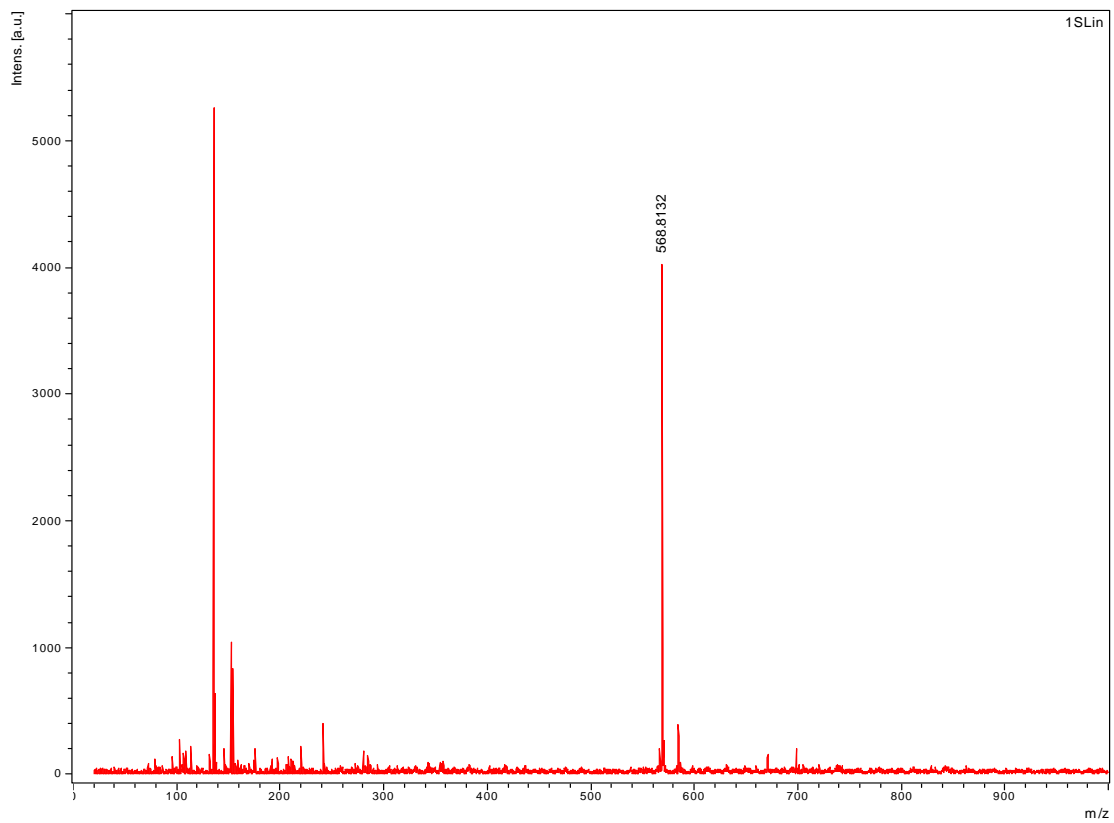


Fig. 9A. Espectre MALDI de la xilotetraosa patró.

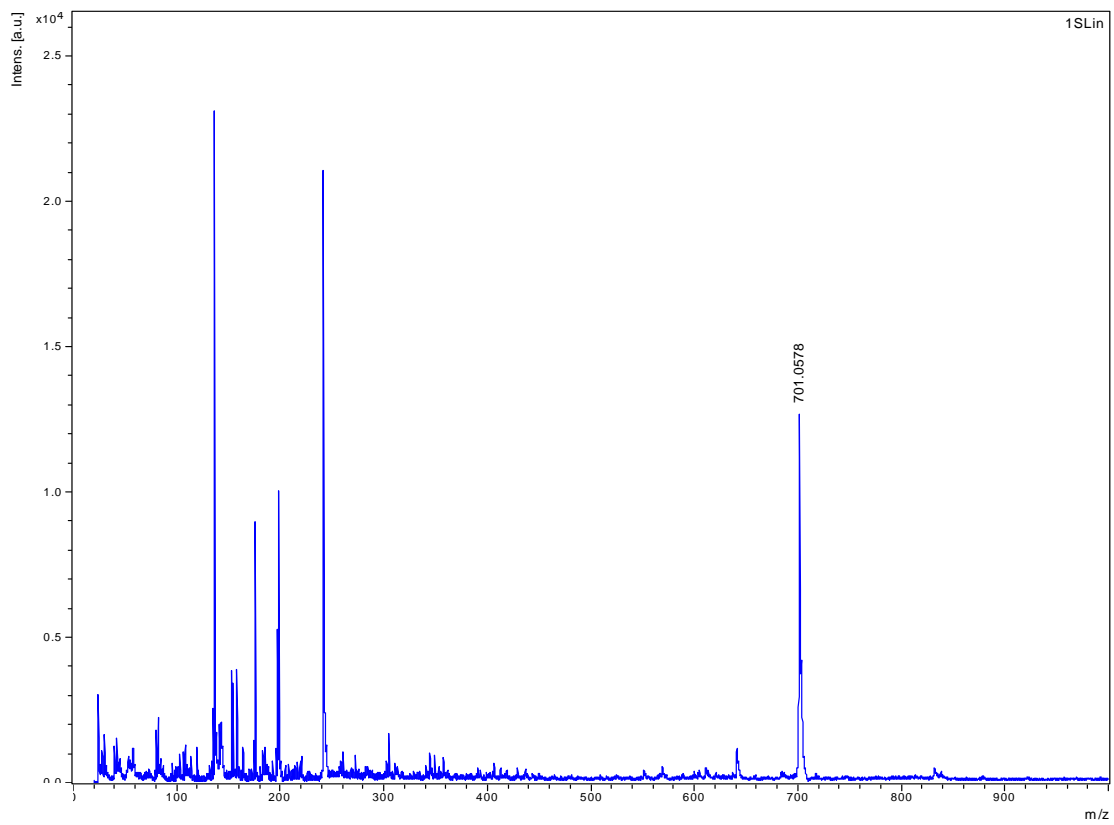
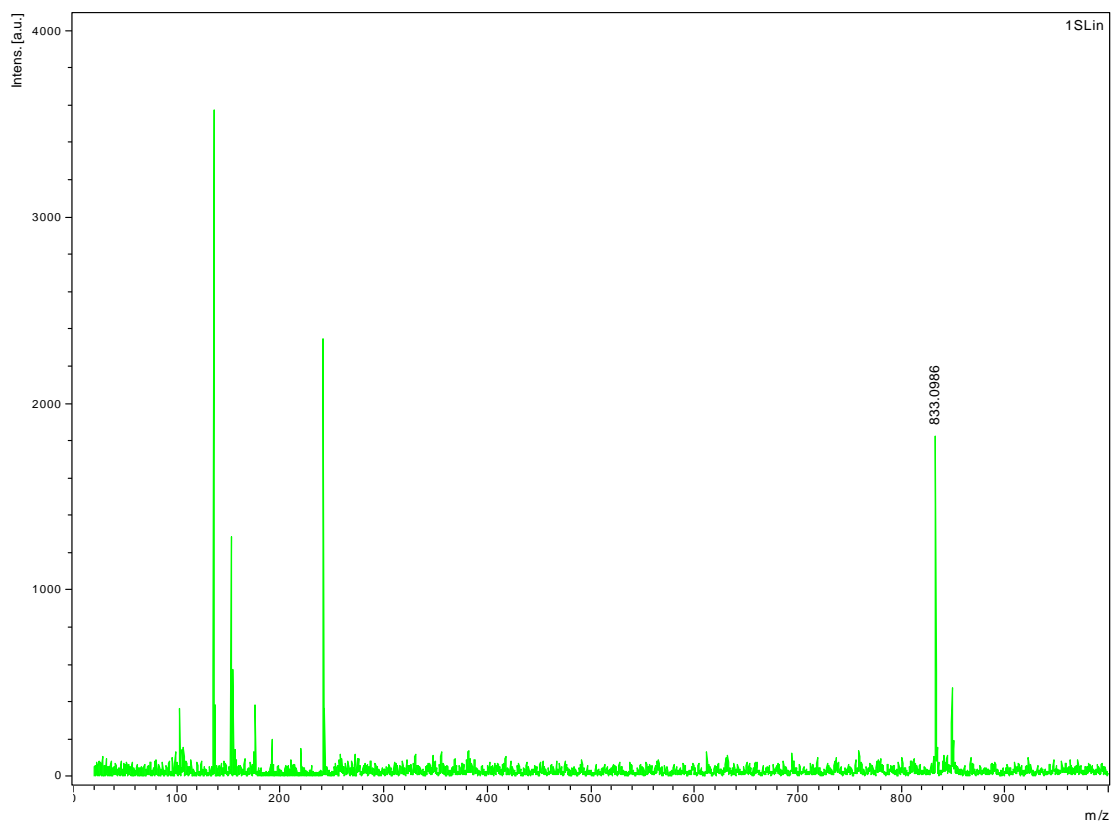


Fig. 10A. Espectre MALDI de la xilopentaosa patró.



Estructures d'aminoàcids

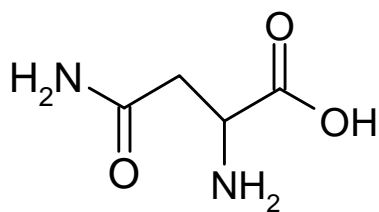


Fig. 12A. Asparagina.

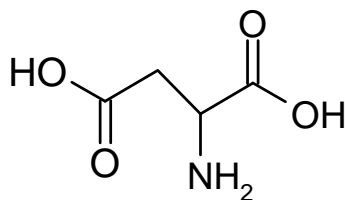


Fig. 13A. Àcid aspàrtic.

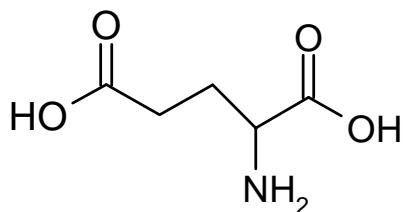


Fig. 14A. Àcid glutàmic.

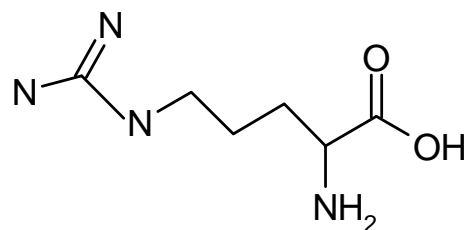


Fig. 15A. Arginina.

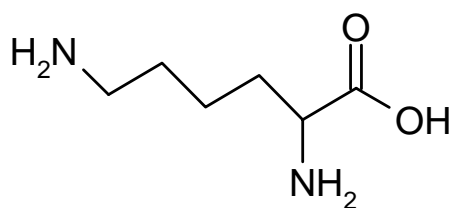


Fig. 16A. Lisina.

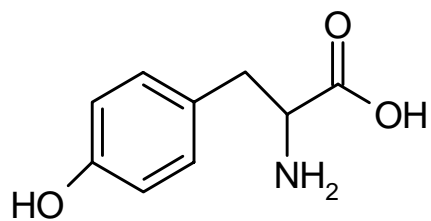


Fig. 17A. Tirosina.

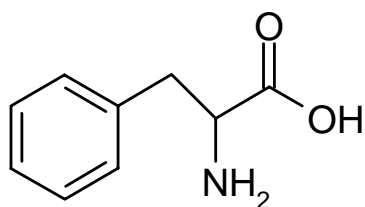


Fig. 18A. Fenilalanina.

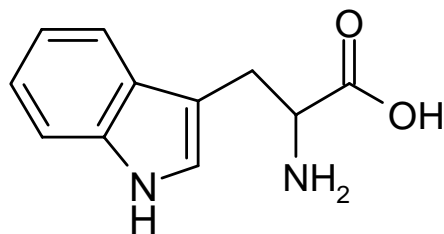


Fig. 19A. Triptòfan.

Estructures de reactius

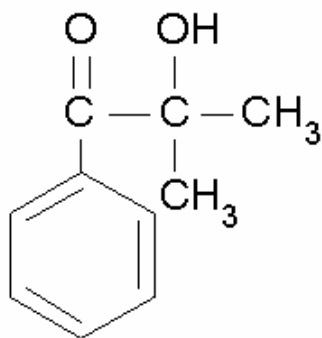


Fig. 20A. HMPP

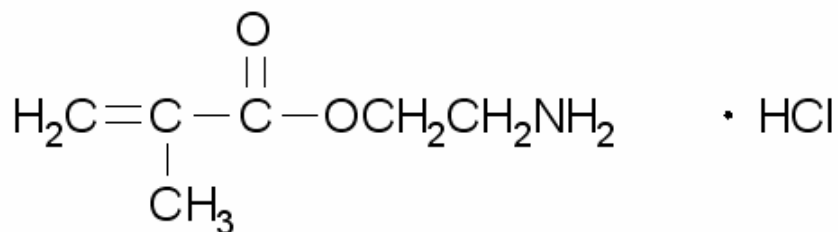


Fig. 21A. AEM.

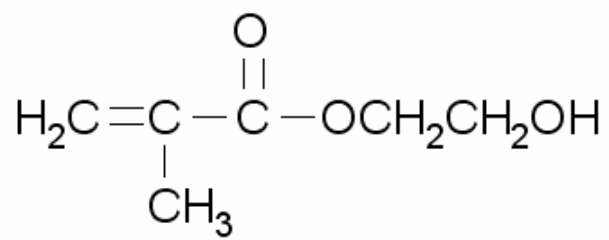


Fig. 22A. HEMA.

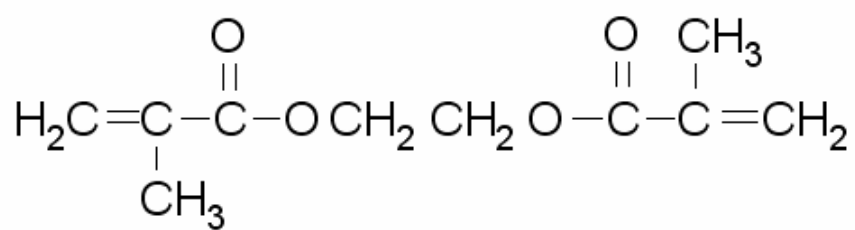


Fig. 23A. EDMA.

ANNEX B

Cano, A.; Torras, C.; Garcia-Valls, R.; Palet, C.
Purification and treatment of vegetal biomass oligosaccharides with enzymatic polymeric membranes.
Proceedings. Int Conf. PERMEA 2003, I Membrane science and technology conference of Visegrad
countries, Tatranské Matliare, Slovakia, Sept. 7-11, 2003.

PURIFICATION AND TREATMENT OF VEGETAL BIOMASS OLIGOSACCHARIDES WITH ENZYMATIC POLYMERIC MEMBRANES

A. Cano,¹ C. Torras² R.Garcia-Valls², and C. Palet^{*1}

¹ Grup de Tècniques de Separació, Unitat de Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalunya, Spain. E-mail: Cristina.Palet@uab.es

² Grup de Biopolimers Vegetals, Departament d'Enginyeria Química, ETSEQ, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, Av. Països Catalans, 26, 43007 Tarragona, Catalunya, Spain

Keywords: Enzymatic Polymeric Membranes, Immobilization, Characterization, Oligosaccharides

The hydrolysis of vegetal biomass (agricultural waste, which mainly contains xylan) allows to recover oligoxilans and offers the possibility of use them in many high value applications, as well in the food and pharmaceutical industries. In the food industry, the oligoxylan derivatives that have the main interest comprise the fraction of small size (DP 2 - 8) that are used as soluble fibres in food preparations. Their consuming by organisms supplies them with a source of carbon that favours the proliferation of enteric microorganisms, and facilitates the digestion and absorption of the nutritious substances.

The use of oligoxylan derivatives in such applications requires their isolation with a high purity degree. The use of solvents or additives to extract them can leave traces of contaminant compounds, and prevents to use the oligoxilans in the former areas.

Membrane processes offer several chances for their purification at low energetic and contaminant costs. In this context, enzymatic polymeric membranes allow the desired hydrolysis of the oligosaccharides and have several advantages in comparison with soluble or encapsulated enzymes. In this sense, such membranes favour the easier isolation of the analytes from a complex mixture, together with the possibility of recover and reuse the immobilised enzyme. There is also an increase of the enzyme stability and resistance towards deactivation observed when immobilised. Xylanases are enzymes that break the polymeric backbone of xylan, because they hydrolyse 1,4- β -glycosidic linkages and release smaller oligosaccharides. So, its immobilization is checked and physically and chemically characterized.

There are many ways to immobilise selective agents as enzymes in membranes. One way, that is presented and evaluated here, is to introduce the enzyme in one step of the preparation method, as i.e. *in situ* polymerisation (in this case the enzyme remains entrapped and linked in the polymeric matrix). So, xylanase is entrapped mainly in the polymeric matrix of polysulphone, used as a polymeric support. The use of different phase inversion methods as the polymer precipitation

step either by solvent evaporation or immersion precipitation, are assayed. Possible denaturalisation of the enzyme for the use of organic solvents is evaluated.

Such membranes are experimentally tested for oligoxilans selective hydrolysis and separation in different chemical configurations, i.e.: in presence or absence of xylanase in the source solution. Their physical properties are evaluated from the Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis of their superficial and transversal sections. It is also important to study the membranes before as well after their performance, in order to evaluate their temporal stability and reuse possibility. So, the surface homogeneity and uniformity of the different membranes are compared, prior and after their use, as well as their assymetry, porosity, mean pore size, etc, which data are obtained from the treatment of SEM images by IFME(R) software (Torras, C., Registered software n° 02/2003/3395, Spain).

Acknowledgements: This work has been supported by “Ministerio de Educación, Cultura y Deportes”, under the project of reference PPQ2002-04201-C02-01. Àngels Cano acknowledge the fellowship from the “Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació, de la Generalitat de Catalunya”, with reference number 2003FI 00501.

ANNEX C

Cano, A.; Minguillón, C.; Palet C.

Immobilization of endo-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: synthesis and characterization.
Journal of Membrane Science 280 (2006) 383-388.

Immobilization of *endo*-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization

Àngels Cano^a, Cristina Minguillón^b, Cristina Palet^{a,*}

^a Centre Grup de Tècniques de Separació en Química, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Catalunya, Spain

^b Institut de Recerca Biomèdica, Parc Científic de Barcelona (IRB-PCB), Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Catalunya, Spain

Received 15 February 2005; received in revised form 13 January 2006; accepted 22 January 2006

Available online 28 February 2006

Abstract

We report on a new enzyme/support system to immobilize proteins such as enzymes through a covalent bond on polysulfone membranes. In the present case the enzyme *endo*-1,4- β -xylanase (E.C.3.2.1.8) is attached to polysulfone previously derivatized by introducing an acrylate group. Membranes are properly prepared from this polysulfone acrylate. Afterwards the enzyme is immobilized through the amino groups of side chains of the amino acids of the enzyme and the acrylate group of the derivatized polysulfone. Such immobilization of the enzyme is confirmed by microelemental analysis as well as by amino acid analysis by HPLC. Moreover, the enzymatic activity of the membranes was evaluated and compared with that corresponding to the free enzyme. Certain physical parameters (asymmetry, irregularity, pore size and surface roughness) of the corresponding enzymatic membranes were obtained from SEM and AFM image interpretation.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Covalent immobilization; Enzyme; Polysulfone acrylate

1. Introduction

The attachment of enzymes on polymeric supports and membranes is a research field that has been developed in previous studies [1,2]. Immobilized enzymes are used in various areas such as industrial production [3], waste processing [4] and the treatment of diseases [5], in a wide range of applications. The immobilization consists of confining an enzyme in a material to obtain insoluble forms that permit its recovery and recycling, while maintaining the catalytic activity [6]. The reuse of the enzyme leads to a cost reduction and simplifies the global process [7].

Enzymes can be immobilized by physical or chemical methods. The former include the entrapment of the enzyme in a solid polymeric matrix, or adsorption on a surface through the electrostatic interaction between the enzyme and the support [8]. Alternatively, the chemical immobilization involves the covalent linkage between the polymeric support and the protein. In

this case, the retention of the enzyme in the obtained membranes is stronger than in membranes prepared by adsorption or entrapment methods [6]. Unfortunately, in the case of random immobilization, the active site may be blocked by the linkage to the support. However, if the covalent attachment of the protein takes place through functional groups away from the active site, a higher efficiency and catalytic yield can be obtained. This is possible to achieve using site directed immobilization techniques [9].

In the present work, *endo*-1,4- β -xylanase from *Trichoderma reesei* has been chemically immobilized on modified polysulfone membranes. Xylanases are enzymes that can hydrolyze β -1,4-glycosidic linkages of the xylan backbone to release small oligosaccharides [10]. These xylooligosaccharides have relevance in food applications, as sweeteners and components of prebiotic products, as they stimulate the proliferation of human intestinal *Bifidobacteria* [11]. Xylanases have been immobilized previously, by non-covalent methods, in reversibly soluble–insoluble polymers (i.e. Eudragit S-100) as reported by Gawande and Kamat [12], silica-based microspheres, hydrogels [13] or polyurethane foam [14]. Covalent binding of these enzymes has also been performed onto polymeric matrixes, such

* Corresponding author. Tel.: +34 935813475; fax: +34 935812379.
E-mail address: cristina.palet@uab.es (C. Palet).

as polyvinyl alcohol (PVA) [15]. In the present case the immobilization procedure has been carried out by the reaction between xylanase amino groups and acrylate groups on a previously derivatized polysulfone (PS) membrane.

The enzymatic membranes were analyzed by elemental microanalysis and HPLC amino acid analysis to check the efficiency of the protein immobilization. The enzymatic activity of xylanase was evaluated to assess the influence of the immobilization process. Common microscopic techniques, scanning electron microscopy (SEM), and atomic force microscopy (AFM) together with the treatment of SEM images with IFME (R) software (Torras, C., Registered software no. 02/2003/3395, Spain), were used to physically characterize corresponding enzymatic membranes.

2. Experimental

2.1. Materials and equipment

Polysulfone acrylate was obtained through the reaction between raw PS (BASF, Germany) and acryloyl chloride a.r. (Sigma–Aldrich, Germany) as reported elsewhere [16]. A.r. grade *N,N*-dimethylformamide (DMF, Sigma–Aldrich) and the non-woven polyester support (Hollytex 3329) were required for the membrane preparation. Sodium hydrogen carbonate 99.5% was purchased from Sigma–Aldrich (USA). Xylanase from *T. reesei* solution was kindly supplied by Genencor International (The Netherlands). All the reagents used in the enzymatic activity assays were of ACS grade. The elemental microanalyses were carried out using a CHN EA-1108 Elemental Analyzer from Thermo Instruments. HPLC analysis were performed using a WATO52885 column and an Agilent® HPLC equipment (G1315A).

SEM top surface and cross-section images from membranes, prior to and after the enzyme immobilization procedure, were obtained with a HITACHI S-570 microscope and evaluated. Furthermore, cross-section images were treated by IFME (R) software (Torras, C., Registered software no. 02/2003/3395, Spain). AFM measurements were carried out by using a Nano Scope III equipped with a 1553D scanner from Digital Instruments, USA.

2.2. Preparation of polysulfone acrylate membranes

In order to prepare the membrane casting solution 8.3 g polysulfone acrylate [16] are dissolved in 50 ml of *N,N*-dimethylformamide with magnetic stirring at 6.66 Hz (400 rpm). This solution is cast above the non-woven polyester support to obtain a film of controlled thickness. The result is immersed into a non-solvent coagulation bath (water) at ca. 4 °C, to precipitate the solid porous membrane layer [17].

2.3. Immobilization of the protein

Once obtained, the membranes are immersed in a solution of 150 U/ml of *endo*-1,4- β -xylanase from *T. reesei* in 200 ml of sodium hydrogen carbonate buffer solution 0.1 M pH 9, and are kept in this medium avoiding exposure to sunlight. In these

conditions, the enzyme is covalently linked to the membrane by the Michael type reaction of the arginine and lysine amino acids of the xylanase on the acrylate group of the derivatized polysulfone membrane. Experiments at several different immobilization times have been undertaken to study the increase or decrease of enzymatic activity with reaction time. The enzymatic activity of 1 cm² of membrane was assayed, and this parameter was monitored at 1, 3, 4.5, 6, 9, and 24 h of immobilization reaction in order to determine the minimum time necessary to get the highest enzymatic activity. Finally, membranes are washed with distilled water and kept in this medium at 4 °C until further use.

2.4. Membrane analysis

The amino acid content of the membrane polymer, prior to and after xylanase immobilization, as well as the analysis of the commercial enzyme solution was determined through HPLC using the AccQTag method from Waters®. In the case of the enzymatic membranes, these were firstly hydrolyzed with HCl 6N, for 2.5 h at 155 °C. Prior to chromatographic analysis the derivatization of primary and secondary amino groups with 6-aminoquinolil-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) is required. The corresponding derivatives present absorption at 248 nm. In each case three replicates were performed.

2.5. Enzymatic activity assays

Enzymatic activity assays were carried out using 0.1 ml of enzyme solution (of 80 U/ml) for free enzyme determination, and with 1 cm² of enzymatic membrane for the assays with the immobilized protein, following the Sigma Quality Control Test Procedure: Enzymatic Assay of Xylanase [18]. With this procedure the amount of reducing sugars released by the enzymatic reaction is determined through a colorimetric assay, based on the Somogy–Nelson method [19]. The influence of pH and temperature on the enzymatic activity of the free and immobilized enzyme were studied separately and compared. Relative activity data were calculated with respect to the maximum activity value in each case.

2.6. Physical characterization

SEM top surface and cross-section images from membranes were acquired at acceleration voltage of 15 kV. To obtain a cross-section image it was necessary to soak the membrane in ethanol and afterwards in liquid nitrogen to enable a regular break just with simple bending. The images were further treated by IFME® software [20], which determines physical parameters from color variation of the images.

AFM data are acquired from the control and register of the vertical oscillation of a tip that screens the sample surface. AFM images were obtained by tapping mode in air to investigate the membrane morphology employing silicone nitride cantilevers. The scanning speed was 2.98 Hz. The roughness parameter (R_a) was calculated for membranes with immobilized enzyme as well for blank membranes of polysulfone and com-

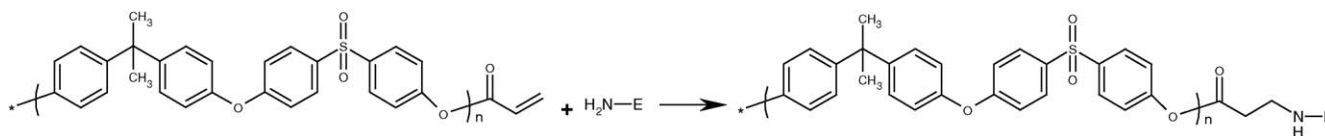


Fig. 1. Scheme of the immobilization reaction to attach the protein to the acrylate of polysulfone support.

pared. R_a values were calculated as indicated in the equation, $R_a = (1/n) \sum_{i=0}^n |Z_i - Z_m|$, where n is the number of points in the image, Z_i the height of each point considered, and Z_m is the average height value.

3. Results and discussion

3.1. Enzyme immobilization

The enzyme *endo*-1,4- β -xylanase is a protein that contains, among others, a considerable proportion of lysine and arginine amino acids through its sequence. The sequence, as well the amino acid distribution in the tertiary structure of xylanase is well known [10]. The presence of arginine and lysine residues away from the active site was considered interesting in order to plan an immobilization procedure involving these groups. Thus, the immobilization between the acrylate groups on the derivatized polysulfone with the amino groups of these amino acids by a Michael type addition reaction was considered. Fig. 1 shows the scheme of the reaction of immobilization of the protein. The amount of acrylate groups per polysulfone unit is 0.5. As polysulfone acrylate membranes have a dense surface, without pores that enable the diffusion of the enzyme inside the membrane structure, we expected that the coupling reaction was limited only to the acrylate groups on the surface.

Elemental microanalysis results of the enzymatic prepared membranes give an indication of a higher presence of nitrogen, with respect to the blank membrane (polysulfone acrylate membrane). The nitrogen content in the blank membrane is lower than the detection limits of the technique (<0.1%) while in the case of the enzyme immobilized membrane the nitrogen content is 0.38%. Taking into account the membrane preparation procedure, the solvent used to prepare the membrane casting

solution (DMF) could be responsible for the percentage of nitrogen found. Nevertheless, the low nitrogen values corresponding to the blank membrane are an indication that the nitrogen content from DMF is negligible. This nitrogen content (0.38%) should come only from the protein. Moreover, as the nitrogen content in the native enzyme is 6.24%, comparing the final nitrogen content in the membrane it is possible to estimate the amount of protein immobilized per gram of polysulfone acrylate membrane using the following formula:

$$\frac{\text{g protein}}{\text{g membrane}} = \frac{\text{g N membrane}}{\text{g membrane}} \times \frac{\text{g protein}}{\text{g N in protein}}$$

The amount of enzyme in the polysulfone acrylate membranes is 61 mg of enzyme per gram of membrane, that is 6.1% (w/w) of protein in the membrane.

HPLC analysis for the determination of amino acid content also confirmed the presence of the enzyme in the enzymatic polysulfone acrylate membranes when comparing the corresponding chromatogram with that obtained for the free commercial xylanase solution. The same amino acid profile is observed in both cases. Peaks corresponding to the same amino acids and in the same relative ratios are found, which demonstrates the incorporation of the enzyme (Figs. 2 and 3). On the other hand no significant differences are observed, when comparing the chromatograms for the free xylanase and the polysulfone acrylate membrane. As the attachment of the enzyme is carried out through these amino acids, we expected to observe a decrease in their chromatographic signals after enzyme immobilization, and the appearance of new signals, corresponding to the amino acids when they are attached to the membrane. The lack of new or different signals could be explained by the low number of enzyme molecules immobilized (as seen from the nitrogen content). Furthermore we do not rule out the possibility that some molecules

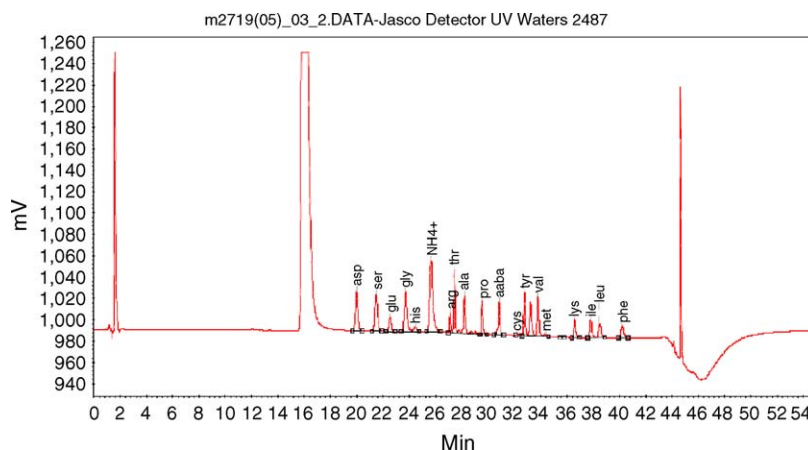


Fig. 2. Amino acid HPLC chromatogram of free commercial xylanase solution.

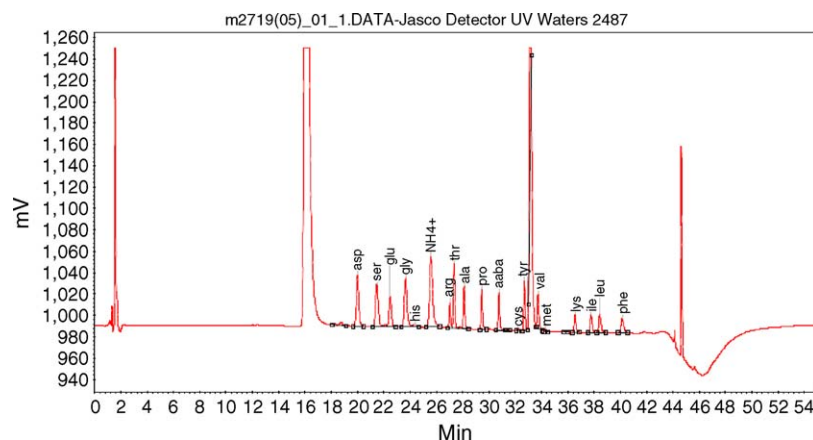


Fig. 3. Amino acid HPLC chromatogram of xylanase immobilized in polysulfone acrylate membranes.

of the enzyme have probably been attached to the polysulfone acrylate membranes through the terminal free amino group of the protein, so this could also be another reason to explain the absence of differences in the amino acid peaks. The possibility of physical adsorption of the protein could be also considered, although we rule it out, as the membranes were washed thoroughly in strict mechanical conditions after immobilization and prior to their use.

Also, a study of the enzymatic activity of the membranes has been undertaken, in order to determine the minimal reaction time required to immobilize the protein without loss of activity. Therefore, 1 cm² of acrylate membrane was withdrawn at different intervals of time and the enzymatic activity of such membranes was determined to evaluate the extension of the enzyme immobilization. As observed in Fig. 4, the enzymatic activity shows a slight decrease in the first hours of immobilization reaction. As the reaction takes place at room temperature this decrease could be due a deactivation of the enzyme at 25 °C. From 6 h reaction the activity remains more or less at a constant level, and it is maintained up to 72 h of immobilization. To obtain the highest enzymatic activity whilst minimizing immobilization time, 24 h of immobilization reaction under described conditions was selected as the best reaction time.

Moreover, the lifetime and stability of the enzymatic membranes has been studied. Membranes prepared as indicated were conserved in MilliQ water at 4 °C, and their enzymatic activity was measured after 3, 12, 14 and 38 days storage. The results collected in Table 1 show that there is only a slight decrease in the activity value over time, which means that the membranes are stable for at least longer than 1 month.

3.2. Membrane characterization

Membranes prepared were characterized in terms of the influence of the aqueous pH and temperature on the enzymatic activity and compared with the free commercial enzyme solution. The same optimum enzymatic activity is found for the immobilized enzyme membrane and the free xylanase (pH 6, 50 °C), as observed in Figs. 5 and 6. According to this observation, it can be concluded that the structure of the active site and the microenvironment in which the enzyme is operating are the same in the free and the bound forms [21]. Moreover, a lower variation in enzymatic activity is observed in the immobilized protein with pH and temperature changes, especially at a high temperature range.

The results show that in the pH range studied the relative activity is higher when the assay is carried out with the immobilized form than with the free enzyme solution. This means that the immobilized form is more protected than the free form [21]. Immobilized enzymes normally tend to show higher resistance to deactivation. The enzyme is confined in a region that is not as exposed to the bulk of the solution as in the case of the free enzyme. Because of this restriction, the microenvironment around the enzyme is not affected to the same extent as the

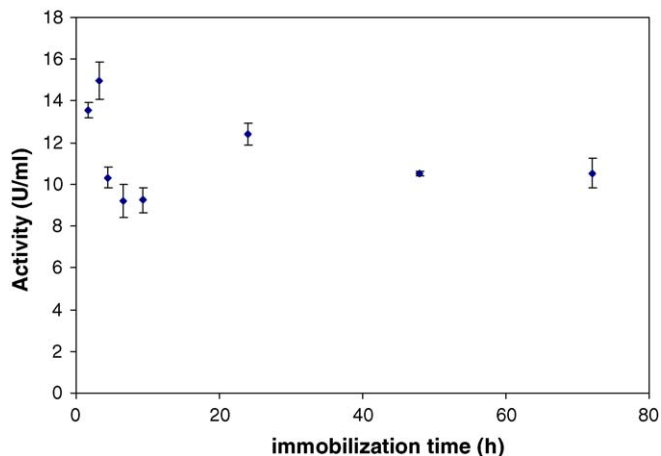


Fig. 4. Enzymatic activity of the acrylate polysulfone membranes with immobilized xylanase at different immobilization times.

Table 1
Enzymatic activity of acrylate of polysulfone membranes, after enzyme immobilization, related to the time of storage

Storage time (days)	Enzymatic activity (U/ml)
3	10.54 ± 0.05
12	10.27 ± 0.02
14	10.92 ± 0.06
38	8.667 ± 0.004

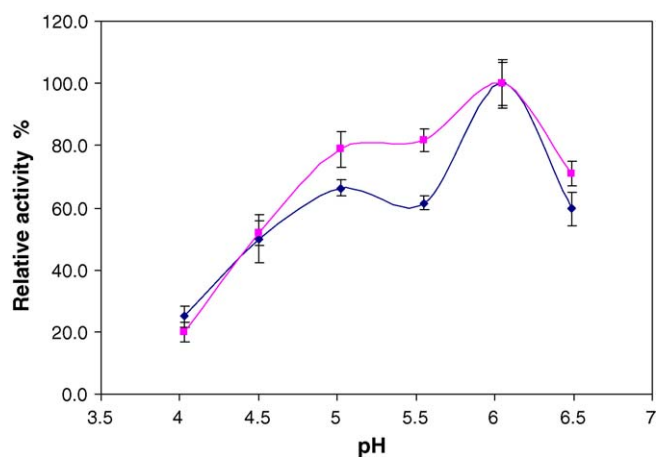


Fig. 5. Relative enzyme activity as a function of pH for free (◆) and immobilized (■) xylanase.

bulk solution by the changes in the parameters of the medium. In the case of the *T* range evaluated, as seen from Fig. 6, when working at 55 °C the relative activity of the immobilized form is also higher than the one of the free form (83.9% and 72.7% of the maximum value, respectively). This probably means a higher resistance to thermal inactivation of the protein since the structure of the catalytic site is strengthened by the immobilization procedure, which creates strong bonds between the macromolecule and the carrier [1]. Thus, an increase in enzyme resistance to deactivation is found [4] when immobilized. This is important to get efficient membranes for the corresponding application purposes.

From SEM cross-section images properly treated by IFME® software it is possible to obtain information of the asymmetry, irregularity and pore size parameters [20]. When comparing SEM images, prior to and after enzyme immobilization (*blank* and *enzymatic* membranes, respectively), only some slight differences in morphology were observed, which are related to the uncertainty related to the membrane preparation procedure [22,23]. As observed in Table 2, asymmetry values of the *enzymatic* membrane do not differ from those corresponding to the

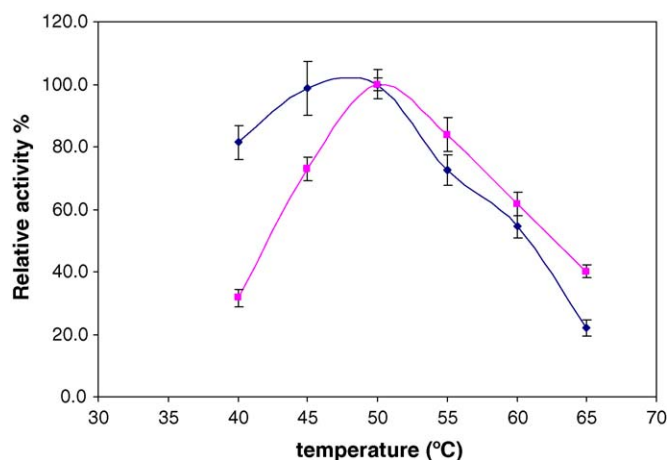


Fig. 6. Relative enzyme activity as a function of temperature for free (◆) and immobilized (■) xylanase.

Table 2

Physical parameters, obtained by IFME® analysis of SEM cross-section images, of the acrylate polysulfone membranes prior and after enzyme immobilization (*blank* and *enzymatic* membranes, respectively)

Membrane	Asymmetry (%)	Global irregularity	Porosity (pores/μm ²)	Pore size (μm)	S.D.
Blank	22	0.0076	0.398	1.1	0.3
Enzymatic	26	0.0052	0.191	1.7	0.5

Table 3

Roughness parameter values (*R_a*) from AFM data of *blank* and *enzymatic* membranes, respectively

Membrane	Roughness parameter (nm)
Blank	4.7 ± 0.3
Enzymatic	3.9 ± 0.8

blank membrane. In all cases, the small amount of enzyme introduced in the polysulfone acrylate membrane turns out to be too low to be able to produce noticeable changes in the morphology as observed from the corresponding mentioned physical parameters of the membranes.

As indicated previously, roughness parameter value of the polysulfone acrylate membranes, prior to and after enzyme incorporation, is obtained with AFM technique [22]. This value is also not affected by the presence of the protein, at least under these study conditions, as shown in Table 3. When higher amount of molecules are immobilized differences in roughness can be found [21], although this is not the present case, as indicated above.

4. Conclusions

Enzymatic polymeric membranes containing *endo*-1,4-β-xylanase have been obtained by covalently bonding the enzyme to an acrylate of polysulfone membrane prepared with a simple procedure. The presence of the enzyme is confirmed by elemental microanalysis as well as by HPLC amino acid analysis. These membranes present catalytic activity, as expected. Compared with the soluble form of the protein, enzymatic membranes are more resistant to deactivation caused by pH changes or high temperatures. Therefore, the covalent enzyme immobilization process leads to an insoluble and quite stable form of the enzyme that, whilst retaining catalytic properties, allows us to work in a wide range of aqueous pH and temperature solutions than for the free form. No significant changes in physical parameters have been observed in membranes after protein immobilization, as observed from SEM and AFM results, due to the small amount of immobilized enzyme, although it could be enough for further application in biomass treatment.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Science for the funding project of Reference No. PPQ2002-04201-C02-01. A. Cano acknowledges the “Depart-

ment d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, de la Generalitat de Catalunya" for the research scholarship (Reference 2003FI 00501). The authors also acknowledge Genencor International for the xylanase solution free supply. We also acknowledge the Chemical Analysis Service (SAQ) and the Electronic Microscopy Service from the Universitat Autònoma de Barcelona as well as the Industrial Membrane Research Institute (IMRI) of the Chemical Engineering Department of the University of Ottawa.

References

- [1] K. Ogawa, B. Wang, E. Kokufuta, Enzyme-regulated microgel collapse for controlled membrane permeability, *Langmuir* 17 (2001) 4704–4707.
- [2] H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, T. Sugo, H. Kawamoto, Optimization of reaction conditions in production of cycloisomaltooligosaccharides using enzyme immobilized in multilayers onto pore surface of porous hollow-fiber membranes, *J. Membr. Sci.* 205 (2002) 175–182.
- [3] T. Kawai, H. Kawatita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, T. Sugo, H. Kawamoto, Conversion of dextran to cycloisomaltooligosaccharides using an enzyme-immobilized porous hollow-fiber membrane, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1073–1076.
- [4] H. El-Sherif, S. di Martino, P. Travascio, A. de Maio, M. Portaccio, D. Durante, S. Rossi, P. Canciglia, D.G. Mita, Advantages of using non-isothermal bioreactors in agricultural waste water treatment by means of immobilized urease. Study of the influence of spacer length and immobilization method, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2802–2811.
- [5] K.M. Veremenko, G.F. Karpenko, Prospects for the use of immobilized enzymes in medicine, *Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal* 51 (4) (1979) 409–419.
- [6] M. Arroyo, Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications, *Ars Pharm.* 392 (1998) 23.
- [7] Z. Ai, Z. Jiang, L. Li, W. Dg, I. Kusakabe, H. Li, Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylooligosaccharide production, *Process Biochem.* 40 (2005) 2707–2714.
- [8] S. Akgöl, Y. Kaçar, S. Özkara, H. Yavuz, A. Denizli, M.Y. Arica, Immobilization of catalase onto L-histidine grafted functional pHEMA based membrane, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 15 (2001) 197.
- [9] A. Butterfield, D. Bhattacharyya, S. Daunert, L. Bachas, Catalytic bio-functional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review, *J. Membr. Sci.* 181 (2001) 29–73.
- [10] A. Törönen, J. Rouvinen, Structural comparison of two major *endo*-1,4- β -xylanases from *Trichoderma reesei*, *Biochemistry* 24 (1995) 847–856.
- [11] M. Okazaki, S. Fujikawa, N. Matsumoto, Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria, *Bifidobacteria Microflora* 9 (1990) 77–86.
- [12] P.V. Gawande, M.Y. Kamat, Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100, *J. Biotechnol.* 66 (1998) 165.
- [13] S. Dumitriu, E. Chornet, Immobilization of xylanase in chitosan–xanthan hydrogels, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 539–545.
- [14] P. Haapala, S. Linko, E. Parkkinen, P. Suominen, Production of *endo*-1,4-glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam, *Biotechnol. Tech.* 8 (6) (1994) 401–406.
- [15] M. Rao, C. Mishra, Properties and applications of *Penicillium funiculosum* cellulase immobilized on a soluble polymer, *Biotechnol. Lett.* 6 (5) (1984) 319–322.
- [16] B. Gutiérrez, A. Cano, C. Minguillón, Synthesis and characterization of polysulfone acrylate: a versatile tool in the derivatization of polysulfone, in preparation.
- [17] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000.
- [18] M. Somogyi, Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* 195 (1952) 19.
- [19] N. Nelson, A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.* 153 (1944) 375–380.
- [20] C. Torras, R. Garcia-Valls, Quantification of membrane morphology by interpretation of scanning electronic microscopy images, *J. Membr. Sci.* 233 (2004) 119.
- [21] M.S. Mohy Eldin, M. Portaccio, N. Diano, S. Rossi, U. Bencivenga, A. D'Uva, P. Canciglia, F.S. Gaeta, D.G. Mita, Influence of the microenvironment on the activity of enzymes immobilized on teflon membranes grafted by γ -radiation, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 7 (1999) 251–261.
- [22] T. Gumf, M. Valiente, K.C. Khulbe, C. Palet, T. Matsuura, Characterization of activated composite membranes by solute transport, contact angle measurement, AFM and ESR, *J. Membr. Sci.* 212 (2003) 123–134.
- [23] A. Cano, Disseny i caracterització de membranes enzimàtiques aplicades a la hidròlisi de biomassa vegetal, Master Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2004.

ANNEX D

Cano, A.; Moschou, E.A.; Daunert, S.; Coello, J.; Palet, C.
Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments (DOE).
Bioprocess and Biosystems Engineering (acceptat 19 juny 2006) in press.

Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments

Àngels Cano · Elizabeth A. Moschou ·
Sylvia Daunert · Jordi Coello · Cristina Palet

Received: 22 June 2006 / Accepted: 29 June 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The aim of this work was the development and optimization of enzymatic monolithic membranes with high catalytic activity for the degradation of xylan into xylooligosaccharides. The chemometric tool design of experiments has been utilized here for the first time for the optimization of the enzymatic activity of the monolithic membranes based on their constituents. The effect of three process variables, including the amount of various monomer contents and the porogenic solvents ratio, has been studied on the enzymatic activity of the resulted membranes. The experimental design chosen was a central face centred with six central points in order to obtain an orthogonal model, with the precision of the results being independent of the range of values considered for each parameter. The software Modde© 6.0 from Umetrics© was used to build and analyze the results of the experimental design using partial least squares regression. The optimization of the suggested model provided the best membrane composition to achieve maximum enzy-

matic activity, which can be related to the amount of enzyme immobilized on the monolithic membrane. The predictive capacity of the model was evaluated performing additional experiments.

Keywords Design of experiments · Enzymatic membrane · Monolithic polymers · Xylan degradation

Introduction

Macroporous polymer monoliths are attractive materials with unique physical and functional properties, which have been utilized so far in a variety of analytical applications [1, 2]. Looking at their internal structure, polymer monoliths are highly crosslinked and porous materials that consist of numerous interconnected cavities [3]. Additionally, this internal structure remains rigid even in the dry state, which is an advantage in contrast to other polymers that require solvent swelling in order to become porous. Furthermore, polymer monoliths may also contain a variety of chemical functionalities based on the appropriate selection of the monomer constituents. Moreover, polymer monoliths exhibit low mass transfer resistance, which results in ultimately better analytical performance as compared to other conventional media [4]. Due to these characteristics, polymer monoliths are ideal for the development of continuous stationary phases, and have been mainly used as separation media in HPLC applications [1], as well as supports for solid phase chemistry [5], gas chromatography [6] and molecular recognition [2].

The unique characteristics of the monolithic polymers are the immediate result of the polymerization

À. Cano · C. Palet (✉)
Centre Grup de Tècniques de Separació en Química,
Departament de Química, Universitat Autònoma de
Barcelona, Facultat de Ciències, Campus de Bellaterra,
Ed. Cn, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
e-mail: cristina.palet@uab.es

E. A. Moschou · S. Daunert
Department of Chemistry, University of Kentucky,
Lexington, KY 40506-0055, USA

J. Coello
Grup de Quimiometria Aplicada, Departament de Química,
Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències,
Campus de Bellaterra, Ed. Cn,
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

procedure of these materials. In this process, the formation of the polymeric backbone of the monolith is the result of a phase separation that takes place during the polymerization of the monomer mixture, which also contains the crosslinking agent in an inert solvent medium [7]. Both the crosslinker and the inert solvent medium, which is the mixture of the porogenic solvents used, are responsible for the final crosslinking degree and the porosity of the material [8]. Therefore, the chemical characteristics of the polymer monoliths, i.e., functionality, and their physical properties, i.e., porosity and mechanical stability, can be finely tuned by selecting the appropriate constituents and their content in the monolith precursor solution.

The immobilization of biomolecules, such as enzymes, in polymer monoliths is highly desirable, as it will allow for the development of efficient polymeric membranes with relatively high enzyme loading and improved enzyme stability. In some comparative studies it has been revealed that the activity of an enzyme, i.e., trypsin, which has been immobilized on monoliths, was higher than the activity of the same enzyme immobilized on packed beds [9]. Nowadays, there are several applications of polymer monoliths in bioseparation and biotransformation, based on different compositions and preparation procedures of these materials [10]. The interest for the attachment of enzymes on polymeric supports relies mostly on the reduction in the cost and the simplification of the global process, as well as in the ability for the continuous reuse of the enzyme for as long as its catalytic activity is maintained [11].

In this work, we present the development and the optimization of enzymatic monolithic membranes using chemometric tools for the enzymatic degradation of xylan into xylooligosaccharides. These xylooligosaccharides have special interest in food applications as sweeteners and components of prebiotic products [12]. The enzyme utilized for the development of the enzymatic membranes was the endo-1,4- β -xylanase (E.C. 3.2.1.8), which can hydrolyze the β -1,4-glycosidic linkages of the xylan backbone for the release of small oligosaccharides [13]. Xylanases have been utilized previously for the catalytic degradation of xylan [14, 15], but there is still a great interest in the development of cost-effective methods that will increase the catalytic production of xylooligosaccharides. In this work, we present the utilization of polymer monoliths as highly porous supports for the efficient and high loading immobilization of the enzyme endo-1,4- β -xylanase and the improvement of the enzymatic activity as well the yield of the catalytic degradation of xylan [16] with respect to other supports [15]. Design of experiments

(DOE), a technique that has been proven useful for the optimization of the performance of membranes based on the experimental operative conditions [17], was utilized for the first time for the development of enzymatic membranes and the increase of their catalytic activity by the optimization of the monolith membrane composition. The experimental design chosen was a central face centred with six central points in order to obtain an orthogonal model, which means that the precision of the results is independent of the range of values considered for each parameter. Three process variables have been evaluated, including the amount of monomer, the content of the crosslinking agent and ratio of the porogen solvents used, which collectively affect the chemical functionality and physical characteristics of the corresponding monolithic membranes. It is shown that the chemometric tool DOE was proven useful for the development and the optimization of monolithic membranes exhibiting an increased catalytic activity of 29.13 U/ml utilizing the enzyme endo-1,4- β -xylanase for the catalytic degradation of xylan into xylooligosaccharides.

Methodology and design of experiments

Response surface methods are used to study the relation of the response variables to the experimental conditions, analyzing the effect of variations in the settings of the experimental variables in the response. The obtained models also permit the location of the optimum conditions [18]. The variable settings corresponding to the optimum conditions will give the best result, while all other settings will lead to a lower value in the response. From the model it is possible to analyze the role played by all the experimental variables.

The software Modde© 6.0 from Umetrics© (Norway) was used to build and analyze the results of the experimental design. After finding the proper model, the software uses the simplex method to approximate the optimum location. The process involves three major steps: the estimation of the coefficients in the mathematical model, the response prediction, and the reassurance of the predictive capacity of the model that was run performing additional experiments.

In this study we chose a central face centred design, considering six central points to get an orthogonal model, so that the precision of the results will be independent of the range of values considered for each parameter. The process variables selected were the porogenic solvents ratio, the amount of the crosslinking agent ethylene dimethacrylate (EDMA), and the amount of the monomer 2-aminoethylaminomethane

(AEM), which will react with the enzyme. These parameters are designated as X_1 , X_2 and X_3 , respectively. The response to be optimized was the enzymatic activity of the membranes in order to improve the amount and efficiency of the enzyme immobilization, and therefore the catalytic degradation of xylan into xylooligosaccharides. The solvent ratio was increased from the lowest ratio that was possible to obtain membranes with a certain mechanical stability, with a cyclohexanol/dodecanol molar ratio of 2.54, up to a value of 35.29. The range of the EDMA content in the monolith precursor solution was set accordingly to a quantity that does not exceed the total amount of the other monomers, from 305 to 714 μl , equivalent to 315 and 750 mg. The maximum amount of AEM utilized depended on the solubility of the monomer in the polymer precursor solution, and was set to range from 70 to 100 mg, which was the maximum amount of AEM that was still soluble in the specific aliquots of the porogenic solvents used. The different variables studied, including their low, medium and high levels, are listed in Table 1.

In the present case, as we are considering three independent variables, the response can be expressed as a lineal combination of these variables, including the quadratic and cross product terms. Therefore, the response can be expressed with the following second degree polynomial equation 1:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{23}X_2X_3 + A_{13}X_1X_3 + A_{11}X_1X_1 + A_{22}X_2X_2 + A_{33}X_3X_3 \quad (1)$$

where A_0 corresponds to the independent term, A_1 , A_2 and A_3 are the coefficients of the linear contributions, A_{11} , A_{22} and A_{33} the coefficients of the quadratic terms, and A_{12} , A_{23} and A_{13} are the coefficients of the cross products. A total of 20 experiments were run to estimate the coefficients of the model. The response monitored (Y) was the enzymatic activity, expressed in terms of enzymatic units (U/ml of membrane). The DOE selected is shown in Table 2.

Table 1 List of the different variables considered in the model, including their low (-1), medium (0) and high (+1), medium and high levels

Porogenic solvents molar ratio	Amount of crosslinker EDMA (μl)	Amount of AEM (mg)
2.54 (-1)	300 (-1)	70 (-1)
18.915 (0)	507 (0)	85 (0)
35.29 (+1)	714 (+1)	100 (+1)

Table 2 Proposed design of experiments (DOE), in relation to the variables considered in the model, including their low (-1), medium (0) and high (+1) levels

Experiment	Porogenic solvents ratio	Amount of crosslinker EDMA	Amount of AEM
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1	0	0
10	+1	0	0
11	0	-1	0
12	0	+1	0
13	0	0	-1
14	0	0	+1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Materials and methods

Materials

The monomers AEM, hydroxymethyl methacrylate (HEMA) and EDMA as well the free radical initiator 2-hydroxy-2-methylpropiophenone (HMPP) were purchased from Aldrich (Germany). Cyclohexanol (Panreac, Spain) and dodecanol (Aldrich, Germany) were the porogenic solvents used. The membranes were prepared on a non-woven polyester support (Hollytex 3329, GA, USA). *N*-(3-Dimethylaminopropyl) *N'*-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC) (Fluka, Germany) and *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) (Aldrich, Germany) were employed for the covalent carbodiimide linkage of the enzyme to the membranes [19]. All the chemicals were of analytical grade. The enzymatic solution of endo-1,4- β -Xylanase from *Trichoderma reesei* (93 mg/ml; activity 7250 U/ml) was kindly supplied by Genencor International (The Netherlands). A 0.1% w:w solution of Birchwood xylan (Sigma, Germany) in acetic acid/sodium acetate 0.05 M at pH 5 was used as substrate for the enzymatic reaction.

Preparation of the membranes

The monolithic polymer precursor solutions were prepared mixing the monomer AEM, which was utilized for the covalent linking of the enzyme, with

HEMA that plays the role of the methacrylate monolith backbone, and EDMA, which serves as the cross-linking agent determining the pore volume of the monolith. Porogenic solvents, such as cyclohexanol and dodecanol, were used for the dissolution of the monomers, as well as the formation of the pores of the polymer monolith. The polymerization of the monomers was based on the fast free radical initiation through UV irradiation. HMPP was incorporated in the membrane precursor solution as a UV free radical initiator [10].

The membrane precursor solution was properly cast above a non-woven polyester support to obtain a film of controlled thickness. Then, this film was irradiated with a UV lamp at 254 nm for 15 min to initiate the polymerization. Once the membranes were obtained, they were soaked in ethanol to remove the excess of porogenic solvents, and consequently they were thoroughly washed with distilled water for the removal of the ethanol, in order to avoid any deactivation of the enzyme at the following step.

A total number of 20 membranes were prepared, from which 15 had a different composition, and the rest were replicates of the central experiment of the DOE. The amount of each component of the membrane precursor solutions is summarized in Table 3.

In order to attach the enzyme to the membranes, *N*-(3-Dimethylaminopropyl) EDC and NHS were used. EDC covalently binds the carboxylic groups of the enzyme with the primary amines of the monolith, which were provided by AEM. The reaction was carried out at room temperature for 2 h in phosphate buffer at pH 7.4 in 0.15 M NaCl, containing 2 mM EDC and 5 mM NHS. A commercial xylanase solution was added to get a final concentration of protein in the medium of 0.5 mg/ml. Afterwards, the membranes were washed with distilled water and stored in this medium at 4°C, at least overnight, until their activity was tested.

Enzymatic activity assays of membranes

The enzymatic activity assays were carried out according to the Sigma quality control test procedure, enzymatic activity assay for endoxylanase (E.C. 3.2.1.8), based on the Nelson method [20]. A piece of 1 cm² of an enzymatic membrane was incubated in the presence of Birchwood xylan (0.1% w:w) dissolved in acetic acid/sodium acetate 0.05 M pH 5 medium at a fixed temperature of 50°C. The amount of reducing sugars released by the enzymatic reaction was determined through a colorimetric assay. The concentration

Table 3 Proposed DOE in relation to the composition of the membrane precursor solutions

Membrane	EDMA (mg)	AEM (mg)	HEMA (mg)	Molar ratio of solvents	Cyclohexanol (mg)	Dodecanol (mg)	Monomer (%)	Solvents (%)
N1	315	70	1115	2.54	4416	3280	15.94	83.69
N2	315	70	1115	35.29	7776	410	15.15	84.51
N3	750	70	680	2.54	4416	3280	15.94	83.69
N4	750	70	680	35.29	7776	410	15.15	84.51
N5	315	100	1085	2.54	4416	3280	15.94	83.69
N6	315	100	1085	35.29	7776	410	15.15	84.51
N7	750	100	650	2.54	4416	3280	15.94	83.69
N8	750	100	650	35.29	7776	410	15.15	84.51
N9	532	85	883	2.54	4416	3280	15.94	83.69
N10	532	85	883	35.29	7776	410	15.15	84.51
N11	315	85	1100	18.92	7504	739	15.06	84.60
N12	750	85	665	18.92	7504	739	15.06	84.60
N13	532	70	898	18.92	7504	739	15.06	84.60
N14	532	100	868	18.92	7504	739	15.06	84.60
N15	532	85	883	18.92	7504	739	15.06	84.60
N16	532	85	883	18.92	7504	739	15.06	84.60
N17	532	85	883	18.92	7504	739	15.06	84.60
N18	532	85	883	18.92	7504	739	15.06	84.60
N19	532	85	883	18.92	7504	739	15.06	84.60
N20	532	85	883	18.92	7504	739	15.06	84.60

The three variables assayed are indicated in bold font. The HEMA composition is adjusted to ensure that the total amount of monomers is set to 1,500 mg. EDMA amount is expressed as mg to consider the final monomer wt% content in the membrane composition, which is maintained constant (15%) and it is equivalent to the following volumes considered in the DOE model: 305 µl (315 mg), 507 µl (532 mg) and 714 µl (750 mg) The amount of cyclohexanol and dodecanol was adjusted to the selected molar ratio of solvents, defined as cyclohexanol (mol)/dodecanol (mol). All membrane precursor solutions contained a fixed amount of 215 mg of the UV initiator HMPP

of the reducing sugars was related to the enzymatic activity units of the respective membranes. The enzymatic activities were expressed as U/ml of membrane, where U is one enzymatic activity unit that is related to the amount of enzyme required for the conversion of 1 μmol of substrate or to obtain 1 μmol of product per minute [21].

Results and discussion

Analysis of the model

The composition of the monolithic membrane was varied by changing three parameters, the content of the monomer, the crosslinking agent and the ratio of the porogenic solvents in the monolith precursor solution. The response surface methodology is an empirical modelization technique that evaluates the relationship between controlled experimental factors and results. Various experiments were conducted by altering the values of the three parameters to their low, medium and high levels, as shown in Table 2. Additionally, two more points were added that were the replicates of the corresponding extreme values of the experimental design, one membrane with the three factors at low level and another membrane with the three factors at high level, in order to check the precision at the extreme of the design. These experiments were named N21 and N22 and were equivalent to N1 and N8 (see Table 2). The model was obtained by fitting the data with partial least squares regression [22] (PLS). The data points N12 and N14 were found to be outliers, so they were removed from the data matrix. Two PLS factors were enough to model the data. Figure 1 shows the scores plot for the experimental matrix.

The values $R^2_{\text{adj}} = 0.882$ and $Q^2 = 0.842$ are a summary of the good fit of the model; R^2_{adj} is the fraction of variation of the response explained by the model, adjusted for degrees of freedom, and Q^2 is the fraction of variation of the response that can be predicted by the model (see Table 4).

Equation 2 expresses the enzymatic activity of the membranes as a function of their composition in terms of the molar ratio of the porogenic solvents, and the AEM and EDMA content. The terms not included were found to be insignificant for a confidence level of 95%.

$$Y = 7.316 + 1.934 X_1 + 0.502 X_2 + 0.658 X_3 + 0.801 X_1 X_2 + 0.657 X_2 X_3 \quad (2)$$

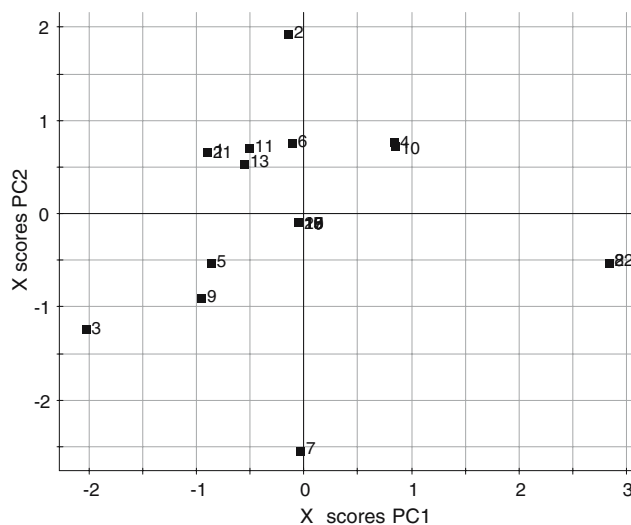


Fig. 1 PC2 versus PC1 scores plot of the X matrix. PC1 is related with the enzymatic activity

Effect of AEM content on the enzymatic activity of the membrane

The response surface plots shown in Fig. 2a–c represent the enzymatic activity of the monolith membranes in respect with the porogenic solvent ratio and the EDMA content at three different levels of AEM. Regarding to the amount of AEM, it was seen that the best results were achieved when working with the higher amount of monomer, 100 mg AEM, which was the highest amount of AEM that was still soluble in the specific aliquots of the porogenic solvents used. This result can be explained considering the fact that AEM provides the amino groups which will react with the EDC activated enzyme. As the amount of AEM increases there is a higher amount of amino groups available on the membrane to bind to the activated

Table 4 Regression analysis from the measured enzymatic activity of the monolith membranes

Activity	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
Total	20	1301.93	65.10		
Constant	1	1142.92	1142.92		
Total Corrected	19	159.011	8.369		
Regression	6	145.899	24.317	24	0.000
Residual	13	13.112	1.009		
Lack of fit (model error)	6	9.244	1.541	2.788	0.103
Pure error (replicate error)	7	3.868	0.553		

Quadratic response surface model fitting. *n* 20, PLS comp 2. Q^2_0 0.807, R_2 0.918, R^2_{2adj} 0.879. RSD 1.004

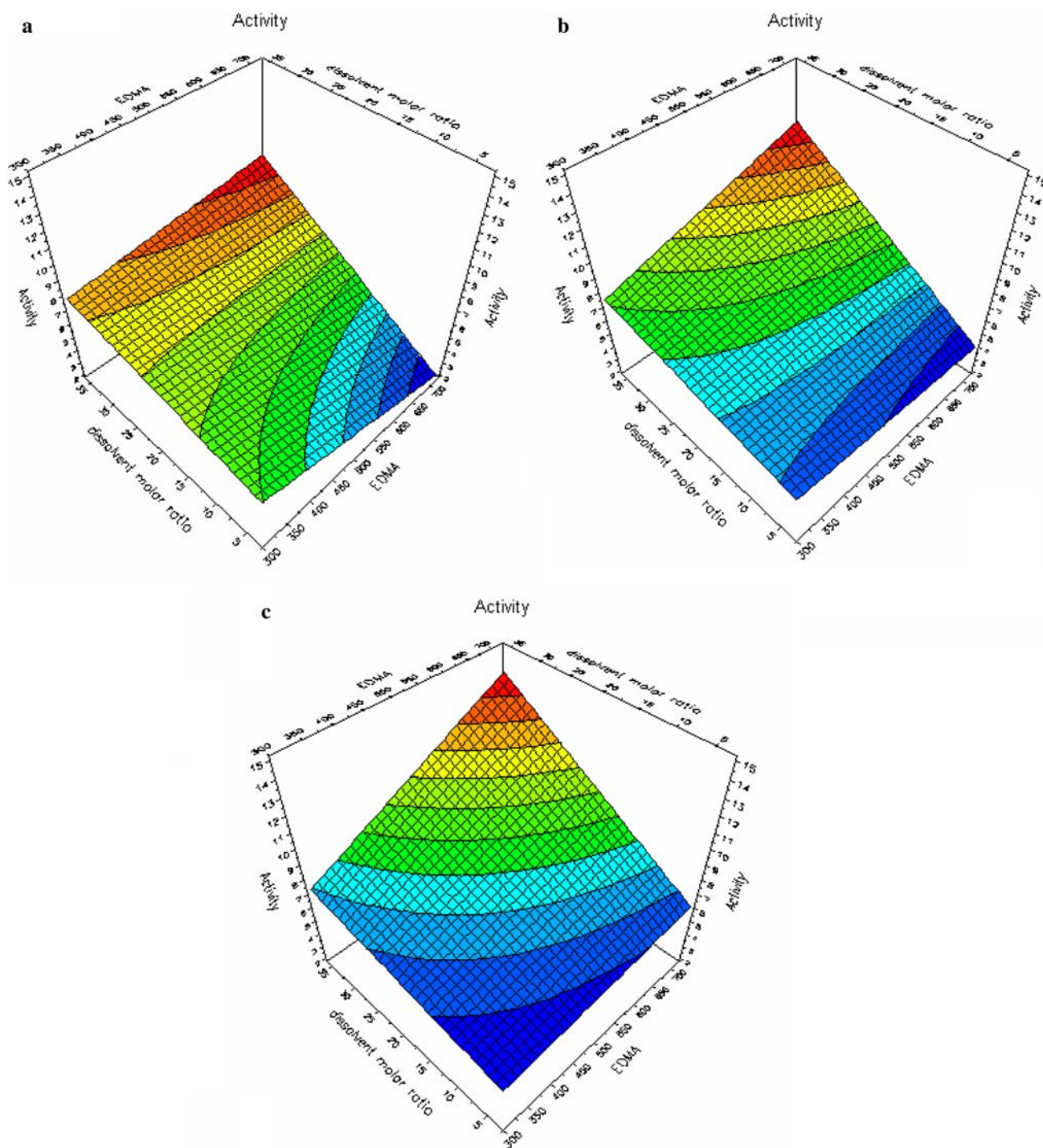


Fig. 2 Contour plot of the enzymatic activity response with respect to the porogenic solvents ratio and the amount of EDMA (μ) at three levels of AEM content. **a** AEM 70 mg, **b** AEM 85 mg, and **c** AEM 100 mg

xylanase, and therefore the amount of the enzyme that will be covalently immobilized on the membrane will also be increased. Another observation that can be deduced from these plots is that when using a lower amount of AEM than the optimum one, the contour lines of the isoresponse come closer to each other, and

therefore any change in the system composition will result in higher changes in the enzymatic activity. This behaviour reveals that membranes containing lower amounts of AEM are less robust, due to experimental errors in changes in the composition of these membranes during their preparation.

Effect of EDMA content on the enzymatic activity of the membrane

The variation in the content of the crosslinking agent in the membrane precursor solution is known to affect both the composition as well as the porous properties of the polymeric monoliths prepared. It is demonstrated that the higher amount of EDMA results in the development of membranes with increased enzyme activity. This increase can be explained by the fact that a more crosslinked membrane structure provides a higher surface area related to a decreased average pore size, as a result of an earlier formation of crosslinked globules with reduced tendency to coalesce [23]. Therefore, the monolith is characterized by a higher reactive surface that is available to react with the functional groups of the enzyme during the reaction of the xylanase immobilization.

Effect of porogenic solvents ratio on the enzymatic activity of the membrane

The porogenic solvents are utilized in the preparation of the polymer monoliths in order to control the porous properties of these materials without affecting their chemical composition, as these solvents are removed after the completion of the polymerization. The solvents cyclohexanol and dodecanol were utilized in this work as porogens for the development of the enzymatic monolithic membranes. It was observed that the increase of the ratio of cyclohexanol to dodecanol resulted in the increase of the enzymatic activity of the corresponding membranes, and this can be a consequence of the higher amount of enzyme immobilized on the membrane. In more detail, it is known that when the ratio of dodecanol to cyclohexanol increases the structure of the corresponding monoliths is characterized by larger pores. This is the result of dodecanol that is a poorer solvent and prevents further polymerization of the monomers on the globules that are formed on the early stages of polymerization, resulting in the formation of large voids between these globules [7, 23]. On the contrary, if the amount of cyclohexanol is higher, the resulting monolithic polymers are characterized by smaller pores, because the monomers keep polymerizing on the already formed globules, decreasing the voids and the dimensions of the pores within the monolith. In this case, the increase of the cyclohexanol to dodecanol porogen ratio, which leads to the formation of smaller pores within the monolith structure, seems to improve the enzymatic activity of the membrane due to the higher monolith surface available for an increased enzyme loading on the monolithic membrane.

Predictive capacity of the model

At this point, the predictive capacity of the model was determined. According to the Optimizer function of the model, and fixing the amount of EDMA and AEM at a constant level corresponding to the best results observed from the contour plots, the porogenic solvents ratio was optimized. The amount of EDMA utilized for the preparation of the monolith precursor solution was set at 714 μl (which corresponds to an amount of 750 mg), while the content of AEM selected to be used was 100 mg. The enzymatic activity of the model was adjusted between 14.7 and a target value of 25.0 U/ml of membrane, as the 14.7 value is the highest result obtained experimentally so far. The limits for the solvents ratio were between the best value obtained and up to an excess value of 100. The program suggested an optimum value for the porogenic solvents ratio of 100 for the experiment named N23, which had the following composition: 714 μl (750 mg) EDMA, 100 mg AEM and solvent molar ratio of 100, therefore, the three factors were set at the high levels.

The membrane based on the aforementioned precursor solution was prepared and its enzymatic activity was determined by carrying out three replicates. The obtained value of the enzymatic activity of this membrane was 29.13 ± 0.80 U/ml, which is very close to the predicted value (29.10). Even another membrane, named as N24, was prepared setting the porogenic solvent ratio higher (at 748), maintaining the same amount of EDMA and AEM. The enzymatic activity for that membrane was found to be 28.62 U/ml, which is very close but still lower than that of membrane N23. This demonstrates that although the cyclohexanol increases further, this will not lead to an increase of the enzymatic activity of the membrane. Probably, when working with a very low content of dodecanol, although there is an increase of the active surface, the presence of smaller pores limits the diffusion of the substrate within the membrane reducing the yield of the enzymatic reaction. This could explain the slight decrease in the enzymatic activity observed for membrane N24 with respect to the optimum membrane (N23). Therefore the predictive capacity of the model has been examined.

Conclusions

Monolithic polymers have been utilized as polymeric supports for the development and the optimization of enzymatic membranes with high catalytic activity for the degradation of xylan into xylooligosaccharides. The

enzymatic activity results for the obtained monolithic membranes with respect to Birchwood Xylan are higher than the ones obtained with other membranes at the same experimental conditions of assay [15]. The chemometric tool DOE has been utilized here for the first time for the evaluation of the effect of three process variables regarding the membrane composition on the enzymatic activity of the monolithic membranes. The experimental design chosen was a central face centred with 6 central points in order to obtain an orthogonal model, where the precision of the results is independent of the range of values considered for each parameter. The composition of the precursor monolithic membrane solution has been optimized with respect to three process variables, the amount of the functional monomer (AEM), the crosslinker (EDMA), and the porogenic solvents ratio (cyclohexanol/dodecanol). The best results were obtained for the enzymatic membrane that was based on a monolith precursor solution that contained the high level of 100 mg of the monomer AEM, which contained the amino functionality that was responsible for the covalent binding of the enzyme. It was also found that a higher amount of crosslinker resulted in the formation of membranes with higher enzymatic activity, which was attributed to the increase of the surface of the polymer and therefore the increase of the amount of enzyme immobilized on the membrane. Finally, as the content of dodecanol increased the pore volume of the structure also decreased, due to an earlier phase separation at the formation of the membrane globules. A very high content of dodecanol resulted to a decrease in the yield of the enzymatic reaction, because of the loss of the active surface for the immobilization of the enzyme. Additionally, it was found that a too high content of cyclohexanol does not improve the enzymatic activity of the membranes, as the porous structure of the monolith becomes now too narrow, decreasing the diffusion of the substrate in the membrane, and therefore limiting the enzymatic hydrolysis of xylan. In conclusion, DOE has been successfully used for the optimization of the composition of enzymatic monolithic membranes for the degradation of xylan into xylooligosaccharides, and the mathematics model enabled the prediction of the activity of new monolith membranes related to their composition.

Acknowledgments The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Science for the funding projects of reference nos. PPQ2002-04201-C02-01, CTQ2005-09430-C05-01 and CTQ2004-02013. A. Cano acknowledges the “Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació, de la Generalitat de Catalunya” for the research and the travel scholarship (references 2003FI 00501 and 2004BV2 00039) that have made possible this work. The authors also acknowledge Genencor International for the xylanase solution free supply. Cristina López Gómez is acknowledged for her contribution in the experimental assays.

References

- Petro M, Svec F, Gitsov I, Fréchet MJM (1996a) *Anal Chem* 68:315
- Nilsson K, Lindell J, Norrlof O, Sellergren B (1994) *J Chromatogr A* 680:57
- Svec F (2004) *J Sep Sci* 27:747–766
- Jungbauer A, Hahn R (2004) *J Sep Sci* 27:767–778
- Xie S, Svec F, Fréchet MJM (1998) *Chem Mater*, vol 10:4072
- Sykora D, Peters EC, Svec F, Fréchet MJM (2000) *Macromol Mater Eng* 275:42
- Viklund C, Svec F, Fréchet MJM (1996) *Chem Mater* 8:744–750
- Hodge P, Sherrington DC (1989) *Syntheses and separations using functional polymers*, Wiley, New York
- Petro M, Svec F, Fréchet MJM (1996b) *Biotechnol Bioeng* 49:355
- Xie S, Allington RW, Svec F, Fréchet MJM (2002) *Adv Biochem Eng Biotechnol* 76:87–125
- Arroyo M (1998) *Ars Pharm* 39(2):23
- Okazaki M, Fujikawa S, Matsumoto N (1990) *Bifidobact Microflora* 9:77–86
- Tönnönen A, Rouvinen J (1995) *Biochem* 34(3):847–856
- Gawande PV, Kamat MY (1998) *J Biotechnol* 66:165
- Cano A, Minguillón C, Palet C (2006) *J Membr Sci* 280:383–388
- Moschou EA, Nicholson AD, Jia G, Zoval JV, Madou MJ, Bachas LG, Daunert S, *Anal Bioanal Chem*, In press
- Sivakumar M, Annadurai G, Mohan D (1999) *Bioprocess Eng* 21:65–68
- Carlson R (1992) *Design and optimization in Organic synthesis*, vol 8. Data handling in science and technology. Elsevier, Amsterdam
- Grabarek Z, Gergely J (1990) *Anal Biochem* 185(1):131–135
- Nelson N (1944) *J Biol Chem* 153:375–380
- Definition of enzymatic activity international units http://www.efunda.com/units/convert_units.cfm?From=171
- Wold H (1982). Soft modeling, The basic design and some extensions, In vol II of Jöreskog K-G, Wold H (eds). *Systems under indirect observation*, vols I and II, North-Holland, Amsterdam
- Santora BP, Gagne MR, Moloy KG, Radu NS (2001) *Macromol* 34:658

ANNEX E

Cano, A.; Palet, C.

Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS.

Submitted to *Journal of Membrane Science*.

Elsevier Editorial System(tm) for Membrane Science

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characterization of products with MALDI-TOF-MS

Article Type: Full Length Article

Keywords: enzymatic membranes, biomass waste, hydrolysis, oligosaccharide recovery

Corresponding Author: Dr. Cristina Palet, PhD

Corresponding Author's Institution: Universitat Autònoma de Barcelona

First Author: Àngels Cano, MSc

Order of Authors: Àngels Cano, MSc; Cristina Palet, PhD

Abstract: The target of agricultural biomass waste recovery from hydrolysis treatment is presented by comparing the performance of two different types of enzymatic polymeric membranes that were previously developed and characterized based on a polysulfone derivative or monolithic polymers. Our aim was to achieve in one single step both enzymatic catalyzed hydrolysis of the xylan polysaccharide and the separation of the released products for the recovery of the short chain xylooligosaccharides. We present the behaviour of two different membrane modules operating in different procedure settings. The possible reuse of the membranes has also been evaluated. Xylooligosaccharides products have been characterized using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). The application of such enzymatic membranes enables the recovery of short chain xylooligosaccharides from biomass waste treatment, which has many potential applications in the food and pharmaceutical industries as well in the production of renewable energy.

**Xylooligosaccharide recovery from agricultural biomass waste treatment with
enzymatic polymeric membranes and characterization of products with
MALDI-TOF-MS**

Àngels Cano^a, Cristina Palet^{a*}

^a Centre Grup de Tècniques de Separació en Química, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Catalunya, Spain

* Corresponding author. Tel. +34935813475; fax +34935812379. Email address: cristina.palet@uab.es

Abstract

The target of agricultural biomass waste recovery from hydrolysis treatment is presented by comparing the performance of two different types of enzymatic polymeric membranes that were previously developed and characterized based on a polysulfone derivative or monolithic polymers. Our aim was to achieve in one single step both enzymatic catalyzed hydrolysis of the xylan polysaccharide and the separation of the released products for the recovery of the short chain xylooligosaccharides. We present the behaviour of two different membrane modules operating in different procedure settings. The possible reuse of the membranes has also been evaluated. Xylooligosaccharides products have been characterized using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). The application of such enzymatic membranes enables the recovery of short chain xylooligosaccharides from biomass waste treatment, which has many potential applications in the food and pharmaceutical industries as well in the production of renewable energy.

Key words: enzymatic membranes, biomass waste, hydrolysis, oligosaccharide recovery.

Introduction

The biomass concept comprises organic non-fossil material, such as flora, fauna or organic vegetal waste, which can produce biomass energy. Different biomass resources can be classified in terms of their origins as residual biomass coming from stockbreeding, solid urban waste, sludge from water treatment plants, forests and agriculture. Nevertheless, the main biomass comes from the latter two, which comprises the residues proceeding directly from agricultural practices and forest maintenance, and the sub-products of wood processing, which represent around 40 million tons of solid waste per year. [1] The theoretical forecast for agricultural and forest biomass consumption in Catalonia for the next few years is rising, and from 2003 to 2015 an increase of around 45.5% is expected with respect to consumption in 2003, accordingly to data reported by the Catalan Institute of Energy (ICAEN) in the Catalan Energy Strategic Plan for 2006-2015.[2]

Xylooligosaccharide recovery from agricultural waste side products, mostly based on xylan, such as almond shells and corn, which are very common in the Mediterranean area, is an interesting target, because besides reducing the amount of waste it also makes possible to recover high added-value compounds with a wide range of applications. Xylooligosaccharides have been used in the food industry either as *Bifidobacteria* stimulating growth [3] or as sweeteners and dietary fibers [4], in the pharmaceutical industry [5] for treating viral [6, 7] and cancer processes [8] and in new emerging and promising areas of application, such as the production of such renewable energy sources as biofuels. [9] Biofuels, such as bioethanol and biodiesel, are of particular interest as

they represent a means for improving the environment, helping the economy, and reducing dependence on foreign oil. Nowadays, some Biomass Research Programs are developing technologies that use lignocellulosic biomass as feedstocks for bioethanol production, which can also be used as fuel for cars in its pure form and as a gasoline additive to improve vehicle emissions. Bioethanol is an alcohol made by fermenting short chain oligosaccharides of biomass.

Therefore, the first step required for both the bioethanol production and the food and pharmaceutical industry applications is the biomass hydrolysis of the complex polysaccharides into smaller units (oligosaccharides). These reactions are mostly catalysed by acids (commonly H_2SO_4) [10] as well as by enzymes. Endo-1,4- β -xylanase is the enzyme responsible for O-glycosydic bond hydrolysis in the xylan polymeric backbone, which is one of the main polymers of vegetal biomass lignocellulosic material. [11]

The range of enzymatic membrane applications and studies carried out worldwide covers areas from industrial production [12] to waste treatment [13] among other areas in continuous development. The implementation of enzymes to membranes is a promising objective as it permits process simplification. [14] Enzyme immobilization in membranes makes it possible for them to be reused, as long as they maintain their catalytic activity when immobilized, leading to a reduction in the cost of the process due to enzyme recycling. Also, there is no need for further separation steps to recover the main products released in the enzymatic reaction. These membrane processes offer a promising application for xylooligosaccharides recovery, as they avoid further separation techniques which could require the use of organic solvents or other reagents, which would lead to their presence in the final products and therefore make them unacceptable for the aforementioned food and pharmaceutical applications.

Polysulfone acrylate is a suitable material for membrane preparation and its capacity to immobilize the enzyme endo-1,4- β -xylanase has been studied. [15] Monolithic polymers are used in many analytical applications as they exhibit low mass transfer resistance, which results in ultimately better analytical performance in comparison to other conventional media. [16] Moreover, they present interesting properties as biomolecule immobilization supports, as reported in some comparative studies. In those cases, enzymes immobilized on monoliths showed higher activity in comparison with the same enzyme immobilized on packed beds. [17] Membranes based on these polymers have also been previously developed and characterized for the purpose of endo-1,4- β -xylanase immobilization. [18]

The two substrates treated differ in their nature and properties (i.e: viscosity), besides in their origin as birchwood xylan consists on wood material while the URV substrate proceeds from an agricultural source. In the first case, the birchwood xylan is a commercial product so it is possible to know its initial concentration. Moreover, commercial xylans usually present a lower ramification degree which leads to its easier degradability and hydrolysis. [11] On the contrary, as URV sample are the result from direct treatment of agricultural biomass waste, this substrate solution is more complex (with a expected higher ramification degree and its exact composition is unknown). Nevertheless, the use of both types of substrates is interesting. The commercial xylan will permit the chemical characterization of the enzymatic hydrolysis system under study, by using proper enzymatic membrane reactors. On the other side, the biomass waste samples are necessary to study the possibilities to use these reactors for real applications.

In the present work, membranes based either on polysulfone acrylate or monolithic polymers, which are already accepted as biocatalyst immobilization supports, are

considered a promising tool for achieving enzymatic reaction and the separation of the obtained products in one step. By comparing different membranes, previously designed, [15, 18] with different membrane reactors or modules, we aim to state a membrane process for the xyloligosaccharides recovering from xylan polymers treatment. Furthermore, such systems should be able to be applied as well in the treatment of biomass waste samples.

Experimental

1. Membranes and substrate solutions

Two different membranes, called ACPS and N25 respectively, were studied. ACPS membranes are based on polysulfone acrylate. A solution of 15% polysulfone acrylate in N,N'-Dimethylformamide (Aldrich, Germany) was set on a non-woven polyester support (Hollytex 3329, GA, USA) to obtain a thin layer of controlled thickness. Membranes were obtained by phase inversion induced by immersion in a water coagulation bath as described previously. [15]

N25 membranes are made of monolithic polymers and their composition is based on the monomers 2-aminoethylaminomethane (AEM), hydroxymethyl methacrylate (HEMA) and ethylenedimethacrylate (EDMA), and 2-hydroxy-2-methylpropiophenone (HMPP) was required as a free radical source. All of these were from analytical grade and purchased from Aldrich (Germany). Cyclohexanol (Panreac, Spain) and dodecanol (Aldrich, Germany) were used as the porogenic solvents. The membrane precursor solution consists of 714 μ l EDMA, 85 mg AEM, 610 μ l HEMA, 215 μ l HMPP and the porogenic solvents in a molar ratio of 49.1 up to a total volume of 8600 μ l. This precursor membrane solution was also cast on the non-woven polyester support (Hollytex 3329, GA, USA) and polymerization was initiated by UV irradiation at 254

nm for 15 minutes. The excess of porogenic solvents was removed by soaking the membranes obtained in ethanol and afterwards washing them with distilled water to remove the ethanol, which could affect the enzymatic activity.

The enzymatic solution of endo-1,4- β -xylanase from *Trichoderma reesei* was kindly supplied by Genencor International (The Netherlands). Enzyme covalent immobilization in ACPS membranes was performed by soaking the membranes in a bicarbonate/carbonate buffer 0.1 M, pH 9.5 with an enzyme concentration of 0.5 mg/ml as described. [15] N-(3-Dimethylaminopropyl) N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC) (Fluka, Germany) and N-Hydroxysuccinimide (NHS) (Aldrich, Germany) were employed for the covalent carbodiimide linkage of the enzyme to the N25 membranes. [19] The reaction was carried out at room temperature for 2 hours in phosphate buffer at pH 7.4 in 0.15 M NaCl, containing 2 mM EDC and 5 mM NHS. [18]

Substrate solutions studied consist of two different biomass sources. Birchwood xylan (Sigma, Germany) was dissolved in a concentration of 0.1% (w:v) in acetic acid/sodium acetate buffer 0.05 M, (at pH 6 when employing ACPS membranes and at pH 5 in the experiments carried out with the N25 membranes, as these are the optimum pH values for the immobilized enzyme in each case) and was used as a substrate for the enzymatic reaction. Moreover, another substrate sample, called URV, was considered. This corresponds to a 1:80 dilution of the filtrated solution that results from the previous hydrolysis of 0.5 kg of dry corn shells treated with 4 l H₂O at 179 °C, for 22.4 minutes, performed at the laboratories of *Grup de Biopolimers Vegetals de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química* (ETSEQ) at *Universitat Rovira i Virgili* (URV) (Tarragona, Catalunya). The pH of this solution was adjusted to 5 or 6, depending on the enzymatic membrane considered, with sodium hydroxide solution (Panreac, Spain). Accordingly to MALDI-TOF-MS analysis of this substrate, no xylooligosaccharides

were present in the initial sample, as observed from the lack of signals in the acquired spectra. Also, by using the colorimetric assay method the total content of xylooligomers here determined corresponds to the same value obtained for blank samples (0.0279 $\mu\text{mol/ml}$).

2. Membrane modules

Two different membrane modules were used to study the enzymatic hydrolysis of the aforementioned solutions.

The “UAB membrane module”, which was designed previously in our laboratories, consists of two 200ml compartments, where feed and stripping solutions are placed (fig. 1). These compartments are separated by a round window of a diameter of 3.8 cm, where the membrane is supported, [20] setting the active side towards the feed compartment (membrane area of 11.34 cm^2). Both feed and stripping reservoirs are stirred continuously at a constant rate of 1200 rpm [21] with motors connected to a power supply. All experiments were run for at least 6 hours. Some longer experiments were also run occasionally for 24 hours. Experiments were performed at 23 and 50°C. In the latter, the membrane module was placed in an oven (ULM400 Mermmert GmbH) to keep the temperature constant throughout the experiment.

A dead-end filtration membrane module was also used to perform hydrolysis experiments (fig. 2). This module operates in batch mode, with a membrane area of 11.3 cm^2 and at a pressure that was provided by a corresponding N_2 flux (starting at 1 bar and increasing up until 1.5 bar as the experiment progresses to maintain the flow rate constant during all the filtration). The membrane module was filled with 80 ml of substrate solution and conveniently pressured. Experiments were carried out at a constant temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$, and with magnetic stirring to avoid the formation of a diffusion layer attached to the membrane. [22] Experiments were run until the substrate

solution was filtrated through the membranes, which was achieved in 6 hours by adjusting the N₂ pressure to keep the proper flow rate (0.3 ml/min). In this case, experiments at 50 °C could not be performed as it was not possible to place the whole membrane module in the oven.

In both membrane systems, both feed and recovery (named stripping for the UAB module, and filtrate for the dead-end filtration one) samples were periodically withdrawn throughout the experiment to determine the concentration of oligosaccharides released in the enzymatic hydrolysis.

The “UAB membrane module” is interesting as it has two compartments separated by the membrane. Therefore, the idea of recovering the products released during the hydrolysis process appears as a promising feature, as they could pass through the membrane to the recovery solution (stripping). This solution can be considered a clean media which contains solely an acetic acid/sodium acetate buffer 0.05 M at pH 5 or 6 depending on the membrane, as aforementioned. Once the xyloligosaccharides have been recovered in this stripping solution, the excess of sodium from the sodium acetate buffer should be removed. An ion-exchange separation system can be used to replace this sodium by hydrogen ions, leading to the formation of acetic acid, which could be afterwards also removed by lyophilisation or vacuum evaporation. [23] This “UAB membrane module” has been previously used for the chemical characterization of systems in different membrane experiments. [20] Nevertheless, the transport of the products to the stripping compartment is slower in comparison with the dead-end filtration module, as in the latter case pressure is applied.

In the case of the dead-end filtration module, the applied pressure can enable a higher rate of transport and more efficient contact between the bulk of the membrane and the substrate, as it is forced to enter in the membrane structure. Moreover, this could lead to

higher hydrolysis yields comparing the treated substrate volume/membrane surface ratio, which is higher in the dead-end filtration module. Despite these advantages, a drawback should be taken into account in the dead-end filtration module. In the filtration process the xylan substrate, the polymer is not able to pass through the membrane as it is too big, so it makes a surface deposition layer on the membrane which can block it (fouling process, not characterized here). Nevertheless, there is no total certainty that there is any presence of xylan in the filtration samples and there is no way to determine its content. Therefore, both modules appear interesting to study the enzymatic hydrolysis of xylan, although the dead-end filtration module seems more suitable to achieve the two objectives; hydrolysis and separation.

ACPS and N25 membranes were studied in such both membrane modules, previously performing blank experiments, which correspond to the same membranes without the enzyme immobilized. In all cases, three replicates were run. The use of URV samples as a substrate was only performed with the dead-end filtration module due to the lack of significance out of performing them with the “UAB module”, as seen during successive previous experiments with birchwood xylan. Membrane reutilization is also evaluated by performing new hydrolysis experiments of fresh substrate samples with the same membranes. The reutilization has to be considered in a discontinuous mode as both modules required stopping the experiments for removing all the aqueous solutions, and for refilling with new substrate solution.

The summary of the experiments run with each membrane and with both modules are listed in table 1.

3. Analytical

Samples collected in all the experiments were analyzed using the Somogyi-Nelson [24, 25] method, which is a common method for the determination of reducing sugars. To

perform a quantitative determination, xylose standards were prepared from a xylose stock of 1mg/ml dissolved in the same buffer as the samples, and therefore the reducing sugar content in samples was expressed as the amount of xylose.

In order to elucidate the degree of polymerization of the sugars released in the hydrolysis, some samples were also characterized with Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS). The analyses were performed at the *Institut de Biotecnologia i Biomedicina* (IBB) of *Universitat Autònoma de Barcelona*, with a MALDI-TOF equipment from Bruker (Ultraflex). Spectra were acquired in a lineal and positive modus, at a voltage of 25 KV as an average of 5 acquisitions. Prior to MALDI analysis, samples were mixed in 1:1 (v:v) proportion with a matrix of 1% 2,5-dihydroxibenzoic acid (DHB) in methanol, and 1 μ l of the mixture was placed on the sample carrier plate to enable crystallization.

Results and discussion

Membrane results are presented in three different and separate parts. The first refers to the results of the enzymatic membrane performance for both ACPS and N25 in Birchwood xylan treatment, which is evaluated using the aforementioned “UAB membrane module”. The second part comprises the results obtained in the enzymatic membrane hydrolysis experiments with the dead-end membrane module applied to the treatment of both different substrates and with both types of membranes. The last one corresponds to Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) results, as this technique was used to characterize the products obtained from the enzymatic hydrolysis of vegetal biomass with such membrane systems.

1. UAB membrane module

This membrane configuration module was used to better characterize the enzymatic membrane systems.

Influence of the operating temperature

The effect of the operating temperature is clearly influential on enzymatic activity. It is known from previous studies [15] that the optimum temperature for endo-1,4- β -xylanase is 50 °C. The first experiments carried out with both membranes showed this temperature dependence in the enzymatic hydrolysis reaction. In all cases, as shown in fig. 3, the concentration of products released in the reaction is higher when working at 50 °C. In the plots, only feed results are shown. The concentration of reducing sugars at the feed increases with time, as expected from the progress of the enzymatic hydrolysis. When comparing the behaviour of both membranes (ACPS and N25) towards Birchwood xylan, the concentration of reducing sugar products released, expressed as the amount of xylose, is around 0.200 $\mu\text{mol/ml}$ in both cases (at 50°C) at the longer times here showed (for 5 and 6 hours of hydrolysis), which can probably mean that at these times the steady state is reached (at which all the available enzyme molecules are interacting with the substrate). Nevertheless, at the initial times of the hydrolysis membrane reaction there are differences between membranes, as seen in fig. 3. With N25 membranes the concentration of obtained products is lower than when using ACPS membranes under the same conditions. These differences in the reaction kinetics could probably be due to a different concentration of enzyme on the membrane surfaces. Membrane N25, as it is based on monolithic polymers, has a higher porous structure with high surface and probably some enzyme molecules can be placed inside this membrane structure. So, the enzymatic hydrolysis of the substrate takes longer, but once the steady state is reached the results can be comparable to the ones for ACPS membranes. In the later case, ACPS membranes have a different structure with no

surface pores, so the enzymatic reaction takes place solely on the surface. Consequently it is possible to reach the steady state faster than when working with the N25 membranes.

On the contrary, in the stripping solution such hydrolysis products are not found. As the measurements do not differ from the blanks, so their concentration is negligible. This means that this membrane configuration module does not enable the product to be transported across the membrane.

In the experiments performed for longer times, some transport from the feed compartment to the stripping one was observed, as indicated by the presence of reducing sugars in the stripping solution. Nevertheless, the concentration of these samples was not as high as the concentration found in the feed compartment at any time. This transport could be a consequence of passive diffusion. The corresponding data is presented in fig. 4.

Influence of pH differences

The influence of a pH difference between feed and stripping solutions was evaluated. Therefore, experiments varying the pH of the stripping solution were performed, maintaining the pH of the feed solution either at 6 (for ACPS membranes experiments) or at 5 (for N25 membranes), as these are the optimum pH for enzyme performance. In this case, only ACPS membrane was studied and experiments were carried out at three different pH values for the stripping solution: 4, 6 and 7.5. Again, the lack of any signal at the stripping reveals that this module is probably not suitable for separating the products from the substrate once they are originated in the hydrolysis reaction in the feed phase compartment. In all cases, the reducing sugar concentration in the stripping samples does not differ from that corresponding to the blank during the 6 first hours of experimentation. Therefore, at this reaction time the pH difference between the feed and

stripping compartments does not favour the transport of the product across the membranes.

Reutilization of the enzymatic membranes

The possibility of reutilizing both enzymatic membranes was analyzed by performing different consecutive experiments at 50°C with the same membrane and different fresh feed and stripping solutions. Comparing the results related to the ACPS membrane together with the results for the corresponding blank experiments (ACPS membrane without immobilized xylanase) it is observed that during the second use of the membrane, the concentration of oligosaccharides (expressed as xylose equivalents) decreased by up to 20% with respect to the first hydrolysis concentration values. Considering the standard deviation of the three replicates, the results of the second and third uses did not differ from that corresponding to the blank ones, which indicates that it is not possible to reuse them more than once (6 hours). This could be attributed to a loss of enzymatic activity. Regarding enzyme deactivation, and taking into account the fact that these experiments are run at 50°C, it seems that the temperature could be responsible for the membrane deactivation, as generally occurs with proteins working at a higher temperature than one at which they can be denaturalized. Xylanase maintains its activity at 4°C for a year, [26] but the deactivation rate increases at higher temperatures.

The reuse of N25 membranes was also studied by means of up to two consecutive experiments with fresh feed and stripping solutions. As shown in fig. 5, although the second use of the membrane is different to the blank membrane performance, the concentration of the released reducing sugars from this second consecutive enzymatic hydrolysis is very low in comparison with the first. The hypothesis of the possible thermal deactivation of the enzyme is also considered.

2. Dead-end filtration membrane module

This membrane configuration module was used to better characterize the performance of the enzymatic membrane hydrolysis of different substrates: the Birchwood xylan commercial substrate and the URV sample.

Experiments with Birchwood xylan commercial substrate

In this case, the initial feed solution passes through the corresponding enzymatic membrane under pressure (between 1 and 1.5 bar, properly set to maintain the flow rate at 0.3 ml/min, as mentioned) and the filtrate is collected. The filtrated solution appeared clear and colourless in contrast to the turbidity and brown colour of the initial substrate solution. Comparing both enzymatic membrane systems, in the Birchwood xylan hydrolysis with the N25 membrane the concentration of reducing sugar products in the filtrate was higher (equivalent to around 0.600 $\mu\text{mol/ml}$ of xylose, which expressed as a molar flux corresponds to 1061027.3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ considering 1 bar of pressure, as in all the molar fluxes calculated) than when using the ACPS membrane (with only 0.150 $\mu\text{mol/ml}$ of xylose; and a molar flux of 265256.8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$), as seen in fig. 6. This difference could be explained by the differences between the membranes. ACPS membranes are made of a polysulfone derivative that contains acrylate functional groups to covalently link the enzyme xylanase.[27] The amount of xylanase immobilized is quite low, [15] and due to the physical structure of this polymeric membrane, it has probably mostly been immobilized on its surface. Furthermore, N25 membranes are based on monolithic polymers, which are much more hydrophilic materials than polysulfone. So, they provide a much “friendlier” environment for enzyme immobilization, which can lead to a better performance. N25 membranes permit the development of fairly efficient polymeric enzymatic membranes with relatively high enzyme loading and improved enzyme stability. This is probably due to

the internal structure of the polymeric backbone of the monolith. This provides a high surface area and a high crosslinking degree [28] and also with a high number of functional groups available for the covalent immobilization of the enzyme on the membrane, as reported in previous studies. [18] Regarding these characteristics, the amount of xylanase immobilized in the monolithic membranes is probably higher than in the ACPS membranes, which could explain the higher yield of hydrolysis with the former.

With the “UAB membrane module” there were no differences between them as the enzymatic reaction only occurs on the membrane surface that is in contact with the feed reservoir, because the substrate solution does not penetrate the internal structure of the membrane. With the dead-end filtration module, as pressure is applied, the substrate is forced to pass through the internal structure of the membranes, so it will come into contact with the enzyme loaded inside the monolithic polymer backbone structure in N25, which is not the case with the ACPS membrane.

As the best results among these experiments were obtained with N25 membranes, their possibilities for reutilization were studied. In the second cycle hydrolysis experiment the concentration of the products of the enzymatic membrane hydrolysis in the filtrate is comparable to the initial substrate sample concentration and to the corresponding samples of the blank experiments. Probably it is due to the enzyme deactivation after being at room temperature for a long time, as it has been mentioned. Moreover, a brown layer of solid deposition on the membrane surface can be seen after use. This layer probably offers a resistance to filtration, as an increase in pressure is required to maintain constant flux through the membranes throughout each whole experiment. Moreover, the decrease in flow rate in filtration experiments is usually related to the concentration polarization phenomena on the active membrane side. [22]

Experiments with URV substrate

Both, the ACPS and N25 enzymatic membranes were also used for the treatment of URV substrate samples, with the same operative conditions as for the Birchwood xylan substrate. In fig. 7 results corresponding to the reuse of the ACPS membrane system in two consecutive hydrolysis experiments are shown. In this case, the product concentration in the filtrate is equivalent to around 0.090 $\mu\text{mol/ml}$ of xylose (molar flux 159154.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$) in the first hydrolysis cycle, and 0.060 $\mu\text{mol/ml}$ of xylose (molar flux 106102.7 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$) in the second cycle. Although the concentration of oligosaccharides in the filtrate is low, the study of the use of the membranes in successive experiments is highly interesting in terms of the possibilities of application to a real case. These concentrations are lower than the corresponding ones obtained with Birchwood commercial substrate. The affinity of the enzymes depends on the substrate, so that explains the difference in the reaction yield in both cases. Anyway, as shown, it is still possible to reuse the ACPS membrane in a second cycle hydrolysis experiment.

With regard to N25 membrane reuse when treating URV substrate samples, in the first cycle hydrolysis experiment the average concentration of oligosaccharides in the filtrate is 0.065 $\mu\text{mol/ml}$ of xylose (molar flux 114944.6 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$), while in the second cycle this concentration decreases to 0.045 $\mu\text{mol/ml}$ of xylose (molar flux 79577.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$). Although the data corresponding to the second hydrolysis differs from the blank signals in statistical terms, the yield of the enzymatic hydrolysis in the second successive experiment with the same membrane is not high enough to be able to accept the reuse capacity of these membranes. Again, regarding that the affinity of the enzyme depends on the substrate that it is interacting with, the reutilization of the membrane system will be strongly dependent on the nature of the samples to be treated. This is related to the presence of ramifications or substituent groups that can offer sterical

hindrances for the interaction with the catalytic site. Even more, accordingly to the chemical nature of the constituents of the polymer, maybe some repulsion between the polymer functional groups and some groups of the protein can take place. Therefore, the reuse of these membranes should be studied for each particular case of substrate.

3. Product characterization with MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS spectra for xylose and standard xylooligosaccharides of a degree of polymerization between 2 and 6 were acquired in order to identify their m/z (mass/charge) peaks. It was observed that the m/z peaks found in the collected samples correspond to adducts of xylooligosaccharides with a sodium atom. The summary of identified peaks and their correspondence to xylooligomers is listed in table 2. The theoretical molecular weight of xylooligomer adducts is calculated considering that during glycosidic bond formation between two xylose residues one water molecule is released, and that the xylooligomeric compounds form an adduct with a sodium atom present in the media.

Feed samples in further experiments with the “UAB membrane module”, for the treatment of the *Birchwood xylan* commercial substrate, either with ACPS or N25 membranes were analyzed. Filtrate samples from a dead-end filtration module in experiments with *Birchwood xylan* as the substrate, for both membranes (ACPS and N25) were also studied. Experiments with *URV substrate* could not be identified, due to a higher noise in the baseline of the spectra and to the presence of non-significant peaks, probably because of the presence of other compounds in the solution, which would proceed from the real sample after direct treatment as vegetal biomass waste.

As a general remark, in all MALDI-TOF-MS spectra only the xylotriose compound was found. This observation agrees with the active site structure of endo-1,4- β -xylanase, [29] which favours xylan hydrolysis mainly to obtain short chains of 3 residues of

xylose. The relative intensity of these peaks with respect to a reference peak at 326 mass units increases as far as the enzymatic hydrolysis proceeds in all cases, as shown in fig. 8. The highest increase in relative intensity is observed for the dead-end filtration module and with the N25 enzymatic membrane, which agrees with the total reducing sugar content found (mentioned above). Moreover, the trend of xylotriose increase is higher in all the experiments using the dead-end filtration module, as expected. With this module, a higher product concentration is achieved, probably due to the application of pressure, which enhances the contact of the immobilized enzyme inside the membrane and the substrate solution, as indicated.

Only in the case of working with the “UAB membrane module” with the N25 enzymatic membranes, the peaks corresponding to the dimer (xylobiose) are observed at the longest membrane hydrolysis experimental times (between 5 and 6 hours), although the relative intensity of such peaks is very low (0.05 and 0.08). Another interesting observation is that the monomer (xylose) is not found in any case, which is a highly interesting result as the main objective of the project work is to obtain oligosaccharides from DP 2 to 10, and to avoid the presence of monomer for their subsequent industrial application.

Conclusions

It is generally observed that application as catalysts in xylan hydrolysis is possible for both types of enzymatic polymeric membranes considered, as the endo-1,4- β -xylanase maintains its catalytic activity and permits the release of short chain xylooligosaccharides (with a degree of polymerization of 2 and 3). Therefore, ACPS (acrylate of polysulfone) and N25 (monolithic polymers) membranes are suitable supports not only as membrane materials but also as immobilization supports. When

they are used beside catalysts for separation purposes, there are differences in the possibilities for application depending on the experimental set-up considered.

With the “UAB membrane module”, the hydrolysis reaction progresses with the immobilized catalyst as shown as the xylooligosaccharides released are present in the feed, although it is not possible to separate them from the initial substrate solution to the stripping compartment, even not when changing the pH of this solution. Moreover the reutilization of the membranes in sequential hydrolysis experiments with new substrate solution is not successful, most probably due to the hypothesis of loss of enzymatic activity as a result of its denaturalization. Once the steady state is reached during the progress of the hydrolysis, no differences between ACPS and N25 membranes are observed, as the final concentration of the products is the same in both cases. Nevertheless at the earlier stages of the hydrolysis the concentration profiles are different, which indicates that the kinetics of the enzymatic reaction is different. Probably the different sterical hindrances in the interaction between the structure of the immobilized enzyme and the substrate are responsible of these differences. Anyway, the UAB module is not suggested to be applied in industrial processes for recovering xylooligosaccharides, and the use of a dead-end filtration module is suggested, as it is possible to recover filtrate solution with the products partially separated from the initial substrate.

When the dead-end filtration module is used, membrane N25 leads to higher hydrolysis yields than ACPS membrane in the Birchwood xylan treatment under the same working conditions. It is not possible to reuse any of these membranes in a second hydrolysis cycle. On the contrary ACPS is reusable in the treatment of lignocellulosic material samples proceeding from direct treatment of vegetal feedstock (URV substrate samples) although the concentration of products was lower than the obtained with the commercial

substrate solution. As observed from the present cases of study N25 seem more promising as the concentration of products obtained are higher, but the selection of the membrane will depend on the type and nature of substrate to be treated.

From MALDI-TOF-MS analysis of hydrolysis samples the product determined is mostly xylotriose (and xylobiose in only some cases) and corresponds to that expected from the catalytic reaction mechanism of the enzymatic hydrolysis. These are the desired xylooligosaccharide products for the further food, pharmaceutical, industrial and energy production applications presented here, which was the objective of our work.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support of the Spanish Ministry of Science in the funding of projects reference Nos. PPQ2002-04201-C02-01 and CTQ2005-09430-C05-01. A. Cano acknowledges the “Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació, de la Generalitat de Catalunya” for the research scholarship (reference 2003FI 00501) that made this work possible. The authors also acknowledge Genencor International for free supply of the xylanase solution, Dr. Daniel Montané from the *Grup de Biopolimers Vegetals of Universitat Rovira i Virgili* for the supply of dry corn shell hydrolysis samples, and Dr. Sílvia Bronsoms from the *Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) of Universitat Autònoma de Barcelona* for her technical assistance with MALDI-TOF-MS analysis.

References

[1] J. Romero, J. Miralles. *Perspectiva ambiental 24: Biocombustibles*. Ed. Fundació Terra, Barcelona, 2002. p: 4-5.

- [2] Pla de l'energia de Catalunya 2006-2015. Pla estratègic. Edicions Generalitat de Catalunya, Barcelona, 2005.
- [3] M. Okazaki, S. Fujikawa, N. Matsumoto. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria, *Bifidobacteria Microflora* 9 (1990) 2: 77-86.
- [4] P. Meyer, S. Diederick, N. Roosendaal. Nondigestible Oligosaccharides as Dietary Fiber, *Journal of AOAC International* 87 (2004) 3: 718-726.
- [5] K. Watson, N. K. Gooderham, D. S. Davies, R. J. Edwards. Interaction of the transactivating protein HIV-1 tat with sulfated polysaccharides. *Biochemical Pharmacology*, 57 (1999) 7: 775-783
- [6] A. L. Stone, D. J. Melton, M. S. Lewis. Structure-function relations of heparin-mimetic sulfated xylan oligosaccharides: inhibition of Human Immunodeficiency Virus-1 infectivity in vitro, *Glycoconjugate Journal*, 15 (1998) 7: 697-712
- [7] E. B. Damonte, M. C. Matulewicz, A. S. Cerezo, C. E. Coto. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Chemotherapy*, 42 (1996)1: 57-64
- [8] K. Hisado, K. Minoru, M. Yoshitada, T. Suguru, U. Kiichi, W. Nobuhiro, Y. Hisao. Polysaccharide RON substance, US Patent 4762825 (1985).
- [9] M. Godliving, Y. Nakamura. Bioconversion of lignocellulosic waste from selected dumping sites in Dar es Salaam, Tanzania. *Biodegradation* 16 (2005) 493-499.
- [10] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y.Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass *Bioresource Technology* 96 (2005) 673-686.
- [11] T.W. Jeffries. Biochemistry and genetics of microbial xylanases, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 3: 337-342.

- [12] T. Kawai, H. Kawatita, K. Sugita, K. Saito, M. Tamada, T. Sugo, H. Kawamoto. Conversion of dextran to cycloisomaltooligosaccharides using an enzyme-immobilized porous Hollow-fiber membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 1073-1076.
- [13] H. El-Sherif, S. di Martino, P. Travascio, A de Maio, M. Portaccio, D. Durante, S. Rossi, P. Canciglia, D. G. Mitta. Advantages of using non-isothermal bioreactors in agricultural waste water treatment by means of immobilized urease. Study of the influence of spacer length and immobilization method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 2802-2811.
- [14] P. Czemark, M. Ebrahimi, K. Grau, S. Netz, G. Sawatzki, P.H. Pfromm. Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process, *Journal of Membrane Science* 232 (2004) 85-91.
- [15] A. Cano, C. Minguillón, C. Palet. Immobilization of *endo*-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization, *Journal of Membrane Science* 280 (2006) 383-388.
- [16] A. Jungbauer, R. Hahn. Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology, *Journal of Separation Science* 27(2004) 767-778.
- [17] M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet. Immobilization of Trypsin onto “Molded” Macroporous Poly(Glycidyl Methacrylate- *co* -Ethylene Dimethacrylate) Rods and Use of the Conjugates as Bioreactors and for Affinity Chromatography. *Biotech. Bioeng.* 49 (1996) 355.
- [18] A. Cano, E. A. Moschou, S. Daunert, J. Coello, C. Palet. Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their

composition using design of experiments (DOE) *Bioprocess and Biosystem Engineering* (accepted June 2006) in press.

[19] Z. Grabarek, J. Gergely. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters, *Analytical Biochemistry* 185 (1990) 1: 131-135

[20] T. Gumí, M.Valiente, C. Palet. Elucidation of *SR*-propranolol transport rate and enantioselectivity through chiral activated membranes, *Journal of Membrane Science* 256 (2005) 150-157.

[21] R. Garcia-Valls; M. Muñoz; M. Valiente. Selective separation of lanthanides by supported liquid membranes containing Cyanex 925 as a carrier. *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 77-84.

[22] M. Mulder. *Basic Principles of Membrane Technology, second edition*; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000.

[23] J. R. Thayer; J. S. Rohrer; N. Avdalovic.; R. P. Gearing. Improvements to in-line desalting of oligosaccharides separated by high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry* (1998), 256(2), 207-216.

[24] M. Somogyi. Notes on sugar determination, *Journal of Biological Chemistry* 195 (1952) 19

[25] N. Nelson. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose, *Journal of Biological Chemistry* 153 (1944) 375-380.

[26] Multifect Xylanase product information datasheet from Genencor International Inc., Leiden, The Netherlands, 2001.

[27] B. Gutiérrez, A. Cano, C. Minguillón, Synthesis and characterization of polysulfone acrylate: a versatile tool in the derivatization of polysulfone, *in preparation*

[28] P. Hodge, D.C. Sherrington. *Syntheses and Separations using functional polymers*, Wiley, New York, USA, 1989

[29] P. Biely. *Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases*, in M.P Coughan and G.P. Hazlewood. *Hemicelluloses and hemicellulases* Portland Press, London, UK, 1993, p: 29-51

Figure captions

Fig. 1. “UAB membrane module” scheme

Fig. 2. Dead-end filtration module

Fig. 3. Hydrolysis experiments of Birchwood xylan commercial substrate, working with the “UAB membrane module”. Xylose concentration in the feed phase as a function of time for ACPS membranes at 23 °C (◆) and 50° C (■), and for N25 membranes also at 23 °C (▲) and 50 °C (×). All the series are the average of three replicates. Error bars correspond to S.D of the replicates.

Fig. 4. Hydrolysis experiments of Birchwood xylan commercial substrate, working with the “UAB membrane module” at 50 °C. Xylose concentration as a function of time for ACPS membranes, in the feed (◆) and in the stripping phases (■), and for N25 membranes, also in the feed (▲) and in the stripping phases (●).All the series are the average of three replicates. Error bars correspond to S.D of the replicates.

Fig.5. N25 membrane reutilization in consecutive hydrolysis experiments of Birchwood xylan commercial substrate, working with the “UAB membrane module” at 50 °C: first cycle (◆), second cycle (▲), and blank (■) hydrolysis experiments. All the series are the average of three replicates and error bars correspond to S.D of the replicates.

Fig. 6. Birchwood xylan hydrolysis by using the dead-end filtration membrane module (23 °C, average N₂ pressure 1 bar, filtrate flow rate 0.3 ml/min), with ACPS (◆), and N25 (■) enzymatic membranes. Also, corresponding blank experiments are plotted: ACPS blank (●), and N25 blank (▲). All the series are the average of three replicates. Error bars correspond to S.D of the replicates.

Fig. 7. ACPS membrane reutilization in consecutive hydrolysis experiments of URV substrate samples, with the dead-end filtration membrane module (23 °C, average N₂ pressure 1 bar, filtrate flow rate 0.3 ml/min). First cycle (■), second cycle (▲) as well as and blank (◆) hydrolysis experiments. All the series are the average of three replicates. Error bars correspond to S.D of the replicates.

Fig.8. Relative intensity of xylotriose signals with respect to a reference peak from MALDI-TOF-MS data. Results for different membrane modules and enzymatic membranes used are shown: feed samples of UAB membrane module, corresponding to ACPS (◆) and N25 (■) membranes; and dead-end filtration module for ACPS (▲) and N25 (●) membranes.

Figures

Fig. 1

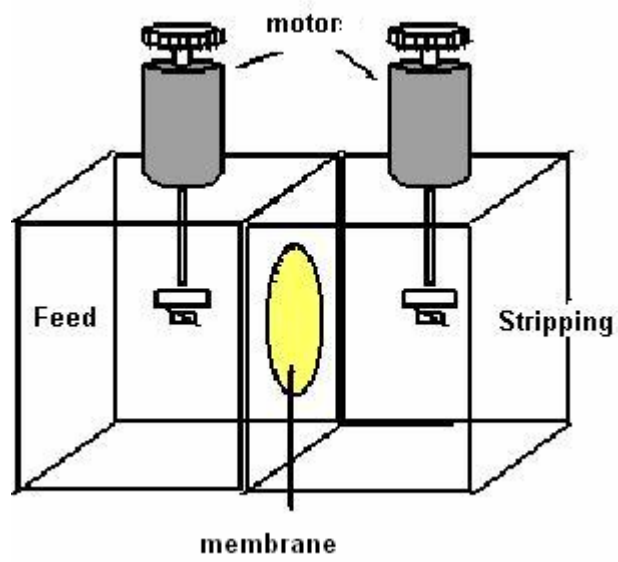


Fig. 2

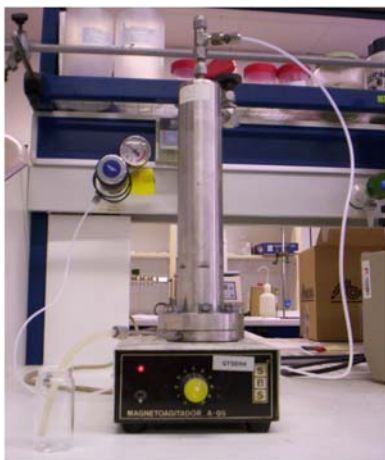


Fig. 3

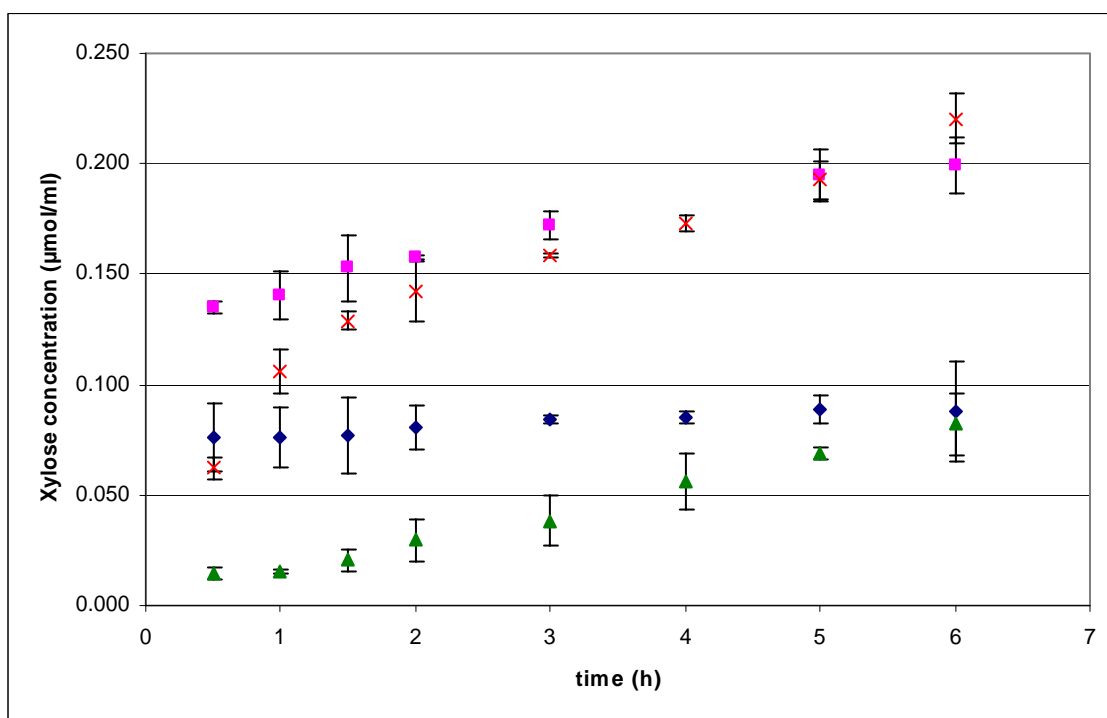


Fig. 4

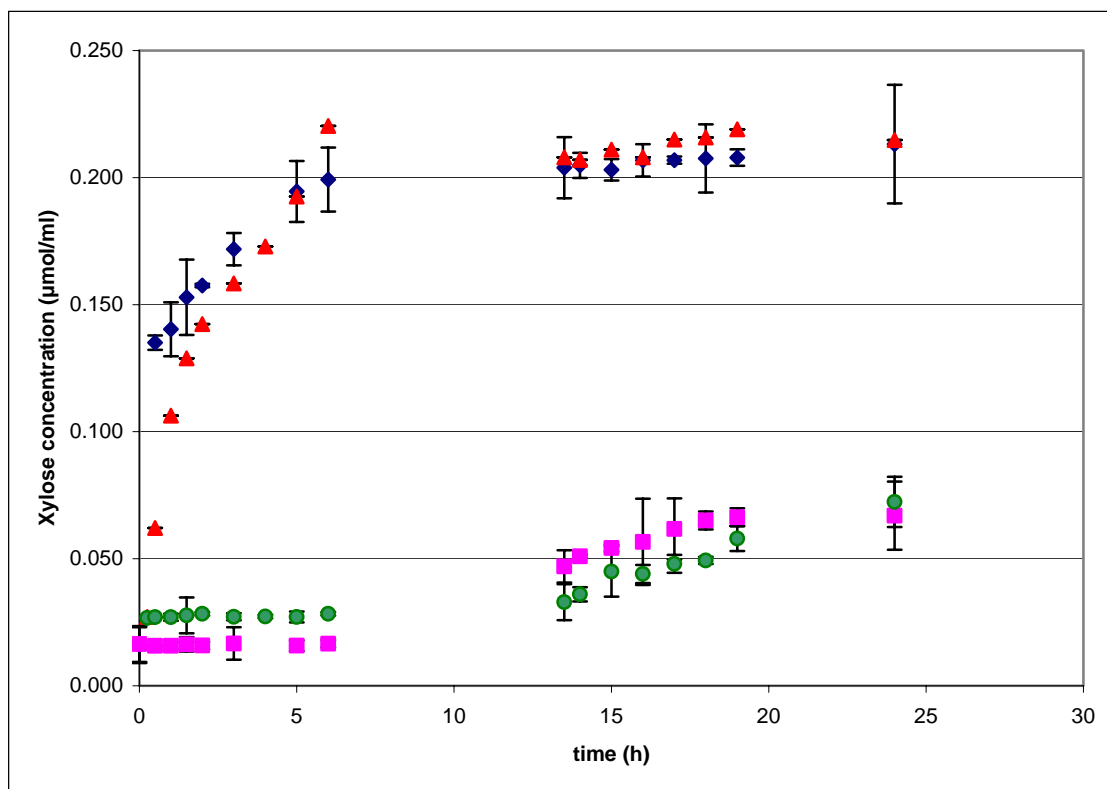


Fig. 5

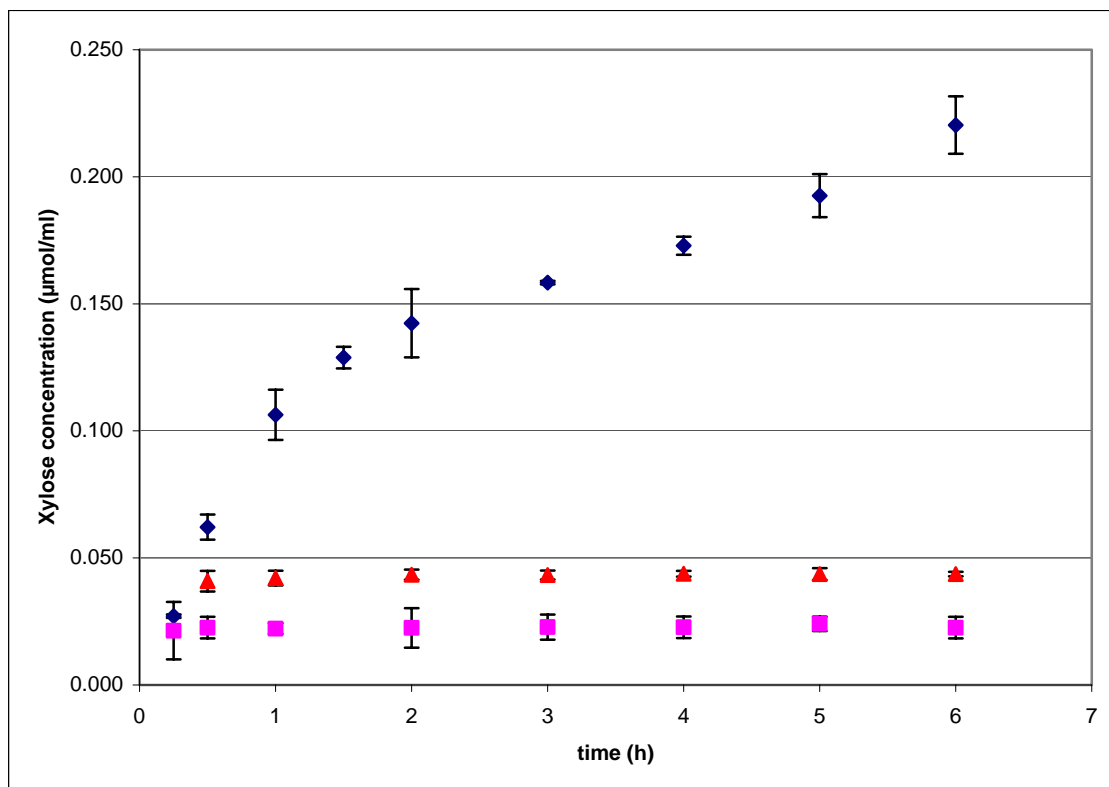


Fig. 6

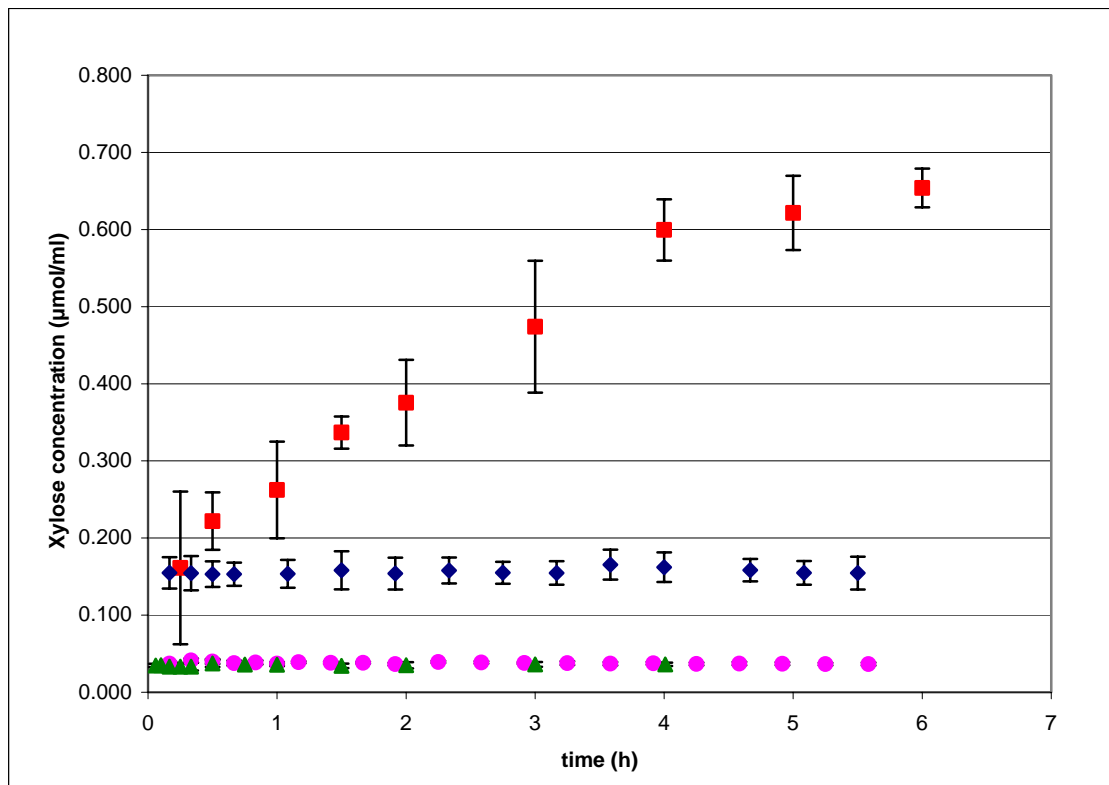


Fig. 7

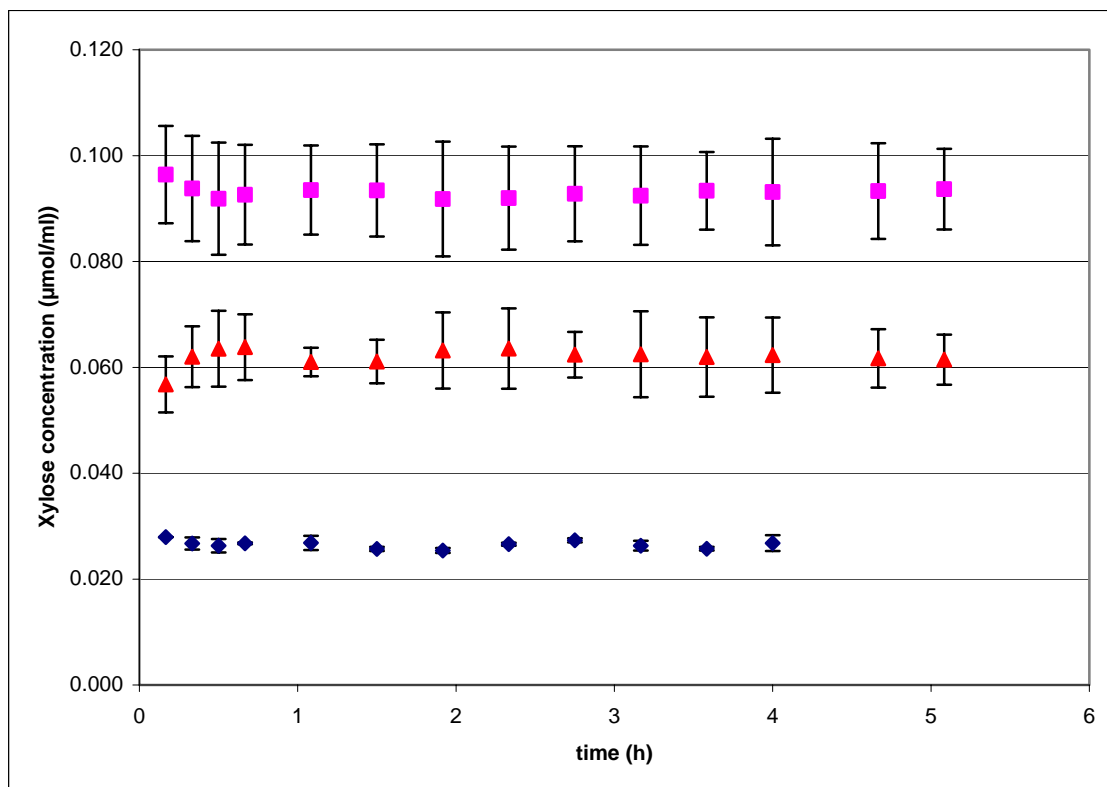
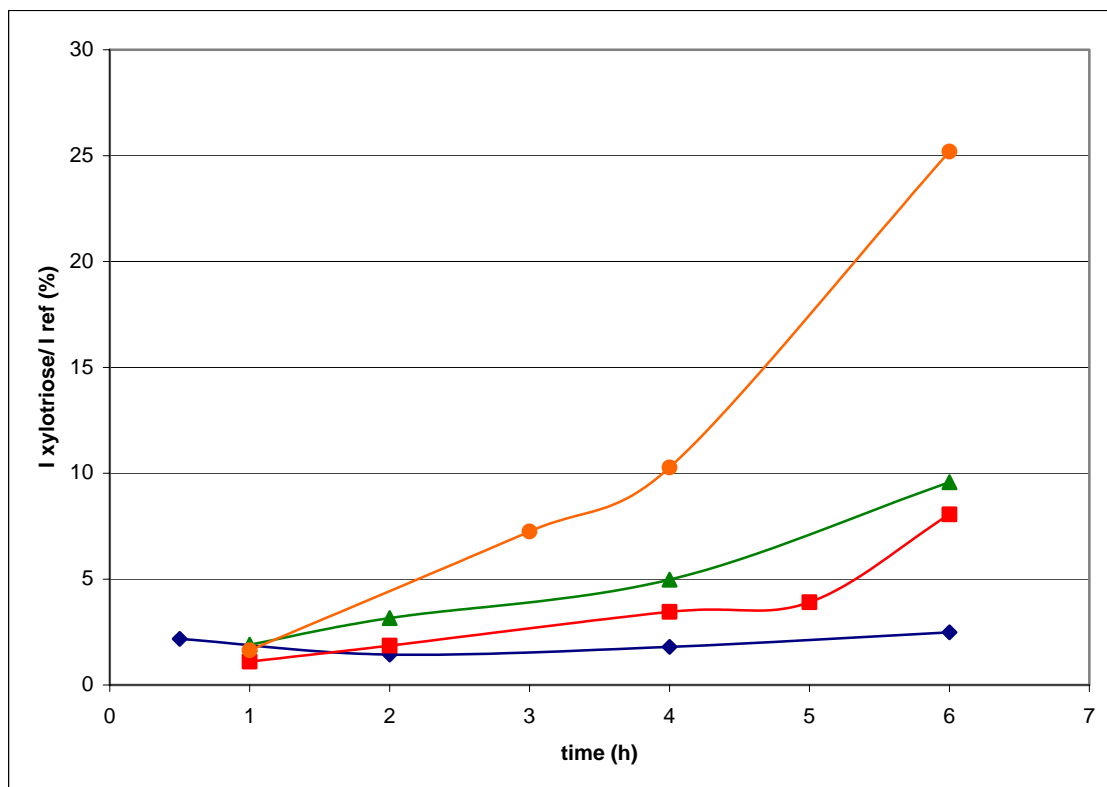


Fig. 8



Tables

Table 1. Summary of all the membrane experiments performed.

UAB module	Blank experiments (membrane without enzyme) Experiments with enzymatic membranes with Birchwood xylan substrate Working temperatures comparison Studies with different stripping solutions Study of membrane reuse
Dead-end module	Blank experiments (membrane without enzyme) Experiments with enzymatic membranes with Birchwood xylan substrate Study of membrane reuse Experiments with enzymatic membranes with URV substrate Study of membrane reuse

Table 2. Summary of the xylooligosaccharide peaks identification in MALDI-TOF-MS spectra.

	Theoretical Mw (a.m.u)	Observed Mw (a.m.u)
Xylose	173.12 (150.13+ 22.99)	172.05
Xylobiose	305.25 (150.13*2-18 + 22.99)	305.00
Xylotriose	437.38 (150.13*3 -2*18+ 22.99)	437.60
Xylotetraose	569.51 (150.13*4-3*18 + 22.99)	568.80
Xylopentaose	701.64 (150.13*5-4*18 + 22.99)	701.06
Xylohexaose	833.77 (150.13*6-5*18 + 22.99)	833.10