

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

**Diseño, Operación y Modelización de Procesos
Continuos Biorreactor Enzimático-Módulo de
Membrana, Aplicación a la Eliminación de
Contaminantes Fenólicos de Efluentes Industriales**

Dña. Dalje Sunith Barbosa Trillos

2012



El Dr. D. Victor Francisco Meseguer Zapata, Profesor Titular de Universidad del Área de Ingeniería Química y Presidente de la Comisión Académica del Programa de Ingeniería Química. INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Diseño, operación y modelización de procesos continuos biorreactor enzimático-módulo de membrana, aplicación a la eliminación de contaminantes fenólicos de efluentes industriales”, ha sido realizada por D^a. Dalje Sunith Barbosa Trillos, bajo la inmediata dirección y supervisión del Dr. D. José Luis Gómez Carrasco y la Dra. D^a. M^a Fuensanta Máximo Martín, y que la Comisión Académica ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 21 de mayo de 2012



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

El Dr. D. José Luis Gómez Carrasco, Catedrático de Universidad del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Diseño, operación y modelización de procesos continuos biorreactor enzimático-módulo de membrana, aplicación a la eliminación de contaminantes fenólicos de efluentes industriales”, realizada por D^a. Dalje Sunith Barbosa Trillos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 21 de mayo de 2012



La Dra. D^a. M^a Fuensanta Máximo Martín, Profesora Titular de Universidad del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Diseño, operación y modelización de procesos continuos biorreactor enzimático-módulo de membrana, aplicación a la eliminación de contaminantes fenólicos de efluentes industriales”, realizada por D^a. Dalje Sunith Barbosa Trillos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 21 de mayo de 2012



School of Life, Sport and
Social Sciences
Edinburgh Napier University
Sighthill Campus
Sighthill Court
Edinburgh
EH11 4BN
Scotland, UK

Ms Dalje Sunith Barbosa Trillos
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus di Espinardo
30071 Murcia
Spain

16 April 2012

Dear Ms Trillos

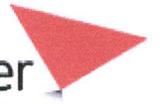
**DESIGN, OPERATION AND MODELING OF CONTINUOUS PROCESSES,
ENZYMATIC BIOREACTORS-MEMBRANE MODULE, APPLICATION TO
THE REMOVAL OF PHENOLIC CONTAMINANTS FROM INDUSTRIAL
WASTEWATER**

Many thanks for sending me the above titled submission for the award of PhD at the University of Murcia. I have reviewed the thesis and can confirm that it is suitable for the award of the PhD degree meeting the required standard for a higher degree across Europe and other parts of the World.

The thesis provides original data on the treatment of phenolic pollutants using biological techniques. The literature review is complete and current showing appreciation and limitations of existing technologies and has been put in context to the potential of enzymic methods as cost effective alternatives in pollutant phenol degradation.

The breadth of the work done is impressive. The study has systematically examined the efficacy of a number of commercially available peroxidises and the physical and chemical factors affecting the bioconversion of specific chlorophenolic compounds. Batch and continuous reactor systems have been utilised in the study and conditions for optimum removal of 4-chlorophenol obtained that could have applied uses. The use of batch and continuous reactors for the removal of the toxicants of interest has been very well considered and research is of a high standard.

The study presents a critical appraisal of the observations made. The study has effectively used the data in mathematical modelling of the processes involved.



The English version of the thesis that I examined is generally very clearly written and presentation is logical. I complement the student for a succinct discussion and conclusion of the data.

In summary I am impressed by the work and I have no hesitation in stating that the work meets the required standard.

Yours sincerely

Professor Nick Christofi
Emeritus Professor, Environmental Biotechnology



School of Life, Sport and
Social Sciences
Edinburgh Napier University
Sighthill Campus
Sighthill Court
Edinburgh
EH11 4BN
Scotland, UK

Ms Dalje Sunith Barbosa Trillos
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus di Espinardo
30071 Murcia
Spain

16 Abril 2012

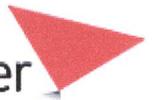
Estimada señorita Trillos

DISEÑO, OPERACIÓN Y MODELIZACIÓN DE PROCESOS CONTINUOS,
BIORREACTOR ENZIMÁTICO-MÓDULO DE MEMBRANA, APLICACIÓN A
LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES FENÓLICOS DE EFLUENTES
INDUSTRIALES

Muchas gracias por enviarme el documento arriba indicado para el reconocimiento de Doctor por la Universidad de Murcia. He revisado la tesis y confirmo que es adecuada para el reconocimiento del grado de Doctor, cumpliendo todos los requerimientos exigidos tanto en Europa como en otras partes del mundo.

La tesis contiene información original sobre el tratamiento de contaminantes fenólicos usando técnicas biológicas. La revisión bibliográfica es completa y actual mostrando ventajas y limitaciones de tecnologías existentes y enfocándose desde el punto de vista del potencial de los métodos enzimáticos como alternativas viables y económicas en la eliminación de contaminantes fenólicos.

La amplitud del trabajo hecho es impresionante. El estudio examina sistemáticamente la eficacia de una serie de peroxidasas comercialmente disponibles y los factores físicos y químicos que afectan la bioconversión de compuestos clorofenólicos específicos. Diversas configuraciones de reactor, continuo y discontinuo, se han usado en el estudio y se han obtenido las condiciones óptimas para la eliminación del 4-clorofenol. El uso de reactores continuos y discontinuos para la eliminación de los contaminantes de interés se ha enfocado muy bien y la investigación tiene un alto nivel.



El estudio presenta una evaluación crítica de las observaciones hechas. El estudio ha usado eficazmente los datos experimentales en modelos matemáticos de los procesos implicados.

La versión en inglés de la tesis que he examinado está en general escrita muy claramente y su presentación es lógica. Felicito a la doctoranda por presentar una discusión y unas conclusiones concisas.

En resumen estoy impresionado con el trabajo y no tengo duda en afirmar que cumple con los requisitos exigidos.

Atentamente

Professor Nick Christofi
Emeritus Professor, Environmental Biotechnology



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE

Institute for Environment and Sustainability
Air and Climate Unit

Informe sobre la memoria de tesis doctoral

“Diseño, operación y modelización de procesos continuos biorreactor enzimático-módulo de membrana, aplicación a la eliminación de contaminantes fenólicos de efluentes industriales”

de Dña. Dalje Sunith Barbosa Trillos

La tesis bajo evaluación lleva a cabo un estudio exhaustivo sobre la eliminación de compuestos fenólicos de efluentes industriales acuosos por vía enzimática. Estos contaminantes, presentes en una gran variedad de efluentes industriales son un problema real por su peligrosidad y persistencia y su eliminación sigue siendo aún en la fecha actual un problema de difícil solución.

La tesis consta de dos partes principales. En la primera se comparan tres peroxidases vegetales comerciales y se concluye, después de una exhaustiva investigación en la que se tienen en cuenta aspectos muy variados, que una de ellas posee mejores características que las otras dos para la eliminación del contaminante modelo. La enzima seleccionada, una peroxidasa comercial de soja, se utiliza en distintas configuraciones de reactor continuo y de forma tanto soluble como inmovilizada. De este estudio, que abarca varios capítulos de la tesis doctoral, se concluye que también hay una forma más efectiva de utilizarla actividad enzimática: se trata de un reactor tanque continuo en el cual la enzima es retenida con un sistema de ultrafiltración. Este sistema, además de permitir la utilización en continuo de la enzima sin necesidad de inmovilizarla en un soporte sólido, también consigue la separación de los productos en los cuales se transforma el contaminante, que son de carácter polimérico.

Aunque estos dos aspectos son los fundamentales de la tesis, y a los que más esfuerzo se ha dedicado, hay otros que merecen también ser mencionados y que es justo destacar en este informe. Por un lado está el modelo de diseño del reactor tanque continuo con módulo de ultrafiltración. Aunque no es objetivo primordial del estudio, este modelo aporta un valor añadido al mismo ya que describe de forma bastante aproximada las conversiones en el reactor y en la corriente efluente del mismo, y además está basado en hipótesis realistas. Este modelo podría utilizarse como herramienta en el escalado del sistema ya que la aplicación última de estos sistemas debe ser eliminación de contaminantes fenólicos en efluentes industriales.

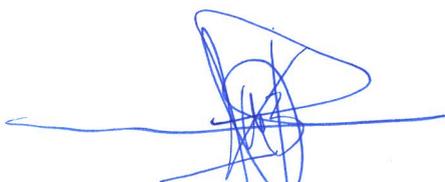
Otro aspecto que también es de destacar en mi opinión, es el estudio que constituye el capítulo 12 de la Tesis, otras alternativas de tratamiento relacionadas con las que se proponen. Puesto que uno de los principales inconvenientes del tratamiento enzimático de corrientes residuales es el coste de las enzimas comerciales, la doctoranda ha realizado, en una estancia breve en otra universidad, estudios preliminares para sustituir los preparados comerciales por extractos crudos de dos plantas. Aunque éstos se han realizado en reactores discontinuos, parece que los resultados obtenidos podrían dar lugar a una sustitución de los biocatalizadores en plantas industriales.

Por último mencionar la inclusión en la memoria de tesis de resultados de eliminación de otros contaminantes fenólicos, distintos del utilizado como modelo, lo cual garantiza que el sistema propuesto puede ser utilizado para la eliminación de distintos fenoles. En el capítulo 11 de la tesis, en un intento de acercarse a situaciones más reales en las que más de un compuesto fenólico esté presente, se demuestra que la eliminación de estos contaminantes se ve afectada por la presencia de otras moléculas de la misma familia.

Ya de forma más general decir que la tesis conlleva un importante volumen de trabajo experimental, que la memoria está redactada de un modo correcto y estructurado, que los objetivos se encuentran claramente identificados y que la metodología y el rigor científico se hacen patentes en los distintos planteamientos y estudios llevados a cabo en la misma, siendo las conclusiones consecuentes con las evidencias científicas previamente expuestas. Además, el trabajo está adecuadamente referenciado.

Desde mi punto de vista, el estudio presenta un gran interés en cuanto a su posible aplicación en el ámbito industrial. La tesis puede considerarse inédita y de suficiente valor científico como para dar origen a un número significativo de publicaciones en revistas científicas y de alto índice de impacto en el campo de la ingeniería química.

Por todo lo anteriormente expuesto emito sin ningún tipo de duda este informe favorable para que la autora de la tesis opte al correspondiente grado de doctor en su modalidad europea.



Dr. Pascual Pérez Ballesta

Scientific Officer

European Commission

Joint Research Centre
Institute for Environment and Sustainability

Via Enrico Fermi 2749 – 21027 Ispra (VA) Italy
Tel. +39 0332 78 5322 Fax. +39 0332 78 9364
pascual.ballesta@jrc.ec.europa.eu



Trabajo presentado para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Murcia
Con Mención internacional del título de doctor
Murcia, 21 de mayo de 2012

Dalje Sunith Barbosa Trillos
Licenciada en Química

El presente trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia, a través del proyecto “Diseño, operación y modelización de procesos continuos biorreactor enzimático-módulo de membrana. Aplicación a la eliminación de contaminantes fenólicos de efluentes industriales”. Ref.: CTQ2007-64327/PPQ.

Durante la ejecución del presente trabajo, su autora, Dalje Sunith Barbosa Trillos, ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Por todo ello, expresamos nuestro más sincero agradecimiento a dicha institución.

*A eso de caer y volver a levantarte,
de fracasar y volver a comenzar,
de seguir un camino y tener que torcerlo,
de encontrar el dolor y tener que afrontarlo.
A eso no le llames adversidad, llámale
Sabiduría.*

*A eso de sentir la mano de Dios y saberte impotente,
de fijarte una meta y tener que seguir otra,
de huir de una prueba y tener que encararla,
de planear un vuelo y tener que recortarlo.,
de aspirar y no alcanzar, de querer y no poder,
de avanzar y no llegar.
A eso no le llames castigo, llámale
Enseñanza.*

*A eso de pasar días radiantes,
días felices, días tristes,
días de soledad y días de compañía.
A eso no le llames rutina, llámale
Experiencia.*

*A eso de que tus ojos miren y tus oídos oigan,
tu cerebro funcione y tus manos trabajen,
tu alma irradie, tu sensibilidad sienta,
y tu corazón ame.
A eso, no le llames poder humano, llámale
Milagro divino...*

Anónimo....

Han sido muchas las ocasiones en las que he pensado, en cómo sería el día en que escribiera los agradecimientos de mi tesis, cada vez que lo hacía un flash de recuerdos de todas y cada una de las personas que lo han hecho posible aparecían en mi mente, acompañado de un rocío que resbalaba por mis mejillas, pues no es un secreto, que este logro me ha significado sudor y lagrimas. . . . y ahora que estoy a un paso de conseguirlo y que me invade la nostalgia por la etapa concluida, quiero agradecer en primer lugar, al grupo de investigación "Análisis y Simulación de procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana", muy especialmente en la persona del Dr. D. José Luis Gómez Carrasco, como investigador principal, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por la paciencia y tolerancia que siempre ha tenido en las diferentes situaciones que se me han presentado.

Mis más sinceros agradecimientos a mis directores de tesis el Dr. D. José Luis Gómez Carrasco y la Dra. Dña. M^a Fuensanta Máximo Martín, por su dedicación incondicional, acertada orientación en todo momento y paciencia constante, en el desarrollo de esta Tesis.

Agradezco también a la Dra. Dña. Elisa Gómez Gómez por estar siempre pendiente de mí y por mostrarme su apoyo en todo momento.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Dña. Josefa Bastida Rodríguez por su cercanía y amabilidad a cada instante, y a la Dra. Dña. M^a Claudia Montiel Morte por su amabilidad.

Quiero agradecer con especial cariño al Dr. Antonio, como siempre le he dicho, por ser quien es y por su amabilidad hacia a mí desde el primer momento.

Sería imposible olvidar a la Dra. Asunción María Hidalgo Montesinos, Asun, a quien quiero expresar un profundo agradecimiento por su cariño y por haber sido siempre tan especial conmigo en estos 4 años.

Muchas gracias a todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, porque siempre han sido muy amables conmigo, quiero decir gracias también a María y María Dolores que siempre han estado dispuestas a colaborarme en todo lo que he necesitado, a Gloria por escuchar mis largas historias en la sobremesa y Ana Belén, Dori, Rocío y Sofí por los cafés tan divertidos que he compartido en su compañía.

Quiero agradecer también al Dr. Joao Crespo y a la Dr. Carla Brazinha por brindarme la oportunidad de estar en su grupo de investigación en la Universidad Nueva de Lisboa (Portugal) aprendiendo un poco más de membranas, y por su amabilidad en todo momento.

También agradezco a la Dra. Elizabeth Agostini y a su grupo de investigación en la Universidad Nacional de Río Cuarto (Argentina) por darme la oportunidad de investigar en su grupo y haber podido conocer y compartir con persona tan lindas como la Pao, la Cintia, la Sabri, la Orne, el Lucas y todo el resto del combo, quienes me hicieron sentir como en casa desde el primer día.

A Pili, mi Pili quiero decirle gracias de todo corazón por su bonita amistad, por haber estado tan pendiente de mí en todos estos años, por todas sus invitaciones, por las noches de salsa, por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado. A Fer, a Luisito, a Carlos (Panamá) y a Manolo gracias por los momentos bonitos que he compartido con Ustedes y a José Ginés miles de gracias por estar siempre dispuesto a ayudar.

Gracias miles, a mis amigos del alma, que a pesar de la distancia siempre han estado ahí para mí, a Mi Ferchito a quien quiero como un hermano, quiero darle las gracias por impulsarme a continuar mi sueño cuando me veía desfallecer, quiero pedirle también que siga luchando, que hay muchas cosas que aún nos quedan por vivir. A mi Caris, ¡qué decir de mi Caris!, gracias por su amistad, por sus esperas con Jorgito en el aeropuerto el Dorado de Bogotá cuando retornaba a mi bella COLOMBIA, por todos los hermosos e inolvidables momentos que hemos compartido, como bien diríamos, POR SER FELICES, a Jorgito un gracias enorme porque nunca ha tenido un no para mí y por robarme una sonrisa con sus lindas frases cuando aparecía en el msn. A todo el combo de CEFACIANOS (Edgar, Pato, Andrea y Martha) gracias por apoyarnos cuando más lo necesitamos, a Nelícita gracias por estar siempre pendiente de mí y a Rocío mi compañerita de aventura en Lisboa mil gracias por su compañía y por estar siempre dispuesta a ayudar

A Gustavo decirle gracias por haber sido una de las razones, por la cual inicie mi aventura en el antiguo continente, gracias por su disponibilidad y ayuda en todo lo que necesite a mi llegada a España.

A Yannick gracias por ser quien es, por todo su cariño y sus cuidados, por haber estado siempre que necesite alguien para escucharme, por su ayuda incondicional, por estas y muchas cosas más
GRACIAS DE CORAZÓN

Por último y no menos importante quiero agradecer profundamente a mi Familia por creer en mí, sin su apoyo nada de esto hubiera podido ser posible, en especial gracias a mi madre por ser mi ejemplo de vida, esfuerzo y superación a ella le debo todo lo que soy, a mi padre gracias por todo su cariño, a mi hermano Lencho gracias por su apoyo, a pesar de nuestras diferencias siempre aparece cuando lo he necesitado (así es la familia), a mis hermanas Nana y Liz, gracias por su cariño, por todos los momentos lindos que hemos vivido, a mi sobrino Levin gracias por estar ahí, a Juan Román y a Tiago gracias por ser la nueva alegría de la familia y a JULIANA mi hija, mi reina hermosa, las palabras se quedan cortas para decirle GRACIAS desde lo más profundo de mi corazón por entender y compartir mis sueños.

Al universo llamado Dios gracias por haber conspirado para que este sueño se haya hecho
REALIDAD.

*A mi JULIANA, mi hija hermosa, por ser
la razón de mi existencia. . . .*



ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Fenol y clorofenoles: descripción y problemática medioambiental	9
2.1.1. Problemática medioambiental e impactos sobre la salud humana	14
2.2. Vertido de efluentes fenólicos	16
2.3. Legislación ambiental	24
2.3.1. Normativa vigente europea	24
2.3.2. Normativa vigente española	25
2.3.3. Normativa vigente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia...	27
2.4. Tratamientos de eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales	30
2.4.1. Tratamientos físicos.....	31
2.4.1.1. Adsorción sobre carbón activo y otros materiales	31
2.4.1.2. Extracción con disolventes	33
2.4.1.3. Tecnologías de membrana	33
2.4.2. Tratamientos químicos.....	37
2.4.2.1. Oxidación húmeda	38
2.4.3. Tratamientos biológicos	45
2.4.3.1. Degradación por microorganismos	46
2.4.3.2. Eliminación por enzimas	47
2.4.3.3. Degradación por cultivos de algas	49
2.4.3.4. Degradación por plantas	49
2.5. Aplicación de las peroxidasas en la eliminación de compuestos fenólicos	50
2.5.1. Peroxidasa de rábano (HRP)	55
2.5.2. Peroxidasa de soja (SBP)	56
2.5.3. Peroxidasa de alcachofa (AKPC)	59
2.6. Inmovilización de enzimas	59
2.6.1. Métodos de inmovilización de enzimas	60
2.6.2. Inmovilización de la enzima peroxidasa y su aplicación en la eliminación de compuestos fenólicos	63
2.7. Cinética del proceso de eliminación de compuestos catalizado por peroxidasas	68
2.8. Reactores continuos para la eliminación de compuestos fenólicos	77
2.9. Antecedentes inmediatos de tratamientos enzimáticos en compuestos fenólicos	80

3. MATERIALES Y MÉTODOS	83
3.1. Materiales	85
3.1.1. Reactivos	85
3.1.1.1. Reactivos utilizados en la determinación de la actividad enzimática	85
3.1.1.2. Reactivos utilizados en la valoración de la disolución patrón de peróxido de hidrógeno	86
3.1.1.3. Reactivos utilizados en la eliminación de compuestos fenólicos	87
3.1.1.4. Reactivos utilizados en la determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos	87
3.1.1.5. Reactivos utilizados en la determinación de proteína por el método de Lowry	87
3.1.1.6. Reactivos utilizados en la inmovilización de la enzima	88
3.1.1.7. Reactivos y material utilizados en la determinación de fenol y 4-clorofenol por HPLC	88
3.1.2. Equipos	89
3.1.2.1. Equipo utilizado en la eliminación de los compuestos fenólicos	89
3.1.2.2. Equipo utilizado en la inmovilización de la enzima	90
3.1.2.3. Equipos analíticos	90
3.2. Métodos	92
3.2.1. Método analítico utilizado en la factoración de la disolución de peróxido de hidrógeno	92
3.2.2. Determinación de la actividad enzimática..	92
3.2.3. Determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos....	94
3.2.4. Determinación de fenol y 4-clorofenol mediante HPLC..	96
3.2.5. Determinación de proteína por el método de Lowry	98
3.2.6. Inmovilización de la enzima a PG-aldehído a través de grupos amino..	100
3.2.7. Caracterización de los derivados inmovilizados.	101
3.2.7.1. Cantidad de enzima inmovilizada	102
3.2.7.2. Determinación del porcentaje de actividad enzimática retenida	102
3.2.8. Experimentación en reactor tanque discontinuo	103
3.2.8.1. Ensayos para determinar el pH óptimo y T ^a óptima de las tres peroxidasas en forma soluble	103
3.2.8.2. Ensayos con la enzima inmovilizada	104
3.2.9. Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima en soluble	105
3.2.9.1. Calibrado de las bombas	105
3.2.9.2. Puesta en marcha y modo de operación	106

3.2.9.3. Ensayos sin reacción	108
3.2.9.4. Ensayos con reacción	109
3.2.9.4.1. Ensayos con enzima solo en el reactor. Estabilidad operacional	109
3.2.9.4.2. Ensayos con adición complementaria de enzima en la corriente de alimentación	110
3.2.9.4.3. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero	110
3.2.9.4.4. Ensayos para la eliminación de mezclas de fenol y 4-clorofenol	111
3.2.10. Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada	112
3.2.10.1. Calibrado de las bombas	112
3.2.10.2. Puesta en marcha y modo de operación	112
3.2.11. Experimentación en reactor de lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada.	114
3.3. Series experimentales	115
3.3.1. Selección de la mejor peroxidasa para la eliminación de 4-clorofenol.	115
3.3.1.1. Determinación de la actividad enzimática	115
3.3.1.2. Reactor tanque discontinuo. Determinación del pH óptimo, T ^a óptima y estabilidad al almacenamiento en el proceso de eliminación de 4-clorofenol	116
3.3.1.3. Estudios preliminares en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Estudio de pérdida de actividad	117
3.3.2. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima soluble	118
3.3.2.1. Determinación de las condiciones óptimas de operación	118
3.3.2.2. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero.....	119
3.3.3. Resultados y caracterización del derivado inmovilizado....	119
3.3.3.1. Determinación del porcentaje de actividad retenida	119
3.3.4. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada	120
3.3.4.1. Series experimentales	120
3.3.5. Reactor de lecho fluidizado asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada	121
3.3.5.1. Series experimentales	121

3.3.6. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Eliminación de diferentes compuestos fenólicos clorados ..	122
3.3.6.1. Determinación de la actividad enzimática	122
3.3.6.2. Serie experimental	123
3.3.7. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Mezcla de compuestos fenólicos .	123
3.3.7.1. Series experimentales	123
4. COMPARACIÓN DE PEROXIDASAS COMERCIALES EN LA ELIMINACIÓN DE 4-CLOROFENOL	125
4.1. Determinación de la actividad enzimática	127
4.2. Reactor tanque discontinuo	129
4.2.1. Determinación del pH óptimo y T ^a óptima para el proceso de eliminación	129
4.2.1.1. pH óptimo	130
4.2.1.2. Comparación del pH óptimo obtenido, mediante medidas de actividad y en reactor tanque discontinuo	132
4. 2.1.3. T ^a óptima	133
4. 2. 2. Estabilidad al almacenamiento .	136
4.3. Estudio preliminar en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie	137
4.3.1. Estudios de pérdida de actividad de las tres peroxidasas...	138
4.3.1.1. Ensayo sin reacción	138
4.3.1.2. Ensayo con reacción. Estabilidad operacional	141
5. REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA CON PEROXIDASA DE SOJA EN SOLUBLE	147
5.1. Series experimentales	149
5.1.1. Variación de la concentración de SBP en el reactor .	150
5.1.2. Variación de la adición complementaria de enzima en la corriente de alimentación	151
5.1.3. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1 ...	154
5.1.4. Variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno...	155
5.1.5. Variación conjunta de la concentración inicial de enzima en el reactor y el tiempo espacial	157
5.2. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero	159
6. CARACTERIZACIÓN DEL DERIVADO INMOVILIZADO DE SOJA	163
6.1. Caracterización del derivado inmovilizado	165

6.1.1. Cantidad de enzima inmovilizada.	166
6.1.2. Determinación del porcentaje de actividad enzimática retenida....	166
7. REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA CON PEROXIDASA DE SOJA INMOVILIZADA	169
7.1. Series experimentales	171
7.1.1. Variación de la concentración de SBP en el reactor	172
7.1.2. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1	174
7.1.3. Variación del caudal de alimentación.	176
7.1.4. Adiciones sucesivas de enzima	177
8. REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA	181
8.1. Series experimentales	183
8.1.1. Variación de la altura inicial del lecho..	184
8.1.2. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1	186
8.1.3. Variación del caudal de alimentación.	188
9. COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS CONFIGURACIONES DE REACTOR	191
9.1. Resultados y Discusión	193
10. MODELO DE DISEÑO DEL REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA	199
10.1. Modelo de diseño	201
10.1.1. Esquema global del conjunto biorreactor-módulo de membrana...	201
10.1.2. Hipótesis.	202
10.1.3. Ecuaciones de balance de materia.	204
10.1.3.1. Balance de materia para el compuesto fenólico en el tanque	204
10.1.3.2. Balance de materia para el 4-clorofenol en la membrana	205
10.1.3.3. Concentración de 4-clorofenol en el permeado	206
10.1.3.4. Balance global de materia para el peróxido de hidrógeno	207
10.1.3.5. Balance global de enzima en la membrana	208
10.1.3.6. Balance global de enzima en el sistema...	209
10.2. Resolución y ajuste del modelo	211
10.2.1. Método de resolución y algoritmo de cálculo..	211
10.2.2. Discusión	217
10.3. Nomenclatura	218

11. ELIMINACIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS CLORADOS	221
11.1. Determinación de la actividad enzimática	223
11.2. Serie experimental.....	225
11.2.1. Variación de la concentración de SBP en el reactor	226
11.2.2. Comparación y discusión..	229
12. ELIMINACIÓN DE MEZCLAS DE FENOLES.....	231
12.1. Series experimentales	233
12.1.1. Variación de la concentración inicial de enzima en el reactor y la alimentación	233
12.1.2. Influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol.....	240
12.1.3. Influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol.	242
12.1.4. Comparación y discusión..	244
13. OTRAS ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO	247
13.1. Caracterización de las diferentes isoenzimas de peroxidasas	250
13.1.1. Obtención de extracto crudo total de peroxidasas	250
13.1.2. Determinación de la actividad enzimática..	250
13.1.3. Estabilidad al almacenamiento	251
13.1.4. Determinación del punto isoeléctrico (pI) e índice de Reinheitszahl(RZ).	253
13.1.5. Determinación del peso molecular (PM).	254
13.2. Series experimentales en reactor tanque discontinuo	256
13.2.1. Variación de la cantidad de unidades de peroxidasa en el reactor	257
13.2.2. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1	259
13.2.3. Variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno	261
13.2.4. Estudio comparativo de las tres peroxidasas.	264
13.2.5 Comportamiento de las peroxidasas en estudio frente a un efluente industrial	266
14. CONCLUSIONES	271
15. BIBLIOGRAFÍA	279
16. ANEXOS	317
17. RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL EN INGLÉS	365



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El género humano se ha distinguido en el transcurso de su desarrollo por la búsqueda de una mejor calidad de vida; este interés ha requerido el crecimiento de conocimientos y avances tecnológicos. Sin embargo todo este adelanto ha tenido repercusiones negativas para nuestro planeta afectando en mayor parte al sistema acuático, que no podemos olvidar forma el 70% de la superficie de éste.

En los años precedentes los procesos de producción generaban subproductos de fabricación que no se podían utilizar comercialmente, y por ello eran vertidos. Estos vertidos se realizaban sin tener en cuenta el tipo de sustancias, tóxicas o contaminantes, y las repercusiones que tenían sobre el medio que las rodeaba. Esta práctica era usual desde la primera revolución industrial hasta la década de los ochenta del siglo XX [1]. El avance de las tecnologías ha permitido mejorar los procesos, y con ello disminuir la cantidad de subproductos producidos [2].

Los efluentes residuales se puede clasificar según su origen en: efluentes urbanos e industriales. Estos últimos son del interés de nuestro estudio especialmente aquellos que tiene como principal carga contaminante compuestos fenólicos los cuales tienen muy diversas procedencias: la fabricación de conservas vegetales, plásticos, resinas, pinturas, industrias papeleras, textiles, etc. Su presencia es perjudicial, tanto para el medio ambiente como para la salud humana, por tratarse de sustancias tóxicas y

corrosivas difíciles de degradar. Debido a estas características, el fenol y sus derivados halogenados han sido considerados contaminantes críticos prioritarios. En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo investigador y económico por solucionar el problema de la presencia de fenol y sus derivados en vertidos líquidos, prueba de ello es la gran cantidad de artículos publicados sobre su eliminación.

Existen varios procesos disponibles para la eliminación de fenoles, pero, las desventajas que presentan algunos de estos tratamientos (costos elevados, alto consumo de energía, producción de biomasa, generación de productos secundarios tóxicos, alteración del ambiente, entre otras...) hacen que se busquen nuevas alternativas, ya que no existe un método claramente ventajoso. El proceso enzimático se presenta como una buena opción, y se ha desarrollado en las últimas dos décadas principalmente con el uso de peroxidasas extraídas de plantas y microorganismos.

Las peroxidasas catalizan la oxidación de fenol y sus derivados, en presencia de peróxido de hidrógeno, generando radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros. Éstos son insolubles y de fácil separación por métodos convencionales. Es importante mencionar que, para llevar a cabo la eliminación de estos contaminantes fenólicos a escala industrial, es necesario el empleo de un proceso continuo, que pueda ser automatizado y que permita operar durante largos periodos.

Como ya se mencionó, hasta la fecha han sido numerosos los trabajos que se han realizado en el ámbito del biotratamiento de efluentes fenólicos. En esta línea, el grupo de Investigación “Análisis y Simulación de Procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana”, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, ha venido trabajando en diferentes proyectos con el propósito de estudiar distintos sistemas para la eliminación de compuestos fenólicos con tratamientos enzimáticos.

Como continuación de estos trabajos, en la presente Tesis se estudiará el proceso de eliminación de 4-clorofenol empleando para ello tres peroxidasas: una nueva enzima de soja, con excelentes propiedades *a priori*, que nos suministró una empresa norteamericana, una de rábano que ya había sido

utilizada por el grupo investigador, y adicionalmente una peroxidasa de alcachofa producida en la Región de Murcia. Una vez seleccionada la mejor peroxidasa, la investigación se enfocará al estudio de dos configuraciones de reactor en continuo (tanque continuo y de lecho fluidizado), en ambos casos asociados a un módulo de ultrafiltración, utilizando la enzima libre e inmovilizada.

Los principales objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Evaluación de la influencia de las variables más relevantes, como pH y temperatura, en la eliminación del 4-clorofenol catalizada por las tres peroxidasas en estudio. Esta se realizará tanto en cubetas espectrofotométricas, midiendo velocidades iniciales, como en reactores tanque discontinuo, midiendo conversiones a lo largo del tiempo. Estos ensayos serán la herramienta para seleccionar la peroxidasa más adecuada para el proceso cuyo diseño se pretende abordar.
2. Estudio de la influencia de las variables de operación más relevantes sobre la conversión alcanzada de 4-clorofenol en un reactor tanque continuo asociado a un módulo de ultrafiltración, con la peroxidasa seleccionada.
3. Inmovilización de la enzima seleccionada mediante enlace covalente a un soporte de vidrio poroso y caracterización del derivado obtenido, analizando su comportamiento en la eliminación de 4-clorofenol.
4. Estudio de la influencia de las variables de operación más destacadas sobre la conversión alcanzada de 4-clorofenol en reactor tanque continuo asociado a un módulo de ultrafiltración, utilizando la peroxidasa inmovilizada.
5. Experimentación en reactor de lecho fluidizado con la peroxidasa inmovilizada, estudiando la influencia de las variable de operación más relevantes.

6. Comparación de los resultados obtenidos en los diferentes reactores continuos para establecer cuál es la configuración más adecuada para la eliminación de 4-clorofenol.
7. Formulación y validación de un modelo de diseño para la mejor configuración de reactor que haya sido seleccionada tras el cumplimiento de la tarea recogida en el objetivo anterior.
8. Estudio del comportamiento de la enzima frente a la eliminación en continuo de fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol, utilizando la configuración de reactor que haya sido seleccionada tras el cumplimiento de la tarea recogida en el objetivo 6.
9. Estudio del comportamiento de la enzima frente a la eliminación de una mezcla de fenol y 4-clorofenol, utilizando la configuración de reactor que haya sido seleccionada tras el cumplimiento de la tarea recogida en el objetivo 6.
10. Finalmente, estudio comparativo entre la peroxidasa seleccionada tras el cumplimiento de la tarea descrita en el objetivo 1, y extractos crudos obtenidos a partir de cultivos de raíces transformadas de nabo y tabaco transgénico wt, para la eliminación de 4-clorofenol.



2. ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 Fenol y clorofenoles: descripción y problemática medioambiental

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener un núcleo aromático unido a un grupo hidroxilo y se clasifican en monohidroxílicos, dihidroxílicos, trihidroxílicos, etc. según el número de grupos hidroxilo.

Generalmente los fenoles se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, que es el fenol. Algunas veces, los fenoles se denominan hidroxicompuestos y los metilfenoles reciben el nombre especial de cresoles.

Los fenoles abundan en la naturaleza y sirven como intermediarios en la síntesis industrial de productos tan diversos como adhesivos y antisépticos. Por ejemplo el fenol mismo es un desinfectante general que se encuentra en el alquitrán de hulla.

Por otra parte, los fenoles, como los alcoholes, contienen el grupo -OH, teniendo estas familias algunas características semejantes. Sin embargo, tanto en la preparación, como en las propiedades estos compuestos son bastante diferentes, y es necesario clasificarlos en distintas familias.

Los fenoles son mucho más ácidos que los alcoholes por ello es posible separar un componente fenólico de una mezcla de compuestos, por medio de una simple extracción con disolvente acuoso básico y posterior reacidificación.

Como regla general, los fenoles con sustituyentes electrófilos son más ácidos, puesto que estabilizan el ion fenóxido al deslocalizar la carga negativa [3].

El fenol: en forma pura es un sólido cristalino de color blanco-incoloro a temperatura ambiente. Su fórmula química es C_6H_5OH , es conocido también como ácido fénico o ácido carbólico. La Figura 2.1 muestra su estructura química. Tiene un punto de fusión de 41 °C y un punto de ebullición de 182 °C. Su presión de vapor es 47 Pa a 20 °C. Su densidad relativa (agua = 1) es 1.07 y su solubilidad en agua es de 9.3 g por 100 ml a 20 °C, pK_a 9.89 en agua a 25 °C. Puede sintetizarse mediante la oxidación parcial del benceno.

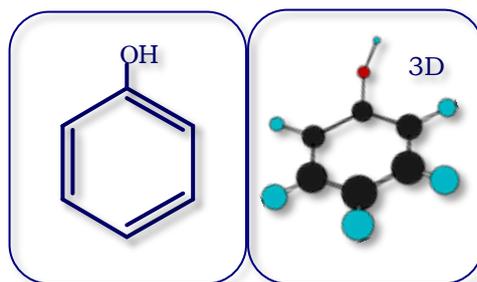


Figura 2.1. Estructura química del fenol.

Industrialmente se obtiene mediante oxidación de cumeno (isopropil benceno) a hidroperóxido de cumeno, que posteriormente, en presencia de un ácido, se escinde en fenol y acetona, que se separan por destilación.

Se puede detectar el sabor y el olor del fenol a niveles más bajos que los asociados con efectos nocivos. El fenol se evapora más lentamente que el agua y una pequeña cantidad puede formar una solución con agua. Se inflama fácilmente, corrosivo y sus gases son explosivos en contacto con la llama.

Se usa principalmente en la producción de resinas fenólicas. También se usa en la manufactura de nylon y otras fibras sintéticas. Es muy utilizado en

la industria química, farmacéutica y clínica como un potente fungicida, bactericida, sanitizante, antiséptico y desinfectante, también para producir agroquímicos, bisfenol A (materia prima para producir resinas epoxi y policarbonatos), en el proceso de fabricación de ácido acetilsalicílico (aspirina) y en preparaciones médicas como enjuagues bucales y pastillas para el dolor de garganta.

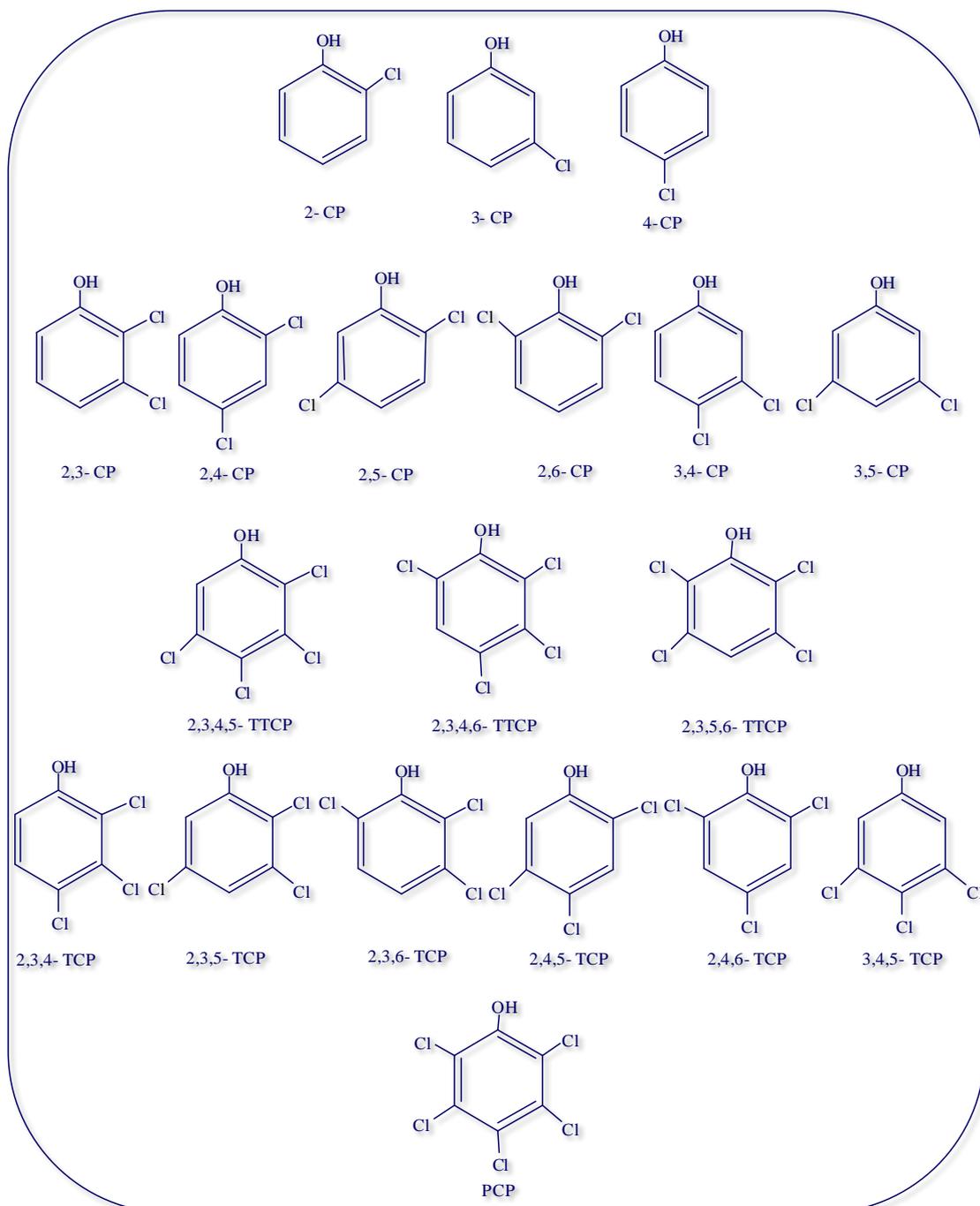


Figura 2.2. Familia de clorofenoles.

Un grupo importante de los fenoles, son los derivados halogenados (clorofenoles). Dicho grupo consta de 19 diferentes compuestos, éstos incluyen 3 monoclorofenoles, 6 diclorofenoles, 6 triclorofenoles, 3 tetraclorofenoles y el pentaclorofenol. En la Figura 2.2 se muestra la estructura química de todos estos compuestos. Las propiedades de cada uno de ellos dependerán de la naturaleza de los grupos presentes en el anillo bencénico. En general, los clorofenoles son sólidos incoloros (excepto el 2-clorofenol), son muy solubles en disolventes orgánicos y poco solubles en agua. Presentan un olor penetrante desagradable y son muy tóxicos. Dentro de este gran grupo, sólo el 2-clorofenol es líquido a temperatura ambiente y es el que presenta mayor solubilidad en agua [4].

Debido al amplio espectro de propiedades antimicrobianas de los clorofenoles, han sido utilizados para la preservación de la madera, pinturas, fibras vegetales y cuero. También como desinfectantes, herbicidas, fungicidas e insecticidas y como intermedios en la fabricación de productos farmacéuticos y tintes. Asimismo como antisépticos, especialmente el 4-clorofenol.

El 4-clorofenol: también llamado *p*-clorofenol es un compuesto aromático de fórmula empírica C_6H_4ClOH [5]. La Figura 2.3 muestra su estructura química. Es sólido a temperatura ambiente, incoloro y cristalino. Tiene un punto de fusión de 43 °C y un punto de ebullición de 220 °C. Su presión de vapor es 13 Pa a 20 °C. Su densidad relativa (agua = 1) es 1.2 y su densidad relativa como vapor (aire = 1) es 4.44. Su solubilidad en agua es moderada (2.7 g por 100 ml a 20 °C), pK_a 9.20 en agua a 25 °C. Se obtiene principalmente por cloración del fenol o de la *p*-cloroanilina. Presenta un fuerte olor y sabor a producto medicinal.

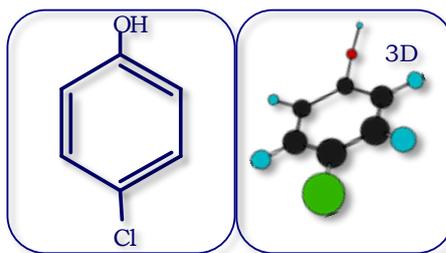


Figura 2.3. Estructura química del 4-clorofenol.

El 3-clorofenol: también llamado *m*-clorofenol es un compuesto aromático de fórmula empírica C_6H_4ClOH [6]. La Figura 2.4 muestra la estructura química del 3-clorofenol. Este es sólido a temperatura ambiente, cristal amarillo claro, de olor característico. Tiene un punto de fusión de $33\text{ }^\circ\text{C}$ y un punto de ebullición de $214\text{ }^\circ\text{C}$. Su densidad relativa (agua = 1) es 1.268. Su solubilidad en agua es moderada (2.6 g por 100 ml a $20\text{ }^\circ\text{C}$), pK_a 8.80 en agua a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

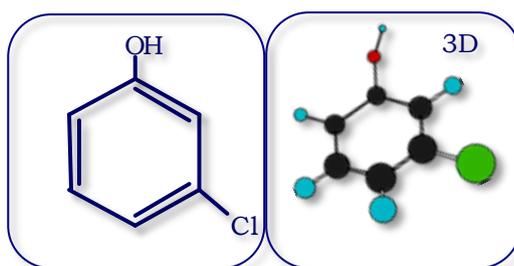


Figura 2.4. Estructura química del 3-clorofenol.

El 2-clorofenol: también llamado *o*-clorofenol es un compuesto aromático de fórmula empírica C_6H_4ClOH [7]. La Figura 2.5 muestra la estructura química del 2-clorofenol. Este es líquido a temperatura ambiente, incoloro, de olor característico. Tiene un punto de fusión de $7\text{ }^\circ\text{C}$ y un punto de ebullición de $174\text{ }^\circ\text{C}$. Su presión de vapor es 230 Pa a $20\text{ }^\circ\text{C}$. Su densidad relativa (agua = 1) es 1.262. Su solubilidad en agua es moderada (2.8 g por 100 ml a $20\text{ }^\circ\text{C}$), pK_a 8.11 en agua a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

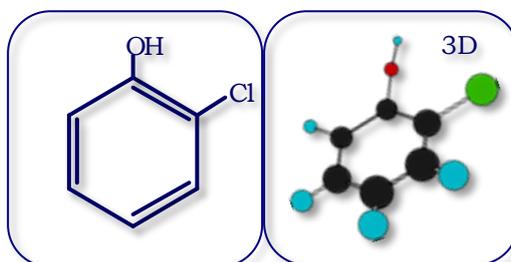


Figura 2.5. Estructura química del 2-clorofenol.

2.1.1. Problemática medioambiental e impactos sobre la salud humana

Los fenoles y clorofenoles son compuestos orgánicos muy tóxicos y ampliamente distribuidos en el medio ambiente acuático y terrestre. Estos compuestos se encuentran presentes en aguas residuales de industrias químicas y petroquímicas, carboníferas, textiles, papeleras entre otras. Los clorofenoles comercialmente relevantes son obtenidos por cloración directa del fenol utilizando cloro gas. Normalmente, en el producto comercial hay impurezas de otros isómeros del clorofenol.

Durante sus procesos de fabricación o en su utilización como pesticidas, se transfieren al medio ambiente. La mayoría de ellos van a parar a las aguas, donde se eliminan por biodegradación, foto-descomposición y volatilización. El 4-clorofenol por ejemplo, se caracteriza por ser uno de los derivados clorados del fenol de mayor volatilidad y tiene gran tendencia a formar vapores. Cuando están en la atmósfera, los rayos solares propician su destrucción parcial y vuelven al suelo a través del agua de lluvia quedando retenidos en el suelo y en los sedimentos del fondo de los lagos, ríos o escorrentías. Cuando hay bajos niveles en el agua, suelo o sedimentos, éstos son descompuestos por microorganismos y se eliminan del medio ambiente en pocos días [8]. En la Tabla 2.1 se muestra el tiempo necesario para la degradación aerobia de clorofenoles en suelo.

Las aguas residuales industriales no son la única fuente de estos compuestos; las aguas residuales domésticas también contribuyen relevantemente debido a que los clorofenoles son usados como insecticidas, fungicidas, desinfectantes y antisépticos en el hogar. Esta fuente repercute directamente en el medio ambiente.

Tabla 2.1. Degradación aerobia de clorofenoles en suelo

Compuesto	Porcentaje de descomposición (%)	Tiempo (días)
2-clorofenol	67	40
3-clorofenol	31	160
4-clorofenol	5	20
2,4-diclorofenol	31	40

Por otro lado, la desinfección de agua potable por medio de cloración puede originar la formación de clorofenoles. El cloro disuelto en agua reacciona rápidamente con los compuestos fenólicos (fenol, guayacol, catecol) produciendo derivados mono- di- o triclorados muy solubles y citotóxicos por su facilidad para atravesar membranas celulares.

Toxicidad

El fenol, de ser ingerido en altas concentraciones, puede causar envenenamiento, vómitos, decoloración de la piel e irritación respiratoria. En el caso de los clorofenoles, al compararlos con otras clases de compuestos orgánicos, muestran grados de toxicidad variable, dependiendo de la cantidad de cloros presente en el anillo aromático y de la pureza de la muestra. Así, entre los monoclorofenoles, el 4-clorofenol es más tóxico que el 2- o 3-clorofenol, a su vez el 2- y 3-clorofenol son considerablemente más tóxicos que los fenoles diclorados, pero menos tóxicos que el pentaclorofenol.

Los clorofenoles se absorben vía digestiva al consumir agua contaminada o alimentos que contienen residuos de clorofenoles, también se pueden absorber a través de la piel por exposición, que es particularmente importante en los trabajadores de la industria química. Asimismo estos compuestos pueden ser absorbidos por los pulmones. Aproximadamente el 80% es expulsado por los riñones sin haber sufrido ninguna transformación.

La presencia de clorofenoles en aguas puede ser fácilmente detectada por el olor y sabor medicinal que le imparten; en la Tabla 2.2 se presenta la concentración en $\mu\text{g}/\text{l}$ que pueden ser detectadas mediante el sentido del gusto y olfato. Los principales síntomas de intoxicación por clorofenoles son: agitación respiratoria, temblores, ligeras convulsiones, náuseas, vómitos y dolor abdominal, aunque dosis elevadas de clorofenoles pueden llegar a producir la muerte. En cuanto a su posible poder cancerígeno no hay datos que lo atestigüen, ni para humanos ni para animales.

Tabla 2.2. Concentraciones de clorofenoles en agua que pueden ser detectados por su olor y sabor [8]

Compuesto	2-clorofenol ($\mu\text{g/l}$)	4-clorofenol ($\mu\text{g/l}$)	2,4-clorofenol ($\mu\text{g/l}$)
Olor	0.33	33.0	0.60
Sabor	0.10	0.10	0.30

El 4-clorofenol por ejemplo, se descompone al calentarlo intensamente, produciendo humos tóxicos y corrosivos de cloro y ácido clorhídrico. Por razones como está se encuentra en la lista de sustancias peligrosas que ha sido elaborada por DOT (Departamento de Transporte), DEP (Departamento de Protección al Medio Ambiente de New Jersey), NFPA (Asociación Nacional para la Protección contra los incendios) y EPA (Agencia de Protección al Medio Ambiente) de USA [4]. Además los clorofenoles se encuentran dentro de los contaminantes tóxicos prioritarios según la Decisión Europea 2455/2001/EC.

Los clorofenoles no sólo son perjudiciales para el ser humano, sino que también afectan la vida de otros mamíferos y la acuática. Los valores publicados de LD_{50} para ratas son 570-670 mg/kg y de LC_{50} para organismos acuáticos son 2-14 ppm/96 horas [8].

Considerando la importancia de todos los riesgos enumerados para la salud y el medio ambiente, y teniendo en cuenta que la presencia de compuestos fenólicos y sus derivados clorados en las aguas residuales dificultan los tratamientos de depuración convencionales, surge la necesidad de estudiar posibles tratamientos específicos para alcanzar la calidad de las aguas establecida por la legislación, que es cada vez más estricta. También se plantea la posibilidad de la reutilización de las aguas contaminadas por los compuestos fenólicos, para un posible nuevo consumo o para riego, especialmente en regiones donde el agua es un recurso escaso.

2.2. Vertido de efluentes fenólicos

Los compuestos fenólicos están presentes en efluentes de desecho de varias industrias como la de conversión del carbón, conservación de la madera, farmacéutica, textil, manufactura del papel, cervecera, fabricación de

resinas, industria química y del petróleo, entre otros. A continuación se describen los procesos y actividades de las diversas industrias que generan efluentes líquidos que contienen compuestos fenólicos [9]:

- Química:
Obtención de herbicidas, fungicidas, insecticidas y biocidas; producción de adhesivos, gomas y gelatinas; preparación de antisépticos, desinfectantes y detergentes y champús; elaboración de material pirotécnico y explosivo.
- Farmacéutica:
Principios activos terapéuticos, baños agotados en procesos de fermentación, agua de limpieza del lavado de los suelos, aguas sanitarias del laboratorio, etc.
- Plásticos:
Producción de resinas fenol-formaldehído, bisfenol A y moldeo.
- Textil:
Proceso de cloración.
- Petroquímica:
Obtención de bisfenol, fenoxialcoholes, pentaclorofenol, desalinización del petróleo crudo, refinado de bases lubricantes y destilación primaria del crudo.
- Madera:
Conservación de la madera con creosota o pentaclorofenol.
- Papelera:
Obtención de la pasta, producción de celulosa blanca.
- Fotográfica:
Revelado e impresión de películas fotográficas.
- Siderúrgica:
Limpieza de los gases de los hornos de coque (28-3900 mg/l).
- Galvánica:
Baños de cobre ácido, en baños de cinc cianurado, o baños de cinc alcalino y en el desencalado.
- Alimentaria (oleícola, vinícola y cervecera):
Producción de orujo, en el alpechín y en las aguas residuales.

En el Registro Europeo de Emisiones de Sustancias Contaminantes (EPER) se incluye a los clorofenoles dentro del grupo de contaminantes denominado fenoles. Este registro recopila cada tres años los datos de las emisiones generadas al aire y al agua de los complejos industriales de los Estados Miembros [10]. Sin embargo a la fecha no han sido actualizados, manteniendo aún la información recopilada hasta el 2004.

Estas emisiones se clasifican en dos grupos, los vertidos directamente a cauce o a mar (emisiones directas), y los vertidos a través del sistema de alcantarillado hasta una depuradora externa municipal o industrial (emisiones indirectas).

En las Tablas 2.3 y 2.4 se muestran los vertidos directos y los indirectos, de los países miembros de la Unión Europea en 2004 [10]. En dichas tablas se puede apreciar que España ocupó el primer lugar de emisiones directas y el décimo puesto de emisiones indirectas.

Tabla.2.3. Emisiones directas de compuestos fenólicos al agua por Estado miembro en el año 2004 (toneladas/año).

País	Emisiones totales directas (t/a)
Portugal	0.11
Finlandia	0.16
Austria	0.47
Dinamarca	0.47
Irlanda	0.69
Bélgica	0.72
República Checa	0.96
Hungría	1.34
Grecia	1.85
Países Bajos	3.07
Eslovaquia	3.13
Suecia	7.82
Alemania	13.45
Italia	21.75
Francia	35.54
Polonia	38.13
Reino Unido	162.38
España	229.06

Tabla 2.4 Emisiones indirectas de compuestos fenólicos al agua por Estado miembro en el año 2004 (toneladas/año).

País	Emisiones totales indirectas (t/a)
Irlanda	0.05
Letonia	0.21
Eslovenia	0.13
Dinamarca	1.20
Bélgica	2.28
Portugal	3.15
Finlandia	3.56
España	7.82
Francia	10.13
Polonia	18.99
Países Bajos	22.20
Reino Unido	55.47
Eslovaquia	108.00
Italia	149.82
Austria	340.13
República Checa	611.60
Alemania	841.97

Asimismo, en la Figura 2.6 se representa el porcentaje de cada país sobre el total de las emisiones directas e indirectas de fenoles en la unión europea.

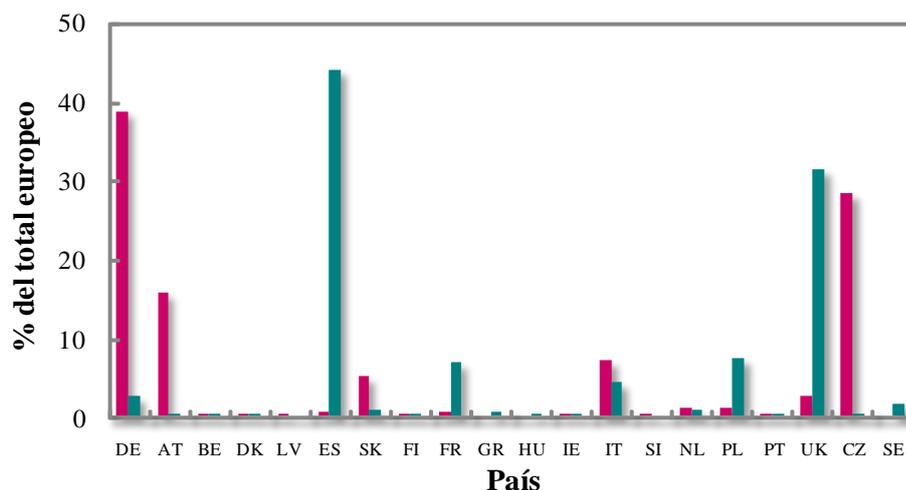


Figura 2.6. Porcentajes de emisiones de fenol a agua por Estado Miembro en el año 2004. ■ directas e ■ indirectas.

A continuación se presentan los valores de vertidos de fenoles en España por actividad industrial, complejo industrial y por Comunidad Autónoma.

En la Tabla 2.5 se muestran las emisiones de fenol por actividad en España en el año 2010. En dicha tabla se observa que algunas de las industrias predominantes de vertidos son: refinerías de petróleo y gas, producción de fundición o aceros brutos, y la fusión de metales no ferrosos. Los valores de la Tabla 2.5 se representan mediante el gráfico de sectores en la Figura 2.7.

Tabla 2.5. Emisiones totales de fenoles (como C_{total}) agrupadas por actividad en España en el año 2010 (toneladas/año).

Actividad	*Agua (t/año)
Refinerías de petróleo y gas	4.6098
Instalaciones de combustión > 50 MW	0.1150
Producción de fundición o aceros brutos (capacidad > 2.5 t/h)	9.6797
Laminado en caliente (capacidad > 20t acero bruto/h)	0.1870
Fusión de metales no ferrosos (> 4 t/día plomo y cadmio o > 20 t/día resto de metales)	3.6550
Tratamiento de superficie por procedimiento electrolítico o químico (volumen de cubetas o líneas completas > 30 m ³)	0.0925
Fabricación hidrocarburos simples	0.0868
Fabricación hidrocarburos oxigenados	0.3768
Fabricación hidrocarburos nitrogenados	0.0660
Fabricación materias plásticas de base	0.0520
Fabricación colorantes y pigmentos	0.4651
Procedimiento químico o biológico para fabricación de medicamentos de base	0.3161
Fabricación de explosivos	1.5200
Incineración de los residuos municipales (capacidad > 3 t/h)	0.0536
Eliminación de residuos no peligrosos (capacidad > 50 t/día)	0.0655
Vertederos (recepción >10 t/día o capacidad total >25.000 t, excluidos residuos inertes)	0.8748
Fabricación de papel y cartón (capacidad >20 t/día)	0.2485
Plantas industriales para la fabricación de otros productos básicos de la madera (capacidad de producción de 20 t/día)	0.0306
Mataderos (capacidad de producción canales > 50 t/día)	0.1836
Fabricación productos alimenticios a partir de materia prima vegetal (capacidad producción producto acabado >300 t/día)	0.6050
Tratamiento previo o tinte de fibras o productos textiles (capacidad >10 t/día)	0.9919
Tratamiento de suspensión con disolventes orgánicos (capacidad de consumo > 200 t/año)	0.2557
Total	24.53

* Emisiones directas e indirectas de fenoles totales al agua

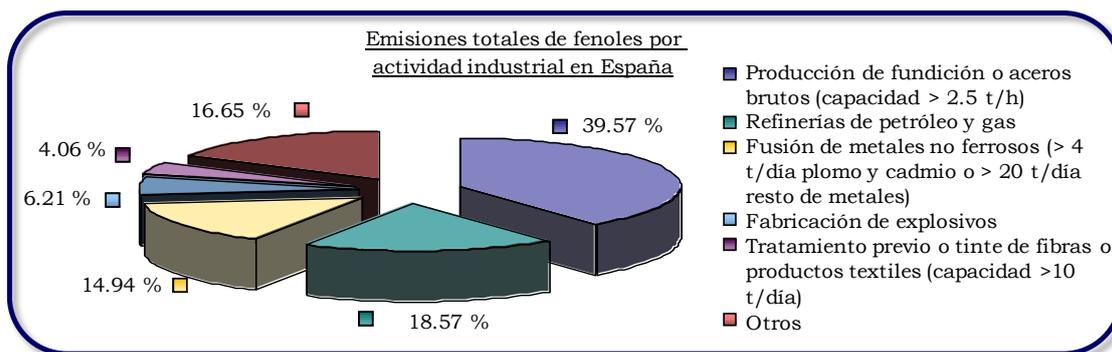


Figura 2.7. Emisiones de fenoles en España por actividad industrial en el año 2010.

Los complejos industriales generadores de emisiones de compuestos fenólicos se recogen en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Complejos industriales generadores de emisiones (toneladas/año) de fenoles al agua en España en el año 2010.

Nombre del complejo	*Agua (t/año)
ACERÍA COMPACTA DE BIZKAIA, S.A. (ACERÍA COMPACTA DE BIZKAIA)	0.0478
AGRICONSA	0.1530
ARCELOMITAL ESPAÑA - PLANTA SIDERÚRGICA DE AVILÉS Y GIJÓN	9.3800
ASHLAND CHEMICAL HISPANIA (CANTABRÍA)	0.0288
BAYER HISPANIA S.L.	0.0288
BAYER MATERIALSCIENCE, SL (TARRAGONA)	0.0660
BILBANIA DE ALQUITRANES, S.A. (BILBANIA ALQUITRANES)	0.0867
BIOETANOL GALICIA	0.0507
BP OIL REFINERÍA DE CASTELLÓN	0.0526
CELLA II	0.0306
CELSA. - POLIGON INDUSTRIAL DEL LLOBREGAT	0.1870
CELSA. - POLIGON INDUSTRIAL SANT VICENC	0.1870
CENTRO DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE GALICIA	0.0244
CLARIANT IBERICA PRODUCCIÓN, S.A. (EL PRAT DE LLOBREGAT)	0.1815
CLARIANT IBERICA S.A. (CASTELLBISBAL)	0.1060
COMPLEJO MEDIOAMBIENTAL DE CERDEDA	0.0238
CORRUGADOS GETAFE	0.0649
CONSORCIO DE AGUAS BILBAO BIZKAIA, S.A.D. (ESTACIÓN DEPURADORA AGUAS RESIDUALES DE GALINDO SESTAO)	0.6540
CORRUGADOS GETAFE	0.0649
DAICOLORCEHM EU S.A.	0.0230
DEPÓSITO CONTROLADO DEL MAS VELL	0.1400

2. Antecedentes.

Nombre del complejo	Agua (t/año)
DEPÓSITO DE MONTICAÑO	0.0256
EXPAL SISTEMA DE PROPULSIÓN MURCIA – FÁBRICA DE MURCIA	0.0200
FÁBRICA DE GUADARRANQUE (CEPSA QUÍMICA)	0.0861
FÁBRICA DE PALOS DE LA FRONTERA (CEPSA QUÍMICA)	0.1170
FABRICA DE VILLARICOS (DERETIL, S.A.)	0.1510
FÁBRICA GUARDAMAR (VB AUTOBATERÍAS)	3.6550
GARBIKER A.B. (S.A.), S.A. (GARBIKER - IGORRE)	0.0289
GENERAL DYNAMICS SANTA BÁRBARA SISTEMAS	1.5000
GENRAL QUÍMICA, S.A.	0.1546
GOMA-CAMPS S.A.U.	0.0255
HEINEKEN ESPAÑA VALENCIA	0.4040
HUNTSMAN ADVANCED MATERIALS SPAIN, S.L.	0.0270
INTERQUIM, S.A.	0.0280
IVECO ESPAÑA	0.0925
MANCOMUNIDAD MUNICIPAL DE SAN MARCOS, C.L. (VERTEDERO DE AIZMENDI)	0.0256
MEDICHEM, S.A.	0.0430
NEWARK SAN ANDRES	0.1400
PAPELERA DE PRINCIPADO S.A.- PAPRINSA-	0.0830
PLANTA DE RECICLAJE DE R.S.U. Y VERTEDERO CONTROLADO DE ONDA	0.1100
PLAN DE SECADO DE LODOS (DEPURADORA SUR)	0.1150
PLATAFORMA CONTINENTAL, S.L. (GRUPO DAMM)	0.0480
PSA PEUGEOT CINTROEN, CENTRO DE MADRID	0.0297
PSA PEUGEOT CINTROEN, CENTRO DE VIGO	0.2260
REFINERÍA GIBRALTAR	2.2800
REFINERÍA LA RÁBIDA	0.2480
REFINERÍA TENERIFE	0.0950
REPSOL PETRÓLEO S.A.	0.3970
REPSOL PETRÓLEO, S.A. – C.I. CARTAGENA	0.0682
REPSOL QUÍMICA C.I. PUERTOLLANO	0.0232
REPSOL QUÍMICA, S. A.	0.096
REPSOL YPF REFINO ESPAÑA, COMPLEJO INDUSTRIAL DE TARRAGONA	1.4690
SADA P.A. VALENCIA (RAFELBUNYOL)	0.1070
SATI GRUPO TEXTIL, S.A.	0.0222
TEXTIL SANTANDERINA, S.A.	0.4813
TEXTIL ATHENEA	0.0603
URQUIMA S.A.	0.0653
UVESA, S.A.	0.0766
VERTEDERO DE CANA PUTXA	0.0206
VERTEDERO DE ZALLA	0.4770
WINTEX. POLÍGONO INDUSTRIAL LA PEDRERA	0.4280
XILO GALICIA SL	0.0227
ZABALGARBI, S.A. (ZABALGARBI)	0.0298
Total	24.53

* Emisiones directas e indirectas de fenoles totales al agua

Tabla 2.7. Emisiones totales de fenoles en el año 2010 por Comunidades Autónomas.

CC.AA	*Total (t/año)
Asturias (Principado de)	9.4088
Comunidad Valenciana	5.1099
Andalucía	2.9587
Cataluña	2.5546
Castilla y León	1.5000
País Vasco	0.9159
Cantabria	0.5102
Castilla - La Mancha	0.4202
Galicia	0.3732
Madrid (Comunidad de)	0.3502
Navarra (Comunidad Foral de)	0.1670
Canarias	0.0950
Murcia (Región de)	0.1162
Aragón	0.0306
Balears (Illes)	0.0206
Total	24.53

* Emisiones directas e indirectas de fenoles totales al agua

En la Tabla 2.7 y en la Figura 2.8 se muestra la distribución la emisión de fenoles totales vertidos por Comunidades Autónomas.

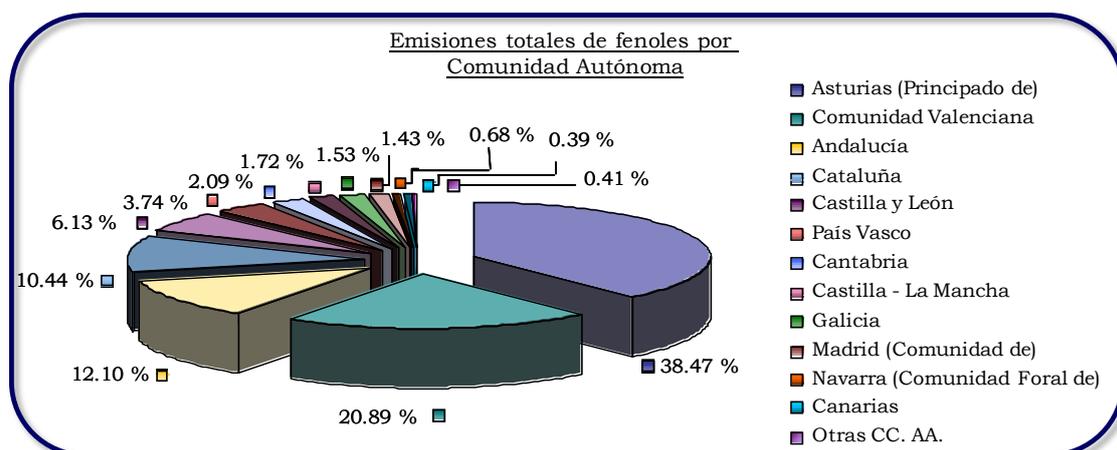


Figura 2.8. Emisiones totales de fenoles por Comunidad Autónoma en España en 2010.

2.3. Legislación ambiental

El grado de contaminación al que ha llegado nuestro planeta ha generado la necesidad de que todos los estamentos que conforman nuestra sociedad se inclinen por procesos productivos más eficientes y "limpios", que reduzcan o eliminen el uso y producción de sustancias peligrosas, teniendo en cuenta varios aspectos tales como la lógica desde el punto de vista científico, mayor seguridad que en los procesos convencionales, menor coste y compatibilidad con un desarrollo sostenible. De ahí que la legislación sobre residuos y vertidos industriales sea cada más severa y restrictiva

En la Unión Europea los temas ambientales cobran cada vez más protagonismo y, de hecho, una tercera parte de lo que se legisla se refiere a este tema. La política de la Unión Europea se basa en la convicción de que el crecimiento económico, el progreso social y la protección del medio ambiente son necesarios para la mejora de la calidad de vida.

Dentro de la legislación ambiental consultada, en relación a la presencia de estos compuestos en el agua, se observa que para el 4-clorofenol, 3-clorofenol y 2-clorofenol no existe una normativa específica, encontrándose éstos incluidos, con el resto de clorofenoles al fenol y a los demás compuestos fenólicos, dentro del grupo que se denomina "fenoles totales".

Se ha consultado la Normativa Ambiental Europea, Estatal y Autonómica y a continuación se resumen dichas normativas, así como los valores máximos permitidos de fenoles en función del uso del agua y del tipo de cauce donde sean vertidos.

2.3.1. Normativa vigente europea

- Directiva del consejo 76/464/CEE, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad. (DOCE nº 129/L, 18/05/76)

- Directiva del consejo, de 15 de julio de 1980, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. (DOCE nº 229/L, 30/08/80)
- Directiva del Consejo 91/271/CEE, del 21 de mayo del 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. (DOUE nº 135/L, 30/05/91)
- Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. (DOUE nº 330/L, 05/12/98)
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. (DOUE nº 327/L, 22/12/00)
- Decisión nº 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. (DOUE nº 331/L, 15/12/01)
- Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. (DOUE nº 348/L, 24/12/08)

2.3.2. Normativa vigente española

- Real Decreto 849/1986, de 11 de abril de 1976, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los títulos preliminar I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. (BOE nº 103, 30/04/1986)
- Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, en desarrollo de los títulos II y III de la Ley de Aguas, (BOE nº 209. 31/08/1988)
- Real Decreto 258/1989, de 10 de marzo, por el que se establece la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar. (BOE nº 64. 16/03/1989)

- Real Decreto 1541/1994, de 8 de julio, por el que se modifica el anexo número 1 del reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, aprobado por el Real Decreto 927/1988, de 29 de julio. (BOE nº 179. 28/07/1994)
- Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establece las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. (BOE nº 77. 29/03/1996)
- Real Decreto 1664/1996, de 24 de julio, por el que se aprueban los Planes Hidrológicos de cuenca. (BOE nº 191. 11/08/1998)
- Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. (BOE nº 176. 24/07/2001)
- Ley 16/2002, de 1 de julio, de Prevención y Control Integrados de la Contaminación. (BOE nº 157. 02/07/2002)
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (BOE nº 45. 21/02/2003)
- Real Decreto 606/2003, de 23 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos preliminar, I, IV, V, VI y VII de la ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. (BOE nº 135. 06/06/2003)
- Orden MAM/1873/2004, de 2 de junio, por la que se aprueban los modelos oficiales para la declaración de vertido y se desarrolla determinados aspectos relativos a la autorización de vertido y liquidación del canon de control de vertidos regulados en el Real Decreto 606/2003, de 23 de mayo, de reforma del Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos preliminar, I, IV, V, VI y VIII de la ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. (BOE nº 147. 18/06/2004)
- Real Decreto-Ley 2/2004, de 18 de junio, por el que se modifica la Ley 10/2001, de 5 de julio, del Plan Hidrológico Nacional. I, IV, V, VI y VIII de la ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. (BOE nº 148. 19/06/2004)

- Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. I, IV, V, VI y VIII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. (BOE nº 19. 22/01/2011)

2.3.3. Normativa vigente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia

- Real Decreto 16/1999, de 22 de abril, sobre vertidos de aguas residuales industriales al alcantarillado. (BORM nº 97. 29/04/1999)
- Ley 3/2000, de 12 de julio, de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de la Región de Murcia e Implantación del Canon de Saneamiento. (BORM nº 175. 29/07/2000)
- Decreto 90/2002, de 24 de mayo por el que se aprueban los Estatutos de la entidad de Saneamiento de Depuración de la Región de Murcia. (BORM nº 90. 24/02/2002)
- Ley 3/2002, de 20 de mayo, de Tarifa de Canon de Saneamiento. (BORM nº 128. 04/06/2002)
- Decreto nº 316/2007, de 19 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento del Canon de Saneamiento de la Región de Murcia. (BORM nº 316. 19/10/2007)
- Ley 4/2009, de 14 de mayo, de Protección Ambiental Integrada. (BORM nº 4. 14/05/2009)

Se ha encontrado en la legislación estatal y autonómica de aplicación, los valores límite de los fenoles totales en agua. En ella se ha diferenciado por un lado la normativa en el caso de la presencia de estos compuestos en el agua potable; que viene regulada por el Real Decreto 140/2003, que establece los criterios sanitarios sobre la calidad del agua del consumo humano y, por otro, la legislación vigente en relación a las concentraciones límite de estos contaminantes en las aguas residuales en función del tipo de vertido que se autorice.

La normativa que establece los valores de concentración máxima de fenol en aguas potables se expone a continuación:

• Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre (BOE de 20 de septiembre de 1990), donde la concentración máxima admisible de fenoles totales en agua potable es de 0.5 µg/l. Este Real Decreto estuvo vigente hasta el 22 de febrero de 2003 y fue sustituido por el Real Decreto 140/2003, el cual incorpora al derecho interno español la Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998. Este Real Decreto establece los criterios sanitarios de la calidad del agua del consumo humano.

• Real Decreto 1541/1994, de 8 de julio, por el que se modifica el Anexo I del Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, aprobado por el Real Decreto 927/1988, de 29 de julio (BOE de 31 de agosto de 1988). Fija como límite de concentración de fenoles totales permitidos en aguas superficiales susceptibles de ser destinadas a consumo humano lo siguiente:

- Aguas de calidad A1: 0.001 mg/l.
- Aguas de calidad A2: 0.005 mg/l.
- Aguas de calidad A3: 0.1 mg/l.

Las aguas se clasifican de A1 a A3 en orden decreciente de calidad y, por tanto, presentan una mayor necesidad en cuanto a los tratamientos de potabilización:

- Tipo A1: tratamiento físico simple y desinfección.
- Tipo A2: tratamiento físico normal, tratamiento químico y desinfección.
- Tipo A3: tratamiento físico y químico intensivos, afino y desinfección.

La normativa relacionada con los vertidos, diferencia tres tipos de autorización según sea:

- ✚ Vertido al mar.
- ✚ Vertido a cauce público.
- ✚ Vertido a la red de saneamiento.

Las competencias para la autorización de estos vertidos son las siguientes: en el caso de vertidos al mar, las competencias las tiene asignadas la propia Comunidad Autónoma; en el caso de cauce público el organismo que debe realizar la autorización es la Confederación Hidrográfica de la Cuenca, que en el caso de la Región de Murcia, corresponde a la Confederación Hidrográfica del Segura, y por último, son los Ayuntamientos quienes poseen las competencias para autorizar los vertidos al alcantarillado.

A continuación, se va a considerar el tipo de cauce donde se va a producir el vertido del efluente líquido y cuál es la normativa que se ha encontrado al respecto, en cuanto al contenido máximo permitido de fenoles en vertidos industriales en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia:

- Real Decreto 258/1989, BOE nº 64 16-3-89, de 10 de marzo, por el que se establece la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar, indicando una concentración máxima de 0.5 mg/l de fenoles totales en vertidos al mar.

- Decreto 16/1999, de 22 de abril, sobre vertidos de aguas residuales al alcantarillado, BORM nº 97 29-4-99. En el Anexo I viene una relación de distintas industrias cuyos efluentes contienen fenoles totales. En el Anexo II, se clasifican los clorofenoles como residuos tóxicos y peligrosos. En el Anexo III, el valor máximo instantáneo de fenoles totales es de 2 mg/l y en el Anexo IV, vienen los métodos analíticos para la determinación de fenoles:
 - Destilación y espectrofotometría de absorción atómica.
 - Método de la 4-aminoantipirina.

- En vertidos a cauce público, se distinguen tres grupos de calidad según el Real Decreto 1664/1998, BOE nº 191 11-8-98:
 - El primer grupo de calidad comprende todos los cauces de las subcuencas de los ríos Segura y Mundo, hasta el punto de su confluencia, y la concentración máxima permitida es de 0.001 mg/l.

- El segundo grupo de calidad abarca el río Segura, en el tramo comprendido entre la confluencia con el río Mundo y su confluencia con el Guadalentín, y todos los cauces afluentes a este tramo, así como la cabecera del río Guadalentín, hasta Lorca. En este grupo la concentración máxima de fenoles totales es de 0.002 mg/l.
- El tercer grupo incluye todos los demás cauces no comprendidos en alguno de los dos grupos anteriores, y la concentración máxima de fenoles totales permitida es de 0.05 mg/l.

La normativa en cuanto a actividades potencialmente contaminantes del suelo viene especificada en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero. La importancia de este Real Decreto se debe a que cuando llueve, los compuestos que hay en el suelo pueden contaminar las aguas subterráneas mediante un proceso de lixiviación. En el Anexo V, de este Decreto, se determinan los niveles genéricos de referencia para la protección de la salud humana en función del uso del suelo. En concreto, para el 4-clorofenol o 3-clorofenol no vienen niveles pero sí para otros compuestos fenólicos como el fenol y el 2-clorofenol.

2.4. Tratamientos de eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales

Para llevar a cabo el tratamiento y eliminación de aguas residuales, se dispone en la actualidad de una amplia gama de tecnologías denominadas tradicionales y/o convencionales que, sin embargo, muchas veces se muestran claramente insuficientes o dan lugar a un costo adicional elevado. En la práctica, la aplicación de los métodos de tratamiento debe tener en cuenta fundamentalmente la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes a tratar. Por lo tanto debido a las propiedades bactericidas del fenol y sus derivados, estos efluentes no pueden ser tratados en las plantas depuradoras biológicas convencionales, dado que a concentraciones de 50 mg/l inhiben la reproducción de los microorganismos y en concentraciones

del orden de 1 g/l destruyen completamente la flora y la fauna de las depuradoras [11].

Además, el tratamiento final con cloro, en las plantas depuradoras, produce clorofenoles, de olor y sabor desagradable en el agua, incluso a muy bajas concentraciones (ppb). En el caso de 2-clorofenol, concentraciones de estos productos superiores a 200 ppm no pueden ser efectivamente tratados por métodos biológicos directos debido a su efecto antimicrobiano [12, 13]. De ahí que el tratamiento de aguas residuales conteniendo fenol y/o clorofenoles tiene que hacerse por otros métodos de tratamiento alternativos para estos tipos de efluentes.

En la bibliografía, aparecen un gran número de alternativas que eliminan compuestos fenólicos. Busca y col. [14] han realizado una revisión de dichas alternativas haciendo una comparación de las diferentes técnicas, encontrando buenos resultados en tratamientos químicos, físicos y biológicos.

2.4.1. Tratamientos físicos

Entre los tratamientos físicos para la eliminación de compuestos fenólicos destaca la adsorción sobre carbón activo, adsorción sobre resinas, la extracción y las tecnologías de membranas.

2.4.1.1. Adsorción sobre carbón activo y otros materiales

El desarrollo de adsorbentes baratos, como el carbón activo [15-18], para el tratamiento de aguas residuales, es un área de investigación importante en la ciencia medioambiental. Algunas plantas como las siderúrgicas y las de fertilizantes han utilizado diversos adsorbentes para la eliminación de compuestos fenólicos, entre ellos el carbón activo, consiguiendo una eliminación de fenol próxima al 45%. Esta técnica implica un bajo coste de producción, aunque se ha comprobado que estos métodos sólo son eficaces cuando se opera con bajas concentraciones de compuestos fenólicos y grandes tiempos de residencia. En muchos casos se requiere de un pretratamiento para la eliminación de sólidos suspendidos, aceites, grasas y compuestos químicos inestables presentes en los residuos.

Se han realizado muchos estudios sobre la preparación de carbón activo de bajo coste a partir de subproductos, o la utilización directa de éstos como adsorbentes, para la eliminación de compuestos fenólicos. Para ello, se han empleado diversos materiales, concretamente: cáscara de coco [19, 20], fangos activados y cenizas [21], semillas de palmera [22], semillas del árbol de caucho [23], carbón bituminoso [24], barro procedente de residuos de la industria del aluminio [25, 26], fangos de plantas de fertilizantes [27, 28], mazorcas de maíz [29] y cáscaras de plátano [30].

Estos materiales adsorbentes de bajo coste han presentado buenas capacidades de adsorción, concretamente el carbón activo preparado a partir de cáscaras de coco consiguió un rendimiento de eliminación de 4-clorofenol del 98% [19, 20]. Utilizando residuos de la industria del aluminio y fangos de plantas fertilizantes [25, 28] el rendimiento de eliminación del 4-clorofenol también es muy alto, estableciéndose el siguiente orden de eficacia de eliminación de los compuestos fenólicos con este material:

2,4-diclorofenol > 4-clorofenol > 2-clorofenol > fenol

Por otro lado, las resinas adsorbentes más utilizadas son de estructuras basadas en polímeros de estireno-divinilbenceno, ésteres acrílicos, fenol-formaldehído o polivinilo [31-37].

En los procesos de adsorción sobre resinas [34] el residuo es introducido de modo descendente en el lecho de resina, el cual está contenido en un tanque cilíndrico cerrado de acero inoxidable, o de acero recubierto de caucho. La ventaja respecto a la adsorción en carbón es que la intensidad de la fuerza de atracción entre las moléculas de soluto y la resina es más débil, y por tanto es más fácil la regeneración.

Otros tipos de adsorbentes pueden ser las zeolitas [38-40], arcilla modificada [41], bentonita [42-43], serrín [44], fangos activados [45], piedra pómez [46], alginato [47], y hongos secos [48].

Un estudio reciente utilizó microcápsulas de polisulfona porosa (PSF) que contienen fosfato de tributilo (TBP) como agente de extracción y

nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) para la adsorción de 4-clorofenol, 2-clorofenol, 4-nitrofenol y fenol [49]. Los resultados obtenidos se ofrecen como una alternativa interesante en el tratamiento de estos compuestos.

2.4.1.2. Extracción con disolventes

La extracción líquido-líquido tiene la ventaja de recuperar el compuesto fenólico, disminuyendo así los costes de operación [50]. El proceso utiliza disolventes que presentan alto coeficiente de reparto (metil isobutil cetona (MIBK) y diisopropil éter (DIPE)) y una cinética de transporte rápida. Estos procesos de extracción se suelen utilizar industrialmente para el tratamiento de efluentes con concentraciones elevadas (hasta 9 g/l) de contaminantes fenólicos; sin embargo se consume una gran cantidad de disolvente.

2.4.1.3. Tecnologías de membrana

En los últimos años, las tecnologías de membrana han adquirido importancia en el amplio campo del tratamiento de aguas, subterráneas, superficiales o residuales. Entre las principales ventajas de esta tecnología, destaca su eficacia, bajo coste y carácter no contaminante, puesto que trabaja sin la adición de productos químicos, con un uso relativamente bajo de la energía y en condiciones de operación suaves.

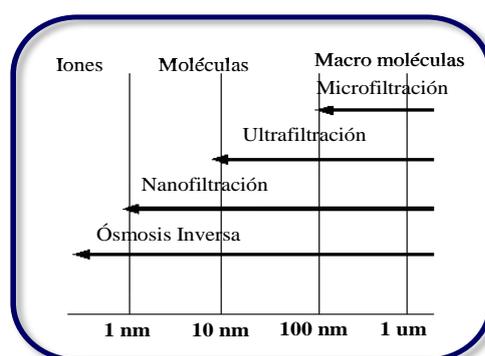


Figura 2.9. Métodos de separación de partículas según su tamaño.

La tecnología de membranas se basa en la acción separadora que ejerce una membrana sobre una mezcla líquida de composición compleja. Mediante

una fuerza impulsora, que bien puede ser un gradiente de presión, de concentración o un potencial eléctrico, se provoca el paso de aquellas especies químicas capaces de atravesar los poros de la membrana. En todos los procesos de membrana la alimentación se divide en dos corrientes: una de ellas pasa a través de la membrana y se denomina “permeado”, y otra, rechazada, “concentrado” o “rechazo”.

Las membranas suelen poseer una distribución de tamaños de poro estrecha. Dichos tamaños se definen como equivalentes al peso molecular de una molécula patrón a partir de la cual se produce la retención de más del 90% del soluto. En la Figura 2.9 y 2.10 podemos ver los distintos métodos de separación por tecnología de membrana según el tamaño de las partículas y tipo de sustancia a separar o eliminar [51].

En la Figura 2.10 se muestra otra clasificación tipo de los distintos procesos de separación con membranas, basada en las distintas sustancias que son capaces de atravesarla.

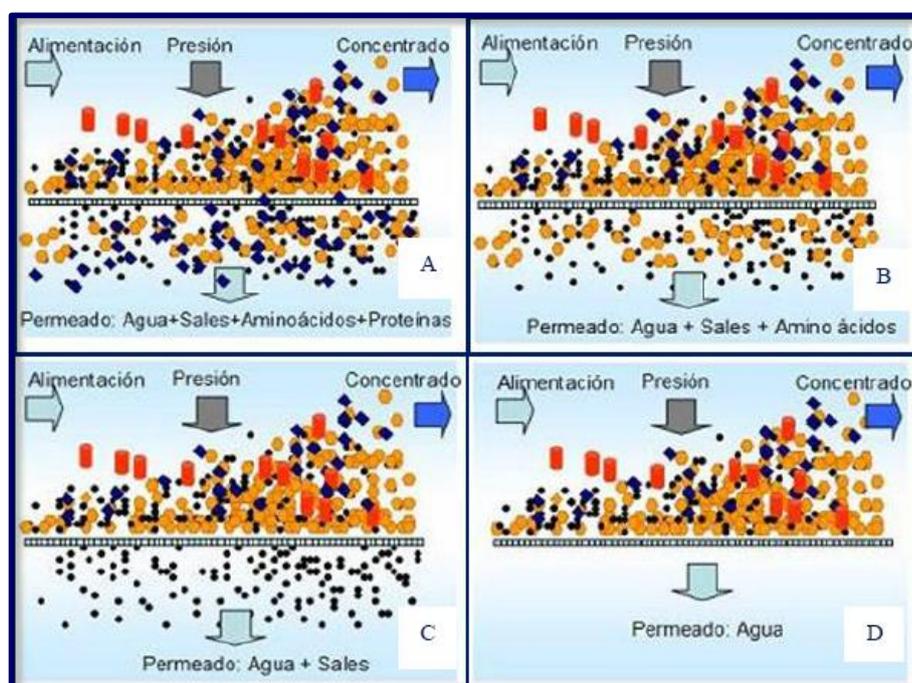


Figura 2.10. Clasificación de los distintos procesos de separación con membranas. A: microfiltración, B: ultrafiltración, C: nanofiltración, D: ósmosis inversa.

Hay dos factores que determinan la efectividad de un proceso de filtración de membrana, la selectividad, que se expresa mediante un parámetro llamado coeficiente de rechazo (expresado en %) y la productividad, que se expresa en $l/m^2 \cdot h$ de líquido permeado. La selectividad y la productividad dependen de cada membrana.

En cuanto a los materiales empleados en su fabricación, las membranas se subdividen en orgánicas (poliméricas) e inorgánicas (cerámicas o metálicas).

Los usos de las membranas orgánicas están muy extendidos, a pesar de que ofrecen un rango de operación más reducido en lo que respecta a temperatura, presión y pH, ya que presentan un menor coste económico. Entre los materiales empleados figuran las poliamidas, polisulfonas, polietersulfonas, celulosa regenerada, ésteres de celulosa, polivinildifluoruro (PVDF), polipropileno, nitrato de celulosa, etc.

Las membranas inorgánicas son más caras que las orgánicas, presentan mejores características fisicoquímicas y tienen una vida útil mayor. Son más resistentes a valores de pH extremos y soportan mejor los cambios de temperatura. Entre sus materiales de fabricación se incluyen el dióxido de zirconio, dióxido de titanio, carbono y dióxido de aluminio.

Las tecnologías que utilizan membranas presentan algunas ventajas frente a las técnicas de separación existentes:

- Son procesos que transcurren a baja temperatura. Es por esto que la ósmosis inversa y la ultrafiltración se utilizan ampliamente en las industrias de productos lácteos, alimentos y bebidas, en aplicaciones como clarificación y pre-concentración de zumos de fruta, clarificación de la salmuera de carne para la eliminación de bacterias y su reutilización, concentración de clara de huevo y huevo entero, y otros muchísimos ejemplos de la industria alimentaria [52].
- Es un proceso de bajo coste energético. La mayor parte de la energía requerida es la necesaria para bombear los líquidos a través de la

membrana. La cantidad total de energía utilizada es mínima comparada con las técnicas alternativas, tales como evaporación.

- El proceso puede cambiar de escala con relativa facilidad.

En la Tabla 2.8 se muestran las características y aplicaciones de las diferentes tecnologías de membrana [53].

Entre las aplicaciones de estas tecnologías a la eliminación de compuestos fenólicos, se han empleado procesos continuos de separación con membranas para la eliminación de fenol en efluentes de refinería [54]. También se han realizado estudios de tratamientos de ósmosis inversa con membranas de baja presión para el rechazo de estos compuestos orgánicos fenólicos [55]. En ellos se ha encontrado que el porcentaje de rechazo de 4-clorofenol a pH 5 fue del 50% y a pH 9 próximo al 65%.

Tabla 2.8. Características y aplicaciones de las distintas tecnologías de membrana

Tecnologías de membrana	Características y Aplicaciones
<u>Microfiltración</u>	Elimina los sólidos en suspensión de tamaño superior a 0,1-1,0 μm . Es efectiva eliminando los patógenos de gran tamaño. Usualmente se emplea como pretratamiento de sistemas con las membranas más delicadas, como la osmosis inversa o la nanofiltración.
<u>Ultrafiltración</u>	Se usa tanto para concentrar como para purificar compuestos de medio y alto peso molecular, tales como proteínas lácteas, carbohidratos y enzimas. Puede emplearse para eliminar todas las partículas coloidales y alguno de los contaminantes disueltos más grandes (0.01 μm).
<u>Nanofiltración</u>	Elimina los contaminantes de tamaño superior al nanómetro (0,001 μm). La tecnología se llama también ablandamiento por membrana, ya que se eliminan del agua los iones de la dureza que tienen 2 cargas (calcio y magnesio) mejor que los que solo tienen una (sodio, potasio, cloro).
<u>Ósmosis inversa</u>	Es una tecnología de membrana en la cual el disolvente (agua) es transferido a través de una membrana densa diseñada para retener sales y solutos de bajo peso molecular. Elimina prácticamente la totalidad de las sales disueltas y los solutos de bajo peso molecular; y el total de los sólidos en suspensión.

Los tratamientos con membranas también han sido aplicados a la eliminación de compuestos que producen olor y sabor en las aguas potables (entre ellos los clorofenoles) [56, 57]. En estos estudios se han probado diferentes tipos de membranas: ultrafiltración, ultrafiltración combinada con carbón activo, nanofiltración y ósmosis inversa, también con membranas de baja presión, encontrando que la ultrafiltración combinada con la adsorción en carbón activo resultó ser la más adecuada para la eliminación de estos compuestos.

Algunas otras aplicaciones, no ya estrictamente de procesos de separación con membranas, sino de tecnologías relacionadas con ellas también se han encontrado en la bibliografía. Un ejemplo son las membranas líquidas, que han sido utilizadas para tratar aguas residuales industriales con distintos compuestos fenólicos. Park y col. [58] comprobaron la viabilidad de esta técnica, obteniendo rendimientos de eliminación de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2-nitrofenol del 99% en dos minutos de contacto.

Por otro lado, Kuntiya y col. [59] trabajaron con un biorreactor de membrana en el que los compuestos fenólicos presentes en aguas residuales industriales se difundían a través de una membrana hidrofóbica semi-permeable de silicona para ser degradados posteriormente en una biopelícula formada por cultivos de *Pseudomonas*.

En esta misma línea de trabajo, recientemente Ng y col. [60] utilizaron líquidos iónicos hidrofóbicos como membranas líquidas para la extracción de fenoles, alcanzando eficiencias de remoción hasta del 98%.

2.4.2. Tratamientos químicos

Dentro de los tratamientos químicos para depuración de aguas residuales con fenoles se encuentran diferentes procesos, todos ellos recogidos dentro del concepto de la oxidación húmeda que se expone a continuación [61].

2.4.2.1. Oxidación húmeda

En los procesos de oxidación húmeda los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en los efluentes (industriales) son oxidados en fase líquida con oxígeno o aire en condiciones de presión y temperatura elevadas. Los procesos de oxidación húmeda se pueden clasificar en procesos térmicos y procesos avanzados de oxidación. En la Tabla 2.9 se muestra una clasificación de los distintos procesos de oxidación húmeda.

Tabla 2.9. Clasificación de los procesos de oxidación húmeda.

Procesos de oxidación húmeda	Procesos térmicos	Oxidación húmeda subcrítica	
		Oxidación húmeda catalítica	
		Oxidación húmeda supercrítica	
	Procesos avanzados de oxidación	<u>Procesos no fotoquímicos</u>	Ozonización en medio alcalino (O ₃ /OH•)
			Ozonización con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂)
			Procesos Fenton (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)
			Oxidación electroquímica
			Radiólisis y y tratamiento con haces de electrones
			Plasma no térmico
			Descarga electrohidráulica-Ultrasonido
			Oxidación en agua sub y supercrítica
			Fotólisis del agua en el ultravioleta a vacío (UVV)
			Ultravioleta/peróxido de hidrógeno (UV/H ₂ O ₂)
			Ultravioleta/ozono (UV/O ₃)
			Foto-Fenton y relacionadas
			Fotocatálisis heterogénea

Procesos térmicos

Se ha demostrado que los procesos térmicos de oxidación son adecuados para efluentes de elevado caudal y carga orgánica, pero tienen el inconveniente de que requieren condiciones de operación severas, con altas presiones y temperaturas.

De los distintos procesos térmicos de oxidación húmeda, el más conocido y el que presenta menores costes es la oxidación húmeda subcrítica, que tiene como principales inconvenientes la formación de materiales poliméricos y compuestos de oxidación de difícil degradación.

En la oxidación húmeda catalítica se pueden utilizar diferentes tipos de catalizadores inorgánicos tales como:

- + K-Dopped y Mn-Ce-O [62].
- + Cu/MCM-41 [63].
- + Óxido de cobalto modificado con hierro [64].
- + Ni/sílice [65, 66].
- + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [67].
- + Catalizador formado por Ni, Pd, Pt, Re y Rh soportados en alúmina y carbón activo [68].
- + Pt y RuO_2 [69, 70].
- + Cu, Ni y Zn [71].
- + Pt/Ce-Zr [72] soportados en membranas.
- + $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ [73].

Esta oxidación presenta condiciones de operación más suaves, pero tiene la dificultad de encontrar un catalizador adecuado para el efluente a tratar.

Respecto a la oxidación húmeda supercrítica [74], su principal ventaja es la rápida y total oxidación de los compuestos pero requiere condiciones de operación muy severas y puede provocar corrosión.

Procesos avanzados de oxidación

Los procesos avanzados de oxidación aprovechan el alto poder oxidante del radical hidroxilo (OH·). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar), u otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica. Las ventajas más destacables de estos procesos son: la eliminación de los efectos que sobre la salud ejercen desinfectantes y oxidantes tales como el cloro, son especialmente útiles para contaminantes refractarios que resisten otros métodos de tratamiento, se logra la mineralización completa del contaminante.

Como se observa en la Tabla 2.9 los procesos de oxidación avanzados se dividen en procesos foto y no fotoquímicos de estos últimos se destacan la ozonización con peróxido de hidrógeno, el proceso Fenton y la oxidación electroquímica, y entre los más relevantes de los procesos fotoquímicos se encuentran la oxidación en agua sub/y supercrítica, la fotólisis del agua en el ultravioleta a vacío (UVV), el proceso foto-Fenton y la fotocatalisis heterogénea.

Procesos no fotoquímicos

➤ Ozonización con peróxido de hidrógeno

El uso de dos o más oxidantes combinados permite aprovechar los efectos sinérgicos de ellos, produciendo una descomposición más completa de la carga orgánica.

Yunzheng y Jianlong. [75] han estudiado la eficacia de eliminación de 4-clorofenol por tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno, llegando al resultado de que con 113 mg/l de ozono se pueden eliminar 20 mg/l de 4-clorofenol. Esta eliminación se produce mediante la transformación del 4-clorofenol en 4-quinona, que posteriormente se oxida a ácido fórmico y ácido oxálico.

➤ Proceso Fenton

Se basan en el descubrimiento a finales del siglo XIX de que las disoluciones de peróxido de hidrógeno y sales ferrosas eran capaces de oxidar los ácidos tartárico y málico. Más tarde se descubrió que se forman radicales hidroxilo en la reacción, y que estos radicales actúan oxidando la materia orgánica, actuando el Fe (II) como catalizador.

El proceso Fenton ha resultado efectivo para degradar compuestos alifáticos y aromáticos clorados, PCBs, nitroaromáticos, colorantes azo, clorobenceno, PCP, fenoles, fenoles clorados, octacloro-p-dioxina y formaldehído. También pueden eliminarse con el reactivo Fenton ácido fórmico, fenol, 2,4-diclorofenol, 4-clorofenol y nitrobenceno [76]. Usando diferentes relaciones molares $H_2O_2/4\text{-clorofenol}$ y H_2O_2/Fe^{2+} , se pudo formular la cinética de destrucción del 4-clorofenol a estudio.

Benitez y col. [77] establecieron el siguiente orden en la eliminación de clorofenoles mediante oxidación con el reactivo Fenton:

4-clorofenol > 2,4-diclorofenol > 2,4,6-triclorofenol > 2,3,4,6-tetraclorofenol

➤ Oxidación electroquímica

Como es sabido, la aplicación de corriente eléctrica (2-20 A) entre dos electrodos sumergidos en agua produce la generación de radicales hidroxilo oxidantes de la materia orgánica. La eficacia del sistema se mejora por la adición de Fe (II), siendo el proceso resultante conocido como electro-Fenton.

En trabajos realizados por Shan y col. [78], se ha establecido que la eliminación de 4-clorofenol mediante el proceso electro-Fenton fue próxima al 86%. Este proceso se llevó a cabo con un ánodo de hierro y un cátodo de fibra de carbono sumergidos en una disolución de peróxido de hidrógeno. Las condiciones óptimas de operación fueron temperatura ambiente, pH 4.5, tiempo de reacción de 60 minutos, concentración de sulfato sódico 3 g/l e intensidad eléctrica de 15.38 A/m².

Iniesta y col. [79] recomiendan que este método sólo debe utilizarse en los casos en los que el agua residual no pueda ser tratada por procesos biológicos, ya que es más costoso.

Procesos fotoquímicos

➤ Oxidación en agua sub/y supercrítica

Estas técnicas han permitido la oxidación de mezclas de contaminantes en agua con oxígeno, o aire, a altas presiones y temperaturas. El proceso, que opera en condiciones subcríticas, es llamado también oxidación en aire húmedo (Wet Air Oxidation o WAO) y se utiliza presiones entre 10-220 bar y temperaturas entre 150-370 °C. El amplio rango de trabajo de temperaturas, presiones y tiempos de residencia, permite tratar en un mismo equipo una gran variedad de contaminantes en un amplio rango de concentraciones.

Una variante de este proceso la desarrolló De-Ak y col. [80], cambiando el agente oxidante por agua oxigenada en el estudio de la oxidación de catecol, 2-clorofenol y fenol en un reactor discontinuo, observando que la conversión seguía este orden: catecol > 2-clorofenol > fenol.

En un estudio reciente Lefèvre y col. [81] realizaron una evaluación precisa de los aspectos termodinámicos y la cinética de degradación de fenol utilizando el proceso de oxidación en aire húmedo. En el esquema cinético de la degradación del fenol han obtenido hidroquinonas, catecol, resorcinol y ácido acético calculando parámetros cinéticos para cada uno de estos compuestos.

➤ Fotólisis del agua en el ultravioleta a vacío (UVV)

Este proceso aprovecha la irradiación a longitudes de onda menores de 190 nm, y usa generalmente lámparas de Xe. La excitación bajo estas longitudes de onda conduce, en la mayoría de los casos, a la ruptura hemolítica de uniones químicas, y produce la degradación de materia orgánica tanto en fase líquida como gaseosa. Sin embargo, el uso más importante de esta técnica es la fotólisis del agua, que produce radicales hidroxilo y átomos

de hidrógeno. Los oxidantes y reductores generados pueden llevar a cabo simultáneamente reducciones y oxidaciones. La técnica se utiliza para la eliminación de contaminantes en agua y para el tratamiento de compuestos difíciles de oxidar (clorados y fluorados).

Jakob y col. [82] utilizaron esta técnica para la eliminación de 4-clorofenol de disoluciones acuosas por medio de los radicales hidroxilos generados en la fotólisis del agua, utilizando una lámpara de Xe a una longitud de onda de 172 nm. Encontrando que no es relevante la concentración de oxígeno, la presencia de carbonatos y nitratos en la eliminación de 4-clorofenol.

Una variante de este proceso es la fotólisis directa de los compuestos fenólicos utilizando lámparas de Xe-Br. Matafonova y col. [83, 84] estudiaron la oxidación de tres compuestos fenólicos: 2-clorofenol, 4-clorofenol y 2,4-diclorofenol mediante lámparas de excitación de este tipo. Realizaron ensayos con concentraciones de los compuestos fenólicos de 10, 20, 50 y 100 mg/l en un foto-reactor continuo, obteniendo buenos resultados en todos los casos.

Gómez y col. [85] utilizaron lámparas de KrCl para la eliminación de 4-clorofenol identificando dos fotoproductos intermedios como son la hidroquinona y la benzoquinona. Sin embargo, en las concentraciones ensayadas, consiguieron la eliminación total de 4-clorofenol y sus fotoproductos intermedios principales. En un segundo trabajo Gómez y col. [86] realizaron un estudio comparativo del uso de las lámparas de KrCl y XeBr para la eliminación fenol y 4-clorofenol en presencia de H_2O_2 encontrando que la lámpara de KrCl requiere de un tratamiento más corto que XeBr para degradar totalmente los compuestos fenólicos. En ambos trabajos se ha propuesto un modelo cinético que proporciona una buena correlación entre los datos experimentales y los calculados.

Esta técnica se ha utilizado también para eliminar el rojo Congo producto generado principalmente por efluentes de la industria textil. Murcia y col. [87] utilizaron lámparas de XeBr, KrCl y Cl_2 en presencia de H_2O_2 obteniendo los

mejores resultados de remoción de rojo Congo (90%) con la lámpara de KrCl en ausencia de H₂O₂.

➤ Proceso foto-Fenton

Este proceso consiste en una oxidación solar fotocatalítica homogénea, produciendo radicales hidroxilo mediante el reactivo Fenton (H₂O₂ con sales de Fe²⁺). Evidentemente, la velocidad de degradación de los contaminantes orgánicos se acelera fuertemente con el uso de radiación ultravioleta-visible, de manera que este proceso también ha sido utilizado satisfactoriamente para la eliminación de 4-clorofenol en disoluciones acuosas [88].

Una comparación de los procesos Fenton y foto-Fenton se ha presentado también en otro trabajo para la eliminación de compuestos clorados y contaminantes orgánicos de un efluente industrial [89]. Ambos métodos se presentan eficaces para la eliminación de estos contaminantes, pero el uso combinado del reactivo Fenton con la luz solar presenta mayores rendimientos. Además, debido a la generación adicional de radicales hidroxilo la eliminación de compuestos fenólicos es mayor con esta técnica, comparada con la fotólisis directa, o con la combinación de ultravioleta/peróxido de hidrógeno.

➤ Fotocatálisis heterogénea

Consiste en la utilización de radiación UV cercana a la solar (longitud de onda menor a 380 nm) con el fin de foto-excitar, en presencia de oxígeno, un semiconductor que actúa de catalizador. Bajo estas circunstancias se generan especies oxidantes que provocan la oxidación de los contaminantes y normalmente se usa como catalizador TiO₂.

La aplicabilidad de la fotocatalisis heterogénea utilizando como catalizador TiO₂ fue primero estudiada para el tratamiento de subproductos clorados (tricloroetileno y tetracloroetileno) disueltos en agua, con buenos rendimientos [90].

Para la eliminación de 4-clorofenol y fenol se han utilizado como fotocatalizadores TiO_2 [91-94], Ti, Zr y mezclas de ambos [95], TiO_2 modificado con nanopartículas de oro [96], titanio modificado [97], Pt/ TiO_2 y Ag/ TiO_2 [98], mezclas de Ti y bentonita [99] y ZnAlFe [100].

Otros trabajos [101-103] han comparado la eficacia de eliminación de 4-clorofenol mediante las distintas técnicas explicadas en este apartado, estableciendo el siguiente orden: UV/ H_2O_2 / Fe^{2+} > UV/ O_3 > UV/ H_2O_2 = UV/ TiO_2 .

Ahmed y col. [104] realizaron una revisión de ciento veinte trabajos con el objetivo conocer el estado actual de la aplicación de fotocatálisis heterogénea en la eliminación de fenoles y sus derivados. Encontrando que recientes hallazgos sugieren que diferentes parámetros, tales como la composición y tipo de fotocatalizador, intensidad de la luz, concentración de sustrato inicial, la cantidad de catalizador, pH del medio de reacción, los componentes iónicos en el agua, los tipos de solventes, agentes oxidantes / aceptores de electrones, el modo de aplicación del catalizador, y las temperaturas de calcinación, puede jugar un papel importante en la degradación fotocatalítica de los compuestos fenólicos.

También se han investigado sistemas con tratamientos combinados. Ince y Apikyan [105] han desarrollado un sistema mixto de adsorción y oxidación fotocatalítica heterogénea para el tratamiento de efluentes fenólicos de baja concentración (40 ppm) que consiste en una primera etapa de adsorción sobre carbón activo, y una segunda en la cual se realiza la destrucción del fenol adsorbido por luz ultravioleta y agua oxigenada, dando buenos resultados.

2.4.3. Tratamientos biológicos

Constituyen una serie de importantes procesos de tratamiento para la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de microorganismos, enzimas, algas ó plantas. Según el agente activo utilizado se pueden dividir, en degradación por microorganismos, enzimas, algas ó por plantas y fitorremediación.

2.4.3.1. Degradación por microorganismos

La degradación por microorganismos consigue rendimientos adecuados para pequeñas concentraciones de contaminantes aunque son más complejos que los métodos enzimáticos.

Los microorganismos presentan metabolismos complicados y han de trabajar en condiciones controladas y estables, pues de manera contraria pierden su funcionalidad. Las ventajas de estos métodos radican, fundamentalmente, en que permiten la completa eliminación de fenoles, no son muy agresivos para el medio ambiente y no presentan costes excesivamente elevados.

Por regla general, la biodegradación de fenoles produce ácido acético y CO₂, pasando por la pirocatequina, o-quinona y ácidos dicarboxílicos.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales suelen realizar el tratamiento biológico como tratamiento secundario, empleando los siguientes sistemas [106]:

- + Lodos activos. Se añade agua con microorganismos a las aguas residuales en condiciones aerobias (burbujeo de aire y/o agitación de las aguas).
- + Filtros bacterianos. Los microorganismos están fijos en un soporte sobre el que fluyen las aguas a depurar. En el sistema se introduce oxígeno suficiente para asegurar que el proceso sea aerobio.
- + Biodiscos. Intermedio entre los dos anteriores. Grandes discos dentro de una mezcla de agua residual con microorganismos facilitan la fijación y el trabajo de los mismos.
- + Lagunas aireadas. Se realiza el proceso biológico en lagunas de grandes extensiones superficiales.
- + Degradación anaerobia. Procesos con microorganismos que realizan su metabolismo en ausencia de oxígeno.

Algunos de los microorganismos utilizados que se encuentran en la bibliografía son:

- *Comamonas terrigena* N3H [107].
- *Neurospora crassa* [108].
- *Phanerochaete chrysosporium* [109], *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum* [110].
- *Candida tropicalis* [111].
- *Pseudomonas putida* [112].
- *Agrobacterium spp.* y *Pseudomonas spp.* [113].
- Cultivos mixtos [114].
- *Acinetobacter calcoaceticus* [115].
- Comunidad de bacterias nativas (*Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*) [116].
- *Emericella nidulans*, *Neurospora intermedia* y *Bacillus*. [117].
- *Rhizopus oryzae* ENHE [118].

Olaniran y Igbinsa [119] realizaron una revisión donde exponen los mecanismos de biodegradación de clorofenoles mediante microorganismos, con el fin de comprender cómo los procesos de biorremediación pueden ser optimizados para la eliminación de estos contaminantes.

2.4.3.2. Eliminación por enzimas

A partir de 1970 se han usado enzimas de plantas y microorganismos para catalizar la oxidación de fenoles. En el Tabla 2.10 se presentan algunas enzimas y sus aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales [120].

El uso de las enzimas tiene cada vez un papel más relevante en la eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales. Dicha eliminación tiene lugar mediante la oxidación de los contaminantes fenólicos con peróxido de hidrógeno, formando radicales libres aromáticos que se combinan entre sí por entrecruzamiento dando lugar a productos de alto peso molecular [121]. Estos productos precipitan debido a su baja solubilidad en agua pudiendo ser separados del medio de reacción.

Tabla 2.10. Enzimas y sus aplicaciones

Enzima	Fuente	Aplicación
Peroxidasa	<i>Glycine max</i> [L.] Merr [121, 122-126] <i>Armoracia lapothifolia</i> [127-129] <i>Cynara scolymus</i> L. [130, 131] <i>Coprinus cinereus</i> [132, 133] <i>Artromyces ramosus</i> [134, 135]	Degradación de fenol, anilina, clorofenoles, poliaromáticos y herbicidas. Polimerización de ácido húmico. Biosensores para detección de clorofenoles
Lacasa	<i>Pyricularia oryzae</i> [120] <i>Trametes versicolor</i> [120] <i>Cerrena unicolor</i> [120] <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> [120] Laccasa de hueso de oliva [136]	Degradación de colorantes Degradación de efluentes de textileras y de clorofenoles Degradación de 2,4-diclorofenol Degradación de benzopirenos Degradación de fenol
Cloroperoxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i> [137]	Oxidación de compuestos fenólicos. Biosensores para detección de clorofenoles
Lignina peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> [109, 110] <i>Chrysonilia sitophila</i> [120]	Degradación de compuestos aromáticos Descontaminación de efluentes Kraft
Manganeso peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> [109, 110] <i>Nematolona frowardii</i> y <i>Phebia radiata</i> [120] <i>Lentinula edodes</i> [120]	Degradación de ligninas, fenoles, pentaclorofenol y colorantes Degradación de ligninas Degradación de clorofenoles
Tirosinasa	<i>Agaricus bisporus</i> [138-140]	Biosensor de fenol, degradación de fenoles y aminas, oxidación de catecol y polimerización de compuestos fenólicos. Oxidación de catecol
Catecol dioxigenasa	<i>Comamonas testosterona</i> [120]	Oxidación de clorofenol
Fenoloxidasa	<i>Gloeophyllum trabeum</i> [120] <i>Trametes versicolor</i> [120] <i>Thermoascus aurantiacus</i> [120]	Descontaminación de efluentes Kraft

También es habitual la combinación de métodos, algunos ejemplos son: el tratamiento con fangos activos seguido de ultrafiltración [141] y el tratamiento enzimático seguido de adsorción [142].

Hamid y Khalil [143] realizaron una revisión en el que recogen las principales alternativas de aplicación de las peroxidasas entre ellas se

encuentran la polimerización oxidativa de fenoles y aminas aromáticas, desintoxicación del suelo, biorremediación de aguas residuales contaminadas con fenoles, cresoles y fenoles clorados utilizando HRP, SBP y peroxidasa de nabo. La lignina peroxidasa (LIP) y la manganeso peroxidasa (MnP) puede ser utilizadas con éxito en el bioblanqueo en la industria del papel y puede producir la degradación oxidativa de los colorantes sintéticos. Las peroxidasas también se han utilizado en aplicaciones prácticas de equipos de diagnóstico, tales como la cuantificación de ácido úrico, glucosa, colesterol, lactosa, etc., al igual que en el ensayo inmunoenzimático (ELISA), en el que la enzima peroxidasa es la enzima más común para el etiquetado de anticuerpo. Además también se han utilizado en la detección de toxinas, patógenos, riesgo de cáncer de vejiga y próstata, y muchos otros analitos.

2.4.3.3. Degradación por cultivos de algas

Se han utilizado cultivos de microalgas para la eliminación de compuestos fenólicos. En un trabajo realizado por Hirooka y col. [144] probaron la capacidad de eliminación de compuestos fenólicos con tres microalgas: *Chlorella fusca var. Vacuolata* y *Anabaena variabilis*, obteniendo porcentajes de eliminación superiores al 90% de o-nitrofenol, m-nitrofenol y 2,4-dinitrofenol en 5 días. Sin embargo, en la eliminación de clorofenoles (o-, p-clorofenol y 2,4-diclorofenol) no se han conseguido tan buenos rendimientos de eliminación.

2.4.3.4. Degradación por plantas

La fitorremediación consiste en el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos.

Las plantas pueden metabolizar las sustancias contaminantes mediante distintos procesos que se representan en la Figura 2.11.

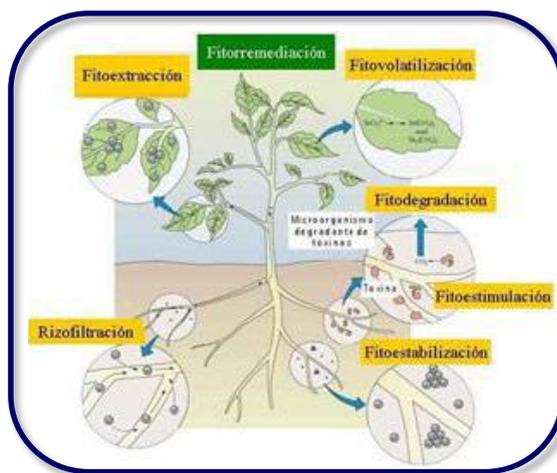


Figura 2.11. Tipos de fitorremediación.

En el caso de los compuesto fenólicos, se emplean dos métodos: la fitoextracción, o rizofiltración, proceso en el que las raíces de las plantas captan los compuestos orgánicos, los cuales se acumulan en tallos y hojas, donde pueden precipitar y concentrarse; y también la fitodegradación, mediante la cual las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o inocuos [146-148].

En un reciente trabajo publicado por Ibañes y col. [148] se ha estudiado la eliminación de fenol con raíces transformadas (RT) de tabaco, los resultados obtenidos muestran que la combinación de diferentes estrategias, tales como el uso de plantas transgénicas asociados con microorganismos, es una alternativa interesante para mejorar el proceso de fitorremediación.

2.5. Aplicación de las peroxidasas en la eliminación de compuestos fenólicos

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son oxidorreductasas que se encuentran distribuidas en el reino vegetal, los tejidos animales y microorganismos. Catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando la capacidad oxidante del peróxido de hidrógeno. Unas de las más usadas son la peroxidasa de rabano (HRP) y la de soja (SBP).

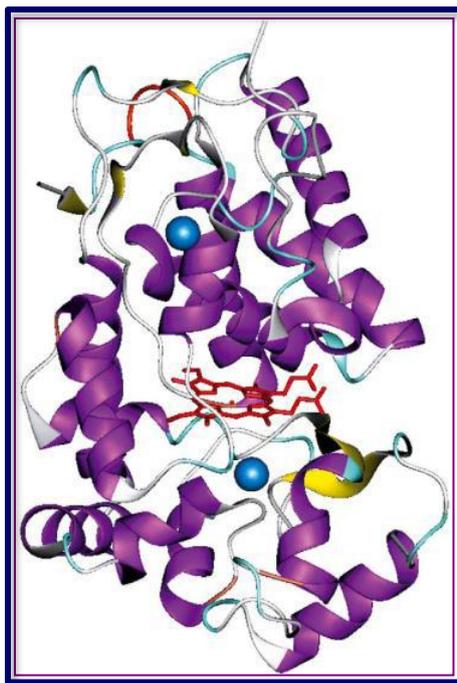
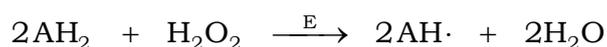


Figura 2.12. Estructura general de la peroxidasa.

En la Figura 2.12 se observa la estructura general de las peroxidasas con el grupo hemo en el centro (de color rojo), localizado entre el dominio distal y proximal, cada dominio contiene un átomo de calcio (esferas de color azul); las hélices α y las láminas β de la enzima se presentan de color morado y amarillo, respectivamente.

Como ya se ha mencionado los tratamientos de eliminación de los compuestos fenólicos con peroxidasas tienen lugar mediante la oxidación de los contaminantes fenólicos con peróxido de hidrógeno, formando radicales libres aromáticos que se combinan entre sí por entrecruzamiento dando lugar a productos de alto peso molecular [121]. Estos productos precipitan debido a su baja solubilidad en agua. La reacción que tiene lugar es:



donde: AH_2 representa al contaminante fenólico y $\text{AH}\cdot$ es un radical libre [149].

A diferencia de los tratamientos biológicos las enzimas son aplicables a una extensa gama de compuestos, actúan en presencia de sustancias tóxicas

para los microorganismos, poseen un amplio rango de pH y temperatura, no necesitan aclimatación y no generan biomasa, y necesitan procesos de control más simples. En comparación con los tratamientos físicos y químicos, su uso no es corrosivo y reduce el consumo de compuestos oxidantes, convirtiéndolas en una alternativa frente a los demás tratamientos [150].

Las ventajas que presentan la eliminación de compuestos fenólicos utilizando enzimas, frente a otros métodos, son las siguientes [151]:

- + Las enzimas presentan una especificidad superior a la de los microorganismos de los que se extraen.
- + Son funcionales en intervalos más amplios de condiciones físico-químicas (tales como pH y temperatura).
- + Aventajan a la oxidación química en su mayor grado de especificidad, en la posibilidad de operar bajo condiciones moderadas de presión y temperatura, y en una superior velocidad de reacción, lo que reduce los costes del proceso.
- + Presentan actividad ante una gran variedad de compuestos fenólicos distintos y a diferentes concentraciones de éstos. Además, al presentar elevada actividad, necesitan tiempos de reacción más cortos.
- + Tienen bajos requerimientos energéticos.
- + Trabajan en condiciones suaves de operación.
- + Sus procesos son fáciles de controlar.
- + Pueden aplicarse al tratamiento de materiales recalcitrantes.
- + Producen un mínimo impacto en el medio ambiente.

Es importante mencionar también que la eliminación de compuestos fenólicos con peroxidasas no provoca la formación de productos secundarios tóxicos, no es peligrosa ni produce alteraciones ecológicas. Además los polímeros fenólicos producto de la polimerización enzimática pueden usarse en recubrimientos, laminados, compuestos de madera, reveladores de color y materiales de grabados. Los fenoles polimerizados también podrían tener aplicaciones en la industria de detergentes [152]. También se pueden utilizar en la fotolitografía y recubrimientos electromagnéticos, se les considera polímeros conductores [153].

Sin embargo, las principales desventajas que presenta este proceso enzimático es que para alcanzar rendimientos de eliminación considerables es necesaria gran cantidad de enzima, además del relativamente corto tiempo de vida catalítica de la enzima, que puede ser causado por la inactivación de la peroxidasa [154, 155].

En la bibliografía disponible, se han encontrado referencias a distintas fuentes naturales de las enzimas peroxidadas entre las que destacan las de origen microbiano y las de origen vegetal.

❖ Peroxidasas de origen microbiano

Desde finales del siglo XX y principios del siglo XXI se han realizado numerosos estudios con peroxidadas de origen microbiano: de *Coprinus cinereus* [132, 133, 156], de *Arthromyces ramosus* [134, 135], de *Caldariomyces fumago* [137]; de *Coprinus macrorhizus* [157, 158] y de *Acinetobacter calcoaceticus* [115, 159] entre otras. Se ha comprobado que todas ellas son eficaces para oxidar compuestos fenólicos, y que son capaces de trabajar en amplios rangos de temperatura y pH. También se observó que presentan una inactivación importante que puede disminuirse con la utilización de ciertos aditivos. Sin embargo, el principal problema de la utilización de estas peroxidadas es la baja concentración de las mismas en los microorganismos que las producen. De hecho, se han realizado estudios para mejorar la producción enzimática utilizando cultivos continuos [160].

De entre todas ellas, la peroxidasa de *Arthromyces ramosus* presenta una alta actividad específica y una aplicabilidad a un amplio grupo de sustratos [135]. Esta peroxidasa es aislada del hipomiceto del hongo de *Arthromyces ramosus*, que produce gran cantidad de peroxidasa extracelular.

Villalobos y Buchanan [161] estudiaron la eliminación de fenol con esta enzima en presencia de polietilenglicol (PEG), encontrando que la estequiometría fenol/peróxido aumentaba al aumentar la concentración de enzima. Observaron también que una adición de peróxido a intervalos regulares de tiempo mejoraba la eficacia de eliminación de fenol, probablemente debido a una reducción de la inactivación enzimática.

La enzima cloroperoxidasa procedente de *Caldariomyces fumago* ha sido utilizada para la eliminación de 4-clorofenol en presencia de peróxido de hidrógeno. La Rotta y col. [162] han realizado estudios de eliminación de 4-clorofenol con esta enzima a distintos pH y a distintas concentraciones de 4-clorofenol y de peróxido de hidrógeno, obteniendo los máximos porcentajes de eliminación (95%) a pH 6 y con valores de la concentración de ambos sustratos de 5 mM.

❖ Peroxidasas de origen vegetal

Son las más estudiadas y de entre ellas destaca la peroxidasa de rábano (HRP) y la peroxidasa de las semillas de la soja (SBP), en la presente investigación se utilizó la peroxidasa de alcachofa (AKPC) como alternativa en la aplicación del tratamiento de efluentes fenólicos. Las tres peroxidasas mencionadas se comentarán en los siguientes apartados de este trabajo. Otras fuentes menos conocidas y menos empleadas son, por ejemplo, cebada, calabaza, tomate y nabo entre otras.

Akhtar y Husain [163] utilizaron peroxidasa procedente de calabaza para la eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales. Realizaron ensayos con la enzima en soluble e inmovilizada, consiguiendo mayores rendimientos con la enzima inmovilizada, encontrando, además, que al inmovilizar la enzima aumenta su periodo de actividad desde 3 a 6 horas.

González y col. [146] utilizaron las raíces del tomate como fuente de peroxidasa, realizando sus estudios en aguas con 100 mg/l de fenoles y en presencia de H₂O₂ 5 mM, alcanzándose altos rendimientos de eliminación en una hora y con rangos amplios de pH (4-9) y de temperatura (20-60 °C).

Santos de Araujo y col. [164] investigaron la utilización de las raíces de la zanahoria, patata y el poroporo como fuente de peroxidasas para la eliminación de fenol y de 2,6-diclorofenol, consiguiendo porcentajes de eliminación de fenol, en 72 horas de tratamiento, del 73, 91 y 99% para la zanahoria, patata y poroporo, respectivamente, y para el 2,6-diclorofenol, 83, 58 y 73%.

2.5.1. Peroxidasa de rábano (HRP)

La peroxidasa de rábano (HRP: horseradish peroxidase) es, sin duda, la peroxidasa vegetal más importante y estudiada hasta el momento en cuanto a su potencialidad para su aplicación al tratamiento de aguas residuales contaminadas por compuestos fenólicos. Pertenece a la familia de la clase III de las peroxidases vegetales [165]. Se extrae de la raíz del rábano silvestre (*Armoracia lapothifolia*), y cataliza reacciones redox en las que el sustrato aceptor de electrones es el H₂O₂, mientras que el sustrato oxidado es de naturaleza variable.

Esta peroxidasa tiene 308 residuos aminoacídicos y un peso molecular comprendido entre 33.89 y 42.1 kD. Mantiene su estabilidad entre pH 5.7 y 8.5, aunque es menos sensible a éstos que la SBP. Su inactivación térmica se produce a partir de los 81.5 °C, nueve grados por debajo de la SBP, aunque Schomburg y col. [166] han encontrado que a 50 °C mantiene su actividad durante 30 minutos y que a 70 °C pierde el 10% de su actividad en 5 minutos. La incubación a temperaturas comprendidas entre 5 y 35 °C tampoco provoca una pérdida significativa de actividad enzimática [167].

Sus aplicaciones actuales son diversas, entre las que encontramos referencias a utilidades en análisis clínicos, biosensores de peróxido de hidrógeno, determinaciones de mercurio, síntesis de compuestos orgánicos y, la de nuestro interés, tratamiento de aguas residuales [168].

De los numerosos trabajos publicados sobre la HRP, cabe destacar las primeras investigaciones desarrolladas por Klibanov y col. [169-171]. Estos autores observaron que los compuestos fenólicos y las anilinas precipitaban como consecuencia de su polimerización enzimática, probaron el método con más de 30 compuestos diferentes y concluyeron que era mucho más sencilla su eliminación por este procedimiento enzimático que con los métodos convencionales que se venían empleando hasta ese momento. Una conclusión importante de estos trabajos es el hecho de que la co-precipitación de una mezcla de compuestos fenólicos es más eficaz que el tratamiento de cada uno de los compuestos de forma separada.

Cooper y col. [172] emplearon con éxito crudo obtenido de raíz de rábano para tratar efluentes fenólicos de aguas residuales procedentes de una fundición.

El principal inconveniente que presenta la HRP para la puesta en marcha de un proceso de eliminación de compuestos fenólicos es el coste de la enzima, ya que, además de los costes de extracción y purificación, la enzima, al igual que la de soja (SBP), se desactiva durante el tratamiento [173].

2.5.2. Peroxidasa de soja (SBP)

La peroxidasa extraída de la cáscara de las semillas de soja (SBP: soybean peroxidase) destaca por su excelente estabilidad y por tener buenas propiedades catalíticas. Pertenece a la clase III de las peroxidases vegetales [165], capaces de oxidar una amplia gama de sustratos orgánicos e inorgánicos usando peróxido de hidrógeno. La SBP es una glicoproteína de 37 kD que está presente en la cáscara de la semilla de soja [174]. Según resultados de estudios espectroscópicos [175-179], la isoenzima C de la peroxidasa de rábano tiene una semejanza con la de soja de un 57%, en cuanto a la secuencia de aminoácidos que las componen.

La SBP presenta actividad catalítica frente a toda clase de hidrocarburos aromáticos policíclicos [180], además de frente a los sustratos fenólicos.

En los últimos años, la peroxidasa de soja ha pasado a ser una de las más estudiadas, debido fundamentalmente a su menor coste y a su estabilidad térmica [121, 181-183]. Su inactivación térmica se produce a partir de los 90.5 °C, nueve grados por encima de la HRP y más de 25 °C de otras peroxidases, como la de *Coprinus cinereus*. Destaca además su alta reactividad en un amplio rango de pH, desde 3 a 9 [121] y, por último, su fácil obtención, ya que está presente en altas concentraciones en la cáscara de las semillas de soja, que además es una fuente muy barata por ser un subproducto de la industria alimentaria relacionada con la soja [174].

Caza y col. [126] estudiaron la eliminación de diferentes compuestos fenólicos con peroxidasa de soja, estableciendo los parámetros óptimos de la reacción. Los resultados obtenidos para el 4-clorofenol fueron los siguientes:

- pH óptimo = 8.
- Dosis óptima de SBP con PEG = 0.15 U/ml.
- Dosis óptima de SBP sin PEG = 0.20 U/ml.
- Relación molar $[H_2O_2]:[4\text{-clorofenol}] = 1:1.25$.

Los resultados de este estudio demostraron la aplicabilidad de la enzima peroxidasa de soja para la eliminación de compuestos fenólicos y concretamente para el 4-clorofenol, contaminante en el que se ha centrado esta investigación.

Un estudio detallado llevado a cabo por Wright y Nicell [121], incubando la enzima en distintas condiciones y diferentes periodos de tiempo, y determinando después la actividad enzimática con fenol como sustrato, llevó a las siguientes conclusiones:

- La actividad enzimática de SBP no se encuentra influenciada por la naturaleza química del tampón utilizado para el mantenimiento del pH.
- Esta enzima es activa en un amplio rango de pH (entre 3 y 9), pero es más sensible a éste que la HRP.
- La incubación a 25 °C de SBP a pH bajo, entre 2 y 3, origina la inactivación total de la misma (con una cinética de primer orden) en un periodo relativamente corto de tiempo (2 a 3 días).
- La incubación a pH neutro o alcalino, a 25 °C, no inactiva totalmente la enzima, la cual retiene actividad hasta 20 días después.
- La enzima SBP, incubada a 80 °C y a pH comprendidos entre 5 y 10.5, mostró una desactivación térmica dependiente del pH, que se puede expresar por una ecuación de primer orden.
- La incubación en presencia de peróxido de hidrógeno provoca inactivación de la enzima, que aumenta al incrementarse la cantidad de peróxido.

Gijzen y col. [183] observaron que la cáscara de la semilla de soja tiene una actividad mayor que la de las raíces, y que el uso directo de la cáscara como biocatalizador parece factible. También, Flock y col. [123] trataron efluentes acuosos conteniendo fenol y 2-clorofenol con cáscara de soja. En este trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- El emplear directamente las cáscaras de semilla de soja reduce los costes del biocatalizador al eliminar las etapas de extracción y purificación.
- Las propias cáscaras actúan como agente protector de la enzima, pues al estar retenida en ellas no puede ser adsorbida por el polímero formado.
- Se ha comprobado que las cáscaras no adsorben al sustrato fenólico, por lo que la desaparición de éste se debe exclusivamente a la reacción enzimática.
- Se han logrado rendimientos de eliminación del 60% en reactores discontinuos, mientras que en los experimentos en continuo con reactores tanque en serie se alcanzaron conversiones próximas al 95%.
- Debido a la presencia de detergentes en las aguas residuales, se determinó que su presencia a baja concentración (0.1% w/v) tiene un efecto positivo en la actividad enzimática, y que en elevada concentración (>1% w/v) no anulan su actividad.

Trivedi y col. [184] han seguido esta línea de investigación inmovilizando las cáscaras de semilla de soja por atrapamiento en partículas mixtas de alginato y sílice obtenida por el proceso sol-gel para su uso en reactores de lecho fluidizado. En este trabajo, comprobaron que la combinación del proceso de inmovilización conjunta orgánica e inorgánica mejora la estabilidad mecánica y química del derivado inmovilizado.

En posteriores investigaciones, estos mismos autores [185] estudiaron la reacción y la regeneración de las partículas con la enzima SBP inmovilizada en el reactor de lecho fluidizado de forma continua, demostrando que el lecho fluidizado puede ser una buena alternativa para estos procesos en los que hay desactivación del biocatalizador.

2.5.3. Peroxidasa de alcachofa (AKPC)

La peroxidasa alcachofa (*Cynara scolymus* L.) es una enzima aislada con actividad peroxidasa (AKPC), formada de una isoenzima catiónica [131] que se encuentra glicosilada, como lo pone de manifiesto su unión específica a conca-navalina-A. La presencia de glicosilación supone una ventaja de esta enzima a la hora de su fijación a biorreactores utilizados en procesos industriales [186].

AKPC presenta un óptimo de actividad a 60 a 70 °C, lo que representa una ventaja para su uso en ciertos procesos industriales. Además, su estabilidad térmica a estas temperaturas es alta. Respecto al pH óptimo la enzima presenta máxima actividad en un intervalo de pH comprendido entre 4 y 6, si bien permanece activa a valores de pH de 8 ó 9.

AKPC muestra una alta velocidad de catálisis con sustratos reductores como guayacol, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico) (ABTS), fenol, pirogalol, catecol, 4-metilcatecol, 4-terc-butilcatecol, 4-hidroxianisol, p-cresol, p-clorofenol o 4-aminoantipirina, por lo que puede ser usada como enzima acoplada en ensayos de determinación de compuestos que incluyan alguno de estos sustratos reductores [187].

López y col. [130] emplearon extractos de alcachofa, que contenían isoenzimas de peroxidasa y polifenol-oxidasas, comprobando que la presencia de ambos tipos de enzima mejoraba los rendimientos de eliminación del 4-clorofenol con respecto a su empleo por separado.

2.6. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos industriales; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones.

En el proceso de inmovilización se confina o localiza a la enzima en regiones definidas de materiales sólidos, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente. Posteriormente, esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se enlazan enzimas, orgánulos ó células, a un soporte [188].

Las principales ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas son las siguientes:

- Aumento de la estabilidad de la enzima.
- Posible reutilización del derivado, disminuyendo así los costes del proceso.
- Posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

A su vez también presentan una serie de inconvenientes como son:

- Alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
- Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
- El biocatalizador con la enzima inmovilizada es más caro que la enzima nativa.

2.6.1. Métodos de inmovilización de enzimas

Existe una amplia variedad de técnicas de inmovilización y de soportes en estos procesos de inmovilización de enzimas. La clasificación de Kennedy y Cabral [189], intenta tomar en consideración tanto la naturaleza de las interacciones responsables de la inmovilización, como la naturaleza del soporte.

❖ Métodos de inmovilización de enzimas:

A. Métodos que implican insolubilización de la enzima:

- Enlace:
 1. Entrecruzamiento.
 2. Enlace a soporte:
 - a. Adsorción física.
 - b. Enlace iónico.
 - c. Complejos metálicos.
 - d. Enlace covalente.
- Atrapamiento:
 1. 1. En geles.
 2. 2. En fibras.
 3. 3. Microencapsulación.

B. Métodos que no implican insolubilización de la enzima:

- Sin modificación de la enzima.
- Con modificación de la enzima.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todas las enzimas en todos los casos. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así se podrá seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar y el tipo de sustrato que tenga que ser procesado. En general, las características de un buen método de inmovilización son: que se realice en condiciones suaves, que no intervengan reactivos tóxicos, la fortaleza de la unión, el coste económico y otras, como el pH y los disolventes. En la Tabla 2.11 se muestra una comparación entre los diferentes métodos de inmovilización de enzimas.

En general, los biocatalizadores más estables y duraderos suelen ser de más difícil preparación y de mayor coste; en cambio, aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento o la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y cuya vida útil es más corta.

Tabla 2.11. Comparación entre los diferentes métodos de inmovilización de enzimas.

Método	Inclusión en membranas	Atrapamiento	Reticulado	Adsorción química	Unión covalente
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil_Media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-Alta	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste proceso	Medio-alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Si	Si	Si	No	Si

Cuando la inmovilización va acompañada de una reacción química, se debe tener cuidado en no introducir cambios conformacionales en el centro activo de la enzima. Esto obliga a realizar la inmovilización bajo condiciones que sean lo más suaves. Sin embargo, una vez que se ha tenido éxito en el proceso, los derivados inmovilizados obtenidos presentan mejores estabildades operacionales, debido precisamente a la fuerza del enlace que ancla la enzima al soporte. En general, los métodos de unión por enlace covalente suelen ser usados en la preparación de derivados inmovilizados con fines industriales, ya que dichos enlaces son estables y en general duraderos.

Los métodos de inmovilización insolubilizan la enzima, habiéndose utilizado una gran variedad de materiales como soportes. Estos materiales difieren en tamaño de partícula, densidad, porosidad y forma (cilindros, placas, fibras y más corrientemente esferas). Los soportes se pueden clasificar en dos grandes grupos [190]:

- ❖ Soportes inorgánicos.
 - Naturales (arcilla, piedra pómez, sílice, etc).
 - Manufacturados (óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).
- ❖ Soportes orgánicos
 - Polímeros naturales.

- Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, alginatos, quitina, chitosan, etc).
- Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
- Polímeros sintéticos.
 - Poliolefinas (poliestireno).
 - Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc).
 - Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Los primeros estudios con enzimas inmovilizadas se realizaron con soportes inorgánicos. En las siguientes etapas del desarrollo de la tecnología de enzimas inmovilizadas se han empleado soportes orgánicos debido, fundamentalmente, a la gran variedad de grupos funcionales reactivos que contienen, lo cual amplía sus posibilidades de unión.

Sin embargo, y a pesar de su menor reactividad química, los soportes inorgánicos son, en muchos casos, más adecuados para el uso industrial, debido a sus propiedades físicas y mecánicas. Además, estos soportes no presentan alteraciones de importancia en su estructura como consecuencia de variaciones de pH, presión y temperatura.

Los soportes inorgánicos (óxidos metálicos, vidrio poroso, etc.), debido a sus propiedades químicas y mecánicas, a su resistencia a la abrasión y a la contaminación bacteriana, y al hecho de que puedan enlazarse con iones que actúen como cofactores de biocatalizadores son, en teoría, soportes ideales para llevar a cabo la inmovilización de enzimas.

2.6.2. Inmovilización de la enzima peroxidasa y su aplicación en la eliminación de compuestos fenólicos

Como se ha mencionado la peroxidasa ha sido descrita como una enzima con mucha tendencia a la inactivación. Una de las principales vías de la misma es la adsorción de la proteína por parte del polímero fenólico que se forma como producto de la reacción enzimática. De ahí que la posibilidad de inmovilizar la enzima peroxidasa presenta una gran ventaja, ya que al

encontrarse la enzima anclada a un soporte sólido no será susceptible de ser adsorbida por el polímero.

En la bibliografía consultada hay numerosos trabajos en los que se describe la inmovilización de la peroxidasa y su utilización en procesos de eliminación de compuestos fenólicos [191-193].

Muchas publicaciones se han encontrado que describen la inmovilización de la peroxidasa de rábano [194-199]. Peralta-Zamora y col. [191], intentaron eliminar los fenoles presentes en tres efluentes industriales de una industria papelera con diferentes derivados inmovilizados de peroxidasa de rábano, utilizando un soporte inorgánico de sílice (vidrio) sometido a cinco tipos de modificaciones diferentes, y cuatro resinas de intercambio iónico distintas. Los mejores resultados los obtuvieron al utilizar como matriz inmovilizador la resina Amberlita IRA-400 consiguiendo reducir la concentración de fenoles totales en un 50% tras un tratamiento de 4 horas. Estos mismos investigadores, en otro trabajo [200], inmovilizaron las enzimas lignina y manganoso peroxidasa procedentes del hongo *Phanerochaete chrysosporium* sobre la resina Amberlita IRA-400, mostrando una magnífica eficacia de inmovilización. Además, este derivado inmovilizado fue usado satisfactoriamente para la eliminación de compuestos fenólicos y coloreados de las aguas residuales procedentes de la industria papelera, consiguiendo rendimientos de eliminación del 50% en 3 horas de tratamiento.

Tatsumi y col. [201], con peroxidasa de rábano inmovilizada por adsorción física sobre magnetita, trataron un efluente sintético, que contenía fenol y una mezcla de mono-, di-, tri- y tetraclorofenoles, en un reactor tanque discontinuo, obteniendo conversiones del 97% en tan sólo 90 minutos de reacción. Sin embargo, con la misma cantidad de enzima en forma soluble se consiguieron conversiones variables entre el 36% y el 97%. Concretamente, el compuesto 4-clorofenol (objeto de estudio en este trabajo) fue eliminado en un 100% con la enzima inmovilizada, mientras que con la enzima soluble sólo se reducía su concentración en un 58%.

A diferencia de lo que ocurre con la peroxidasa de rábano [HRP] se ha encontrado muy poca bibliografía donde se inmovilice la peroxidasa de soja

(SBP), lo que es bastante sorprendente ya que ha demostrado ampliamente ser una alternativa interesante [121, 125]. A continuación se exponen algunos de los trabajos encontrados con esta peroxidasa.

Wang [202] empleó la inmovilización por atrapamiento en películas delgadas sol-gel de peroxidasa de soja, para la fabricación de biosensores usados en la determinación de peróxido de hidrógeno en medio ácido, observando una excelente termo-estabilidad de esta enzima inmovilizada.

En los trabajos de Gacche y col. [203] se ha utilizado peroxidasa de soja extraída de la cáscara de la semilla de soja inmovilizada en fibras de poliamida aromática para tratar compuestos fenólicos de aguas residuales alcanzando una reducción de la concentración de compuestos fenólicos del 91%, disminuyendo la concentración de estos compuestos desde 0.720 a 0.063 mg/ml en el agua residual, después de 5 horas de tratamiento.

Magri y col. [204] también inmovilizaron la enzima peroxidasa de soja en varios polímeros de polianilina tratados con glutaraldehído. La capacidad de inmovilización de uno de estos polímeros fue de 8.2 mg SBP/g soporte, con un pH óptimo de 6.0. Esta enzima inmovilizada retuvo un 82% de actividad y conservó un 80% de actividad al almacenarse durante 15 semanas a 4 °C.

Trivedi y col. [184], con la enzima peroxidasa de soja inmovilizada en partículas híbridas de alginato y sílice, lograron eliminar hasta el 85% de fenol. Este estudio indica que las partículas obtenidas de este modo pueden ser aplicables para su uso en reactores de lecho fijo o lecho fluidizado. Estos mismos autores [185] realizaron otro estudio utilizando estas partículas de enzima inmovilizada en reactores de lecho fluidizado, consiguiendo rendimientos de eliminación de fenol del 54% con relaciones molares de fenol:peróxido de hidrógeno de 1:2.

Entre los trabajos que utilizan el método de inmovilización por enlace covalente se ha encontrado que Caramori y col. [205] sintetizaron un soporte a partir de polianilina y polietilen tereftalato para la inmovilización de la peroxidasa de rábano por enlace covalente. La principal ventaja de este soporte es la posibilidad de su reutilización. La enzima inmovilizada conserva

el 40% de la actividad enzimática, tras el proceso de inmovilización de 90 minutos a 4 °C y pH 4.5.

Shukla y col. [206] han inmovilizado la peroxidasa de rábano por enlace covalente en un copolímero de acrilamida y 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). Los grupos hidroxilo y amino de la proteína fueron activados con glutaraldehído y p-benzoquinona, respectivamente. La activación simultánea de los dos grupos produce un efecto sinérgico y un aumento en la actividad de la enzima. La estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada fue del 60% después de 3 semanas, mientras que la enzima soluble pierde toda la actividad en dos semanas. La enzima inmovilizada perdió el 50% de actividad después de 8 ciclos. Asimismo estudiaron la eliminación de fenol en un reactor de lecho fijo obteniéndose las mejores eficacias de eliminación con una concentración inicial de fenol 1.0 mM, a 45 °C y un caudal de 0.5 cm³/min. Otros polímeros empleados como soportes para la inmovilización por enlace covalente de HRP han sido la isopropilacrilamida [207], acrilonitrilo [208] o polianilina [196].

Chen y col. [195], eliminaron fenol de aguas residuales con la peroxidasa de rábano inmovilizada en capas de arcilla y aluminio, obteniendo porcentajes de eliminación de fenol del 90% en presencia de PEG. Al añadir PEG se mejora el rendimiento de eliminación de fenol y se reduce la cantidad de enzima inmovilizada necesaria para alcanzar altos rendimientos de eliminación.

Otro soporte ampliamente utilizado para la inmovilización de la enzima peroxidasa por enlace covalente y distintas técnicas han sido las esferas de vidrio. Azevedo y col. [209] utilizaron diferentes métodos de inmovilización a partículas de vidrio para obtener una mayor estabilidad operacional. Los métodos de inmovilización estudiados fueron: enlace covalente con glutaraldehído, carbodiimida y la adsorción seguida de entrecruzamiento con glutaraldehído. La inmovilización por enlace covalente con glutaraldehído mostró una alta estabilidad operacional (después de 24 horas de operación se perdió menos del 3% de la actividad inicial), mientras que la inmovilización con carbodiimida mostró baja estabilidad operacional (perdiendo el 40% de la actividad inicial después de 24 horas de operación). La inmovilización por

adsorción seguida de entrecruzamiento con glutaraldehído mostró una estabilidad operacional intermedia, perdiendo un 10% de la actividad inicial.

Lai y Lin [210] utilizaron la peroxidasa de rábano inmovilizada en vidrio poroso activado previamente con γ -APTES y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído obteniendo una actividad específica de 51 U/g de soporte en las condiciones óptimas de inmovilización. Con este derivado estudiaron la eliminación de 4-clorofenol, siendo el porcentaje de eliminación de 25%, muy inferior al descrito en la bibliografía por otros métodos.

También se han utilizado las esferas de vidrio poroso para inmovilizar enzimas de otras procedencias. De este modo, Rogalski y col. [211] han inmovilizado las enzimas laccasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, obtenidas del hongo *Cerrena unicolor*, en vidrio de tamaño de poro controlado, activado con γ -aminopropiltriétoxissilano (γ -APTES), o con una doble capa de dextrano. La mayor actividad hacia los sustratos en presencia de disolventes orgánicos se obtuvo con la lacasa inmovilizada en vidrio activado con dextrano.

A parte de la publicación de Lai y Lin. [210] solo se ha encontrado en la bibliografía otro trabajo que estudia la eliminación de 4-clorofenol con la peroxidasa inmovilizada. Siddique y col. [149] eliminaron 4-clorofenol con peroxidasa de rábano inmovilizada en diferentes soportes (papel celulósico de filtro, bolas de nylon y tubos de nylon) obteniendo porcentajes de eliminación del compuesto del 89% con la enzima inmovilizada en los filtros de celulosa, 82% con las bolas de nylon y 98% con los tubos de nylon.

De acuerdo a la revisión bibliográfica expuesta, se puede decir que aunque hay un camino ya recorrido sobre el uso de las peroxidases inmovilizadas, aún no está todo dicho sobre este tema ya que no hay un derivado inmovilizado que sobresalga del resto. Sin embargo, parece ser que los soportes inorgánicos, sobre todo el vidrio, proporcionan buenos resultados, y la derivatización con enlace covalente a través del γ -APTES, es un procedimiento que podría dar buenos resultados para el uso en la eliminación de 4-clorofenol.

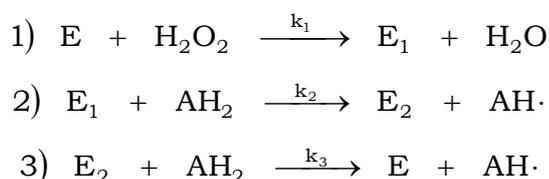
2.7. Cinética del proceso de eliminación de compuestos fenólicos catalizado por peroxidasas

En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos en los cuales se propone un mecanismo cinético para los sistemas peroxidasa/compuestos fenólicos. La mayoría de los artículos en los que aparece el mecanismo de reacción hacen referencia a los estudios realizados por Dunford y Stillman [212] como autores del esquema de reacción de oxidación enzimática.

Dos grupos de investigación canadienses de las Universidades de Windsor y McGill son los que más ampliamente han desarrollado el modelo cinético para la oxidación de fenoles con peroxidasas, bajo la dirección de los profesores Taylor y Nicell, realizando diversas publicaciones todas ellas con el mismo mecanismo de reacción propuesto por Dunford [121, 135, 173 213-219].

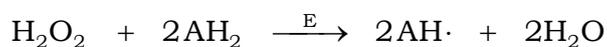
Aparte de estos científicos canadienses, otros autores han usado el mismo mecanismo en sus publicaciones [150, 151, 220, 221].

El modelo cinético, aunque ha sido validado con peroxidasa de rábano, es el que generalmente se acepta para el resto de peroxidasas vegetales. En la Figura 2.13 se muestra el ciclo catalítico de la enzima nativa, la secuencia de las etapas de reacción, consideradas como ciclo principal, es el siguiente:



La enzima nativa E es oxidada por el peróxido de hidrógeno hasta un intermedio activado E₁ (compuesto I en la Figura 2.13), que acepta un compuesto aromático (AH₂) en su centro activo y lo oxida. Se produce el radical libre AH· que se libera al medio de reacción dejando la enzima en el estado E₂ (compuesto II en la Figura 2.13), capaz de oxidar otra molécula de

AH₂ liberando al medio otro radical libre, y quedando en la forma nativa E, completando así el ciclo. La reacción global es por tanto:



Por último, los radicales libres formados en las reacciones 2 y 3, polimerizan para dar un dímero:



El dímero resultante presenta baja solubilidad, pero aún no lo suficientemente reducida para precipitar, por lo que permanecerá soluble en el medio acuoso y puede ser oxidado nuevamente en sucesivas etapas, lo que nos lleva a la formación de un polímero de cadena más larga con aún más reducida solubilidad y cuya precipitación estará más favorecida [222].

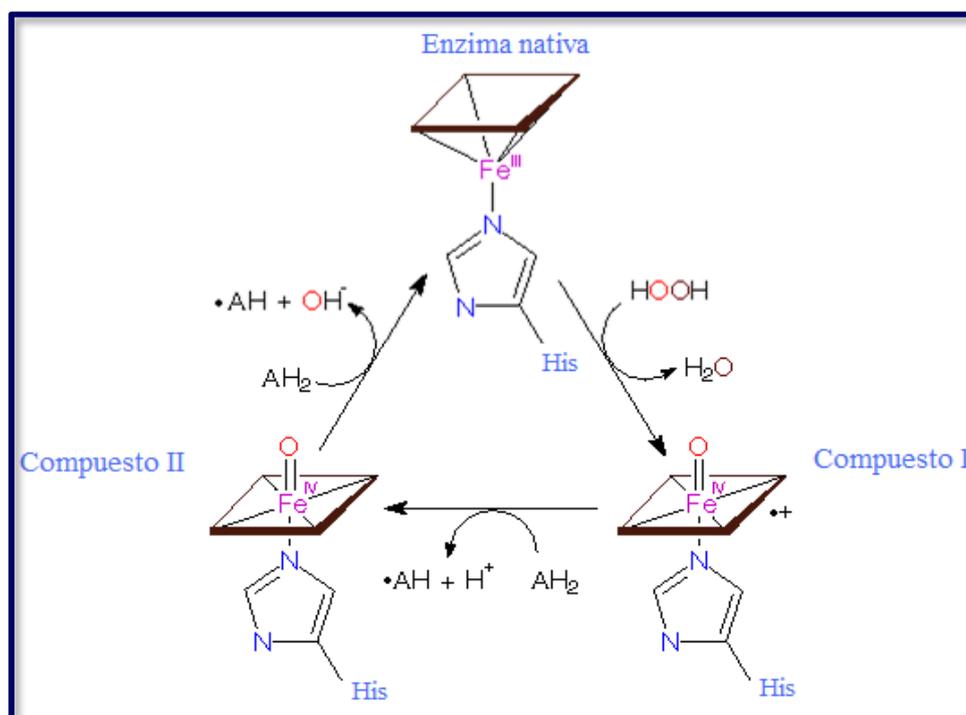


Figura 2.13. Ciclo catalítico de la enzima nativa [165].

En el caso del 4-clorofenol, la formación de unidades superiores a los dímeros lleva consigo la aparición de iones Cl^- y H^+ en el medio de reacción, lo que se traducirá en aparición de ácido clorhídrico que afectará al pH de dicho medio, acidificándolo. No obstante, no se han encontrado estudios en los que se preste atención a este fenómeno.

La reacción global descrita anteriormente indica que se generan dos radicales libres por cada molécula de peróxido consumida. Sin embargo, en muchos estudios se ha demostrado que la precipitación de la mayoría de los compuestos fenólicos, sigue la estequiometría 1:1. Esta inconsistencia puede ser explicada por la formación de polímeros solubles que podrían reaccionar de nuevo para formar trímeros, tetrameros o polímeros mayores que debido a su tamaño finalmente precipitarían. De esta manera a medida que aumenta el tamaño de polímero, la relación entre el consumo de peróxido de hidrógeno y el compuesto aromático se aproxima a la unidad.

Además de este ciclo principal, también se producen otras reacciones secundarias en el medio [151].

El principal inconveniente con el que nos encontramos al tratar de eliminar compuestos fenólicos de disoluciones acuosas con peroxidasa es la fuerte inactivación que dicha enzima sufre. El estudio de la bibliografía disponible que describe esta inactivación nos ofrece tres alternativas distintas de desactivación de la enzima [223, 224].

La primera es la desactivación por parte del H_2O_2 postulada en el modelo cinético de Nicell [215]. Formulada por primera vez por Arnao y col. [225, 226], esta vía de desactivación fue estudiada con profundidad por Nicell y Wright [222] quienes realizaron un estudio completo sobre el efecto perjudicial del peróxido de hidrógeno aislado de las otras inactivaciones propuestas.

La segunda desactivación es provocada por la interacción entre los radicales libres formados en el transcurso de la reacción y el centro activo de la enzima [171]. Buchanan y Nicell [173] son los únicos que proponen una expresión para la inactivación de la enzima provocada por los radicales libres que se enlazan a ella y destruyen su centro activo.

La tercera vía de desactivación se atribuye a una adsorción de la enzima por parte del polímero, producto final de la reacción enzimática [227], o a un atrapamiento de la enzima en el polímero formado [173].

Sin lugar a dudas, la mayoría de los esfuerzos realizados se han concentrado en eliminar o atenuar esta tercera causa de desactivación de la peroxidasa. La mayor parte de los estudios han sido llevados a cabo con peroxidasa de rábano, pero los resultados obtenidos se han venido aplicando tanto a ésta como a la peroxidasa de semillas de soja.

Puesto que en la inmensa mayoría de los estudios documentados se asume que la enzima queda adsorbida en el polímero formado como producto de la reacción enzimática, Wu y col. [228, 229] han realizado estudios con diversos aditivos tales como polietilenglicol (PEG), gelatina y polielectrolitos, concluyendo que es el PEG de entre todos ellos es el que mejores resultados proporciona con HRP. Sin embargo, hay que destacar que es importante determinar la cantidad óptima de PEG, puesto que un exceso de este aditivo provoca un aumento de la DQO del efluente tratado [172].

En la bibliografía consultada se han encontrado algunos trabajos en los que se concretan las expresiones matemáticas representativas de los modelos cinéticos propuestos para predecir la oxidación enzimática de compuestos fenólicos. En el desarrollo de estos modelos cinéticos, los diferentes autores tienen en cuenta el ciclo principal del mecanismo de reacción anteriormente expuesto y algunas de las reacciones secundarias consideradas en la bibliografía. A continuación se exponen brevemente los modelos cinéticos más relevantes.

1. El modelo propuesto por Nicell [215], tiene en cuenta únicamente el ciclo principal del mecanismo de reacción, suponiendo insignificantes las reacciones de inactivación, que se concreta en un mecanismo ping-pong modificado. Suponiendo que las concentraciones de las especies E_1 y E_2 no varían con el tiempo y asumiendo estequiometría 1:1 para el consumo de peróxido de hidrógeno y compuesto fenólico, llegan a la siguiente solución analítica:

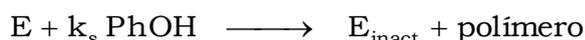
$$t = \frac{1}{k_1 E_0} \ln \left(\frac{[H_2O_2] - [PhOH]_0 + [PhOH]}{[H_2O_2]} \right) - \frac{1}{E_0} \left(\frac{k_2 + k_3}{k_2 k_3} \right) \left(\ln \left(\frac{[PhOH]}{[PhOH]_0} \right) \right)$$

Si las concentraciones iniciales de peróxido y fenol son iguales, quedaría:

$$t = -\frac{1}{E_0} \left(\frac{1}{k_1} + \left(\frac{k_2 + k_3}{k_2 k_3} \right) \right) \ln \left(\frac{[PhOH]}{[PhOH]_0} \right)$$

es decir, una reacción de primer orden. Los propios autores manifiestan que una expresión de este tipo no reproduce los resultados experimentales obtenidos.

2. El mismo autor [215], propone un modelo en estado pseudo-estacionario, que tenga en cuenta la inactivación de la enzima, pero sin precisar en que extensión afectan cada uno de los mecanismos de inactivación. Este autor afirma que, una vez que ha terminado la reacción el número de moléculas de compuesto fenólico precipitado por molécula de enzima en disolución es constante, e independiente de las concentraciones de compuesto aromático, enzima y peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, la enzima es tratada como un pseudo-sustrato, y su desaparición se puede representar por:



donde k_s es el número de moléculas de PhOH eliminadas por molécula de enzima al final de la reacción. La constante k_s se puede estimar usando la siguiente expresión:

$$k_s = \frac{[PhOH]_0 - [PhOH]_{\text{final}}}{E_0}$$

Esta estequiometría permite calcular la fracción de enzima que ha sido desactivada en base a la cantidad de compuesto fenólico eliminado.

$$E_{\text{inact}} = \frac{1}{k_s} ([H_2O_2]_0 - [PhOH])$$

donde E_{inact} incluye todas las formas enzimáticas desactivadas de forma permanente.

La expresión anterior, junto con la siguiente:

$$[PhOH] = [PhOH]_0 - ([H_2O_2]_0 - [H_2O_2])$$

que se obtiene de la suposición de estequiometría 1:1, además de las siguientes expresiones:

$$\frac{d[PhOH]}{dt} = \frac{-(E_0 - E_3 - E_{\text{inact}})}{\left[\frac{1}{k_1[H_2O_2]} + \left(\frac{k_2 + k_3}{k_2k_3} \right) \frac{1}{[PhOH]} \right]}$$

$$\frac{dE_3}{dt} = \frac{k_{\text{app}}(E_0 - E_3 - E_{\text{inact}})}{1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1} \frac{[PhOH]}{[H_2O_2]}} [H_2O_2] - k_s E_3$$

conforman el conjunto de ecuaciones que resueltas simultáneamente, tras el cálculo de las seis constantes implicadas, permitirán simular el proceso de eliminación de compuestos fenólicos con peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno.

Sin embargo, la suposición de que la inactivación de la enzima es proporcional a la cantidad de sustrato eliminado de la disolución e independiente de las concentraciones instantáneas de enzima y sustrato, solo sirvió para predecir la eliminación de 4-clorofenol, y el propio Nicell apunta que el modelo no describe el comportamiento de la enzima con otros sustratos como el fenol, puesto que para este caso la constante k_s es función de las concentraciones de enzima y compuesto aromático.

3. Yu y col. [214] propusieron un modelo cinético en el que, suponiendo que la relación de concentraciones $[PhOH]/[H_2O_2]$ permanece constante a lo

largo de la reacción enzimática, la velocidad de eliminación de fenol se puede simplificar a una expresión de primer orden con respecto a la concentración de fenol.

$$-\frac{d[\text{PhOH}]}{dt} = 2k_{\text{PhOH}}[E_a][\text{PhOH}]$$

donde k_{PhOH} es un parámetro cinético global que contiene las constantes cinéticas k_1 , k_2 y k_3 del ciclo principal del mecanismo de eliminación de compuestos fenólicos y el cociente $[\text{PhOH}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$ que, como se ha comentado, permanece constante.

Además, $[E_a]$ es la concentración de enzima activa cuya evolución viene dada por:

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_d \sqrt{2k_{\text{PhOH}}[E_0]^3[\text{PhOH}]}$$

donde k_d es una constante de desactivación, que tiene una relación logarítmica empírica con el cociente de concentraciones de polietilenglicol y de enzima.

Este modelo cinético sólo ha sido contrastado con unos pocos resultados experimentales obtenidos con HRP y fenol como sustrato y en presencia del polietilenglicol como protector de la desactivación de la enzima.

4. Volviendo al modelo cinético desarrollado por Nicell [215]; este autor intentó esclarecer y cuantificar los diferentes mecanismos de desactivación de la enzima, con el fin de solucionar el problema planteado con la suposición de una inactivación global representada por la constante k_s .

En un primer trabajo, Nicell y Wright [222] desarrollaron una serie de estudios cinéticos en ausencia de precipitado polimérico, con el fin de cuantificar únicamente el efecto del H_2O_2 sobre la peroxidasa (tanto HRP como SBP). Para ello, inmediatamente formados los radicales libres, se les hacía reaccionar con aminoantipirina para formar un producto coloreado y evitar la

formación de polímero. Además, el hecho de utilizar ambas enzimas permitió a los autores determinar y comparar los parámetros cinéticos de ambas peroxidases.

Estas investigaciones mostraron claramente que HRP es catalíticamente más rápida que SBP y menos susceptible a la inhibición por peróxido de hidrógeno, si bien es más sensible a los cambios en la concentración de H_2O_2 . Según dicen los investigadores, los parámetros cinéticos calculados sirven para incorporarlos en el modelo cinético comentado en segundo lugar en este trabajo [215], y así poder evaluar mejor los parámetros asociados a las inhibiciones por radicales libres y por atrapamiento de la enzima en el polímero.

En un trabajo paralelo, Buchanan y Nicell [154] proponen un modelo cinético teniendo en cuenta estos mecanismos de desactivación. Para ello suponen lo siguiente:

- Los radicales libres provocan la inactivación de la enzima enlazándose a ella y destruyendo su centro activo [230]. La reacción se puede escribir como:



- Basándose en trabajos anteriores, suponiendo estequiometría 1:1 entre el peróxido consumido y los compuestos fenólicos eliminados, la concentración de radicales libres en estado estacionario sería:

$$[\text{PhO}\cdot] = \left(-\frac{1}{k_4} \frac{d[\text{PhOH}]^{\frac{1}{2}}}{dt} \right)$$

- De acuerdo con la reacción anterior, la velocidad de inactivación de la enzima por los radicales libres puede formularse como:

$$\left(\frac{dE_{\text{inact}}}{dt}\right)_{\text{rad.libres}} = k_r (E_0 - E_{\text{inact}}) \left(\frac{-d[\text{PhOH}]}{dt}\right)^{\frac{1}{2}}$$

donde E_0 es la concentración inicial de enzima y $k_r = k_r^l (k_4)^{-0.5}$.

La inactivación de la enzima por adsorción en el polímero se puede representar matemáticamente suponiendo que la velocidad de adsorción de enzima activa es proporcional a la concentración de enzima nativa, $(E_0 - E_{\text{inact}})$, y al número de centros de adsorción disponibles en el polímero. El número de centros de adsorción generados durante la reacción debe ser proporcional a la cantidad de polímero formado, o lo que es lo mismo, debe ser proporcional a la cantidad de compuesto fenólico eliminado del medio de reacción, $([\text{PhOH}]_0 - [\text{PhOH}])$. Se supone que el número de centros ocupados es despreciable comparado con el número de centros disponibles debido a la baja relación entre la concentración de enzima y la de polímero. Por tanto, la velocidad de inactivación se puede escribir en la forma:

$$\left(\frac{dE_{\text{inact}}}{dt}\right)_{\text{adsor}} = k_{\text{adsor}} (E_0 - E_{\text{inact}}) ([\text{PhOH}]_0 - [\text{PhOH}])$$

Debido al atrapamiento la velocidad de inactivación de la enzima debe ser función de la velocidad de formación del polímero en las zonas cercanas a la enzima. Ya que la velocidad de formación del polímero es proporcional a la velocidad de eliminación de compuesto aromático, esta inactivación enzimática se puede representar matemáticamente por:

$$\left(\frac{dE_{\text{inact}}}{dt}\right)_{\text{atrap}} = -k_{\text{atrap}} \left(\frac{d[\text{PhOH}]}{dt}\right)$$

donde k_{atrap} es una constante de proporcionalidad.

La velocidad global de inactivación permanente de la enzima es, por tanto:

$$\left(\frac{dE_{\text{inact}}}{dt}\right) = (E_0 - E_{\text{inact}}) \left[k_r \left(\frac{-d[\text{PhOH}]}{dt}\right)^{\frac{1}{2}} + k_{\text{adsor}} ([\text{PhOH}]_0 - [\text{PhOH}]) \right] - k_{\text{atrap}} \left(\frac{d[\text{PhOH}]}{dt}\right)$$

Este modelo cinético está formado por la anterior ecuación diferencial más las dos siguientes:

$$\frac{dE_3}{dt} = \frac{k_{app}}{k_3} [H_2O_2] (E_0 - E_3 - E_{inact}) \left[\frac{[PhOH]}{k_1 [H_2O_2]} + \frac{k_2 + k_3}{k_2 k_3} \right]^{-1} - k_s E_3$$

$$\frac{d[PhOH]}{dt} = -(E_0 - E_3 - E_{inact}) \left[\frac{1}{k_1 [H_2O_2]} + \frac{1}{[PhOH]} \left(\frac{k_2 + k_3}{k_2 k_3} \right) \right]^{-1}$$

que, junto con la relación estequiométrica:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_0 - ([PhOH]_0 - [PhOH])$$

y las condiciones iniciales E_0 , $[PhOH]_0$ y $[H_2O_2]_0$, conforman un sistema que, resuelto por técnicas de cálculo numérico, proporcionan la variación con el tiempo de la concentración de sustrato fenólico. Tras calcular los valores de los parámetros cinéticos con técnicas de minimización, el modelo cinético fue validado con resultados experimentales obtenidos en un reactor tanque discontinuo, utilizando fenol como sustrato, peroxidasa de rábano y concentraciones iniciales de fenol y H_2O_2 iguales.

Sin embargo, no se tiene constancia de que estos dos últimos trabajos se hayan implementado en el modelo cinético original [215] ni que, por lo tanto, haya finalizado esta serie de estudios de Nicell sobre la cinética de la reacción estudiada.

Como resultado de la presente búsqueda bibliográfica se podría resumir que, existe prácticamente unanimidad sobre el ciclo principal del mecanismo de reacción, si bien las discrepancias que surgen sobre las reacciones secundarias y los mecanismos de inactivación de la enzima conducen a diversos modelos cinéticos, los cuales únicamente han mostrado su aplicabilidad en situaciones experimentales muy concretas.

2.8. Reactores continuos para la eliminación de compuestos fenólicos

La utilización de un proceso continuo presenta una serie de ventajas. Entre ellas, el proceso puede ser automatizado, los costes de operación son relativamente bajos y es posible operar durante largos periodos de tiempo y con grandes concentraciones iniciales de los compuestos fenólicos a eliminar. Fundamentalmente para la eliminación de dichos compuestos en continuo se han empleado tratamientos físicos de adsorción sobre lechos de carbón activo, procesos químicos de oxidación catalítica por vía húmeda, y tratamientos biológicos, con microorganismos y enzimas. En cuanto a las configuraciones de reactor utilizadas, las más empleadas son las de tanque continuo y lecho fluidizado.

Los reactores de lecho fluidizado han ido adquiriendo una importancia creciente debido a las ventajas que presentan frente a los reactores continuos más utilizados, el reactor tanque de mezcla completa y el tubular de lecho fijo. Los reactores de lecho fluidizado son especialmente recomendables cuando los sustratos a tratar sean viscosos o contengan partículas en suspensión. En este tipo de reactores, con relación a los de lecho fijo, se reducen las pérdidas de presión y se atenúa la formación de canales preferentes y de taponamientos, proporcionando un mayor aprovechamiento de la actividad catalítica disponible. Una ventaja importante frente a los reactores tanque continuos consiste en que, al estar la mezcla ocasionada por el movimiento de fluidización, no es necesaria la agitación mecánica, lo cual evita el deterioro por abrasión de las partículas de soporte.

Distintos autores han utilizado reactores de lecho fluidizado con carbón activo granular, que actúa como adsorbente de productos fenólicos. En algunos casos, el carbón también sirve de soporte de microorganismos que, unos con metabolismo aerobio y otros con metabolismo anaerobio, degradan dichos productos fenólicos [231-240].

Wilson y col. [241] utilizaron un reactor de lecho fluidizado con carbón activo granular a escala piloto para degradar los compuestos fenólicos de un

agua residual industrial, consiguiendo eliminar hasta un 90% de los compuestos clorados. Loh y Ranganath [242], consiguieron buenos rendimientos de eliminación de 4-clorofenol, trabajando con un biorreactor de lecho fluidizado que operaba simultáneamente con carbón activo granular y con cultivos de *Pseudomonas putida* inmovilizados sobre esferas de poliestireno.

También se han realizado estudios utilizando otros adsorbentes. Fahmy y col. [243] y Long-de Valliere y col. [244] han utilizado reactores de lecho fluidizado rellenos de arena para la eliminación de clorofenoles. Graham y col. [245, 246] usaron esferas de alginato cálcico impregnadas con gránulos de Pd/Fe en reactores de lecho fluidizado para la eliminación de 4-clorofenol.

Aunque se han realizado muchos estudios con *Pseudomonas* para la eliminación de fenol en reactores continuos, así como para la eliminación de 4-clorofenol en reactores discontinuos, hay pocos trabajos en los que dicho microorganismo se utilice para degradar 4-clorofenol en reactores continuos. Loh y col. [242] han estudiado la degradación de 4-clorofenol mediante un reactor “air lift” de lecho fluidizado con *Pseudomonas putida* inmovilizada en partículas de poliestireno expandido. El biorreactor fue capaz de degradar altas concentraciones de 4-clorofenol y fenol, estando dicha biodegradación limitada por la transferencia de oxígeno. Bettmann y Rehm [247] investigaron la eliminación en reactores continuos de fenol con células de *Pseudomonas putida* inmovilizadas en poliacrilamida-hidrazina consiguiendo buenos rendimientos de eliminación de fenol, 4-clorofenol y cresol bajo condiciones estériles.

Las peroxididasas a pesar de presentar mayor grado de especificidad que los microorganismos y de operar en un rango mayor de pH y temperatura, su uso en procesos continuos no está tan extendido, sin embargo ha ido cobrando importancia en los últimos años.

Ensuncho y col. [248] utilizaron tirosinasa inmovilizada en una matriz mixta de quitosan y alginato en reactores trifásicos de lecho fluidizado, a escala piloto y de laboratorio, para catalizar la transformación de fenol a

o-quinona, consiguiendo un porcentaje de eliminación de los productos fenólicos de más del 92%.

Trivedi y col. [249] investigaron la eliminación continua de fenol utilizando peroxidasa de semillas de soja inmovilizada en un gel híbrido sílice/alginate, en un reactor con recirculación que permite la simultánea reacción y regeneración del catalizador.

Las aplicaciones que hemos visto hasta ahora en este capítulo utilizan la inmovilización como medio para retener la enzima dentro del reactor continuo. Sin embargo existe otra forma de retener las enzimas en procesos continuos mediante el uso de membranas de adecuado tamaño de poro. En el caso de procesos enzimáticos suelen ser membranas de ultrafiltración. Ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes, en función de la aplicación específica se elegirá uno u otro.

En la bibliografía no se han encontrado referencias de trabajos de otros autores donde se eliminen los compuestos fenólicos en reactores enzimáticos asociados a un módulo de ultrafiltración. Los únicos trabajos encontrados en la bibliografía que hacen referencia al empleo de membranas de ultrafiltración son para retener el compuesto fenólico o para la inmovilización de la enzima sobre la membrana.

En ese sentido nuestro grupo de investigación ha realizado trabajos [250, 251] en los que se ha puesto de manifiesto la factibilidad de trabajar con reactores enzimáticos asociados a un módulo de ultrafiltración, concretamente con las enzimas β -galactosidasa y L-aminoacilasa. Por este motivo, se pensó probar esta configuración de reactor y módulo de membrana para el sistema que estamos estudiando en este trabajo.

2.9. Antecedentes inmediatos de tratamientos enzimáticos en compuestos fenólicos

A través de distintos proyectos, el grupo de Investigación “Análisis y Simulación de Procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana”, del

Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, donde se ha desarrollado la presente investigación, ha acumulado hasta la fecha amplia experiencia en lo que se refiere a la eliminación de compuestos fenólicos de efluentes industriales con tratamientos enzimáticos.

En primera instancia los sistemas enzimáticos con los que se han realizado estudios han sido: fenol-peroxidasa de soja, fenol-peroxidasa de rábano, 4-clorofenol-peroxidasa de soja, 4-clorofenol-peroxidasa de rábano, y de forma simultánea con ambos sustratos, fenol y 4-clorofenol [252-256]. Todos estos estudios se realizaron con la enzima soluble en reactores tanque discontinuo, en medios de reacción tamponados y con adición de polietilenglicol. Para los citados sistemas, se seleccionaron las condiciones óptimas de eliminación de los compuestos fenólicos, estudiando la influencia de las variables: temperatura, pH, cantidad de enzima, concentración inicial de peróxido de hidrógeno, concentración inicial de sustratos fenólicos (fenol y 4-clorofenol), variación simultánea de la concentración de sustratos (peróxido de hidrógeno y compuesto fenólico), así como la adición de polietilenglicol.

El siguiente paso fue la puesta a punto de métodos de inmovilización para estas enzimas [257-259]. Se eligió el método de inmovilización de enlace covalente a través de los grupo amino ($-NH_2$) de la enzima a un soporte de vidrio poroso (CPG-aldehído). Se inmovilizaron la enzima peroxidasa de soja y de rábano y se realizaron ensayos en reactor tanque discontinuo. Con estos derivados se realizó una primera aproximación a la cinética de la reacción enzimática, mediante un modelo que incorpora elementos propios del mecanismo de Chance-George.

De forma paralela a la inmovilización en soportes sólidos se iniciaron trabajos con configuraciones de reactor que permitían trabajar con la enzima en forma soluble [260]. Los resultados de este trabajo están publicados en tres artículos [261-263]. En ellos se calculan los parámetros cinéticos intrínsecos en el reactor tanque discontinuo y se proponen modelos de diseño, tanto para el reactor tanque discontinuo como para el tanque continuo.

Hasta el momento en el grupo de investigación se han realizado dos tesis doctorales en este ámbito de estudio. En la primera [263] se estudió la

eliminación de fenol con peroxidasa inmovilizada. Una de las principales aportaciones de este trabajo fueron los modelos cinéticos desarrollados y que explican de forma cuantitativa, basándose en la heterogeneidad del sistema, algunos fenómenos que hasta el momento eran difícilmente explicables [265-267]. Estos modelos tienen en cuenta las limitaciones difusionales crecientes que se producen por el hecho de que el polímero formado se deposita constantemente en la superficie de las partículas de catalizador. En este trabajo ya se utilizaron distintas peroxidases, seleccionándose una de ellas [268] que lamentablemente fue descatalogada poco después por la casa comercial que la suministraba.

En la segunda de la Tesis Doctorales [269], en la que el principal contaminante estudiado fue el 4-clorofenol. En esta Tesis se obtuvieron derivados inmovilizados en diversos soportes sólidos con diferentes tamaños de poro y superficies específicas, y se utilizan en distintas configuraciones de reactor continuo [270, 271].

Como continuación de estos trabajos, en la presente Tesis se estudiará el proceso de eliminación de 4-clorofenol empleando para ello tres peroxidases: una nueva enzima de soja, que ha sido suministrada por una empresa norteamericana, una de rábano que ya había sido utilizada por el grupo investigador y adicionalmente una peroxidasa de alcachofa, aislada, purificada y comercializada por un empresario de la Región de Murcia. Una vez seleccionada la mejor peroxidasa en el proceso de eliminación de 4-clorofenol, la investigación se ha enfocado en el estudio de dos configuraciones de reactor en continuo no ensayadas en trabajos anteriores, tanque continuo y lecho fluidizado, en ambos casos asociados al módulo de ultrafiltración. Estas configuraciones permiten mantener el derivado inmovilizado en el interior del reactor y, simultáneamente, la membrana alojada en el módulo retiene el polímero formado, dando lugar a una corriente libre tanto del contaminante fenólico como de los polímeros formados durante la reacción de eliminación. Además se pretende un acercamiento a condiciones más parecidas a los efluentes reales, en los que suele haber más de un contaminante, mediante el estudio de la influencia que pueden tener unos sobre otros, y la prospección de enzimas menos purificadas, y por lo tanto menos costosas, para el tratamiento de estos efluentes.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

A continuación se detallan los reactivos utilizados en los experimentos realizados en este trabajo.

3.1.1.1. Reactivos utilizados en la determinación de la actividad enzimática

- Peroxidasa de semillas de soja (SBP), E.C. 1.11.1.7, de 1356 U/mg (utilizando guaicol como sustrato a pH 6.0 y 30 °C), adquirida a Bio-Research Products, Inc. Lote B275P154.
- Peroxidasa de rábano (HRP), E.C. 1.11.1.7, de 113 U/mg (una unidad se define en este caso como la cantidad de enzima que formará 1 mg de purpurogallina a partir de pirogallol en 20 segundos a pH 6 y 20 °C), adquirida a Sigma-Aldrich Co. Lote 031k7465.
- Peroxidasa de alcachofa (AKPC), E.C.1.11.1.7, de 3142 U/mg (una unidad se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de ABTS en un minuto a pH 4.5 y 25 °C), adquirida a Artbiochem S.I., Inc. Lote AKPC LM1106.

- Tampón fosfato de concentraciones 0.1 M, pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0. El tampón se prepara con fosfato bisódico 0.1 M y con fosfato monosódico 0.1 M
- Fosfato bisódico anhidro (Na_2HPO_4), suministrado por Panreac Química S.A.
- Fosfato monosódico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), suministrado por Panreac Química S.A.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 35% en peso, adquirido a Sigma-Aldrich Co.
- 4-Aminoantipirina, AAP, ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$), proporcionado por Sigma-Aldrich Co.
- 4-Clorofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}$) del 99% de pureza, proporcionado por Sigma-Aldrich Co.
- 3-Clorofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}$) del 98% de pureza, proporcionado por Sigma-Aldrich Co.
- 2-Clorofenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{ClO}$) del 99% de pureza, proporcionado por Sigma-Aldrich Co.
- Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) del 99% de pureza, proporcionado por Sigma-Aldrich Co.

3.1.1.2. Reactivos utilizados en la valoración de la disolución patrón de peróxido de hidrógeno

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), descrito anteriormente.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), del 98% de pureza, suministrado por Panreac Química S.A.
- Permanganato potásico (KMnO_4), disolución 0.1 N exactamente valorada, suministrado por Panreac Química S.A.

3.1.1.3. Reactivos utilizados en la eliminación de compuestos fenólicos

- 4-Clorofenol, 3-Clorofenol, 2-Clorofenol y fenol descritos anteriormente.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), descrito anteriormente.
- Peroxidasa de soja, rábano y alcachofa, descritas anteriormente.
- Tampón fosfato de concentraciones 0.1 M, pH 7.0, descrito anteriormente.
- Catalasa de hígado bovino, E.C. 1.11.1.6, de 1870 U/mg sólido, adquirida a Sigma-Aldrich Co. La catalasa se utiliza para detener la reacción enzimática ya que, en exceso, descompone instantáneamente el peróxido de hidrógeno.
- Sulfato doble de aluminio y potasio, $(AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O)$, de riqueza mínima 98%, adquirido a Sigma-Aldrich Co, que se utiliza como floculante.

3.1.1.4. Reactivos utilizados en la determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos

- Bicarbonato sódico ($NaHCO_3$), del 99.5% de pureza, proporcionado por Sigma-Aldrich Co.
- Ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$), de riqueza 99%, suministrado por Sigma-Aldrich Co.
- 4-Aminoantipirina, AAP descrita anteriormente.

3.1.1.5. Reactivos utilizados en la determinación de proteína por el método de Lowry

- Tartrato sódico-potásico ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$), suministrado por Probus S.A.
- Sulfato cúprico pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), proporcionado por Merck & Co.
- Reactivo Folin-Ciocalteu, 2 N, adquirido a Sigma-Aldrich Co.

- Albúmina de suero bovino (fracción V) proporcionada por Sigma Aldrich Fine Chemicals.

3.1.1.6. Reactivos utilizados en la inmovilización de la enzima

- Peroxidasa de semillas de soja, descrita anteriormente.
- Vidrio poroso de tamaño de poro controlado, PG 75-400, 200-400 mallas, diámetro nominal 77 Å, superficie específica 182 m²/g, proporcionado por Sigma-Aldrich Fine Chemicals. Lote 55F0107.
- Ácido nítrico (HNO₃) del 60% de pureza, suministrado por Tecnoquim S.L.
- γ-APTES, trietoxisililpropilamina, (C₉H₂₃NO₃Si), del 98% de pureza, proporcionado por Sigma Aldrich Co.
- Ácido clorhídrico (HCl), de riqueza mínima del 36.5%, proporcionado por Probus S.A.
- Glutaraldehído (CHO(CH₂)₃CHO), Grado II, 25% en disolución acuosa, proporcionado por Sigma-Aldrich Co.
- Tampón fosfato de concentraciones 0.1 M y 0.05 M, pH 7.0. descritos anteriormente.

3.1.1.7. Reactivos y material utilizados en la determinación de fenol y 4-clorofenol por HPLC

- 4-Clorofenol y fenol descritos anteriormente.
- Filtro de poliéster CROMAFIL Xtra PET- 45/25 para uso con sustancias polares o de polaridad media, tamaño de poro de 0.45 μm de diámetro Ø 25 mm, lote 0221 y ref 729220400
- Agua para uso en HPLC, suministrada por Sigma-Aldrich Co.
- Metanol para uso en HPLC, suministrado por Sigma-Aldrich Co.

- Ácido sulfúrico (H₂SO₄), del 98% de pureza, suministrado por Panreac Química S.A.

3.1.2. Equipos

3.1.2.1. Equipo utilizado en la eliminación de los compuestos fenólicos

- Reactor tanque de vidrio Pobel, con tres bocas superiores, provisto de camisa exterior de agua, con un volumen total de 50 y 100 ml.
- Reactor tubular de vidrio Afora, de 18 cm de altura y 1 cm de diámetro interno, con una placa porosa situada a 1.5 cm de la base, y un volumen total de 14 ml.
- Módulo de ultrafiltración (UF) formado por una célula de ultrafiltración tangencial Millipore Minitan™ System para Minitan^{R-S} Filter Sheets y una bomba peristáltica de recirculación (BR) Millipore provista de tubos de Viton^R de 3.2 mm de diámetro interno capaz de proporcionar un máximo de 1000 rpm. Las membranas empleadas a lo largo de toda la experimentación han sido fabricadas por la misma casa comercial del módulo, Millipore 30000 NMWL de polisulfona.
- Agitador magnético SBS A-01.
- Baño de agua provisto de un termostato de inmersión digital Selecta Digiterm 100.
- Bombas peristálticas de sobremesa Watson Marlow Digital, modelo 520 Du-RL.
- Centrífuga Eppendorf (MiniSpin).
- pHmetro Crisol, modelo micro pH 2000.

En la Figura 3.1 se expone un detalle del reactor tanque, reactor tubular y el módulo de Ultrafiltración utilizado.



Figura. 3.1. Reactor tanque, reactor tubular y módulo de ultrafiltración

3.1.2.2. Equipo utilizado en la inmovilización de la enzima

El dispositivo experimental que ha sido utilizado en el proceso de inmovilización de la enzima está formado por:

- Reactor tubular de vidrio encamisado de 35 cm de altura y 3 cm de diámetro, provisto con una placa porosa en la parte inferior, situada a 4 cm de la base.
- Criostato compuesto por un baño Techne, modelo RB-12A, provisto de un termostato Tempette TE-8D.
- Bombas peristálticas de sobremesa Watson-Marlow Digital, modelo 505 Du/RL.
- Estufa Selecta.

3.1.2.3. Equipos analíticos

- Espectrofotómetro UV/Vis Termo Spectronic, modelo Hellos α . Las cubetas son de vidrio, de 3 ml de capacidad y anchura de paso óptico de 1 cm.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Waters, compuesto de los siguientes elementos:
 - Un detector de matriz de fotodiodos (serie 2996 de Waters).
 - Un inyector automático (serie 717 plus Waters).

- Una columna XBridge C18 (4.6 x 150 mm suministrada por Waters) de tamaño de partícula 5 μm .
- Un sistema de gradiente (serie 600 de Waters).
- Un desgasificador en línea de Waters.
- El software Empower 2 de Waters.

En las Figura 3.2 y 3.3 se muestra una imagen del espectrofotómetro y del cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) empleados.



Figura. 3.2. Espectrofotómetro ultravioleta/visible.



Figura. 3.3. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

3.2. Métodos

3.2.1. Método analítico utilizado en la factoración de la disolución de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se descompone con relativa facilidad, por lo que se hace necesario usar un método analítico de valoración para determinar su concentración real.

El peróxido de hidrógeno reacciona con el permanganato en disolución ácida, con reducción de éste y desprendimiento de oxígeno según la reacción siguiente:



El procedimiento es el siguiente: se toman 25 ml de la disolución de peróxido a valorar (0.2 N), se llevan a un erlenmeyer de 400 ml, diluyendo hasta 200 ml con agua, se añaden 20 ml de ácido sulfúrico diluido (1:5) y se valora con la disolución de permanganato hasta coloración rosa permanente.

El factor del peróxido, $f_{\text{peróxido}}$, se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$V_{\text{permanganato}} \times N_{\text{permanganato}} = V_{\text{peróxido}} \times N_{\text{peróxido}} \times f_{\text{peróxido}}$$

donde,

$V_{\text{permanganato}}$ = volumen en ml de permanganato gastado en la valoración

$N_{\text{permanganato}}$ = normalidad del permanganato = 0.1 N

$V_{\text{peróxido}}$ = volumen empleado de peróxido = 25 ml

$N_{\text{peróxido}}$ = normalidad teórica del peróxido = 0.2 N

3.2.2. Determinación de la actividad enzimática

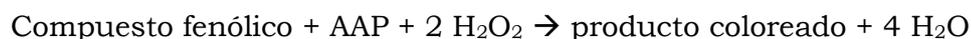
Para la determinación de la actividad enzimática, se ha utilizado un método espectrofotométrico de medida continua de absorbancia en una cubeta

de vidrio de 3 ml y 1 cm de anchura de paso óptico. Las disoluciones empleadas en este análisis han sido:

- Tampón fosfato 0.1 M, pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0.
- El correspondiente compuesto fenólico (4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol y fenol) de concentración 20 mM, disuelto en el correspondiente tampón fosfato 0.1 M.
- 4-Aminoantipirina (AAP) ($C_{11}H_{13}N_3O$) de concentración 9.6 mM, disuelta en el correspondiente tampón fosfato 0.1 M.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de concentración 2 mM, disuelto en agua, recientemente preparado y factorado.
- Solución de la respectiva peroxidasa (SBP, HRP y AKPC), de una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ para soja y rábano, mientras que, para alcachofa ha sido de 5 $\mu\text{g/ml}$, en todos los casos disuelta en agua.

En este análisis se han empleado los correspondiente compuestos fenólicos y el H_2O_2 como sustratos de generación de color. Utilizando cantidades en exceso de cada uno de los compuestos fenólicos y AAP, la velocidad de generación del color a 505 nm es proporcional a la velocidad de consumo del H_2O_2 (reactivo limitante), que a su vez es proporcional a la concentración de enzima activa en la muestra [222].

La reacción que tiene lugar es:



El análisis requirió de la adición de los reactivos en la cubeta en el siguiente orden: 1500 μl del compuesto fenólico 20 mM, 300-400 μl del correspondiente tampón fosfato 0.1 M, 750 μl de la solución de AAP 9.6 mM, 300 μl del H_2O_2 2 mM y, por último, 50-150 μl de la solución de peroxidasa. Las cantidades de tampón fosfato han variado dependiendo de la cantidad de disolución de enzima adicionada, de manera que el volumen total en la cubeta fue constante en todos los experimentos e igual a 3 ml. Se han realizado tres medidas con cada disolución enzimática, adicionando 50, 100 y 150 μl de la misma y, por lo tanto 400, 350 y 300 μl de tampón respectivamente.

Una vez adicionados todos los reactivos a la cubeta, esta se agita, se introduce en el espectrofotómetro y se registra la absorbancia a 505 nm de forma continua durante 1 minuto, obteniéndose la pendiente ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$). Inicialmente se realizó un blanco, exento de enzima, con el correspondiente tampón fosfato 0.1 M y los reactivos ya mencionados.

La pendiente de la recta ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) obtenida se utiliza para determinar el aumento de concentración del producto coloreado con el tiempo de acuerdo a la siguiente ecuación, correspondiente a la ley de Lambert y Beer:

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{l \varepsilon}$$

siendo ε el coeficiente de extinción milimolar del producto ($10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y l la anchura de paso óptico de la cubeta (1 cm).

La unidad de actividad enzimática se ha definido como los μmoles de sustrato convertidos por minuto y por miligramo de enzima. Conocido el valor de la velocidad de generación del producto, y teniendo en cuenta la cantidad de enzima adicionada en cada ensayo, se puede calcular la actividad específica de la peroxidasa, en U/mg, a partir de la expresión:

$$\text{Actividad específica} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\Delta C}{\Delta t} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \times \text{min}} \right) \times \text{dilución} \left(\frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right)$$

3.2.3. Determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos

La concentración del compuesto fenólico residual ha sido determinado por espectrofotometría, el método utilizado es el recomendado por el Standard Methods de 1995 [272]. En estudios previos [264, 268, 269] se realizó un espectro de absorción donde se ha determinado que el producto de la reacción de los compuestos fenólicos y los reactivos colorimétricos, presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 505 nm ($\lambda = 505 \text{ nm}$). Los reactivos colorimétricos empleados en este análisis han sido:

- Ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) de concentración 83.4 mM, disuelto en bicarbonato sódico ($NaHCO_3$) 0.25 M.
- 4-Aminoantipirina (AAP) ($C_{11}H_{13}N_3O$) de concentración 20.8 mM, disuelta en bicarbonato sódico ($NaHCO_3$) 0.25 M.

En una cubeta, de anchura de paso óptico de 1 cm y 3 ml de capacidad, se introducen 2.4 ml de muestra diluida con tampón fosfato (reactor discontinuo) y agua (reactor continuo), de manera que la concentración del correspondiente compuesto fenólico no supere un valor de 0.2 mM. A continuación se añaden 0.3 ml de cada uno de los reactivos de análisis. A manera de ejemplo en la Figura 3.4 se presenta la reacción que tiene lugar con el 4-clorofenol, en ella se forma un producto coloreado (rojo vino) por lo que es posible cuantificarlo espectrofotométricamente frente a un blanco exento de dicho compuesto, de forma idéntica se realiza para los demás compuestos fenólicos de esta investigación.

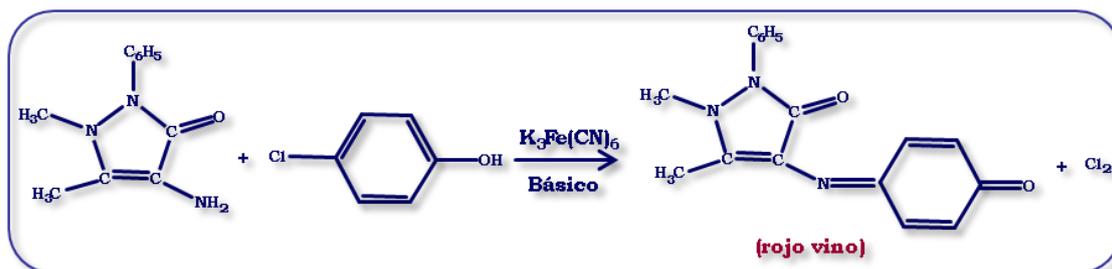


Figura 3.4. Reacción de 4-clorofenol con 4-aminoantipirina en presencia de ferricianuro potásico, dando lugar a una antipirinquinonaimina coloreada.

Previo a la realización de las medidas se ha llevado a cabo una recta de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos con la cual se ha transformado la absorbancia obtenida, en la correspondiente concentración residual para cada sustrato; las rectas de calibrado se muestra en la Figura 3.5, los valores numéricos se recogen en las Tablas 16.1 a 16.4 del Anexo 1.

La ecuación obtenida para cada una de las rectas y su respectivo coeficiente de correlación lineal acompañan a la figura.

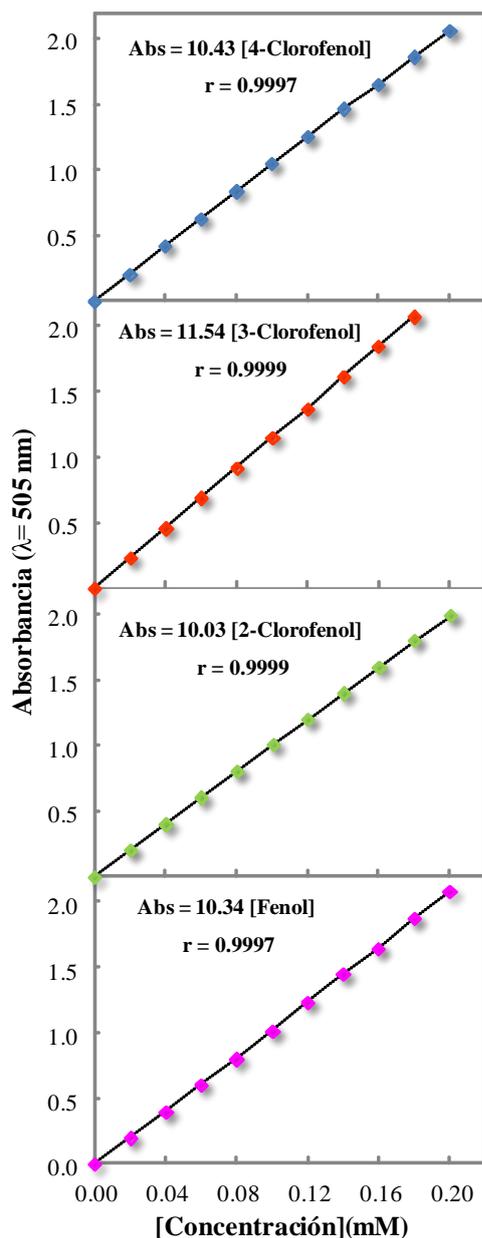


Figura 3.5. Rectas de calibrado para la determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos, utilizando el método de análisis de la AAP ($\lambda = 505$ nm). \blacklozenge 4-clorofenol, \blacklozenge 3-clorofenol, \blacklozenge 2-clorofenol y \blacklozenge fenol.

3.2.4. Determinación de fenol y 4-clorofenol mediante HPLC

El análisis de las muestras por cromatografía líquida se ha realizado en las siguientes condiciones:

Columna: Xbridge C18 de tamaño de partícula 5 μ m.

Fase móvil: CH₃OH/H₂SO₄ 4 mM (50/50)

Caudal: 1 ml/min

Volumen de muestra: 10 μ l

Detector: matriz de fotodiodos

En este análisis se ha determinado la concentración de dos compuestos fenólicos (fenol y 4-clorofenol), en la Tabla 3.1 se muestran los tiempos de retención y las longitudes de onda, en los que han sido cuantificados.

Tabla 3.1. Tiempos de retención y longitud de onda para fenol y 4-clorofenol.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda λ (nm)
Fenol	3.90	218
4-clorofenol	8.49	225

Asimismo en la Figura 3.6 se muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en 2 y 3D.

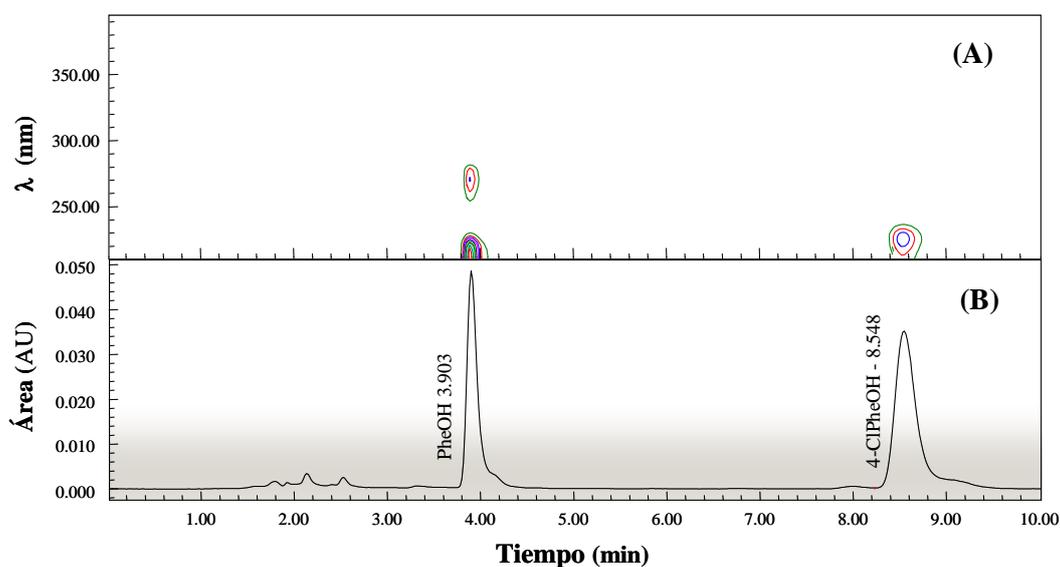


Figura 3.6. Cromatograma de los compuestos fenólicos analizados. (A) 3D y (B) 2D

Inicialmente se ha llevado a cabo la recta de calibrado para cada uno de los compuestos fenólicos, obteniendo la relación entre el área del pico, y su concentración. Las rectas de calibrado se muestra en la Figura 3.7, los valores numéricos se recogen en las Tablas 16.5 y 16.6 del Anexo 1.

La ecuación obtenida para cada una de las rectas y su respectivo coeficiente de correlación lineal acompañan la figura.

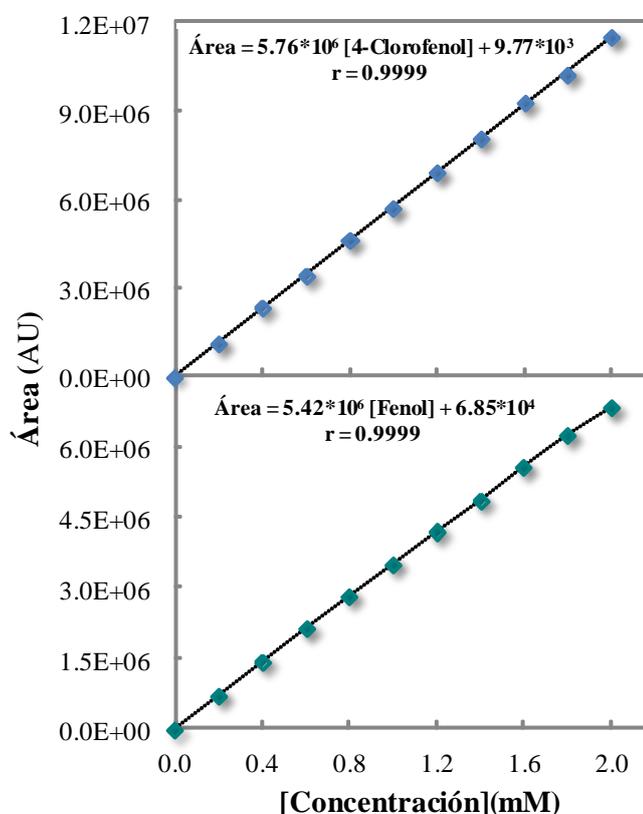


Figura 3.7. Recta de calibrado por HPLC para los compuestos fenólicos: \blacklozenge 4-clorofenol y \blacklozenge fenol.

3.2.5. Determinación de proteína por el método de Lowry

Para la determinación de la concentración de proteína se ha utilizado la modificación del método de Lowry propuesta por Hartree [273].

A 1 ml de disolución de proteína se adicionan 0.9 ml de disolución A y se agita, la mezcla resultante se calienta durante 10 minutos en un baño a 50 °C. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente (≈ 20 °C) y se adiciona 0.1 ml de disolución B. Se agita y se mantiene 10 minutos a temperatura ambiente (≈ 20 °C). Seguidamente se añaden 3 ml de disolución C y de nuevo se calienta la mezcla en un baño a 50 °C durante 10 minutos.

Una vez enfriada la mezcla de reacción, se mide la absorbancia de la disolución resultante en el espectrofotómetro, a 650 nm, frente a un blanco exento de proteína.

Mediante la correspondiente recta de calibrado, realizada con albúmina de suero bovino (0 - 0.15 mg/ml), se calcula la concentración de proteína presente en la muestra.

En la Tabla 16.7 del Anexo 1 y en la Figura 3.8 se recogen los valores numéricos y la representación gráfica de esta recta de calibrado.

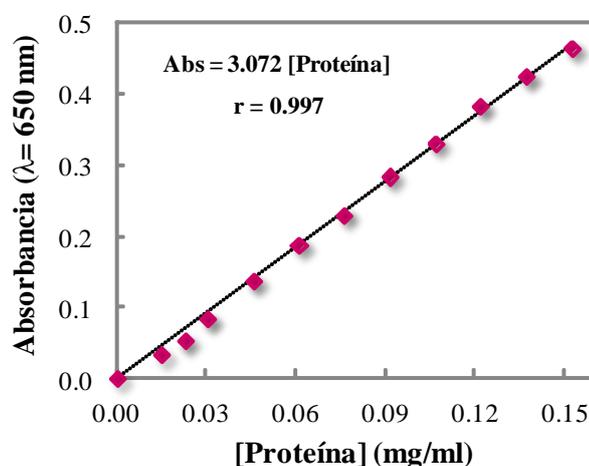


Figura 3.8. Recta de calibrado de la concentración de la proteína albúmina de suero bovino.

La ecuación obtenida para dicha recta y su coeficiente de correlación lineal acompañan la figura.

Las disoluciones usadas en el método de Lowry han sido las siguientes:

- Disolución A: 2 g de tartrato sódico-potásico y 100 g de carbonato sódico disueltos en 500 ml de hidróxido sódico 1 M y llevados a 1 l con agua destilada.
- Disolución B: 2 g de tartrato sódico-potásico y 1 g de sulfato cúprico pentahidratado disueltos en 90 ml de agua bidestilada y 10 ml de hidróxido sódico 1 M.
- Disolución C: un volumen de reactivo Folin-Ciocalteu por cada 15 volúmenes de agua bidestilada. Esta disolución se prepara en el

momento de usarla y debe mostrar una normalidad comprendida entre 0.15 y 0.18 N.

3.2.6. Inmovilización de la enzima a PG-aldehído a través de grupos amino

Preparación de soporte: la limpieza del vidrio se realiza añadiendo por cada gramo de soporte 50 ml de ácido nítrico al 5% (v/v). Se mantiene entre 80-90 °C durante una hora y se lava con abundante agua destilada.

Activación del soporte: a un gramo de soporte lavado se le añaden 20 ml de una disolución acuosa al 10% (v/v) de γ -APTES. Después, se ajusta el pH entre 3 y 4 con ácido clorhídrico 6 N y se mantiene 2 horas a 75 °C. Se filtra en un embudo Buchner y se lava con abundante agua destilada. Una vez seco (115 °C toda la noche), se puede almacenar hasta su uso.



Figura. 3.9. Sistema utilizado en el proceso de inmovilización.

Preparación del PG-aldehído: un gramo del soporte ya activado se coloca en el reactor tubular descrito en el apartado de materiales y se le añaden 25 ml de una disolución de glutaraldehído al 2.5 % (v/v) en tampón fosfato 0.05 M de pH 7. Se recircula la disolución mediante una bomba peristáltica durante una hora a temperatura ambiente (la bomba también ha sido descrita en el apartado de materiales). Se observará un cambio en el color del soporte de blanco a marrón anaranjado. Transcurrido este tiempo, se retira el sobrenadante y se lava dos veces con 25 ml del mismo tampón.

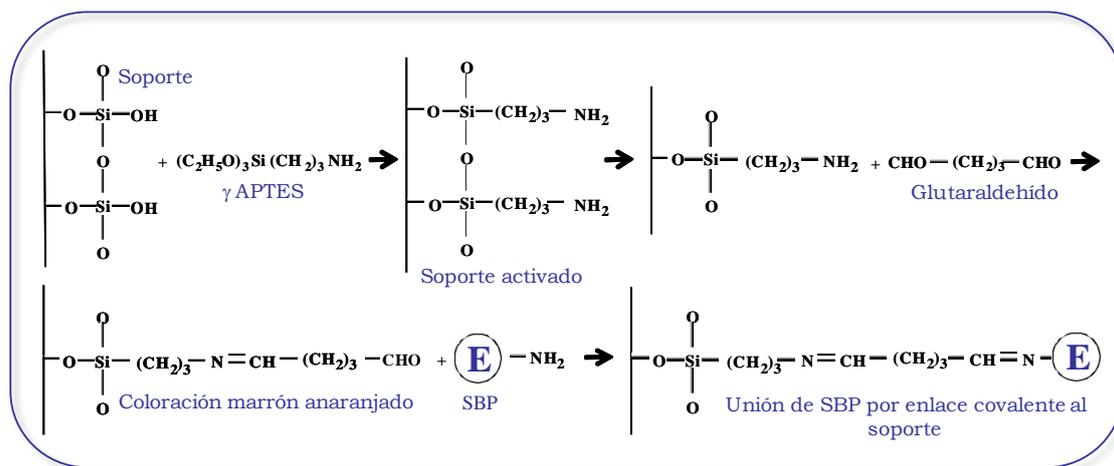


Figura 3.10. Esquema del proceso de inmovilización de la peroxidasa al soporte

Inmovilización de la enzima a través de grupos amino: a un gramo del derivado PG-aldehído se le añaden 40 ml de una disolución de enzima de la concentración deseada disuelta en tampón fosfato 0.1 M de pH 7, recirculándose mediante la bomba durante toda la noche a 4 °C, tal y como se muestra en la Figura 3.9. Transcurrido este tiempo, se retira el sobrenadante (para el análisis de la proteína) y se lava tres veces con 40 ml del mismo tampón (los lavados también se conservan para analizar la proteína). El derivado inmovilizado obtenido se resuspende en 50 ml del tampón que vaya a utilizarse en la reacción enzimática, es decir, tampón fosfato 0.1 M de pH 7, y se almacena a 4 °C hasta ser utilizado. Las reacciones que se producen en la inmovilización se recogen en el esquema representado en la Figura 3.10.

3.2.7. Caracterización de los derivados inmovilizados

En los estudios de inmovilización de enzimas es frecuente determinar una serie de parámetros estándar que permiten la caracterización de los derivados inmovilizados. Entre ellos se encuentran, la cantidad de proteína inmovilizada, el rendimiento de proteína inmovilizada y el porcentaje de actividad enzimática retenida por el derivado inmovilizado. El procedimiento para la determinación de proteína ya ha sido descrito en la *sección 3.2.5 (Determinación de proteína por el método de Lowry)*. A continuación se exponen los protocolos para los otros dos parámetros mencionados.

3.2.7.1. Cantidad de enzima inmovilizada

El rendimiento de proteína inmovilizada es el cociente entre la cantidad de enzima acoplada al soporte y la inicialmente ofrecida en el proceso de inmovilización, expresado en tanto por ciento.

Una vez conocido, mediante el método de Lowry, la cantidad presente de enzima en la disolución inicial, en el sobrenadante y en los tres lavados realizados al derivado inmovilizado, el cálculo de la cantidad de enzima acoplada al soporte vendrá dado por una sencilla resta entre la enzima en la disolución inicial a inmovilizar, menos la enzima retirada en el sobrenadante y en los tres lavados.

$$\text{Rendimiento proteina} = \frac{(\text{mg proteína iniciales} - \text{mg proteína retirados})}{\text{mg proteína iniciales}} \times 100$$

Además de este parámetro, para completar la caracterización del derivado hay que determinar la cantidad de proteína inmovilizada, es decir, los miligramos de proteína inmovilizada por gramo de soporte y la proteína inmovilizada por mililitro de suspensión.

3.2.7.2. Determinación del porcentaje de actividad enzimática retenida

Para el cálculo del porcentaje de actividad retenida por el derivado inmovilizado de la peroxidasa, se han realizado varios ensayos de actividad con la enzima soluble e inmovilizada, variando las cantidades de enzima y determinando las velocidades de reacción en los primeros 2.0 minutos. Se ha tomado como aproximación para dicha velocidad la siguiente expresión:

$$r_{2.0} = \left(\frac{\Delta[4\text{-clorofenol}]}{\Delta t} \right)_{2.0} \text{ mM/min}$$

Representando las velocidades obtenidas frente a las distintas cantidades de enzima empleadas, se obtiene un ajuste lineal. Dividiendo la pendiente de la recta obtenida para la enzima inmovilizada por la obtenida para la enzima soluble, se obtiene el porcentaje de actividad retenido tras la inmovilización.

3.2.8. Experimentación en reactor tanque discontinuo

3.2.8.1. Ensayos para determinar el pH óptimo y T^a óptima de las tres peroxidasas en forma soluble

Las disoluciones que han sido preparadas para estos ensayos son:

- Tampón fosfato 0.1 M, pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0.
- 4-clorofenol de concentración 20 mM, disuelto en el correspondiente tampón fosfato 0.1 M.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de concentración 100 mM, disuelto en agua y debidamente factorado.
- Solución de la respectiva peroxidasa, de concentración 50 µg/ml, disuelta en agua.
- Disolución de catalasa en agua de 2200 U/ml.
- Disolución de sulfato de aluminio y potasio en agua, de concentración 40 mg/ml.

En todos los experimentos se ha utilizado un volumen de reacción de 25 ml, y una velocidad de agitación de 700 rpm. La concentración inicial de ambos sustratos en el reactor se ha mantenido constante en todos los ensayos (2.0 mM) así como la concentración de enzima (10 µg/ml). Para los ensayos de la determinación del pH óptimo se operó a una temperatura de 30 °C y en los ensayos de la determinación de la temperatura óptima se ha utilizado el pH óptimo correspondiente para cada peroxidasa.

Todos los ensayos han comenzado con la puesta en marcha del baño termostático y la recirculación del agua por la camisa exterior del reactor. Al llegar a la temperatura deseada se adiciona al reactor el tampón necesario para alcanzar el volumen indicado y se deja hasta atemperar. En la Figura 3.11 se muestra una imagen del dispositivo utilizado.



Figura 3.11. Reactor tanque discontinuo

A continuación se adiciona el 4-clorofenol, seguido de la respectiva peroxidasa, y finalmente el peróxido de hidrógeno, con cuya adición comienza la reacción. A intervalos de tiempo regulares (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 40, 50 y 60 min) se toman las muestras del reactor. Se pipetea 0.5 ml de muestra añadiéndola a un eppendorf que contiene 0.5 ml de disolución de catalasa saturada y se agita. La catalasa en exceso cataliza la descomposición inmediata del peróxido de hidrógeno, lo cual detiene la reacción. A la mezcla anterior se le añade 0.1 ml de coagulante (sulfato de aluminio y potasio) para favorecer la precipitación del polímero que se forma en la reacción enzimática y que está presente en la muestra. Por último, se centrifugan las muestras durante 30 minutos a una velocidad de 10,000 rpm y posteriormente se analiza el 4-clorofenol en el sobrenadante.

3.2.8.2. Ensayos con la enzima inmovilizada

Cuando se realizan los ensayos con la enzima inmovilizada (derivado inmovilizado de SBP), la toma de muestra se realiza de modo distinto. El dispositivo de toma de muestras consta de un tubo de silicona de 3 mm de diámetro interno unido, en uno de sus extremos, a una malla de nylon de 50 μm de luz de malla, con lo que se consigue que las muestras se encuentren libres tanto del polímero formado como del derivado inmovilizado y, por tanto, preparadas para el posterior análisis de 4-clorofenol sin necesidad de tratamiento previo. El dispositivo de toma de muestras se observa claramente en la Figura 3.12.



Figura 3.12. Reactor tanque, con dispositivo de toma de muestra.

3.2.9. Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima en soluble

3.2.9.1. Calibrado de las bombas

Como primer paso para el trabajo en el tanque continuo con módulo de membrana se llevó a cabo el calibrado de las bombas peristálticas empleadas en la alimentación de los reactivos, y en la evacuación de los productos. Para ello, haciendo circular agua, se han realizado ensayos utilizando distintas velocidades, midiendo con una probeta el volumen evacuado en un tiempo determinado, estableciéndose así, el caudal correspondiente a cada valor de velocidad utilizado.

Con los resultados obtenidos, representando caudales frente a velocidad, se han obtenido las rectas de calibrado de las tres bombas utilizadas, dos para la alimentación de los sustratos (compuesto fenólico y H_2O_2) y una tercera para la evacuación del permeado del módulo de membrana. Las rectas de calibrado de las bombas se muestran en la Figura 3.13, cuyos valores numéricos se corresponden con las Tablas 16.8 a 16.10 del Anexo 1.

Las ecuaciones obtenidas para dichas rectas y su coeficiente de correlación lineal acompañan a la figura.

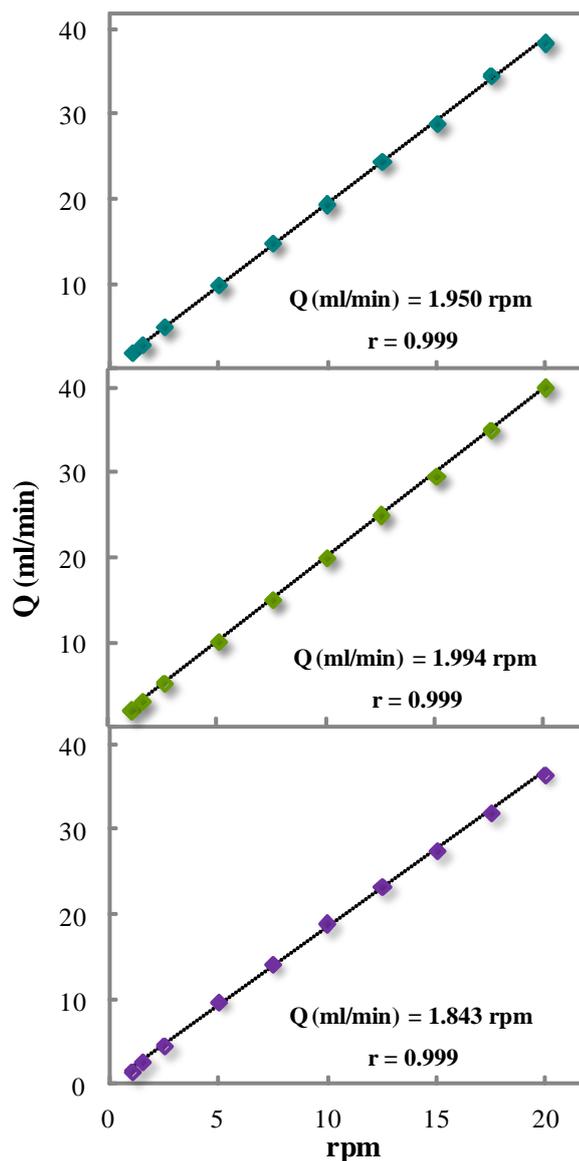


Figura 3.13. ♦ Recta de calibrado de la bomba peristáltica de alimentación de los compuestos fenólicos, ◆ recta de calibrado de la bomba peristáltica de alimentación de H₂O₂ y ◆ recta de calibrado de la bomba de evacuación del permeado del módulo de membrana.

3.2.9.2. Puesta en marcha y modo de operación

El sistema de reacción, del que se muestra un esquema en la Figura 3.14, consiste en un acoplamiento en serie del reactor tanque continuo con el módulo de membrana, ambos descritos en la sección 3.1.2.1. (*Equipo utilizado en la eliminación de los compuestos fenólicos*). Este sistema consta, asimismo, de dos bombas para la alimentación del sustrato fenólico y el peróxido de

hidrógeno, una tercera que succiona del reactor y alimenta la disolución a la cámara de concentrado de la membrana, y una cuarta bomba para la evacuación de los productos de reacción de la cámara de permeado.

En estos experimentos se ha trabajado a temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), en medio sin tamponar y a una velocidad de agitación de 300 rpm. El medio de reacción ha sido agua en todos los casos y se han ensayado volúmenes de reactor de 50, 75 y 100 ml.

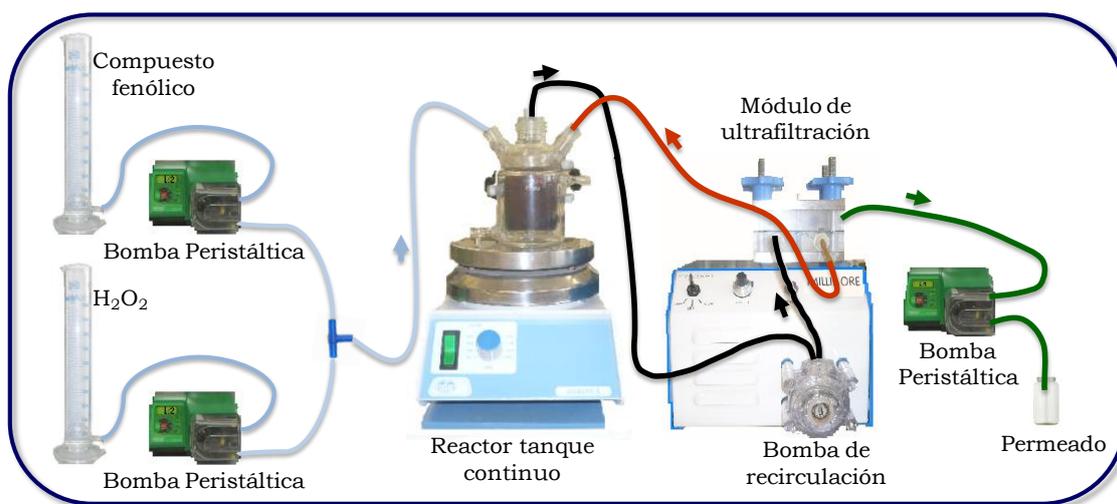


Figura 3.14. Esquema del reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima soluble.

Inicialmente se adicionan al reactor los volúmenes exactos de disolución del correspondiente sustrato fenólico a eliminar y peróxido de hidrógeno requeridos para cada ensayo. A continuación, el sustrato fenólico y el peróxido de hidrógeno se alimentan con el mismo caudal ($Q = 2.5\text{ ml/min}$), por medio de las dos bombas de entrada al reactor. Cuando comienzan a entrar los sustratos al reactor, se accionan las bombas de recirculación y la de salida, esta última a un caudal doble que las de entrada ($Q = 5\text{ ml/min}$), de manera que se mantenga el volumen del reactor constante. También es importante controlar los caudales de entrada y salida al módulo de membrana, que se realiza como se indica a continuación: en el retorno del rechazo al reactor existe una válvula que permanece cerrada hasta que comienza a salir permeado. En ese momento se abre la válvula hasta ajustar el caudal de salida de permeado en 5 ml/min . El tiempo de reacción comienza a

computarse cuando se añade la disolución de enzima al reactor. Las muestras se toman directamente del reactor y de la salida del permeado, a intervalos de tiempo regulares (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 y 80 min). El tratamiento y análisis de las muestras es similar al realizado en tanque discontinuo, se pipetea 0.5 ml de muestra añadiéndola a un eppendorf que contiene 0.5 ml de solución de catalasa saturada que detiene la reacción y se agita. A la mezcla anterior se le añade 0.1 ml o 0.2 ml de coagulante sulfato de aluminio y potasio (0.1 ml para 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol, y 0.2 ml para el fenol) lo que favorece la precipitación del polímero que se ha formado en el reactor. Por último, se centrifugan las muestras durante 30 minutos a una velocidad de 10,000 rpm y se analiza en el sobrenadante, el compuesto fenólico remanente.

3.2.9.3. Ensayos sin reacción

Se han realizado ensayos sin reacción, en ausencia de ambos sustratos, introduciendo en el reactor sólo agua y enzima con dos finalidades: Una primera serie para comprobar si la membrana es capaz de retener la enzima de forma cuantitativa en las condiciones de reacción y a continuación otros ensayos para comprobar si la presencia de polímero sobre la membrana contribuye a evitar el paso de la enzima a través de la misma.

Los experimentos sin reacción para verificar si la enzima atraviesa o no los poros de la membrana, se han realizado para las tres peroxidasas (SBP, HRP y AKPC). Para ello se verificó que las conducciones del sistema solo contenían agua. Seguidamente se llevo a cabo el ensayo con las siguientes condiciones: temperatura ambiente (≈ 20 °C), velocidad de agitación de 300 rpm, caudal de alimentación y salida de 5 ml/min, y volumen del reactor 100 ml de agua destilada, al cual se le adiciona la disolución de enzima de forma que la concentración inicial en el reactor fue de 0.08 mg/ml. A continuación se pone en marcha el sistema, tomándose muestras de 1 ml en el reactor a intervalos de tiempo regulares (5, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 min). A las muestras se les determinó la actividad enzimática tal y como se describe en la *sección 3.2.2. (Determinación de la actividad enzimática)*, con la precaución de preparar las disoluciones de 4-clorofenol y 4-aminoantipirina en agua. De la misma manera se ha usado agua para hacer el blanco y las diluciones de la

enzima. El permeado generado ha sido recogido, concentrado y analizado por el método de Lowry para determinar la cantidad de proteína.

Además, para comprobar si la presencia de polímero en la membrana contribuye a evitar el paso de la enzima a través de la misma, se han repetido los experimentos anteriores, pero utilizando membranas previamente utilizadas en experimentos con reacción.

3.2.9.4. Ensayos con reacción

Se ha llevado a cabo unas series de experimentos con reacción: en primer lugar con la enzima añadida al reactor al comienzo del ensayo, realizando un seguimiento de siete horas para las tres peroxidasas (SBP, HRP y AKPC); otros ensayos adicionando enzima durante todo el experimento en la corriente de alimentación; dos ensayos adicionales, sólo con la peroxidasa de soja, con el fin de comprobar si la enzima retenida en el polímero depositado en la membrana continúa siendo activa en la eliminación de 4-clorofenol; y por último algunas series experimentales utilizando como sustrato una mezcla de dos compuestos fenólicos (fenol y 4-clorofenol).

3.2.9.4.1. Ensayos con enzima solo en el reactor. Estabilidad operacional

Se han realizado tres ensayos de siete horas de duración, para identificar cual de las tres peroxidasas en estudio mantiene a lo largo del tiempo un mejor comportamiento en la eliminación de 4-clorofenol.

Las condiciones del sistema han sido las siguientes: temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), velocidad de agitación de 300 rpm, caudal de alimentación y salida de 5 ml/min, volumen de reacción de 100 ml, concentración de 4-clorofenol y peróxido de hidrógeno de 2 mM y concentración inicial de enzima en el reactor de 0.08 mg/ml. A lo largo del ensayo se tomaron muestras en el reactor y en el permeado a intervalos de tiempo regulares (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360 y 420 min) para el análisis de 4-clorofenol. El tratamiento y análisis de las muestras es el descrito en la *sección 3.2.9.2. (Puesta en marcha y modo de operación)*.

3.2.9.4.2. Ensayos con adición complementaria de enzima en la corriente de alimentación

En estos ensayos, la puesta en marcha, la toma y análisis de las muestras se han desarrollado de forma idéntica a la sección *sección 3.2.9.2. (Puesta en marcha y modo de operación)*. La única diferencia con dichos ensayos es que en el depósito de alimentación del compuesto fenólico se añade una cierta cantidad de enzima que de esta forma se va adicionando al reactor a lo largo del ensayo. Las condiciones del sistema han sido las siguientes: temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), velocidad de agitación de 300 rpm y caudal de alimentación y salida de 5 ml/min. La concentración del compuesto fenólico y del peróxido de hidrógeno y la concentración inicial de enzima en el reactor se han variado de acuerdo a la requerida por el ensayo. La adición de la cantidad complementaria de enzima en la corriente de alimentación del compuesto fenólico, surge a efectos de compensar la pérdida de enzima en el reactor, siendo ésta la única modificación respecto a los ensayos con enzima sólo en el reactor.

3.2.9.4.3. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero

Para la peroxidasa de soja (SBP) se han realizado dos ensayos adicionales con la finalidad de comprobar si la enzima retenida en el polímero depositado en la membrana mantiene parte de su actividad y por lo tanto su capacidad de eliminación del 4-clorofenol.

Estos experimentos se han realizado en dos etapas: La primera etapa en presencia de 4-clorofenol, peróxido de hidrógeno y enzima. Las condiciones del sistema han sido las siguientes: temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), velocidad de agitación de 300 rpm, caudal de alimentación y salida de 5 ml/min, volumen de reacción de 100 ml, concentración de 4-clorofenol y peróxido de hidrógeno 2 mM y concentración inicial de enzima en el reactor de 0.04 mg/ml. A su vez el primero de estos dos ensayos se hizo sin adicionar enzima, mientras que, para el segundo se adicionó enzima con la alimentación (una adición continua de 0.002 mg/ml que corresponde a 0.01 mg/min). En la primera etapa de ambos ensayos se han tomado muestras en el reactor como en el permeado a intervalos de tiempo regulares (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 y 80 min). Una

vez pasados los 80 minutos se procedió a parar, vaciar y lavar el reactor, con lo que queda concluida la primera etapa de ambos ensayos. A continuación se reinicia el proceso alimentando de nuevo ambos sustratos, pero sin adicionar enzima ni al reactor ni al depósito de alimentación. Esta segunda etapa se mantuvo durante otros 80 minutos y se tomaron, como en la etapa anterior, muestras tanto del reactor como del permeado. El tratamiento y análisis de las muestras es el descrito en la *sección 3.2.9.2. (Puesta en marcha y modo de operación)*.

3.2.9.4.4. Ensayos para la eliminación de mezclas de fenol y 4-clorofenol

Se ha llevado a cabo un estudio del comportamiento de la enzima (SBP) frente a la eliminación en continuo de una mezcla de fenol y 4-clorofenol. En estos ensayos, la puesta en marcha y la toma de muestras se han desarrollado de forma idéntica a la *sección 3.2.9.2. (Puesta en marcha y modo de operación)*, con la diferencia de que en el tratamiento de las muestras, se adicionó 0.2 ml de coagulante (sulfato de aluminio y potasio) por ser ésta la cantidad óptima para la precipitación del polímero formado por el fenol. Las condiciones de operación del sistema han sido las siguientes: temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), velocidad de agitación de 300 rpm y caudal de alimentación y salida de 5 ml/min. La concentración de cada uno de los compuestos fenólicos (4-clorofenol y fenol) en la mezcla, la concentración de peróxido de hidrógeno, la concentración inicial de enzima en el reactor y la concentración de enzima en la corriente de alimentación se han variado en cada ensayo. La cuantificación de las cantidades de fenol y 4-clorofenol en las muestras se ha llevado a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, previamente al análisis, las muestras han sido filtradas con el fin de retirar los posibles fragmentos del polímero formado en la reacción. El filtro de poliéster utilizado es el descrito en la *sección 3.1.1.7 (Reactivos y material utilizados en la determinación de fenol y 4-clorofenol por HPLC)*.

3.2.10. Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada

3.2.10.1. Calibrado de las bombas

En estos ensayos se han utilizado las mismas bombas que en la experimentación en tanque continuo con la enzima soluble y añadiendo una nueva bomba situada a la salida del primer tanque, cuya recta de calibrado se muestra en la Figura 3.15 sus valores numéricos se recogen en la Tabla 16.11 del Anexo 1.

La ecuación obtenida para dicha recta, y su coeficiente de correlación lineal acompaña a la figura.

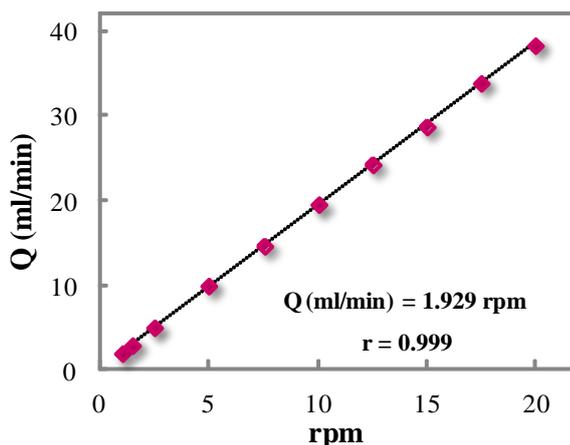


Figura 3.1.5. Recta de calibrado de la bomba de evacuación de los productos del primer reactor en la experimentación en el tanque continuo con modulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada.

3.2.10.2. Puesta en marcha y modo de operación

En todos los experimentos realizados en reactor tanque continuo con la peroxidasa de soja inmovilizada, se ha trabajado a temperatura ambiente (20 °C), con una velocidad de agitación de 300 rpm y un volumen de reactor de 100 ml. Los sustratos de la reacción (4-clorofenol y peróxido de hidrógeno) se han preparado disueltos en agua y el derivado inmovilizado (SBP

inmovilizada en vidrio poroso) se ha resuspendido en tampón fosfato 0.1 M pH 7.

El dispositivo experimental que ha sido utilizado en estos ensayos, es similar al desarrollado para el tanque continuo con la enzima soluble, descrito en la sección 3.2.9.2. (*Puesta en marcha y modo de operación*), con la única diferencia de que, al emplear el derivado inmovilizado, se ha hecho necesario el uso de un tanque adicional, previo al módulo de membrana, para evitar en la medida de lo posible, que las partículas de enzima inmovilizada, por la succión que genera la bomba de recirculación del módulo de membrana, se localizaran en la malla de nylon ubicada en la goma y no permaneciera en suspensión dentro del reactor como se requiere, o atravesaran la malla pudiendo generar problemas mecánicos en el módulo de membrana. De esta manera el segundo reactor, ha funcionado como un tanque amortiguador. En la Figura 3.16 se muestra el nuevo dispositivo experimental. El tanque amortiguador contiene inicialmente la misma concentración de 4-clorofenol que el reactor principal correspondiente a cada ensayo.

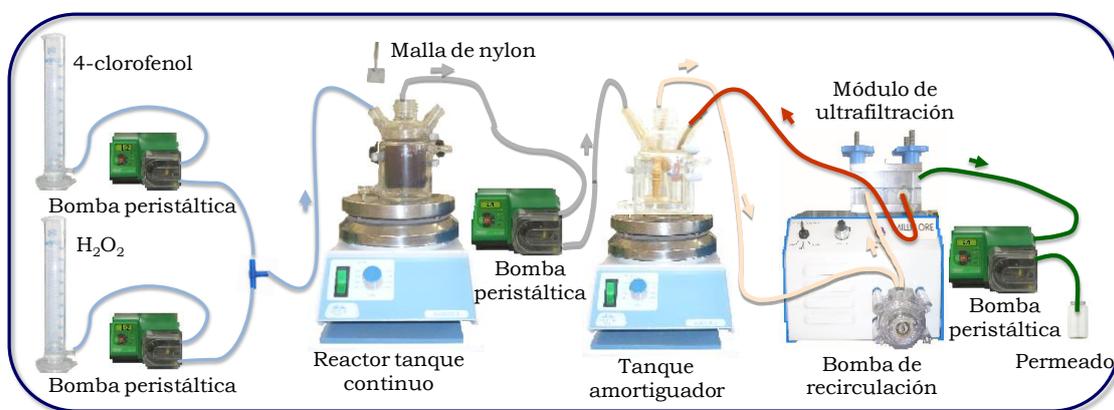


Figura 3.1.6. Esquema del reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada.

Otra diferencia, en este caso en el modo de operación radica en el hecho de que en los ensayos con adición de enzima, ésta no pudo hacerse de forma continua con una de las corrientes de alimentación debido a que la suspensión del derivado inmovilizado no puede adicionarse con una bomba peristáltica. Por este motivo ha de adicionarse de forma discontinua y directamente al reactor.

En estos ensayos se han tomado muestras de 0.5 ml de volumen a intervalos de tiempo regulares (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 min) en el reactor tanque, con el dispositivo descrito en la *sección 3.2.8.2 (Ensayos con la enzima inmovilizada)*, directamente en el tanque amortiguador y en la salida del permeado. En este caso todas las muestras se encuentran exentas del polímero que se forma en la reacción y del derivado inmovilizado por lo tanto están preparadas para su posterior análisis.

3.2.11. Experimentación en reactor de lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada

En todos los experimentos realizados en reactor de lecho fluidizado se ha trabajado a temperatura ambiente (20 °C) y con un volumen de reactor igual a 12 ml. Este volumen se corresponde con una altura de líquido en el reactor de 15 cm, la cual se consigue mediante la posición del dispositivo de succión a esta altura. Los sustratos de la reacción (4-clorofenol y peróxido de hidrógeno) se han preparado disueltos en agua y la peroxidasa de soja inmovilizada se ha resuspendido en tampón fosfato 0.1 M pH 7.

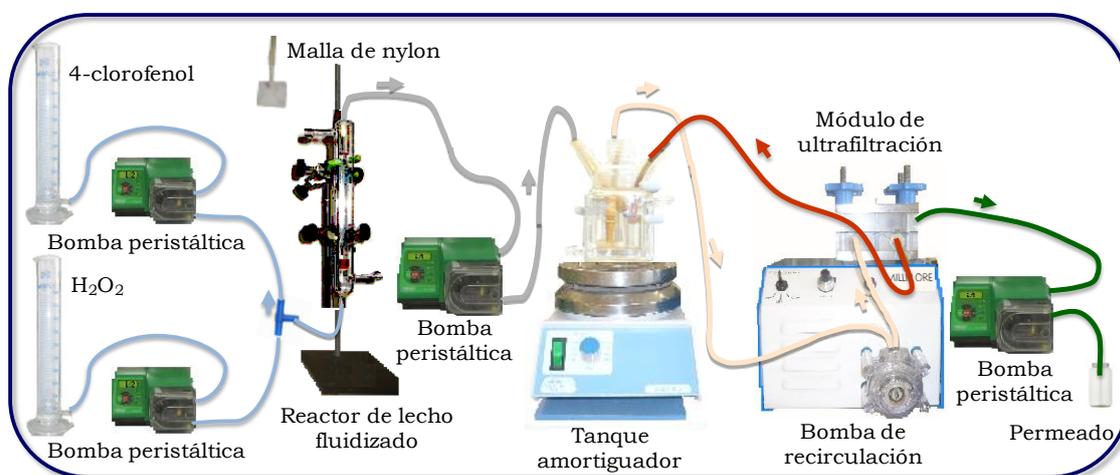


Figura 3.1.7. Esquema del reactor de lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada.

Como se puede apreciar en la Figura 3.17 el sistema experimental que ha sido utilizado, es muy similar al empleado en el reactor tanque continuo con la enzima inmovilizada, con la diferencia que en esta ocasión el primer reactor

tanque, es sustituido por el reactor de lecho fluidizado, las demás partes de dispositivo son las mismas y con igual funcionamiento.

Los ensayos comienzan al poner en marcha las bombas peristálticas que alimentan el 4-clorofenol y el peróxido de hidrógeno, los cuales son alimentados hasta que el nivel del líquido alcanza la base de la placa porosa que retiene el lecho. A continuación se introduce la suspensión de enzima en el reactor, retirando el sobrenadante y completando el volumen de reacción con agua destilada. Se reanuda el bombeo de los reactivos a través del lecho que fluidiza, y el producto de reacción es evacuado por succión a través de la goma de salida provista de la malla de nylon. Se empieza a contar el tiempo cuando cae la primera gota por el extremo de la goma al tanque amortiguador.

Como en el sistema anteriormente descrito, se han tomado muestras de 0.5 ml de volumen a intervalos regulares de tiempo (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 min). Dichas muestras se recogen directamente de la entrada del tanque amortiguador, en el mismo tanque y en la salida del permeado. La malla de nylon ubicada a la salida del reactor lecho fluidizado consigue, nuevamente, que la muestra de este punto quede exenta del polímero que se forma en la reacción y del derivado inmovilizado. De esta manera todas las muestras están listas para el posterior análisis de 4-clorofenol sin necesidad de añadirles floculantes ni centrifugarlas.

3.3. Series experimentales

3.3.1. Selección de la mejor peroxidasa para la eliminación de 4-clorofenol

3.3.1.1. Determinación de la actividad enzimática

En la Tabla 3.2 se recogen las concentraciones y las condiciones experimentales de los ensayos realizados en la cubeta de vidrio para la determinación de la actividad enzimática de las tres peroxidasas (SBP, HRP y AKPC) en cada uno de los diferentes tampones fosfato.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales en la cubeta de vidrio para cada medida

Tampón fosfato 0.1M	[4-Clorofenol] mM	[APP] mM	[H ₂ O ₂] mM	T °C	[SBP] y [HRP] µg/ml	[AKPC] µg/ml
pH = 6.0						
pH = 6.5						
pH = 7.0	10	2.4	0.2	20	0.041, 0.082 y 0.123	0.083, 0.16 y 0.25
pH = 7.5						
pH = 8.0						

3.3.1.2. Reactor tanque discontinuo. Determinación del pH óptimo, T^a óptima y estabilidad al almacenamiento en el proceso de eliminación de 4-clorofenol

En el reactor tanque discontinuo, se ha determinado el pH óptimo y temperatura óptima de operación. Así, se han realizado cinco ensayos para cada una de las peroxidasas (SBP, HRP y AKPC) de cada una de las variables estudiadas.

Tabla 3.3. Condiciones de operación para la determinación del pH óptimo, temperatura óptima y estabilidad al almacenamiento de las tres peroxidasas en reactor tanque discontinuo. Enzima soluble

[E] ₀ µg/ml	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	T °C	Tampón fosfato 0.1M
<u>Determinación de pH óptimo</u>				
				pH = 6.0
				pH = 6.5
10	2.0	2.0	30	pH = 7.0
				pH = 7.5
				pH = 8.0
<u>Determinación de la temperatura óptima</u>				
			25	
			30	
10	2.0	2.0	35	pH = 7.0 (SBP y HRP)
			40	pH = 6.5 (AKPC)
			45	
<u>Estabilidad de almacenamiento*</u>				
				pH = 7.0 (SBP y HRP)
10	2.0	2.0	30	pH = 6.5 (AKPC)

* Ensayos iniciales y sus respectivas replicas a los 14 y 28 días

Una vez se obtuvo el pH óptimo y temperatura óptima, se realizó el estudio de la estabilidad al almacenamiento. Para este estudio se han realizado tres ensayos para cada enzima, un ensayo en las condiciones óptimas de operación de cada enzima, con las disoluciones de enzima recién preparadas, y otros dos que se repitieron en las mismas condiciones a los 14 y 28 días. En la Tabla 3.3 se muestran las condiciones de operación que han sido utilizadas en cada uno de los ensayos mencionados.

3.3.1.3. Estudios preliminares en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Estudio de pérdida de actividad

Se han realizado dos estudios preliminares en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. El primero de ellos, está constituido por ensayos sin reacción, solo con agua y enzima, utilizando una membrana nueva y una membrana con polímero depositado. Esta serie experimental ha tenido la finalidad de comprobar si la membrana es capaz de retener cuantitativamente la enzima y si la presencia de polímero depositado en la superficie de la membrana contribuye a evitar el paso de la enzima a través de la misma.

En el segundo de estos estudios preliminares se han utilizado sustratos (ensayos con reacción) y ha consistido en ensayos largos (siete horas) para determinar la estabilidad operacional de las tres peroxidasas (SBP, HRP y AKPC). En la Tabla 3.4 se muestran las condiciones de operación que han sido utilizadas en cada uno de los ensayos mencionados.

Tabla 3.4. Condiciones de operación para el estudio de pérdida de actividad y estabilidad operacional de las tres peroxidasas en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima soluble

[E] ₀ mg/ml	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	Tiempo de residencia, min
<u>*Ensayos sin reacción</u>			
0.08	0.0	0.0	20
<u>Ensayos con reacción. Estabilidad operacional</u>			
0.08	2.0	2.0	20

* Realizados con membrana nueva y con membrana con polímero depositado

3.3.2. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima soluble

3.3.2.1. Determinación de las condiciones óptimas de operación

Para la determinación de las condiciones óptimas de operación, del sistema de eliminación de 4-clorofenol en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie, se han realizado cinco series experimentales.

Tabla 3.5. Condiciones de operación para la eliminación de 4-clorofenol en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima soluble

[SBP] ₀ mg/ml	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	Tiempo de residencia, min	[SBP] _F mg/ml
<u>Variación de la concentración inicial de enzima</u>				
0.08	2.0	2.0	20	0.000
0.04				0.000
<u>Variación de la concentración de enzima en la alimentación</u>				
0.04	2.0	2.0	20	0.001
				0.002
				0.004
				0.004
<u>Variación de la concentración de ambos sustratos en relación 1:1</u>				
0.04	0.5	0.5	20	0.002
	1.0	1.0		
	2.0	2.0		
<u>Variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno</u>				
0.04	2.0	2.0	20	0.002
		2.5		
		3.0		
<u>Variación conjunta de la concentración inicial de enzima y el tiempo espacial</u>				
0.080	2.0	2.0	10	0.002
0.053			15	
0.040			20	

Las series experimentales que han sido realizadas son: variación de la concentración inicial de enzima en el reactor, variación de la concentración de enzima en la corriente de alimentación, variación de la concentración de

ambos sustratos en relación 1:1, variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno y por último, variación conjunta de la concentración inicial de enzima en el reactor y el tiempo espacial. En la Tabla 3.5 se recogen las condiciones de operación en cada una de ellas.

3.3.2.2. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero

Se han realizado dos ensayos adicionales con la finalidad de comprobar si la enzima retenida en el polímero depositado en la membrana mantiene parte de su actividad y continúa eliminando el 4-clorofenol en el sistema. Cada uno de los ensayos se ha llevado a cabo en dos etapas. En la Tabla 3.6 se muestran las condiciones de operación que han sido utilizadas en los ensayos mencionados.

Tabla 3.6. Condiciones de operación, ensayos para comprobar la actividad de la enzima retenida en el polímero. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima soluble

[SBP] ₀ mg/ml	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	Tiempo de residencia, min	[SBP] _F mg/ml
<u>Primera etapa</u>				
0.04	2.0	2.0	20	0.000 0.002
<u>Segunda etapa</u>				
0.00	2.0	2.0	20	0.000

3.3.3. Resultados y caracterización del derivado inmovilizado

3.3.3.1. Determinación del porcentaje de actividad retenida

Para determinar el rendimiento de la actividad enzimática del derivado inmovilizado se han llevado a cabo dos series experimentales en reactor tanque discontinuo.

Dichas series experimentales se han realizado variando la concentración de enzima empleada, tanto en estado soluble como inmovilizada. En la

Tabla 3.7 se muestran las condiciones de operación que han sido utilizadas en cada una de las series experimentales mencionadas.

Tabla 3.7. Condiciones de operación para la determinación del porcentaje de actividad retenida del derivado inmovilizado en reactor tanque discontinuo.

[SBP] ₀ mg/ml	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	T °C	Tampón fosfato, 0.1M
<u>Enzima libre*</u>				
0.005				
0.010				
0.015	2.0	2.0	30	pH = 7.0
0.020				
0.025				
<u>Enzima inmovilizada**</u>				
0.005				
0.010				
0.015	2.0	2.0	30	pH = 7.0
0.020				
0.025				

* Disuelta en agua

** Suspendida en tampón fosfato 0.1 M

3.3.4. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada

3.3.4.1. Series experimentales

En el estudio de eliminación de 4-clorofenol en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana y la enzima inmovilizada, se han realizado cuatro series experimentales: variación de la concentración inicial de enzima en el reactor, variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1, variación del tiempo espacial y para finalizar un estudio de la adición sucesiva del derivado inmovilizado. En la Tabla 3.8 se recogen las condiciones de operación que han sido utilizadas, en cada una de las series experimentales mencionadas.

Tabla 3.8. Condiciones de operación para la eliminación de 4-clorofenol en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie y la enzima inmovilizada

[SBP] ₀ mg/ml	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	Tiempo de residencia, min	[SBP] _{adicionada} mg/ml
<u>Variación de la concentración inicial de enzima</u>				
0.08				
0.06	1.0	1.0	20	0.00
0.04				
<u>Variación de la concentración de ambos sustratos en relación 1:1</u>				
	0.5	0.5		
0.08	1.0	1.0	20	0.00
	2.0	2.0		
<u>Variación del tiempo de residencia</u>				
			10	
0.08	1.0	1.0	13.3	0.00
			20	
<u>Adiciones sucesivas de derivado inmovilizado</u>				
				0.00
0.08	1.0	1.0	20	0.08
				0.16

3.3.5. Reactor de lecho fluidizado asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada

3.3.5.1. Series experimentales

En la experimentación para la eliminación de 4-clorofenol en el reactor de lecho fluidizado asociado a un módulo de membrana, se han realizado tres series experimentales, variación de la altura del lecho, variación de la concentración de ambos sustratos en relación 1:1 y variación del caudal. En la Tabla 3.9 se recogen las condiciones de operación que han sido utilizadas, en cada una de dichas series experimentales.

Tabla 3.9. Condiciones de operación para la eliminación de 4-clorofenol en reactor de lecho fluidizado asociado a un módulo de membrana en serie y la enzima inmovilizada

SBP mg	[4-Clorofenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	Caudal ml/min
<u>Variación de la altura del lecho</u>			
8	1.0	1.0	5
12			
<u>Variación de la concentración de ambos sustratos en relación 1:1</u>			
8	0.5	0.5	5
	1.0	1.0	
	2.0	2.0	
<u>Variación del caudal de alimentación</u>			
8	1.0	1.0	5
			7.5
			10

3.3.6. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Eliminación de diferentes compuestos fenólicos clorados

3.3.6.1. Determinación de la actividad enzimática

Para establecer el comportamiento de la peroxidasa de soja en la eliminación de 4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol y fenol se ha determinado la actividad enzimática de la SBP frente a cada uno de los sustratos. Estos experimentos se han realizado en cubeta de vidrio y en la Tabla 3.10 se recogen las condiciones experimentales utilizadas:

Tabla 3.10. Condiciones experimentales para la determinación de la actividad enzimática de SBP sobre 4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol y fenol

Compuesto fenólico	*[Compuesto fenólico] mM	*[APP] mM	[H ₂ O ₂] mM	T °C	[SBP] µg/ml
4-Clorofenol	10	2.4	0.2	20	0.041, 0.082 y 0.123
3-Clorofenol					
2-Clorofenol					
Fenol					

* Tampón fosfato pH 7.0

3.3.6.2. Serie experimental

Para el estudio del comportamiento de la enzima frente a distintas posiciones del cloro en el anillo fenólico se han realizado también ensayos en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie con la enzima soluble. Realizando así, una serie experimental para cada uno de los compuestos fenólicos (4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol y fenol) variando la concentración inicial de enzima en el reactor. En la Tabla 3.11 se recogen las condiciones de operación de estos ensayos.

Tabla 3.11. Condiciones de operación para la eliminación de 4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol y fenol en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Enzima soluble

Compuesto fenólico	[SBP] ₀ mg/ml	[Compuesto fenólico] mM	[H ₂ O ₂] mM	Tiempo de residencia, min
Variación de la concentración inicial de enzima				
4-Clorofenol	0.04	2.0	2.0	20
3-Clorofenol				
2-Clorofenol				
Fenol				
4-Clorofenol	0.08	2.0	2.0	20
3-Clorofenol				
2-Clorofenol				
Fenol				
4-Clorofenol	0.12	2.0	2.0	20
3-Clorofenol				
2-Clorofenol				
Fenol				

3.3.7. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Mezcla de compuestos fenólicos

3.3.7.1. Series experimentales

Para el estudio de la eliminación de mezclas de compuestos fenólicos (4-clorofenol y fenol) en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana con la enzima soluble, se han llevado a cabo cuatro series experimentales. El objetivo de las dos primeras ha sido estudiar la variación

de la concentración inicial de enzima en el reactor y en la alimentación. Las dos últimas series, han consistido en ensayos para estudiar la posible influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol y viceversa. En la Tabla 3.12 se recogen las condiciones de operación de las cuatro series que han sido realizadas.

Tabla 3.12. Condiciones de operación para la eliminación de una mezcla de 4-clorofenol y fenol en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie

[SBP] ₀ mg/ml	[4-Clorofenol] mM	[Fenol] mM	[H ₂ O ₂] mM	Tiempo de residencia, min	[SBP] _F mg/ml
Variación de la concentración de enzima en el reactor y en la alimentación					
	0.5	1.5			
0.08	1.0	1.0	2.0	20	0.004
	1.5	0.5			
	0.5	1.5			
0.04	1.0	1.0	2.0	20	0.002
	1.5	0.5			
Influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol					
	0.0		1.0		
	0.5		1.5		
0.04	1.0	1.0	2.0	20	0.002
	1.5		2.5		
	2.0		3.0		
Influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol					
		0.0	1.0		
		0.5	1.5		
0.04	1.0	1.0	2.0	20	0.002
		1.5	2.5		
		2.0	3.0		



4. COMPARACIÓN DE PEROXIDASAS COMERCIALES EN LA ELIMINACIÓN DE 4-CLOROFENOL

4. COMPARACIÓN DE PEROXIDASAS COMERCIALES EN LA ELIMINACIÓN DE 4-CLOROFENOL

4.1. Determinación de la actividad enzimática

Las enzimas son proteínas altamente especializadas que tienen como función la catálisis o regulación de la velocidad de reacción de diversas reacciones químicas. En el presente capítulo se ha determinado la actividad enzimática de tres peroxidasas procedentes de soja, rábano y alcachofa (SBP, HRP y AKPC respectivamente) frente al sustrato 4-clorofenol. Con este propósito, se ha definido la unidad de actividad enzimática como los μ moles de sustrato convertidos por minuto y por miligramo de enzima. Esta determinación tiene por objeto establecer cuál de las tres peroxidasas citadas tiene un mejor comportamiento en la eliminación de este contaminante, identificando a su vez el pH óptimo de operación para cada peroxidasa.

Para la determinación de la actividad enzimática de las tres peroxidasas se ha utilizado un método espectrofotométrico de medida continua de absorbancia, en una cubeta de vidrio de 3 ml y 1 cm de anchura de paso óptico, y en presencia de tampón fosfato de diferentes pH, de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.2. Determinación de la actividad enzimática*).

Las condiciones experimentales para cada medida han sido:

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}] = 10 \text{ mM}$$

$$[\text{AAP}] = 2.4 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.2 \text{ mM}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH} = 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 \text{ y } 8.0$$

$$[\text{SBP}] = 0.041, 0.083 \text{ y } 0.125 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{HRP}] = 0.041, 0.083 \text{ y } 0.125 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AKPC}] = 0.083, 0.16 \text{ y } 0.25 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Es importante mencionar que se han realizado medidas de actividad con diferentes concentraciones de enzima, para asegurarnos de estar utilizando concentraciones de peroxidasa en el tramo en que la actividad específica es independiente de la misma.

Los resultados de actividad (U/mg) obtenidos para cada peroxidasa en los respectivos tampones fosfato se recogen en la Tabla 16.12 del Anexo 2. En la Figura 4.1 se representa la actividad (U/mg) de cada peroxidasa a cada pH.

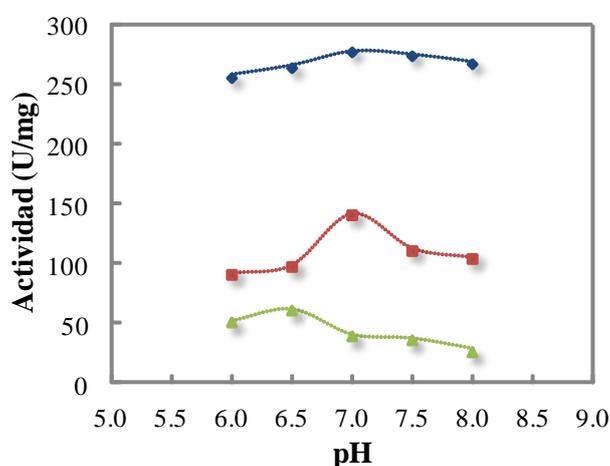


Figura 4.1. Variación de la actividad (U/mg) a pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 para distintas peroxididasas. E = \blacklozenge SBP, \blacksquare HRP y \blacktriangle AKPC. Medidas en cubeta de vidrio de 3 ml y 1 cm de anchura de paso óptico.

En la Figura 4.1 se observa que para SBP y HRP el máximo valor alcanzado de la actividad (U/mg) correspondió a pH 7.0, mientras que, para

AKPC el valor máximo se alcanzó a pH 6.5. En la Tabla 4.1 se muestra el valor máximo de actividad con el respectivo pH óptimo para cada peroxidasa.

Tabla 4.1. Valores máximos de actividad, al respectivo pH óptimo de cada peroxidasa.

Peroxidasa	pH óptimo	Actividad (U/mg)
SBP	7.0	278
HRP	7.0	142
AKPC	6.5	61

En la Figura 4.1 y en la Tabla 4.1 se aprecia que SBP es más activa en la eliminación de 4-clorofenol seguida de HRP y por último AKPC. De la misma forma se observa en la Figura 4.1 que la actividad enzimática para HRP es más dependiente del pH que las otras dos peroxidasas en estudio. A su vez la peroxidasa de soja, además de ser la más activa, mantiene una actividad prácticamente inalterada en el rango de pH estudiado.

4.2. Reactor tanque discontinuo

4.2.1. Determinación del pH óptimo y T^a óptima para el proceso de eliminación

Las medidas de actividad suministran un valor aproximado de la capacidad relativa de eliminación de 4-clorofenol y de las mejores condiciones de operación (pH) para las tres peroxidasas en estudio. Sin embargo, dichas medidas se basan en los valores iniciales de la velocidad de reacción, y no permiten apreciar el comportamiento de la enzima a lo largo del tiempo durante la reacción de eliminación de 4-clorofenol, en donde pueden aparecer fenómenos de inhibición y/o desactivación que pueden modificar dicha actividad. Por este motivo, se ha llevado a cabo un estudio en reactor tanque discontinuo, con el fin de determinar las condiciones óptimas de operación (pH y T^a), a tiempos prolongados, para SBP, HRP y AKPC, y así mismo verificar los resultados obtenidos en la determinación de las medidas de actividad, expuestos previamente *sección 4.1 (Determinación de la actividad enzimática)*.

En la selección de los protocolos desarrollados se ha tenido como referencia, estudios anteriores para la determinación de condiciones óptimas de peroxidadas comerciales [254]. Dichos protocolos han sido descritos en el capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.8. Experimentación en reactor tanque discontinuo*)

4.2.1.1. pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo se han realizado cinco ensayos para cada peroxidasa, variando el pH del tampón fosfato 0.1 M, en un rango entre 6.0 y 8.0.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 25 \text{ ml}$$

$$T^a = 30 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{Enzima}]_0 = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH} = 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 \text{ y } 8.0$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.13 del Anexo 2. En la Figura 4.2 se representa la variación en el tiempo de la conversión. La conversión ha sido definida, como el 4-clorofenol consumido en cada instante, referido al que había inicialmente en el reactor:

$$X_R = \frac{[4\text{-clorofenol}]_0 - [4\text{-clorofenol}]_t}{[4\text{-clorofenol}]_0} * 100$$

En la Figura 4.2 se aprecia que, en función del pH, existen diferencias entre la conversión máxima alcanzada en el reactor para cada peroxidasa. En los casos de SBP (serie A) y HRP (serie B) se observa una mayor conversión para pH 7.0 con conversiones superiores al 97% para SBP y al 70% para HRP, en el minuto 60. Mientras que, a valores de pH ligeramente ácidos, la conversión está por debajo del 95% para SBP y del 65% para HRP en el mismo tiempo.

Igualmente en la Figura 4.2 se aprecia para AKPC (serie C) una mayor conversión a pH 6.5, con un valor superior al 55% en el minuto 60. Mientras que, a valores de pH neutros o ligeramente básicos, está por debajo del 53% en el mismo tiempo. Esto nos indica que esta enzima presenta un mejor comportamiento a pH ácidos que para valores de pH neutros o básicos.

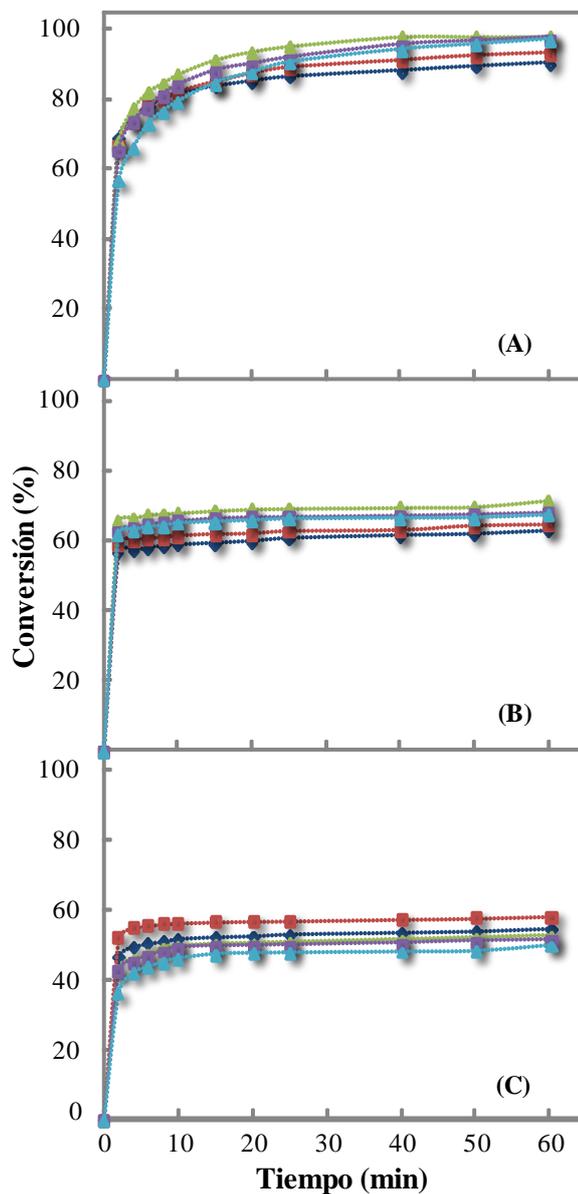


Figura 4.2. Conversión alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo, a distintos pH. pH: \blacklozenge 6.0, \blacksquare 6.5, \blacktriangle 7.0, \blacklozenge 7.5 y \blacktriangle 8.0. (A) SBP, (B) HRP y (C) AKPC.

4.2.1.2. Comparación del pH óptimo obtenido, mediante medidas de actividad y en reactor tanque discontinuo

Como ya se mencionó en la *sección 4.1. (Determinación de la actividad enzimática)*, para SBP y HRP el valor máximo alcanzado de actividad (U/mg) se correspondió a pH 7.0. Mientras que, para AKPC, se registró a pH 6.5. Estos datos han sido corroborados con los experimentos realizados en el reactor tanque discontinuo, donde se ha obtenido para SBP y HRP una mayor conversión a pH 7.0, y pH 6.5 para AKPC.

En la Figura 4.3 se comparan los resultados de pH óptimo que han sido obtenidos por los dos métodos utilizados, (serie A) a partir de velocidades iniciales en la cubeta y (serie B) a partir de la conversión máxima en el reactor discontinuo. Los valores correspondientes se muestran en la Tabla 16.14 del Anexo 2.

Los datos obtenidos de las series de experimentos para SBP con las dos metodologías utilizadas, concuerdan con las investigaciones de Caza y col. [126] quienes reportan que en el rango pH 7.0 - 8.0 se obtienen rendimientos relativamente semejantes para la eliminación de 4-clorofenol con peroxidasa de soja.

Por otro lado, también se puede mencionar, que para SBP y HRP (serie B) existen escasas diferencias en el intervalo del pH estudiado, y en especial para SBP por las altas conversiones alcanzadas (> 90%). Este hecho abre la posibilidad de aplicación industrial ya que no haría falta modificar previamente el pH de los efluentes a tratar, siempre que estuviesen en el rango mencionado, con el consiguiente ahorro en reactivos acidificantes o basificantes.

Finalmente, los resultados en los experimentos de la determinación de la actividad y determinación de pH óptimo en el reactor tanque discontinuo para las tres enzimas coinciden en que SBP tiene un mejor comportamiento para la eliminación de 4-clorofenol, seguida de HRP y por último AKPC.

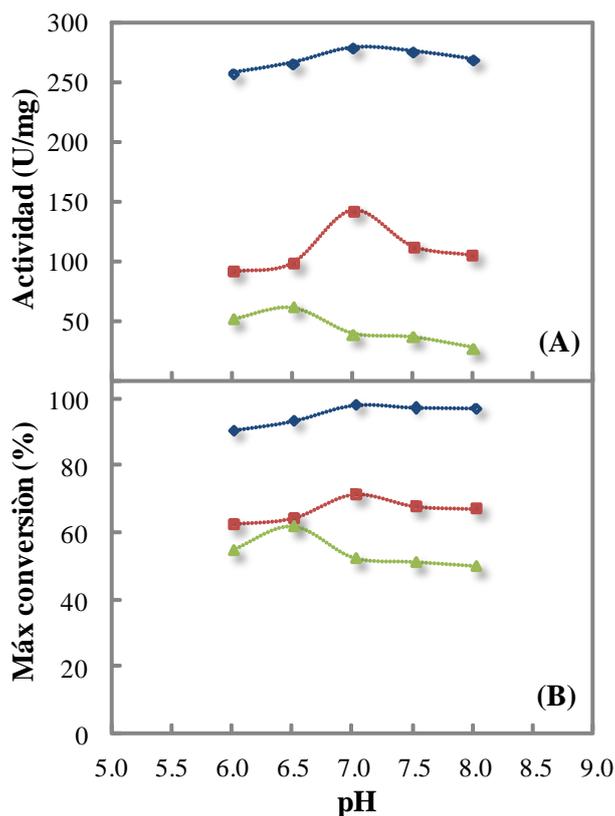


Figura 4.3. Variación de la actividad (U/mg) y de la máxima conversión a diferentes pH para distintas peroxidasas. E = \blacklozenge SBP, \blacksquare HRP y \blacktriangle AKPC. (A) Actividad enzimática (U/mg) medida en cubeta y (B) conversión máxima en reactor tanque discontinuo en el minuto 60.

4. 2.1.3. T^a óptima

Para la determinación de la temperatura óptima se han realizado cinco ensayos para cada peroxidasa variando la temperatura en un rango entre 25 y 45 °C, y utilizando el pH óptimo correspondiente para cada enzima.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 25 \text{ ml}$$

$$T^a = 25, 30, 35, 40 \text{ y } 45 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{Enzima}]_0 = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH } 7.0 \text{ para HRP}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH } 7.0 \text{ para HRP}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH } 6.5 \text{ para AKPC}$$

Los resultados experimentales obtenidos para SBP, HRP y AKPC a las respectivas temperaturas 25, 30, 35, 40 y 45 °C se recogen en la Tabla 16.15 del Anexo 2. En la Figura 4.4 se representa la conversión alcanzada en el reactor a lo largo del tiempo para cada peroxidasa.

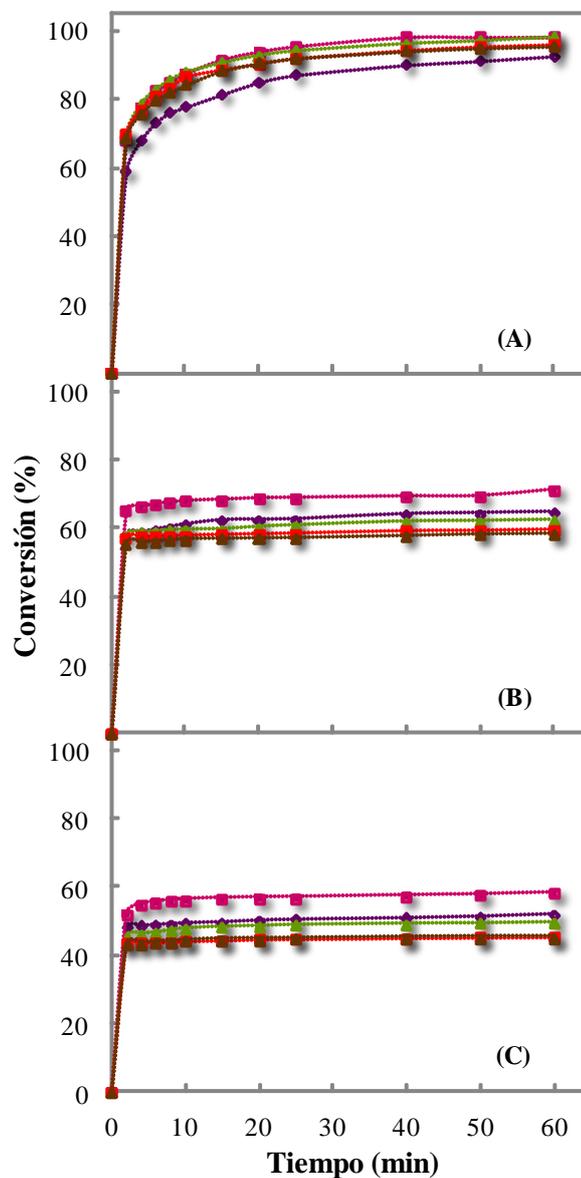


Figura 4.4. Conversión alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo a diferentes temperaturas. T^a = ◆ 25 °C, ■ 30 °C, ▲ 35 °C, ■ 40 °C y ▲ 45 °C. (A) SBP, (B) HRP y (C) AKPC.

En dicha figura se aprecia que, en función de la temperatura, existen diferencias en la conversión máxima alcanzada en el reactor para cada enzima. En todos los casos, SBP (serie A), HRP (serie B) y AKPC (serie C), se

observa una mayor conversión a una temperatura de 30 °C, lográndose un valor superior al 97% para SBP, al 70% para HRP y al 50% para AKPC en el minuto 60.

En la Figura 4.5 se representa la conversión máxima alcanzada en el reactor en el minuto 60. En ella se observa que para SBP la temperatura no afecta su estabilidad en el rango estudiado. Mientras que, en el caso de HRP y AKPC, se aprecia una mayor sensibilidad al incremento de la temperatura, manifestándose dicho comportamiento en un ligero descenso de la conversión. Los valores numéricos correspondientes a esta figura se muestran en la Tabla 16.16 del Anexo 2.

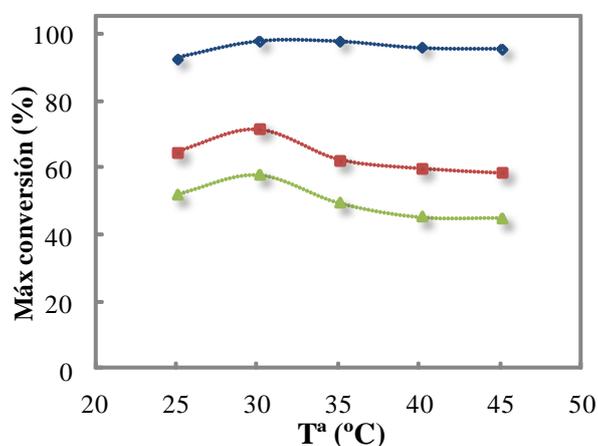


Figura 4.5. Máxima conversión alcanzada en el minuto 60 a diferentes temperaturas para las tres peroxidases. E = ♦ SBP, ■ HRP y ▲ AKPC.

Los resultados de la determinación de pH óptimo y temperatura óptima en el reactor tanque discontinuo arrojaron un pH óptimo de 7.0 para SBP y HRP, y de 6.5 para AKPC. La temperatura óptima para las peroxidases en estudio se correspondió a 30 °C en todos los casos. Este estudio nuevamente mostró que SBP tiene un mejor comportamiento para la eliminación de 4-clorofenol, seguida de HRP y por último AKPC.

4. 2. 2. Estabilidad al almacenamiento

Una vez han sido determinadas las condiciones óptimas de operación (pH y T^a) de las tres peroxidadas (SBP, HRP y AKPC), se ha llevado a cabo el estudio de la estabilidad al almacenamiento, un parámetro que también puede afectar la selección de la mejor peroxidada. Así, se realizó un ensayo en reactor tanque discontinuo para cada una de las peroxidadas y se repitió a los 14 y 28 días en las mismas condiciones. Las peroxidadas han sido almacenadas en disolución acuosa a 4 °C, a una concentración de 50 µg/ml.

Las condiciones en el reactor fueron las siguientes:

$$V_R = 25 \text{ ml}$$

$$T^a = 30 \text{ °C}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{Enzima}]_0 = 10 \text{ µg/ml}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH } 7.0 \text{ para SBP}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH } 7.0 \text{ para HRP}$$

$$[\text{Tampón fosfato}] = 0.1 \text{ M pH } 6.5 \text{ para AKPC}$$

En la Figura 4.6 se representan para las tres peroxidadas, la conversión alcanzada en el reactor en el minuto 60 (A) y el tanto por ciento de esta conversión (B) a los respectivos días del ensayo. En las Tablas 16.17 del Anexo 2 se recogen los valores numéricos.

En la Figura 4.6 se puede apreciar que la peroxidada de soja es la que presenta una mejor estabilidad al almacenamiento. Dicha conducta se observa de forma más notoria en la representación del % de la máxima conversión (B), en la que vemos que la reacción catalizada con peroxidada de soja alcanza una conversión del 97% de la inicial tras 28 días de almacenamiento, mientras que para la peroxidada de rábano y alcachofa estos valores son del 87 y 83% respectivamente.

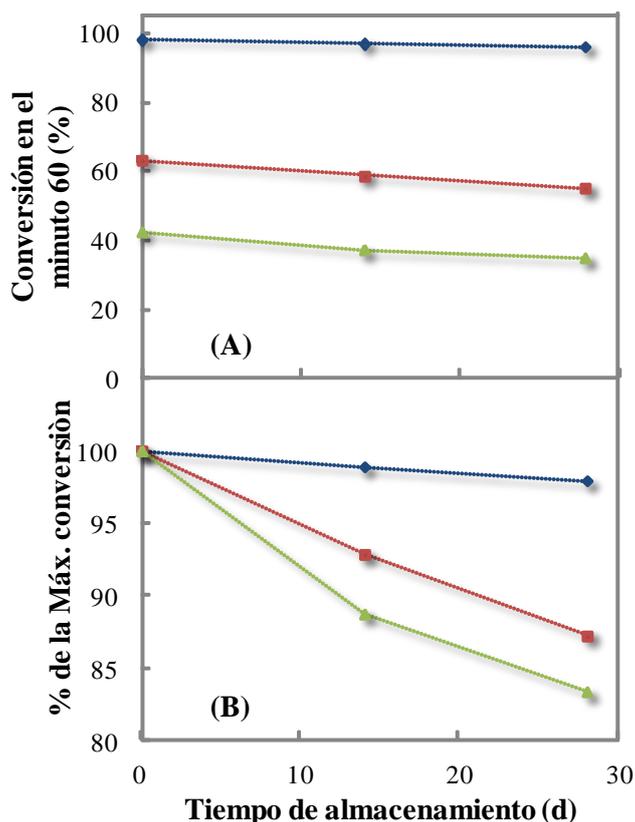


Figura 4.6. Estudio de la estabilidad al almacenamiento para las tres peroxidadas. E = \blacklozenge SBP, \blacksquare HRP y \blacktriangle AKPC. (A) Conversión alcanzada en el minuto 60 y (B) % de la máxima conversión tras el almacenamiento.

4.3. Estudio preliminar en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie

En el reactor tanque continuo con módulo de membrana se han realizado una serie de experimentos, con el fin de estudiar la reacción de eliminación en continuo de 4-clorofenol en presencia de SBP, HRP y AKPC. Al ser éste un sistema de alimentación constante de los sustratos y con el factor adicional del módulo de membrana, se hizo importante estudiar si las tres peroxidadas tendrían la misma tendencia observada en el reactor tanque discontinuo y, a su vez, conocer el grado de eliminación de 4-clorofenol en este sistema.

Teniendo en cuenta que el presente estudio se realiza con miras a la eliminación de contaminantes de efluentes industriales, es de suponer que no podrían utilizarse medios tamponados ni reactores termostatados. Los

estudios anteriores se justifican por el hecho de elegir cual de las tres peroxidasas tiene mayor actividad y cual es más estable en los rangos de pH y temperatura estudiados. A partir de este momento, los experimentos en reactores continuos se llevarán a cabo a temperatura ambiente y utilizando agua destilada como medio de reacción en vez de en tampón.

En todos los experimentos que han sido realizados en el tanque continuo con módulo de membrana en serie de esta sección se han utilizado los protocolos descritos en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9. Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima en soluble*).

4.3.1. Estudios de pérdida de actividad de las tres peroxidasas

Los resultados que han sido expuestos hasta este momento han mostrado, de manera general, un mejor comportamiento en la eliminación de 4-clorofenol usando SBP, seguido de HRP y por último para AKPC. En principio, dicha conducta puede atribuirse a las diferencias de actividad de estas enzimas frente al sustrato 4-clorofenol, tal y como se ha establecido en los ensayos de medida de actividad. Sin embargo con el fin de analizar otras posibles causas de este comportamiento, se han planteado y llevado a cabo una serie de experimentos para evaluar la aparición de posibles fenómenos de desactivación de las peroxidasas en estudio.

4.3.1.1. Ensayo sin reacción

En este primer ensayo se pretende evaluar si las peroxidasas en estudio son retenidas por la membrana o si, por el contrario, pueden, en alguna medida, atravesarla. En esta sección se exponen los resultados obtenidos para los ensayos en el tanque continuo con módulo de membrana, solo en presencia de agua y enzima, utilizando una membrana nueva, junto con los resultados obtenidos para los mismos ensayos, en presencia de polímero previamente depositado en la membrana, para las tres peroxidasas, de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9.3. Ensayos sin reacción*).

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[E]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Membrana Millipore 30000 NMWL de polisulfona

En estos ensayos se han tomado muestras del reactor y del permeado a lo largo del tiempo, a las cuales se les ha determinado la actividad, a través de medidas de velocidad inicial en cubeta. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 16.18 del Anexo 2. En la Figura 4.7 se representa la variación de la actividad enzimática a lo largo del tiempo para los dos ensayos, membrana sin polímero y membrana con polímero depositado, para las tres peroxidasa.

En la Figura 4.7 se observa que los valores de actividad van disminuyendo con el tiempo para las tres peroxidasa (ensayos A, B y C) en ambos ensayos. Dicha caída de actividad a lo largo del tiempo, tanto en el caso de la membrana sin polímero (membrana nueva) como con polímero, es más notoria para AKPC (serie C), seguida de HRP (serie B) y menos acusada para SBP (serie A). De este comportamiento se pueden plantear varias hipótesis: una de ellas es que las enzimas presentan una desactivación mecánica, debido al desplazamiento en continuo de la disolución entre el reactor y el módulo de membrana, la segunda hipótesis que puede formularse es que la enzima atraviese la membrana y abandone el sistema con el permeado, y una última hipótesis es que la enzima se quede retenida en la membrana y/o en el polímero.

Sin embargo vale la pena comentar que, al comparar ambos ensayos, se observa una mayor disminución en los valores de actividad a lo largo del tiempo cuando hay polímero depositado en la membrana, lo cual es incompatible con el hecho de que la enzima mayoritariamente atraviese la membrana, ya que no hay ningún motivo que pueda apoyar la hipótesis de que la membrana sea más permeable a la proteína cuando hay un polímero depositado sobre su superficie.

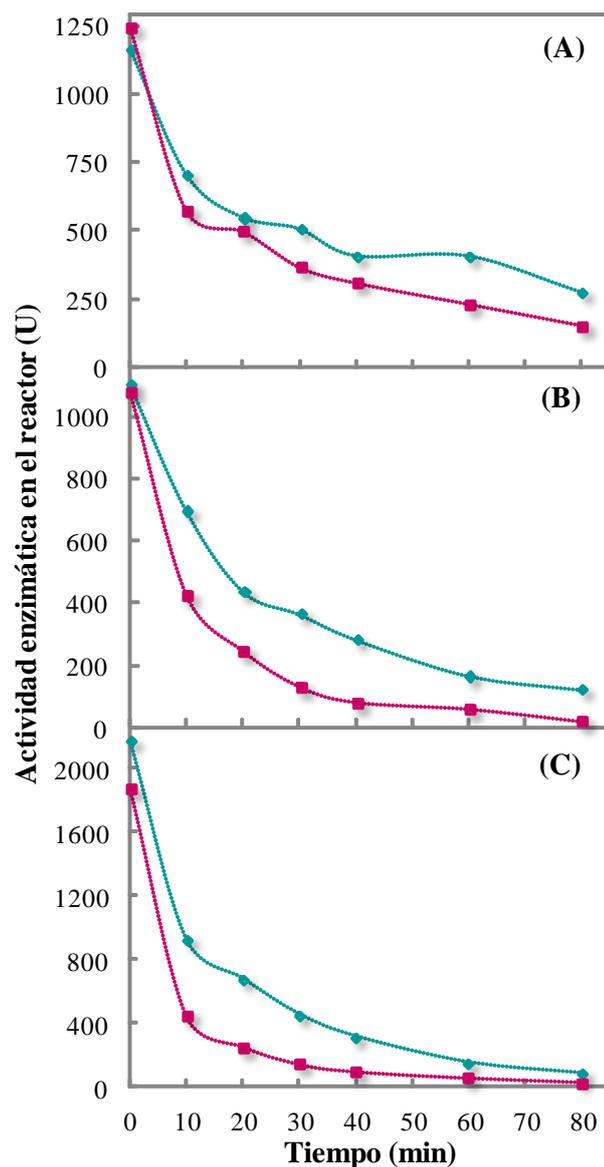


Figura 4.7. Variación de la actividad enzimática (U) a lo largo del tiempo en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. ◆ ensayo con membrana sin polímero y ■ ensayo con polímero depositado en la membrana. (A) SBP, (B) HRP y (C) AKPC.

Adicionalmente, para comprobar si parte de la enzima atraviesa los poros de la membrana, llegando a la corriente de permeado, se ha realizado la determinación de proteína en el permeado, utilizando el método de Lowry. Como la concentración de enzima en el permeado sería baja en cualquiera de los casos, quedando por debajo del límite de sensibilidad del método de Lowry, los permeados han sido sometidos a un proceso de concentración previo a su análisis.

Tabla 4.2. Presencia de enzima en la corriente de permeado.

Peroxidasa	Corriente de permeado			
	*Membrana sin polímero		Membrana con polímero	
	mg enzima	**% enzima	mg enzima	**% enzima
SBP	0.13	1.62	0.04	0.55
HRP	0.75	9.33	0.87	10.82
AKPC	0.78	9.70	0.99	12.36

* Membrana nueva

** Datos calculados en base a 8 mg de enzima presente en los ensayos

En la Tabla 4.2 se exponen de forma resumida los resultados obtenidos en la determinación de proteína en los permeado, los cuales han sido calculados en base a los datos de las Tablas 16.19 y 16.20 del Anexo 2. De los resultados de la Tabla 4.2 se deduce que la cantidad de enzima que atravesó la membrana es netamente inferior a la caída de actividad observada en el reactor, lo que confirma que la enzima se adsorbe en la membrana y/o es retenida por el polímero depositado sobre la misma.

4.3.1.2. Ensayo con reacción. Estabilidad operacional

Por último, para completar el proceso de selección de la mejor de las peroxidasa estudiadas en la eliminación de 4-clorofenol, se han realizado ensayos en presencia de sustratos (4-clorofenol y peróxido de hidrógeno) y enzima. Así se ha llevado a cabo un seguimiento a lo largo de siete horas de reacción, para SBP, HRP y AKPC, en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Esto con el fin de determinar cual de las tres enzimas presenta una mayor estabilidad operacional. Dichos experimentos se han desarrollado siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo de Materiales y Métodos (sección 3.2.9.4.1. *Ensayos con enzima solo en el reactor. Estabilidad operacional*).

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[E]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

El seguimiento del curso de la reacción se ha realizado, tomando muestras en el interior del reactor y en la salida del permeado, determinando en dichas muestras la concentración del 4-clorofenol remanente.

Los resultados con reacción obtenidos se recogen en la Tabla 16.21 del Anexo 2. En la Figura 4.8 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado para las tres peroxidases. La conversión en el reactor y en el permeado se ha definido mediante la relación:

$$X_R = \frac{[4\text{-clorofenol}]_F - [4\text{-clorofenol}]_R}{[4\text{-clorofenol}]_F} * 100$$

$$X_P = \frac{[4\text{-clorofenol}]_F - [4\text{-clorofenol}]_P}{[4\text{-clorofenol}]_F} * 100$$

donde $[4\text{-clorofenol}]_F$ es la concentración de 4-clorofenol en la alimentación al reactor y $[4\text{-clorofenol}]_R$ y $[4\text{-clorofenol}]_P$ es la concentración de 4-clorofenol en el interior del reactor y en la salida del permeado respectivamente.

En la Figura 4.8 se observa que en el caso de SBP (serie A) en el reactor se alcanzan conversiones elevadas, incluso por encima del 90%, hasta el minuto 40 de reacción, a partir del cual comienzan a descender dichos valores. Esta caída se detiene a los 300 minutos manteniendo la conversión estable desde ese instante hasta el final del ensayo, en un valor en torno al 30%. En el permeado se alcanzan valores superiores a los del reactor a lo largo de todo el ensayo, alcanzándose conversiones por encima del 90% hasta el minuto 150 de reacción, a partir del cual comienza a descender, llegando a valores del 40% de conversión a los 420 minutos del ensayo.

En el caso de HRP (serie B), en el reactor se alcanzan conversiones elevadas, incluso por encima del 90% hasta el minuto 30 de reacción. A partir de este tiempo se manifiesta una caída drástica, llegando al 24% de conversión a los 150 minutos del ensayo. Este descenso continuó de forma no tan acusada, hasta llegar a un valor próximo al 10% a los 420 minutos. En el permeado se alcanzan conversiones por encima del 90% hasta al minuto 100,

a partir del cual, al igual que en el reactor, se manifestó una caída drástica, llegando a valores en torno al 20% al los 210 minutos, continuando este descenso de forma menos significativa hasta alcanzar una conversión alrededor del 12% al final del ensayo. Cabe destacar que las curvas, tanto en el reactor como en el permeado, a partir de los 210 minutos manifiestan la misma tendencia.

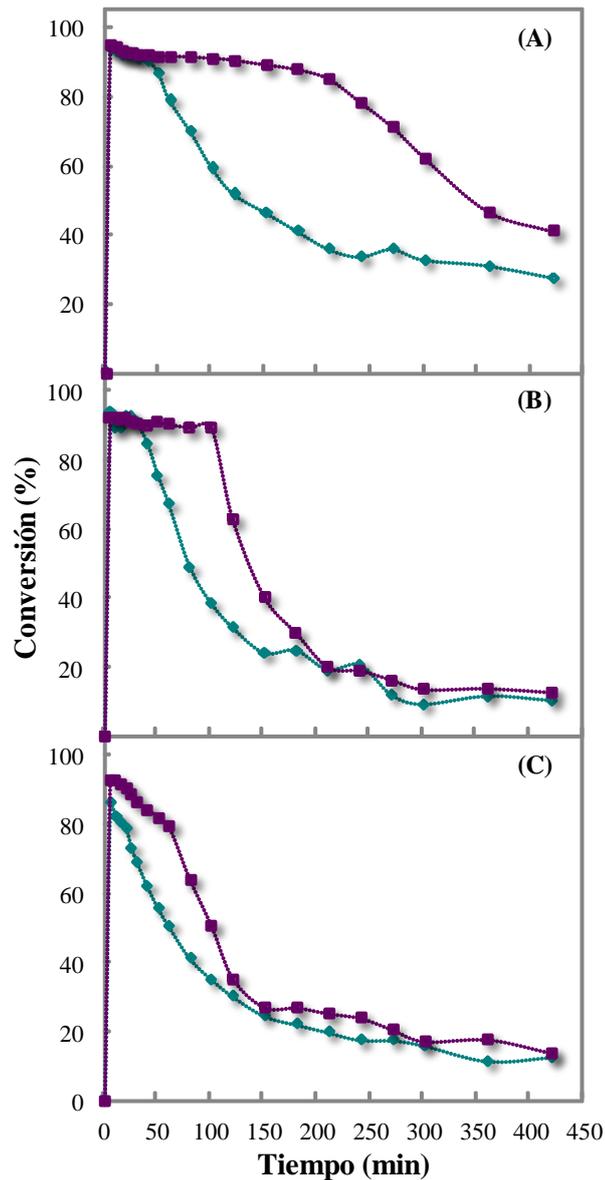


Figura 4.8. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. ♦ reactor y ■ permeado. (A) SBP, (B) HRP y (C) AKPC.

En el caso de AKPC (serie C) tanto en el reactor como en el permeado se aprecia una importante caída de la conversión a lo largo del tiempo. En el reactor se observa un 85% de conversión al inicio de la reacción (minuto 5), produciéndose a continuación un descenso, hasta llegar a un 24% a los 150 minutos. Este descenso continuó de forma no tan acusada llegando a un 12% a los 420 minutos del ensayo. En el permeado la tendencia de la curva fue muy similar a la obtenida para el reactor, con valores de conversión del 90% al inicio de la reacción hasta el minuto 20. A partir de este tiempo, se observa una caída drástica de la conversión, llegando a valores del 26% a los 150 minutos. Este descenso se mantiene de forma no tan marcada hasta llegar a un 13% a los 420 minutos del ensayo.

Para las tres enzimas se aprecia una diferencia en el comportamiento de la conversión en el reactor y en el permeado, presentando mejores conversiones el permeado. Esta conducta puede explicarse por el hecho de que parte de la enzima es retenida por el polímero que se forma en la reacción y se deposita en la superficie de la membrana, lo que corrobora la conclusión extraída en la *sección 4.3.1.1 (Ensayos sin reacción)*. Esta retención de enzima genera una pérdida de peroxidasa en el reactor, que explica la caída de la conversión en el mismo. De igual forma, dicha situación justifica las mejores conversiones en el permeado, pues la enzima retenida en el polímero continúa convirtiendo el 4-clorofenol que atraviesa la membrana con el permeado.

En la Figura 4.9 se representa una comparación del comportamiento de las tres enzimas en estudio, en el interior del reactor (A) y en el permeado (B), a lo largo de siete horas de reacción.

En dicha figura se aprecia que tanto en el reactor como en el permeado, la enzima SBP presenta un mejor comportamiento para la eliminación del 4-clorofenol. Le sigue HRP que, desde el inicio de la reacción hasta un cierto tiempo, presenta una mejor conducta en el reactor (hasta el minuto 100) y en el permeado (hasta el minuto 180) al compararla con AKPC. Sin embargo a partir de los 210 minutos tanto HRP como AKPC prácticamente tienen la misma capacidad de eliminación del 4-clorofenol en el reactor y en el permeado.

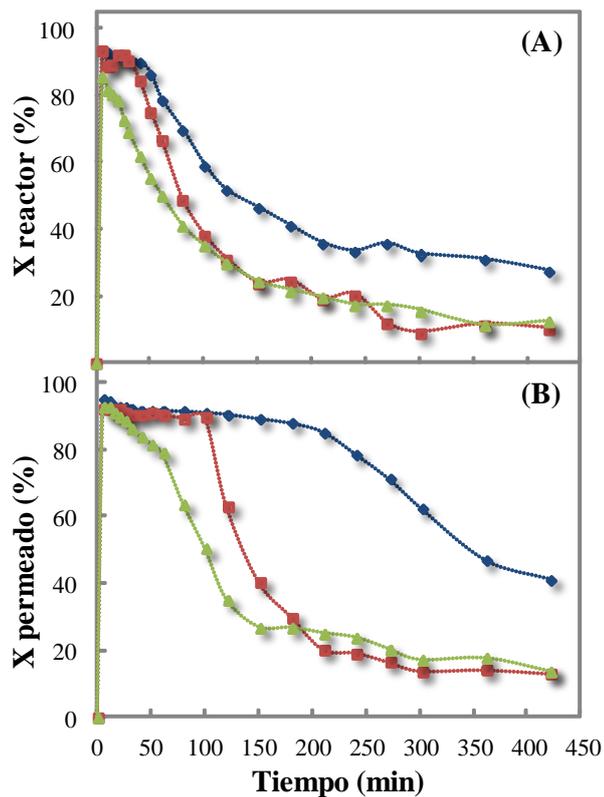


Figura 4.9. Comparación de la conversión alcanzada a lo largo del tiempo, para las tres peroxididasas, en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. E = \blacklozenge SBP, \blacksquare HRP y \blacktriangle AKPC. (A) reactor y (B) permeado.

El comportamiento observado para las tres peroxididasas coincide con los resultados obtenidos previamente, tanto en las medidas de actividad, como en los experimentos realizados en el reactor tanque discontinuo, los cuales arrojaron, en ambos estudios, un mejor comportamiento para SBP, seguido de HRP y por último para AKPC [274].



**5. REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A
UN MÓDULO DE MEMBRANA CON PEROXIDASA
DE SOJA EN SOLUBLE**

5. REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA CON PEROXIDASA DE SOJA EN SOLUBLE

De los resultados del capítulo previo, ensayos de actividad enzimática, reactor tanque discontinuo y del estudio preeliminar en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie, se ha seleccionado la SBP como la peroxidasa que arroja mejores resultados en la eliminación de 4-clorofenol, continuando con dicha peroxidasa el resto de la investigación. En este sentido se hizo necesario, la determinación de las condiciones óptimas de operación del sistema de eliminación de 4-clorofenol en continuo, realizando así la optimización de distintas variables del proceso. A continuación se presentan los resultados obtenidos de diferentes series experimentales estudiadas.

5.1. Series experimentales

En todos los experimentos que han sido realizados en el tanque continuo con módulo de membrana en serie del presente capítulo se han utilizado los protocolos descritos en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9 Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima en soluble*). Se han llevado a cabo cinco series experimentales en las cuales se ha estudiado la influencia de las siguientes variables:

- ✚ Concentración inicial de enzima en el reactor.

- ✚ Adición continua de diferentes cantidades de enzima en la corriente de alimentación.
- ✚ Concentración inicial de ambos sustratos.
- ✚ Relación estequiométrica de sustratos.
- ✚ Tiempo de residencia.

5.1.1. Variación de la concentración de SBP en el reactor

La cantidad de peroxidasa requerida es una variable importante a la hora de proponer un proceso enzimático en la eliminación de compuestos fenólicos de efluentes industriales, por ello, se ha llevado a cabo el estudio de la influencia de la concentración de SBP en el reactor, para determinar la cantidad mínima necesaria de enzima, que permite obtener conversiones deseadas y por ende un menor coste del proceso. Así, se han realizado dos ensayos con concentraciones de enzima en el reactor de 0.04 y 0.08 mg/ml, el protocolo que ha sido utilizado es el descrito Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9.2. Puesta en marcha y modo de operación*).

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ y } 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.22 del Anexo 3. En la Figura 5.1 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En la Figura 5.1 se aprecia un incremento de la conversión al aumentar la concentración de enzima de 0.04 a 0.08 mg/ml para el reactor (serie A). En el permeado (serie B) se alcanzan conversiones elevadas, incluso por encima del 90%, permaneciendo dichos valores prácticamente constantes a lo largo del tiempo para las dos concentraciones ensayadas.

Las diferencias observadas en las conversiones en el reactor y en el permeado ya han sido explicadas en el Capítulo 4 (*sección 4.3.1.2. Ensayos con reacción. Estabilidad operacional*). Allí se indicó que parte de la enzima es atrapada por el polímero que se encuentra depositado en la membrana, disminuyendo así la cantidad de enzima en el reactor y por ende su menor conversión. A su vez dicha situación explica las mejores conversiones en el permeado, pues la enzima atrapada en el polímero sigue catalizando la conversión del 4-clorofenol que va a la corriente del permeado.

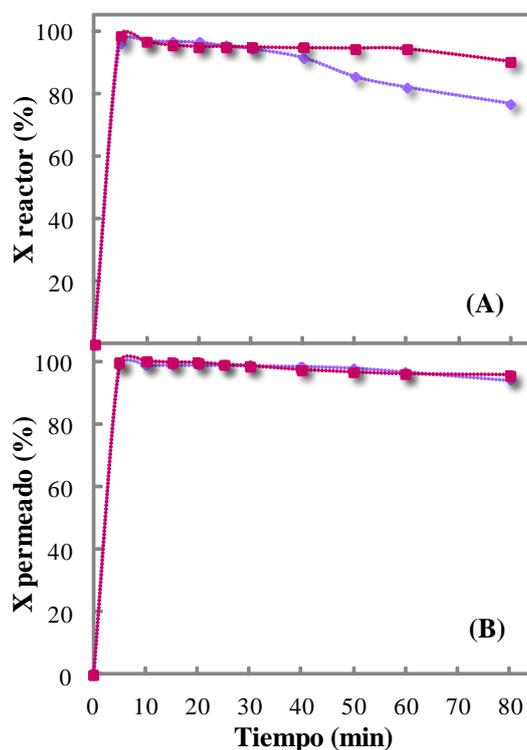


Figura 5.1. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de enzima en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $[SBP]_0 = \blacklozenge$ 0.04 mg/ml y \blacksquare 0.08 mg/ml.

En base a los resultados de este estudio y debido a que la corriente de nuestro interés es la salida del permeado, se hace evidente que no son necesarias concentraciones elevadas de enzima para obtener conversiones superiores al 90% a lo largo del tiempo. De ahí que las series experimentales que se presentan a continuación se han llevado a cabo con una concentración

inicial de SBP en el reactor de 0.04 mg/ml lo que representa un ahorro del 50% de la cantidad de enzima.

5.1.2. Variación de la adición complementaria de enzima en la corriente de alimentación

En los resultados de la variación de la concentración de SBP en el reactor, se observó un descenso de la conversión en el mismo. Como ya se mencionó, esta situación se debe a que parte de la enzima es retenida por el polímero depositado en la membrana. Una estrategia que puede utilizarse para mantener constante la conversión en el reactor es adicionar una pequeña cantidad de enzima de forma continua al reactor. Por esta razón se ha llevado a cabo una serie de experimentos con adición complementaria de enzima en la corriente de alimentación, con el fin de compensar la pérdida de enzima que se genera en el reactor. Para ello se han realizado cuatro ensayos con distintas cantidades de enzima en la corriente de alimentación de 4-clorofenol, el protocolo que ha sido utilizado es el descrito Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9.4.2. Ensayos con adición complementaria de enzima en la corriente de alimentación*).

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.000, 0.001, 0.002 \text{ y } 0.004 \text{ mg/ml,}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Con estas condiciones de operación se adicionaron al reactor 0.000, 0.005, 0.010 y 0.020 mg/min de enzima

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.23 del Anexo 3. En la Figura 5.2 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En esta Figura se observa a partir del minuto 40 un leve descenso de la conversión en el reactor (serie A) siendo éste mayor al disminuir la concentración de enzima en la corriente de alimentación, lo que indica que la caída de la conversión en el reactor es menor cuando la reposición de enzima compensa la pérdida de la peroxidasa retenida por el polímero depositado en la membrana.

En todos los ensayos los valores del permeado alcanzan conversiones estacionarias por encima del 90% (serie B).

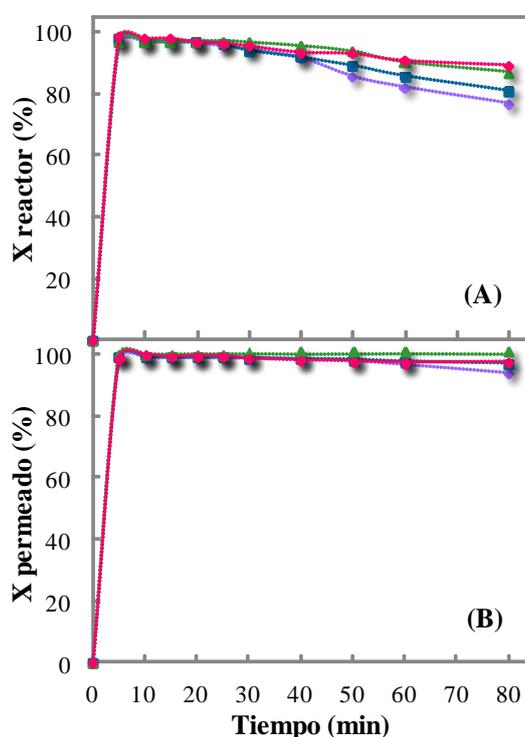


Figura 5.2. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones de enzima en la corriente de alimentación en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $[SBP]_F = \blacklozenge$ 0.000 mg/ml, \blacksquare 0.001 mg/ml, \blacktriangle 0.002 mg/ml y \blacklozenge 0.004 mg/ml.

El estudio de la reposición de enzima en el reactor a través del flujo de alimentación del 4-clorofenol permite obtener conversiones elevadas tanto en el interior del reactor como en el permeado. Así mismo, dicho estudio ha permitido establecer la concentración de SBP en la corriente de alimentación de 4-clorofenol en 0.002 mg/ml que corresponde a la de menor cantidad de

enzima utilizada, ya que da lugar a las conversiones deseadas (superiores al 90%). En consecuencia ésta ha sido la concentración empleada en las series experimentales que se presentan a continuación.

5.1.3. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1

Como ya es sabido en las reacciones enzimáticas la base de la mayor parte de las mediciones cinéticas, es la observación de la velocidad de reacción, la cual varía directamente con la concentración de cada sustrato, de ahí que se ha llevado a cabo la presente serie experimental. Se han realizado tres ensayos con distinta concentración inicial de ambos sustratos, 0.5, 1.0 y 2.0 mM manteniendo siempre una relación molar 1:1.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.24 del Anexo 3. En la Figura 5.3 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En la Figura 5.3 se observa un aumento de la conversión tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B) al aumentar la concentración inicial de ambos sustratos. Este comportamiento es consecuencia de la forma de la ecuación de velocidad cuyo numerador corresponde a una cinética de orden dos. También se puede explicar, debido a que el aumento de la concentración de los sustratos originaría una mayor formación del polímero de la reacción, el cual sería retenido en la membrana, disminuyendo así la permeabilidad de la misma, provocando de esta forma una mayor recirculación del sustrato en el sistema y a su vez un mayor contacto con la

enzima, razón por la cual se incrementa la conversión tanto en el reactor como en la corriente del permeado.

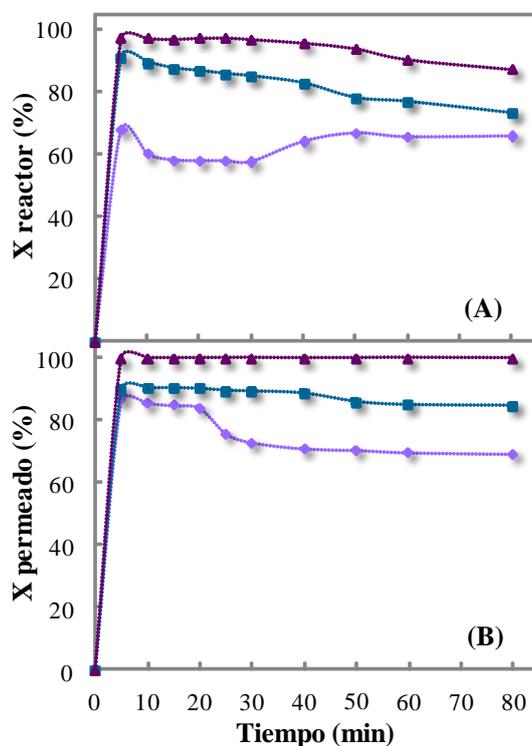


Figura 5.3. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de sustratos en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = \blacklozenge$ 0.5 mM, \blacksquare 1.0 mM y \blacktriangle 2.0 mM.

De los resultados obtenidos se ha establecido la concentración inicial de de ambos sustratos en 2.0 mM como la condición óptima de operación de la presente serie experimental.

5.1.4. Variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno

En la reacción enzimática de nuestro interés el peróxido de hidrógeno es utilizado como el agente oxidante lo que indica que el aumento de la concentración inicial de dicho compuesto podría incidir en la velocidad de reacción para la eliminación del 4-clorofenol, por ello se ha llevado a cabo el presente estudio. Así, se ha realizado tres ensayos con una concentración inicial de 4-clorofenol de 2.0 mM y variando la concentración inicial de

peróxido de hidrógeno, 2.0, 2.5 y 3.0 mM las cuales dan lugar a una relación molar 4-clorofenol:peróxido de hidrógeno, 1:1, 1:1.25 y 1:1.5 respectivamente.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = 2.0 \text{ mM } [H_2O_2]_0 = 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = 2.0 \text{ mM } [H_2O_2]_F = 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$[SBP]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[SBP]_F = 0.002 \text{ mg/ml,}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.25 del Anexo 3. En la Figura 5.4 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

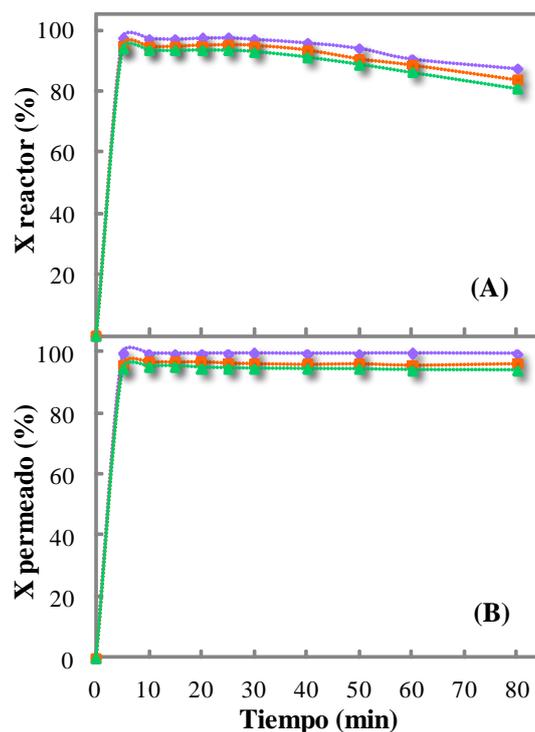


Figura 5.4. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $[H_2O_2]_0 = \blacklozenge$ 2.0 mM (relación molar 1:1), \blacksquare 2.5 mM (relación molar 1:1.25), \blacktriangle 3.0 mM (relación molar 1:1.5).

En dicha figura se observa tanto para el reactor (serie A) como para el permeado (serie B) una leve disminución de la conversión al aumentar la concentración inicial del peróxido de hidrógeno, no siendo esta muy significativa ya que en el reactor se obtuvieron conversiones por encima del 80% al finalizar la reacción y en el permeado conversiones estacionarias superiores al 90%, para las tres concentraciones de peróxido de hidrógeno ensayadas. Lo que indica que un aumento de la concentración del agente oxidante (peróxido de hidrógeno) utilizado en nuestra reacción no se traduce en un aumento de la velocidad de reacción en la eliminación enzimática de 4-clorofenol. Por esta razón se mantiene la relación molar 1:1 entre el 4-clorofenol y el peróxido de hidrógeno como la relación molar óptima de operación del sistema de eliminación de 4-clorofenol en continuo.

5.1.5. Variación conjunta de la concentración inicial de enzima en el reactor y el tiempo espacial

La última serie experimental llevada a cabo con el fin de establecer las condiciones óptimas de operación del sistema de eliminación de 4-clorofenol, consistió en el estudio de la variación simultánea de la concentración inicial de SBP en el reactor y del tiempo espacial. El objeto de estos experimentos es determinar si un aumento en la concentración inicial de enzima podría compensar la disminución del tiempo de residencia en el reactor. Para ello se han llevado a cabo tres ensayos variando las dos magnitudes a la vez, la concentración inicial de enzima en el reactor y el tiempo de residencia. La variación de esta última implicó el uso de volúmenes distintos de reacción (50, 75 y 100 ml) dando lugar a concentraciones iniciales de SBP en el reactor de 0.08, 0.053 y 0.04 mg/ml respectivamente.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 50, 75 \text{ y } 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.08, 0.053 \text{ y } 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml,}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.26 del Anexo 3. En la Figura 5.5 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

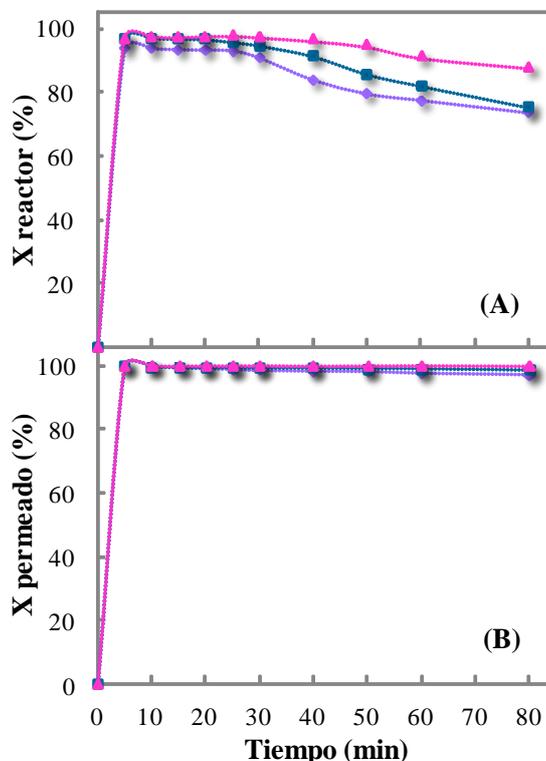


Figura 5.5. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas concentración inicial de enzima en el reactor y distintos tiempos espaciales en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $\tau = \blacklozenge$ 10 min; $[SBP]_0 = 0.08$ mg/ml, \blacksquare 15 min; $[SBP]_0 = 0.053$ mg/ml y \blacktriangle 20 min; $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml.

En la Figura 5.5 se observa un incremento de la conversión al aumentar el volumen de reacción, y con ello el tiempo espacial. En las conversiones del reactor (serie A) se observa un descenso, a partir del minuto 30, mientras que en el permeado (serie B) la conversión permanece prácticamente constante para cada uno de los tiempos espaciales, por tanto, esta variable tiene poca influencia sobre la conversión, al menos en el rango experimental ensayado. Los resultados también indican que, para el caso de la conversión en el reactor, un aumento de la concentración inicial de enzima no compensa la disminución del tiempo de residencia, siendo el tiempo óptimo de operación de

20 minutos lo que se consigue, en nuestro caso, con un volumen de reactor de 100 ml.

5.2. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero

El ensayo pretende comprobar si la enzima retenida por el polímero depositado en la membrana continúa actuando en la eliminación del 4-clorofenol presente en el sistema. Para este estudio se realizaron dos ensayos, utilizando una membrana nueva en cada ensayo. Además, cada uno de los ensayos se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa consistió en la puesta en marcha del sistema en presencia de sustrato y enzima, haciendo un seguimiento de 80 minutos. En uno de los ensayos no se adicionó enzima en la corriente de alimentación y en el otro sí. A partir de este momento se dio inicio a la segunda etapa, donde se procedió a parar, vaciar, lavar el reactor y reiniciar el sistema, alimentando de nuevo ambos sustratos, pero sin adición de enzima (ni en el reactor, ni en la alimentación), el protocolo que ha sido utilizado es el descrito Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9.4.3. Comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero*).

Las condiciones de operación en la primera etapa de los experimentos, han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.000 \text{ y } 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Las condiciones de operación en la segunda etapa de los experimentos, han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.27 del Anexo 3. En la Figura 5.6 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado para los dos ensayos realizados en este apartado. Lo primero que puede observarse en las figuras es que durante la segunda etapa, a pesar de que no se añade enzima al reactor ni a la alimentación en ninguno de los dos ensayos, hay eliminación de 4-clorofenol tanto en el reactor como en el permeado.

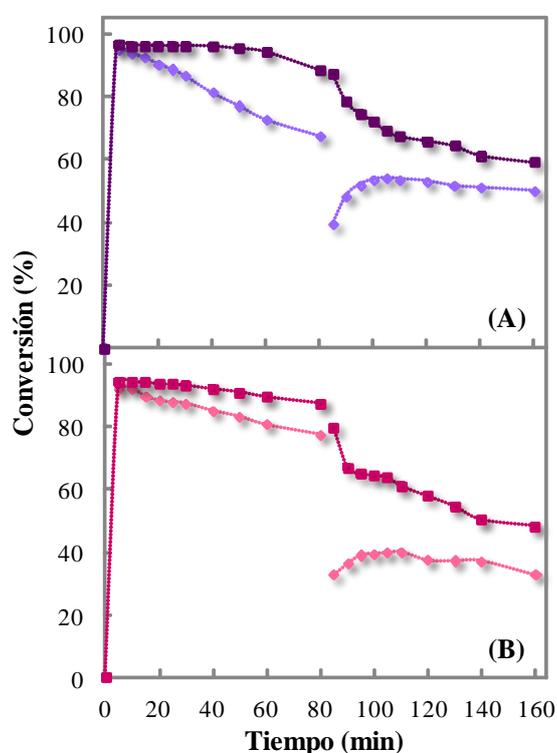


Figura 5.6. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie, con distintas concentraciones de enzima en la corriente de alimentación en la primera etapa del ensayo. (A) ♦ reactor y ■ permeado para $[\text{SBP}]_F = 0.000 \text{ mg/ml}$, (B) ♦ reactor y ■ permeado y para $[\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$.

En el caso del ensayo sin adición de enzima en la corriente de 4-clorofenol en la primera etapa del experimento (A), en las muestras del reactor, al minuto 85 se alcanzó una conversión en torno al 40%,

observándose un leve incremento con el tiempo, llegando a conversiones hasta del 50% al final del ensayo. Contrario a la tendencia expuesta para el reactor, en el caso del permeado, al inicio de la segunda etapa del ensayo (minuto 85), se partió de una conversión alrededor de 87%, dicho valor manifestó un ligero descenso hasta llegar a valores en torno al 60% en el minuto 160.

En el caso del ensayo con adición de enzima en la corriente del 4-clorofenol en la primera etapa del experimento (B), en las muestras del reactor, al inicio de la segunda etapa del ensayo (minuto 85), se obtuvo un porcentaje de conversión en torno al 33%, observándose un leve incremento con el tiempo hasta una conversión alrededor del 40% a los 110 minutos y llegando finalmente a conversiones del 33 % en el minuto 160 del ensayo. Al igual que en el primer experimento, contrario a la tendencia expuesta para el reactor, en el permeado, al inicio de la segunda etapa del ensayo (minuto 85), se partió de un porcentaje de conversión alrededor de 80%; dicho valor manifestó un ligero descenso hasta llegar a valores en torno al 50% en el minuto 160.

En la Figura 5.7 se han representado los experimentos descritos anteriormente, pero en este caso se trata de una comparación del comportamiento en el interior del reactor (A) y en el permeado (B). En ella se aprecia un comportamiento diferente a partir de la segunda etapa de los ensayos (experimentos con sustratos sin enzima), tanto en el reactor (A) como en el permeado (B), al compararlos con la tendencia observada en la primera etapa de los ensayos (experimentos con sustratos y enzima).

En el caso del reactor (A) esta conducta puede explicarse debido a que, parte de la enzima retenida en el polímero depositado en la membrana, se liberó retornando así al reactor. Esto sucedió al inicio de la segunda etapa del ensayo y a lo largo del tiempo de éste, lo que hizo continuar la eliminación del 4-clorofenol de forma ligeramente creciente en el reactor. En el caso del permeado (B), debido al retorno hacia el reactor de la enzima presente en la membrana y/o en el polímero, la actividad enzimática disminuye en la membrana, a lo largo del tiempo, en esta etapa del experimento. Sin embargo, al igual que en el caso del reactor, se continúa la eliminación del 4-clorofenol de la corriente de permeado, pero de manera ligeramente decreciente.

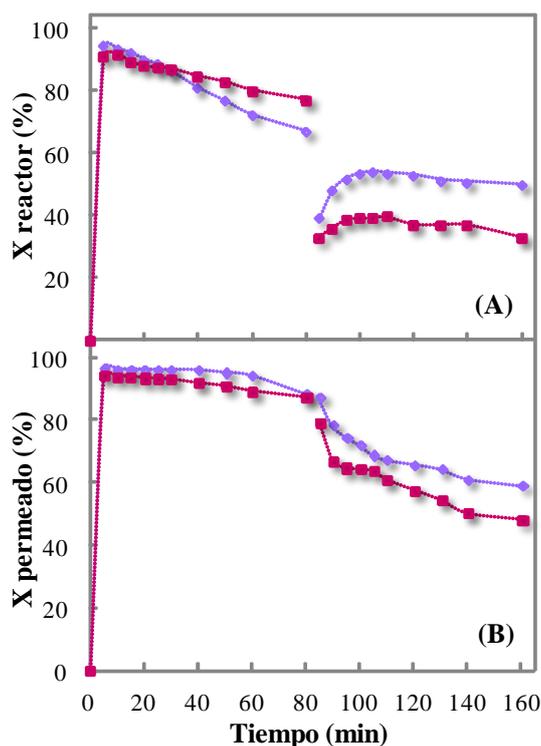


Figura 5.7. Comparación de la conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor (A) y permeado (B) en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie, con distintas concentraciones de enzima en la corriente de alimentación, en la primera etapa del ensayo. $[SBP]_F = \blacklozenge$ 0.000 y \blacksquare 0.002 mg/ml.

El comportamiento apreciado en el reactor y permeado en la segunda etapa de los experimentos adicionales, pone de manifiesto que la enzima retenida en la membrana y/o en el polímero, conserva su actividad. Al mismo tiempo parece que la enzima tiende a alcanzar un equilibrio entre el reactor tanque continuo y el módulo de membrana, lo que hizo mantener la continuidad de la eliminación de 4-clorofenol en el sistema [275].



6. CARACTERIZACIÓN DEL DERIVADO INMOVILIZADO DE SOJA

6. CARACTERIZACIÓN DEL DERIVADO INMOVILIZADO DE SOJA

Las enzimas, aunque presentan francas ventajas frente a catalizadores convencionales, no dejan de tener inconvenientes para el uso en procesos industriales, debido a que muchas de las enzimas no son estables en ciertas condiciones de trabajo y al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil y por tanto no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se ha podido superar, en algunos casos, este último inconveniente, permitiendo que el proceso biotecnológico sea una alternativa viable. De ahí que surgió el interés de probar la SBP inmovilizada en el soporte de vidrio poroso PG 75-400 para la eliminación de 4-clorofenol.

6.1. Caracterización del derivado inmovilizado

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. Dicha metodología se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Así se ha realizado la inmovilización de la peroxidasa de soja (SBP) en el soporte PG 75-400 según el protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.6. Inmovilización de la enzima a PG-aldehído a través de grupos amino*).

Para el derivado obtenido se ha determinado la cantidad de proteína inmovilizada así como la actividad retenida en el proceso de inmovilización, de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos (sección 3.2.7. *Caracterización de los derivados inmovilizados*). Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

6.1.1. Cantidad de enzima inmovilizada

En el proceso de inmovilización se ha utilizado 40 ml de disolución de enzima de 2 mg/ml por un 1 gramo de soporte de vidrio poroso activado (PG 75-400) siendo resuspendido el derivado en 50 ml de tampón fosfato pH 7.0. A partir de las concentraciones de proteína analizadas en la disolución puesta a inmovilizar, en la disolución retirada y en los lavados, se han determinado los parámetros de la inmovilización. En la Tabla 6.1 se muestran los resultados del proceso de inmovilización. Allí se observan la cantidad de proteína inmovilizada en un rango de 27 – 47%, valores característicos para un proceso de inmovilización mediante enlace covalente [264, 268, 269]

Tabla 6.1. Resultados de la inmovilización se SBP en PG 75-400

Numero de inmovilización	Soporte (g)	Proteína inmovilizada (%)	Contenido proteína (mg/g soporte)	Concentración proteína (mg SBP/ml suspensión)
1 ^a	1	38.84	29.20	0.584
2 ^a	2	27.37	21.58	0.411
3 ^a	1	47.50	33.12	0.664
4 ^a	3	42.89	31.62	0.632

Debido a que los resultados de la inmovilización no son totalmente repetitivos, los mililitros de suspensión del derivado añadidos en cada ensayo han sido recalculados para que los mg de enzima en el reactor sean los correspondientes a la concentración de enzima deseada en el experimento.

6.1.2. Determinación del porcentaje de actividad enzimática retenida

La inmovilización por enlace covalente implica la unión entre la enzima y el soporte que, en la mayor parte de las ocasiones, supone una distorsión de la estructura terciaria de la proteína. Esto puede dar lugar a derivados cuya

actividad específica sea muy diferente a la de la enzima nativa, o incluso a derivados inactivos. Para el primer derivado inmovilizado obtenido se ha determinado el porcentaje de la actividad enzimática retenida. De esta manera se han llevado a cabo cinco ensayos en tanque discontinuo, variando la concentración de enzima empleada entre 5 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tanto en estado soluble como inmovilizada y se ha representado la velocidad de reacción calculada a los 2 minutos de reacción frente a los mg de enzima presentes. La velocidad de reacción ha sido definida como:

$$r_{2.0} = \left(\frac{\Delta[4\text{-clorofenol}]}{\Delta t} \right)_{2.0} \text{ mM/min}$$

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 25 \text{ ml}$$

$$T^a = 30 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 5, 10, 15, 20 \text{ y } 25 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$[\text{Tampón}] = 0.1 \text{ M de pH } 7.0$$

En la Figura 6.1 se representa velocidad de reacción calculada a los 2 minutos de reacción frente a los mg de enzima presentes en el ensayo, así como los ajustes de ambas series mediante regresión lineal. Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.28 del Anexo 4.

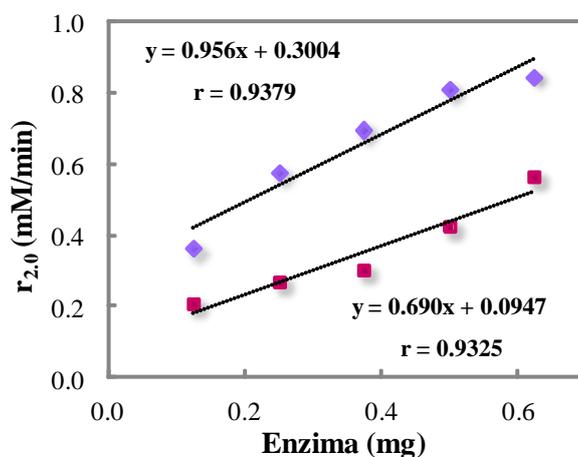


Figura 6.1. Estudio del porcentaje de actividad retenida por la peroxidasa de soja inmovilizada. ◆ SBP soluble y ■ SBP inmovilizada.

Del cociente entre las pendientes de las dos rectas ajustadas en la figura anterior se obtiene un valor de rendimiento de actividad de 72.18%, lo que indica que para el derivado inmovilizado estudiado se retiene más del 70% de actividad enzimática de SBP, lo cual se considera un muy buen resultado para este tipo de inmovilizaciones en las que se implican residuos aminoacídicos de la enzima que pueden estar cercanos a sus centros activos. Asimismo, la disminución del 30% puede deberse, además de a la distorsión en la estructura de la proteína, a las limitaciones difusionales que se generan por el hecho de que la enzima se encuentra inmovilizada en un soporte poroso.



**7. REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A
UN MÓDULO DE MEMBRANA CON PEROXIDASA
DE SOJA INMOVILIZADA**

7. REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA CON PEROXIDASA DE SOJA INMOVILIZADA

Una vez ha sido inmovilizada la peroxidasa de soja (SBP) en el soporte de vidrio poroso PG 75-400 se ha realizado un estudio utilizando el derivado inmovilizado para la eliminación de 4-clorofenol en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. Para dicho estudio se han llevado a cabo cuatro series experimentales que se presentan a continuación.

7.1. Series experimentales

Todos los experimentos que han sido realizados en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie, utilizando el derivado inmovilizado de SBP se han desarrollado según los protocolos descritos en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.10. Experimentación en reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada*). Cabe mencionar que el dispositivo experimental contó con un reactor adicional, previo al módulo de membrana, con la concentración inicial de 4-clorofenol de cada ensayo. Dicho reactor tiene la finalidad de evitar que las partículas del soporte que contiene la enzima inmovilizada, por la succión que genera el módulo de membrana, se adhieran en la malla de nylon y no permanezcan en suspensión dentro del reactor como se requiere, o que atraviesen la malla

pudiendo generar problemas mecánicos en el módulo de membrana. De esta manera el segundo reactor funciona como un tanque amortiguador. Los resultados de conversión en este reactor no se presentan en ninguna de las series experimentales ya que los puntos de nuestro interés se corresponden al reactor inicial y al flujo de salida del módulo de membrana (permeado).

Es importante mencionar que las curvas de conversión del 4-clorofenol en el permeado están influenciadas por la presencia del tanque amortiguador, que, como ya se mencionó, tiene la concentración inicial de 4-clorofenol correspondiente a cada ensayo. Por lo tanto la concentración de 4-clorofenol de dicho tanque va disminuyendo con el tiempo, por el efecto de la mezcla de la corriente proveniente del tanque de reacción, la cual viene con una concentración menor de los sustratos, y en consecuencia la conversión del permeado es el reflejo de lo que está sucediendo en el tanque amortiguador. De ahí que la duración de estos ensayos fue generalmente a 160 minutos en la mayoría de los ensayos, ya que hasta ese momento no se observaron conversiones estables (estado estacionario) en la salida del permeado.

Para los ensayos de la primera serie experimental, en el proceso de inmovilización se ha utilizado 1 gramo de soporte de vidrio poroso activado (PG 75-400) y 40 ml de disolución de enzima de 2 mg/ml, resuspendiendo el derivado en 50 ml de tampón fosfato pH 7.0. En la Tabla 7.1 se muestran los resultados del proceso de inmovilización.

Tabla 7.1. Resultados de la inmovilización de SBP en PG 75-400

Proteína inmovilizada (%)	Contenido proteína (mg/g soporte)	Concentración proteína (mg SBP/ml)
38.84	29.20	0.584

7.1.1. Variación de la concentración de SBP en el reactor

Al igual que en el capítulo anterior, en primer lugar se llevó a cabo el estudio de la variación de la concentración de enzima en el reactor por ser una variable de vital importancia en cualquier proceso enzimático. Así, se ha

llevado a cabo tres ensayos con concentraciones iniciales de enzima inmovilizada en el reactor de 0.04, 0.06 y 0.08 mg/ml.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04, 0.06 \text{ y } 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.29 del Anexo 5. En la Figura 7.1 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

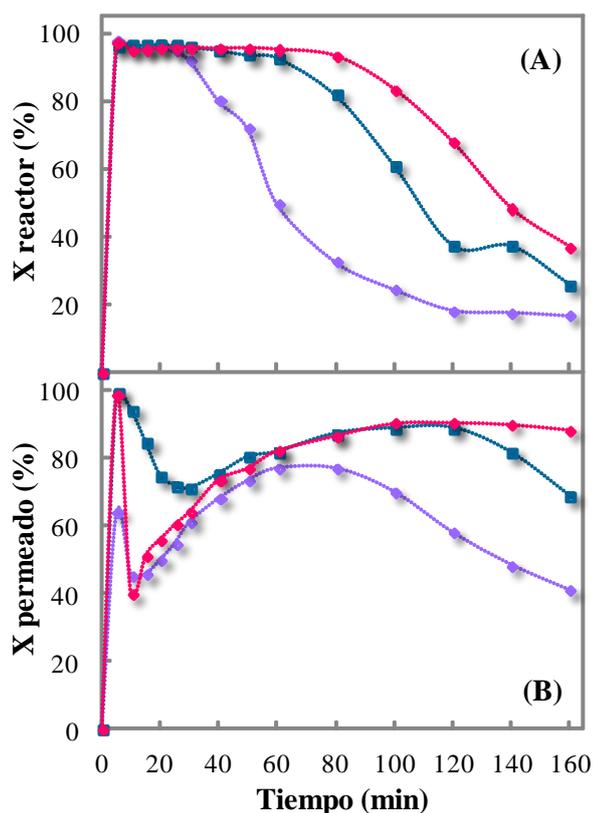


Figura 7.1. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de enzima inmovilizada en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $[\text{SBP}]_0 = \blacklozenge$ 0.04 mg/ml, \blacksquare 0.06 mg/ml y \blacklozenge 0.08 mg/ml.

En esta figura se aprecia un incremento de la conversión al aumentar la concentración de enzima de 0.04 a 0.06 y por último a 0.08 mg/ml tanto en el reactor (serie A), como en el permeado (serie B). No obstante, independientemente de la concentración inicial de enzima utilizada, no se alcanza una conversión estacionaria en el reactor durante el tiempo del ensayo, sino que comienza a descender una vez alcanzado el máximo. Esta pérdida aparente de actividad enzimática es probablemente debida a la deposición sobre las partículas catalíticas del polímero que se forma durante la reacción, el cual limita la accesibilidad de 4-clorofenol a los sitios activos de la enzima.

Para el estudio de la variación de concentración de ambos sustratos en relación 1:1 y de la variación de caudal que se presentan a continuación, se preparó un nuevo derivado inmovilizado de SBP sobre PG 75-400. Se utilizaron 2 g de soporte de vidrio poroso activado (PG 75-400) y 80 ml de disolución de enzima de 2 mg/ml, resuspendiendo el derivado en 100 ml de tampón fosfato pH 7.0. En la Tabla 7.2 se muestran los resultados del proceso de inmovilización.

Tabla 7.2. Resultados de la inmovilización se SBP en PG 75-400

Proteína inmovilizada (%)	Contenido proteína (mg/g soporte)	Concentración proteína (mg SBP/ml)
27.37	21.58	0.411

Como ya ha sido mencionado en el Capítulo 6 (sección 6.1.1. *Cantidad de enzima inmovilizada*) debido a la falta de reproducibilidad de los resultados de inmovilización, los mililitros de suspensión del derivado añadidos en cada ensayo han sido recalculados para que los mg de enzima en el reactor sean los correspondientes a la concentración de enzima deseada en el ensayo.

7.1.2. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1

Para el desarrollo del estudio de la variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1 se han llevado a cabo tres ensayos con la concentración inicial de sustratos de 0.5, 1.0 y 2.0 mM.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.30 del Anexo 5. En la Figura 7.2 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

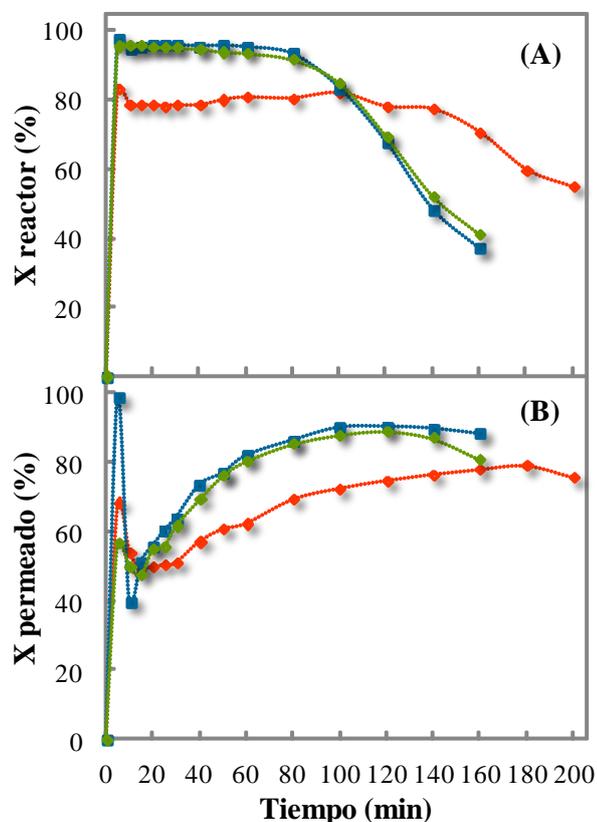


Figura 7.2. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de sustratos en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 =$ \blacklozenge 0.5 mM, \blacklozenge 1.0 mM y \blacksquare 2.0 mM

En la figura se observa un aumento de la conversión tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B) al aumentar la concentración inicial de

ambos sustratos de 0.5 a 1.0 mM. Sin embargo el incremento de la concentración de los sustratos de 1.0 a 2.0 mM no refleja ninguna influencia, teniendo prácticamente la misma curva de conversión en ambos casos, tanto en el interior del reactor como en el permeado. Como se ha comentado en el Capítulo 5 (sección 5.1.3. *Variación inicial de ambos sustratos en relación 1:1*), el incremento de conversión al aumentar la concentración inicial de los sustratos es consecuencia de la forma de la ecuación de velocidad cuyo numerador corresponde a una cinética de orden dos.

En el ensayo de concentración inicial de sustratos de 0.5 mM la toma y análisis de muestras se realizó hasta los 200 minutos en vez de los 160 habituales, ya que es en este momento cuando empiezan a observarse los fenómenos de desactivación de derivado inmovilizado de SBP.

7.1.3. Variación del caudal de alimentación

Para la realización del estudio del caudal de alimentación se han llevado a cabo tres ensayos con caudales de 5, 7.5 y 10 ml/min.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5, 7.5 \text{ y } 10 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.31 del Anexo 5. En la Figura 7.3 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En la Figura 7.3 se observa una disminución de la conversión tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B) al aumentar el caudal, esto se debe a la disminución del tiempo de residencia en el reactor, lo que genera un menor contacto de los sustratos con el derivado inmovilizado y por consiguiente una menor conversión.

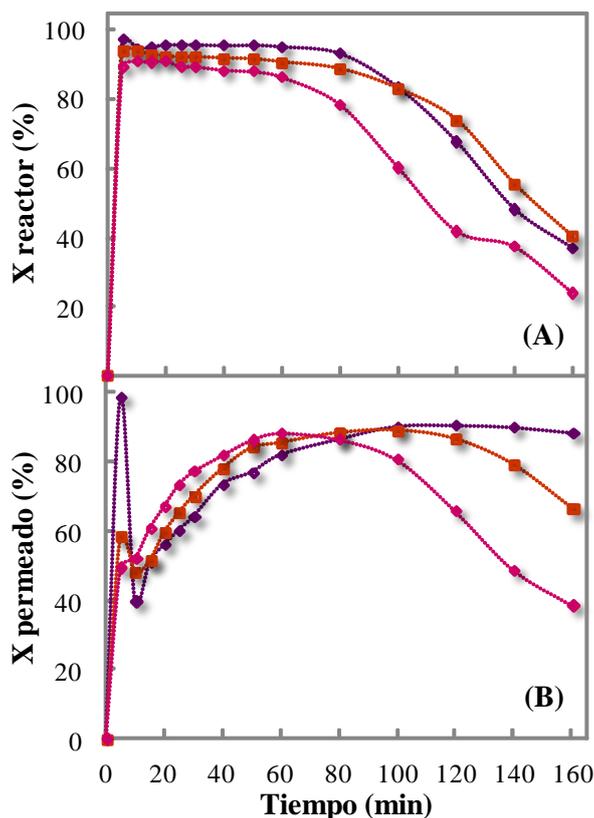


Figura 7.3. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintos caudales de alimentación en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. $Q = \blacktriangledown$ 5 ml/min, \blacksquare 7.5 ml/min y \blacklozenge 10 ml/min

7.1.4. Adiciones sucesivas de enzima

En los resultados obtenidos hasta el momento en las diferentes series experimentales con el uso del derivado inmovilizado de SBP, no se han observado conversiones estacionarias a lo largo del tiempo, razón por la cual se ha realizado esta serie experimental, para comprobar si al adicionar enzima nueva al reactor se logra obtener conversiones estacionarias por encima del 90% en el reactor y permeado.

La serie experimental que se presenta en este capítulo, consistió en la realización de ensayos con adición sucesiva del derivado inmovilizado en el reactor de forma similar a los ensayos con adición continua de enzima al reactor que han sido desarrollados con la enzima soluble. Para esta serie se ha obtenido un nuevo derivado inmovilizado de SBP sobre PG 75-400. En el

proceso de inmovilización se ha utilizado 1 gramo de soporte de vidrio poroso activado (PG 75-400) y 40 ml de disolución de enzima de 2 mg/ml, resuspendiendo el derivado en 50 ml de tampón fosfato pH 7.0 En la Tabla 7.3 se muestran los resultados del proceso de inmovilización.

Tabla 7.3. Resultados de la inmovilización se SBP en PG 75-400

Proteína inmovilizada (%)	Contenido proteína (mg/g soporte)	Concentración proteína (mg SBP/ml)
47.50	33.12	0.664

Se han llevado a cabo tres ensayos, el primero de ellos sin adición de enzima, el segundo con la adición de de 2 mg de enzima de SBP inmovilizada que corresponden a una concentración de 0.02 mg/ml cada 20 minutos desde el minuto 60 al 120 para un total 0.08 mg/ml de SBP adicionados y un último ensayo con la adición de 0.02 mg/ml SBP inmovilizada cada 20 minutos desde el minuto 60 al 200, dando un total de 0.16 mg/ml de SBP adicionados en el tiempo de reacción.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.32 del Anexo 5. En la Figura 7.4 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En la Figura 7.4 se observa que la adición sucesiva de derivado inmovilizado permite obtener conversiones estacionarias tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B), de lo cual se podría decir, que el efecto de desactivación enzimática que se aprecia en el ensayo sin adición sucesiva de SBP, es debido a la gradual deposición del polímero de la reacción, sobre la superficie de las partículas catalíticas, lo que puede relacionarse a una

desactivación aparente de la enzima por la aparición de limitaciones difusionales.

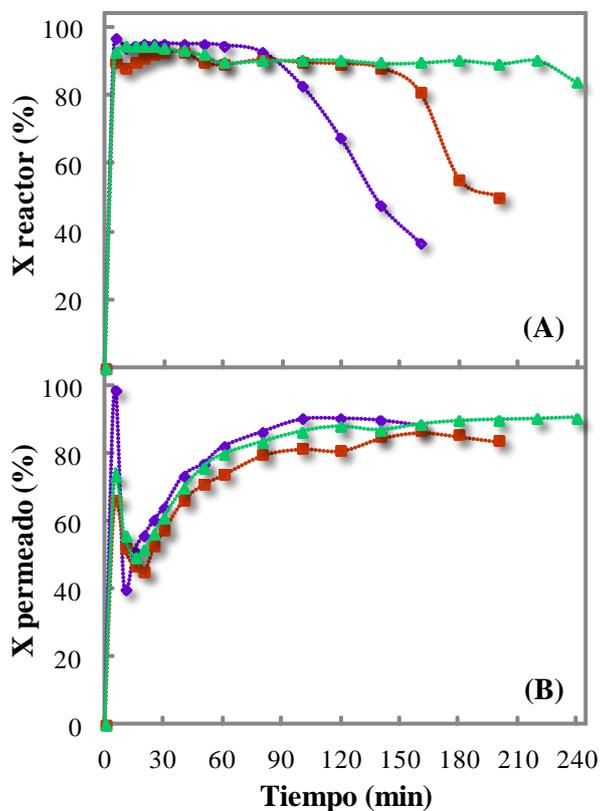


Figura 7.4. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas adiciones sucesivas de SBP inmovilizada en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. ◆ sin adición, ■ adición de 0.02 mg/ml de SBP inmovilizada cada 20 minutos desde el minuto 60 al 120 y ▲ adición de 0.02 mg/ml SBP inmovilizada cada 20 minutos desde el minuto 60 al 200 del tiempo de reacción.



8. REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA

8. REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA

El uso de equipos de lecho fluidizado, ha abierto amplias posibilidades para la mejora de varias tecnologías ambientales. En los lechos fluidizados se alcanza un contacto óptimo entre sólido y fluido sin necesidad de agitación mecánica que pueda dañar las partículas de catalizador. En ese sentido y con la intención de probar la SBP inmovilizada en el soporte PG 75-400 para la eliminación de 4-clorofenol en otra configuración de reactor asociado al módulo de membrana en serie, se ha llevado a cabo el presente estudio. Así, se han realizado tres series experimentales en el reactor lecho fluidizado asociado a un módulo de membrana en serie utilizando el derivado inmovilizado de SBP.

8.1. Series experimentales

Todos los experimentos que constituyen esta serie experimental han sido realizados según el protocolo descrito en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.11. Experimentación en reactor de lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. Enzima inmovilizada*). Cabe mencionar que el dispositivo del sistema experimental contó con un tanque amortiguador previo al módulo de membrana con la concentración inicial de 4-clorofenol correspondiente a cada ensayo para evitar las circunstancias que han sido expuestas en el Capítulo 7 (*sección 7.1. Series experimentales*). Asimismo, en dicha sección se

comenta, la influencia que tiene el tanque previo al módulo de membrana en el comportamiento de las curvas de conversión de 4-clorofenol del permeado.

Los resultados de las series experimentales que se presentan a continuación, se han llevado a cabo con un nuevo derivado inmovilizado de SBP sobre PG 75-400. Para el proceso de inmovilización se ha utilizado 3 gramos de soporte de vidrio poroso activado (PG 75-400) y 120 ml de disolución de enzima de 2 mg/ml, resuspendiendo el derivado en 150 ml de tampón fosfato pH 7.0 En la Tabla 8.1 se muestran los resultados del proceso de inmovilización.

Tabla 8.1. Resultados de la inmovilización se SBP en PG 75-400

Proteína inmovilizada (%)	Contenido proteína (mg/g soporte)	Concentración proteína (mg SBP/ml)
42.89	31.62	0.632

8.1.1. Variación de la altura inicial del lecho

En esta configuración de reactor, se llevo a cabo el estudio de la altura inicial del lecho fijo, parámetro que se relaciona con la cantidad de enzima presente en cada ensayo. De esta manera se han realizado dos ensayos con una altura inicial de lecho fijo de 0.8 y 1.2 cm equivalente a una cantidad total de 8 y 12 mg de SBP inmovilizada en el reactor respectivamente. Esto con la finalidad de poder hacer una comparación de los resultados obtenidos en las distintas configuraciones de reactor tanto con la enzima soluble como inmovilizada.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 12 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0 \text{ mM}$$

$$\text{Altura inicial del lecho} = 0.8 \text{ cm } [\cong 8 \text{ mg de SBP}] \text{ y } 1.2 \text{ cm } [\cong 12 \text{ mg de SBP}]$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

El volumen del reactor es 12 ml para las dos alturas iniciales de lecho fijo debido a que, por la propia naturaleza del proceso, las partículas quedan recubiertas de polímero casi desde el comienzo de la reacción, implicando fenómenos de agregación de las partículas entre si. Como consecuencia de este fenómeno las partículas de catalizador tienen tamaños y densidades muy heterogéneas ocupando al fluidizar la totalidad del volumen de reactor.

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.33 del Anexo 6. En la Figura 8.1 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

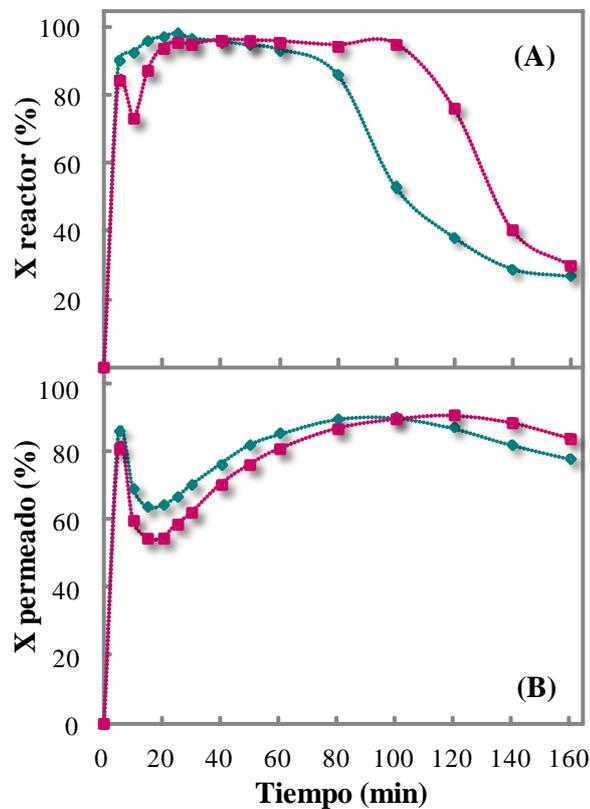


Figura 8.1. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo para distintas alturas de lecho en el reactor lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. Altura inicial del lecho: \blacklozenge 0.8 cm y \blacksquare 1.2 cm

En la Figura 8.1 se observa un incremento de la conversión al aumentar la altura del lecho de 0.8 a 1.2 cm, tanto en el reactor (serie A) como para el permeado (serie B), lo que es de esperar por corresponderse con una mayor

cantidad de enzima presente en el reactor. Sin embargo a pesar del incremento de la altura inicial del lecho no se alcanza una conversión estacionaria durante el tiempo del ensayo. Esto puede explicarse por el hecho de que el polímero formado queda depositado en su mayor parte sobre las partículas del catalizador. Este polímero por un lado constituye una barrera difusional al 4-clorofenol para llegar a los centros activos de la enzima, y por otro provoca la agregación de las partículas aumentando su tamaño y disminuyendo su desarrollo superficial.

8.1.2. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1

A continuación se ha llevado a cabo el estudio de la variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1 manteniendo constante la cantidad de derivado inmovilizado en el reactor. Se realizaron así, tres ensayos con concentración inicial de sustratos de 0.5, 1.0 y 2.0 mM.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 12 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$\text{Altura inicial del lecho} = 0.8 \text{ cm } [\cong 8 \text{ mg de SBP}]$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.34 del Anexo 6. En la Figura 8.2 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En la Figura 8.2 se observa un aumento de la conversión tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B) al aumentar la concentración inicial de ambos sustratos de 0.5 a 1.0 mM. Se aprecia también que con una concentración inicial de 0.5 mM, aunque se alcanzan conversiones más bajas estas se mantienen constantes en el reactor hasta el minuto 100, momento en que comienzan aparecer los fenómenos de desactivación aparente de la enzima, evidenciados en la disminución de la conversión. Por el contrario para

una concentración inicial de 1.0 mM se obtienen conversiones más altas al inicio del ensayo y los fenómenos de desactivación de la enzima aparecen antes. La explicación a dicho comportamiento ya se ha expuesto en los Capítulos 5 y 7 (secciones 5.1.3 y 7.1.2. *Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1*), y es debido a que en la forma de la ecuación de velocidad su numerador corresponde a una cinética de orden dos.

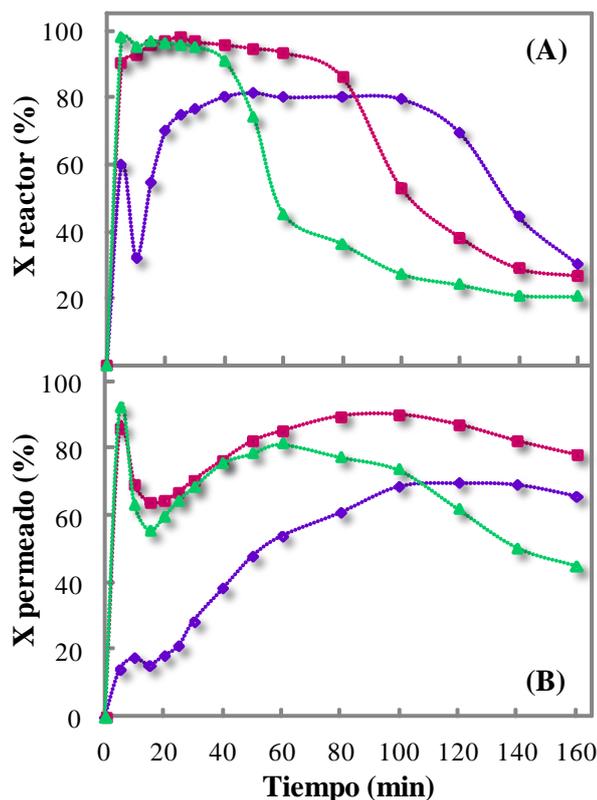


Figura 8.2. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de sustratos en el reactor lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = \blacklozenge 0.5 \text{ mM}$, $\blacktriangle 1.0 \text{ mM}$ y $\blacksquare 2.0 \text{ mM}$

Por otro lado en la Figura 8.2 también se observa una disminución de la conversión tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B) al aumentar la concentración inicial de ambos sustratos de 1.0 a 2.0 mM. Aunque al inicio de la reacción en ambos casos se alcanzan conversiones elevadas por encima del 90%, para el caso de la concentración de 2.0 mM se aprecia una caída drástica de la conversión a partir del minuto 40, lo que puede deberse a que al aumentar la concentración de los sustratos es mayor

la cantidad del polímero que se forma durante la reacción, aumentando así la deposición del polímero sobre las partículas catalíticas generando un incremento de las limitaciones difusionales y evitando que el 4-clorofenol entre en contacto con los sitios activos de la enzima.

8.1.3. Variación del caudal de alimentación

Para terminar las series experimentales en el reactor lecho fluidizado asociando a un módulo de membrana se ha realizado el estudio del caudal de alimentación y para ello se han llevado a cabo tres ensayos con un caudal de 5, 7.5 y 10 ml/min.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 12 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0 \text{ mM}$$

$$\text{Altura inicial del lecho} = 0.8 \text{ cm } [\cong 8 \text{ mg de SBP}]$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5, 7.5 \text{ y } 10 \text{ ml/min}$$

Como se describe en la *sección 8.1.1. (Variación de la altura inicial del lecho)* el volumen de reactor se considera igual en los tres experimentos de la serie ya que las partículas de catalizador ocupan, casi desde el inicio del ensayo, todo el volumen del reactor, independientemente del caudal.

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.35 del Anexo 6. En la Figura 8.3 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

En la Figura 8.3 se observa una disminución de la conversión tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B) al aumentar el caudal. Se aprecia que al inicio de la reacción para los tres ensayos se obtienen conversiones por encima del 90% sin que sea notoria la influencia del caudal. Sin embargo con el paso del tiempo las limitaciones difusionales se hacen presentes, manifestándose en la disminución de la conversión, en el minuto 30 del ensayo para un caudal de 10 ml/min, en el minuto 60 para un caudal de 7.5 ml/min y por último en el minuto 80 para un caudal de 5 ml/min. Esto

puede explicarse por el hecho de que conversiones similares a mayores caudales dan lugar a una mayor formación de producto y por lo tanto a una aparición más temprana de la desactivación aparente del derivado debida al recubrimiento por el polímero.

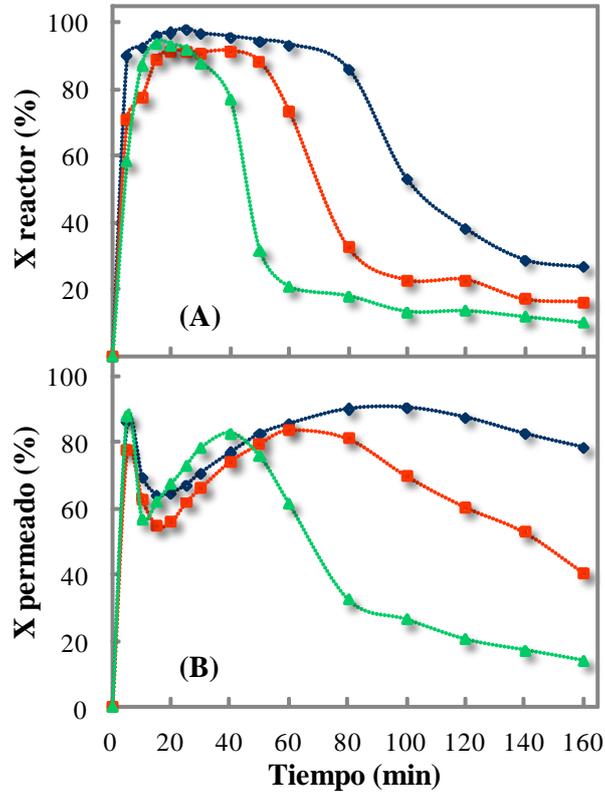


Figura 8.3. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo, para distintos caudales de alimentación en el reactor lecho fluidizado con módulo de membrana en serie. $Q = \blacklozenge$ 5 ml/min, \blacksquare 7.5 ml/min y \blacktriangle 10 ml/min



9. COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS CONFIGURACIONES DE REACTOR

9. COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS CONFIGURACIONES DE REACTOR

En este capítulo se ha realizado una comparación de los resultados experimentales obtenidos utilizando las distintas configuraciones de reactor en continuo, tanto con la enzima soluble como inmovilizada. Así se han comparado los resultados obtenidos en el reactor tanque continuo y el reactor de lecho fluidizado ambos asociado a un módulo de membrana en serie. Además en el primero de ellos se utilizó la peroxidasa de soja soluble y su correspondiente derivado inmovilizado. El fin de este capítulo es seleccionar la mejor configuración de reactor y el estado de la enzima idóneo para la eliminación en continuo de 4-clorofenol.

9.1. Resultados y Discusión

Los ensayos que se han utilizado para llevar a cabo la comparación son: en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana y la enzima de soja en soluble se escogió el correspondiente al estudio de la estabilidad operacional, en el reactor tanque continuo con la enzima inmovilizada y en el reactor lecho fluidizado se han seleccionado las series experimentales donde se estudio la variación de la concentración inicial de sustratos en relación 1:1. Todos estos resultados ya han sido mostrados en capítulos anteriores y fueron escogidos por haberse realizado con las mismas condiciones respecto a la cantidad de enzima presente en el reactor (8 mg), caudal de alimentación

(5 ml/min), concentración inicial de ambos sustratos (2.0 mM) y un tiempo de operación de 160 minutos.

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.36 del Anexo 7. En la Figura 9.1 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado, para las tres configuraciones comparadas.

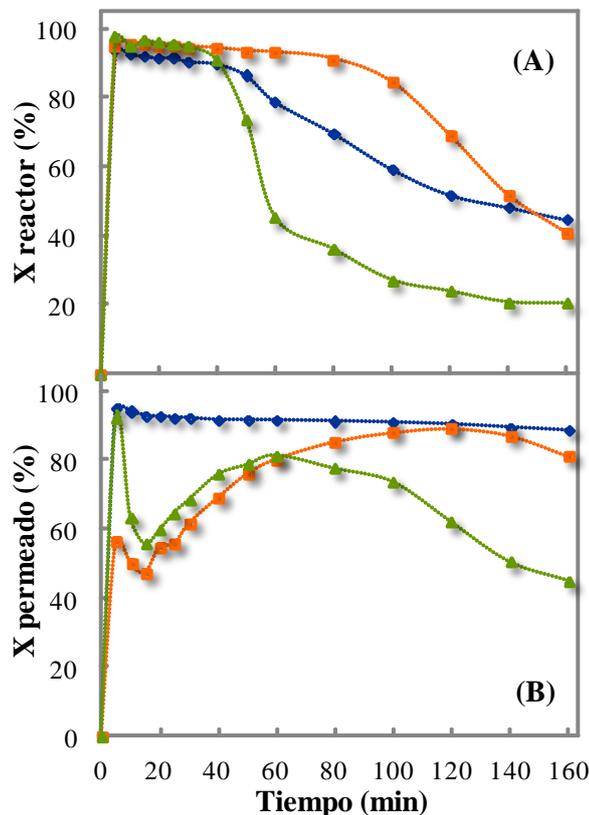


Figura 9.1. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) para distintas configuraciones de reactor en continuo asociando a un módulo de membrana en serie: ▲ tanque continuo, SBP soluble, ■ tanque continuo, SBP inmovilizada y ◆ lecho fluidizado, SBP inmovilizada.

En la Figura 9.1 se observa que hay diferencias en el comportamiento de eliminación de 4-clorofenol tanto al utilizar las distintas configuraciones de reactor, como al utilizar la enzima libre o inmovilizada, y que estas diferencias se aprecian tanto en el reactor (serie A) como en el permeado (serie B). Respecto a las conversiones en el reactor se observa que al inicio de la reacción y hasta el minuto 40 las tres alternativas presentan conversiones

elevadas por encima del 90%. Sin embargo transcurrido este tiempo comienza a manifestarse un descenso de la conversión para el reactor de lecho fluidizado y el reactor tanque continuo con SBP soluble, siendo más drástico éste para el reactor de lecho fluidizado. Por otro lado en el reactor tanque continuo con SBP inmovilizada las conversiones se mantienen por encima del 90% hasta el minuto 100, momento en que comienza a detectarse una caída en la conversión.

La conducta antes mencionada es consecuencia de las explicaciones que ya han sido expuestas en los capítulos anteriores, las cuales tiene que ver con el efecto que tiene el polímero formado en la reacción, ya sea sobre la enzima soluble o sobre las partículas catalíticas del derivado inmovilizado.

En la Figura 9.1 también se puede observar el efecto en el reactor (serie A) del uso del derivado inmovilizado, proporcionando una mayor estabilidad operacional en el reactor tanque continuo al compararlo con la enzima soluble. Sin embargo esta estabilidad operacional no se ve reflejada en la conversión de la corriente del permeado, en la que las mayores y más estables conversiones han sido obtenidas en el reactor tanque continuo con enzima soluble (serie B). Ya se ha comentado en otros capítulos que los descensos de conversión en el reactor, cuando se trabajaba con la peroxidasa en forma soluble, están relacionados fundamentalmente con la pérdida de enzima disuelta en el reactor que pasaba a estar de alguna forma “inmovilizada” sobre la superficie de la membrana, manteniendo en gran parte su actividad. Como el permeado es “forzado” a atravesar la membrana, parte del 4-clorofenol que contiene es convertido por la enzima depositada en la superficie de la misma.

La conclusión de esta comparación es que la opción más conveniente es la utilización de un dispositivo de reactor tanque continuo agitado con un módulo de membrana acoplado en serie, al cual se le añade la enzima disuelta. Sin embargo con el fin de corroborar este resultado se han comparado otros experimentos disponibles.

De las series experimentales anteriores se disponía de ensayos con la enzima inmovilizada para una concentración de sustratos en la alimentación

de 1.0 mM y una cantidad de peroxidasa en el reactor de 8 mg en el reactor tanque y en el reactor tubular. Se realizó un ensayo adicional con una cantidad de enzima libre en el reactor de 4 mg para comprobar si incluso con la mitad de enzima la elección anteriormente realizada era todavía ventajosa y se comparó con los ensayos con una cantidad de enzima en el reactor de 8 mg para el tanque continuo y lecho fluidizado ambos asociado a un módulo de membrana con la enzima inmovilizada. Las demás condiciones de operación se han mantenido constantes, caudal de alimentación 5 ml/min, concentración inicial de ambos sustratos 1.0 mM y un tiempo de operación de 160 minutos.

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.37 del Anexo 7. En la Figura 9.2 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

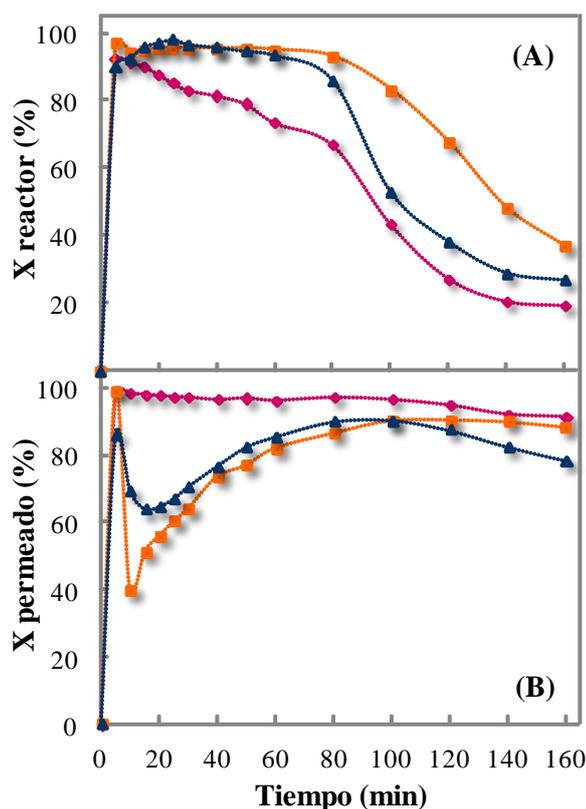


Figura 9.2. Conversión alcanzada en el reactor (A) y en el permeado (B) para distintas configuraciones de reactor en continuo asociando a un módulo de membrana en serie: \blacklozenge tanque continuo, SBP soluble, \blacksquare tanque continuo, SBP inmovilizada y \blacktriangle lecho fluidizado, SBP inmovilizada.

En la Figura 9.2 se observa de nuevo que en el reactor (serie A) la conversión alcanzada con la enzima libre es menor y menos estable con el tiempo, debido sin duda a que la enzima queda adsorbida en la superficie de la membrana y por lo tanto ya no está activa en el reactor. Sin embargo a pesar de que el ensayo con la enzima soluble se ha realizado con la mitad de la cantidad de enzima presente en las otras dos configuraciones, nuevamente es esta configuración la que proporciona las mayores conversiones por encima del 90% en el permeado y las más estables durante el tiempo del ensayo (serie B).

De la comparación de las diferentes configuraciones de reactor para eliminar en un sistema en continuo 4-clorofenol, ya sea con la enzima soluble o inmovilizada, se puede decir que el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana y la enzima soluble, es la configuración más adecuada para dicho fin, puesto que permite trabajar con unos menores costes de operación, ofreciendo conversiones estacionarias deseadas con una menor cantidad de enzima y a su vez se evitan los costes que implican el proceso de inmovilización de la peroxidasa.



**10. MODELO DE DISEÑO DEL REACTOR TANQUE
CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE
MEMBRANA**

10. MODELO DE DISEÑO DEL REACTOR TANQUE CONTINUO ASOCIADO A UN MÓDULO DE MEMBRANA

En la ingeniería de procesos los modelos matemáticos y el análisis teórico son elementos básicos de estudio ya que permiten una interacción virtual con los sistemas reales para comprender y predecir su comportamiento. Estos estudios no sólo se utilizan para el diseño, operación y control de procesos y equipos, sino que también se usan en el análisis de problemas y, para su optimización. De ahí que como complemento de la presente investigación se ha desarrollado y validado experimentalmente un modelo de diseño para la configuración de reactor que ha presentando mejores resultados en la eliminación de 4-clorofenol en continuo (reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie y la peroxidasa de soja soluble).

10.1. Modelo de diseño

10.1.1. Esquema global del conjunto biorreactor-módulo de membrana

En la Figura 10.1, se muestra un esquema del sistema formado por el reactor tanque continuo y el módulo de membrana, indicando la nomenclatura

que se ha sido utilizada en el modelo para los caudales volumétricos de cada corriente y las concentraciones de los sustratos y la enzima.

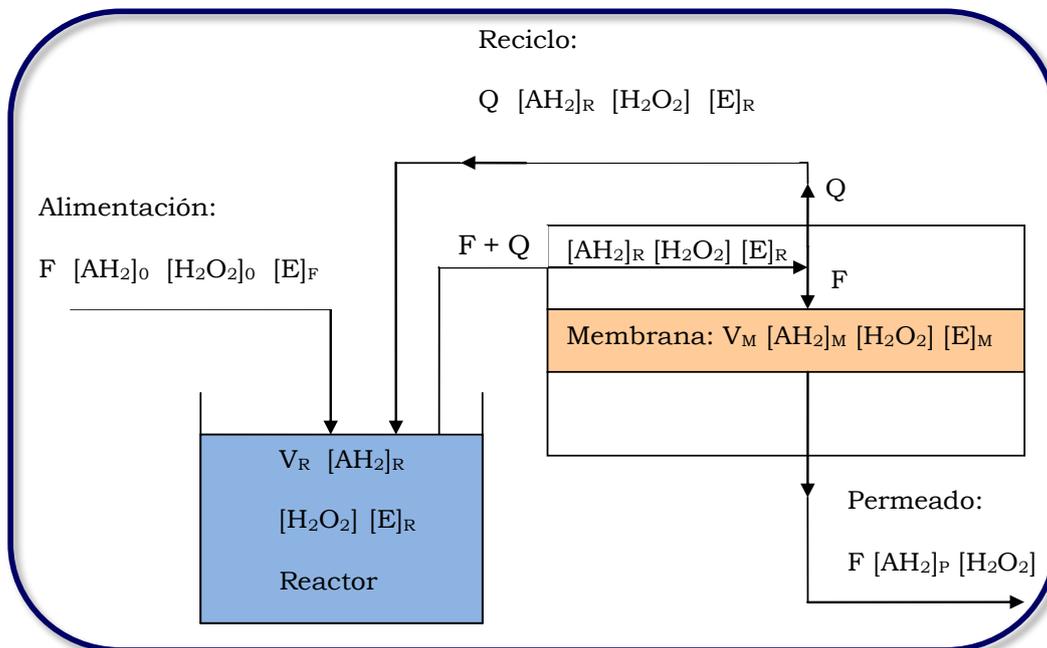


Figura 10.1. Esquema del conjunto biorreactor-módulo de ultrafiltración y nomenclatura utilizada.

10.1.2. Hipótesis

Los resultados experimentales utilizados para la validación del presente modelo de diseño han sido los obtenidos en el Capítulo 5. *Resultados en el Reactor Tanque Continuo Asociado a un Módulo de Membrana en Serie.*

Para el planteamiento del modelo se han tenido en cuenta las observaciones experimentales y se ha tomado como referencia el mecanismo de reacción propuesto por Dunford. Así, se ha propuesto un modelo de diseño del conjunto biorreactor-módulo de ultrafiltración basado en las siguientes hipótesis generales:

- ✚ Todas las especies presentes en el tanque (4-clorofenol, peróxido de hidrógeno, dímero y polímeros de mayor grado, así como la enzima) abandonan el mismo con la corriente de salida, retornando

parcialmente en la corriente de reciclo. Sin embargo, solo los reactantes no consumidos (4-clorofenol y peróxido de hidrógeno) son capaces de atravesar la membrana, abandonando el sistema en la corriente de permeado.

- ✚ Como consecuencia del flujo de salida del tanque y de la presión transmembrana, los productos insolubles de la reacción (dímero y polímeros de mayor alto grado) se depositan gradualmente sobre la superficie de la membrana, atrapando en su interior moléculas de enzima, lo que provoca un fenómeno comparable a una inmovilización “in situ” de la enzima sobre la membrana. Este fenómeno determina una disminución progresiva de la concentración de enzima en el tanque y el correspondiente incremento de dicha concentración sobre la superficie de la membrana del módulo de ultrafiltración. Tanto la enzima que permanece en el tanque como la depositada sobre la membrana conservan su actividad específica inicial.
- ✚ Los productos de la reacción (dímeros y polímeros de mayor grado), al depositarse sobre la membrana obstruyen parcialmente sus poros. Esto provoca una disminución en la permeabilidad del 4-clorofenol a través de la membrana y, como consecuencia, una diferencia de concentración de este compuesto entre la corriente de permeado y la que existe dentro de la membrana y, asimismo, de esta última con la de la disolución que procede del reactor. Si $[AH_2]_R$, $[AH_2]_M$ y $[AH_2]_P$ son, respectivamente, las concentraciones de 4-clorofenol en el reactor, en la membrana y en la corriente de permeado, se verifica que: $[AH_2]_R \geq [AH_2]_M \geq [AH_2]_P$
- ✚ Por el contrario, la permeabilidad del peróxido de hidrógeno, dado su menor tamaño molecular, no se ve afectada por el ensuciamiento de la membrana, y la concentración de este compuesto, $[H_2O_2]$, es la misma en el reactor, en la membrana y en la corriente de permeado.
- ✚ Como consecuencia de lo anterior, el conjunto biorreactor-módulo de ultrafiltración se comporta como una asociación de dos tanques en serie, siendo V_R y V_M sus volúmenes efectivos de reacción, respectivamente. Dado que el caudal total de entrada al sistema es

igual al caudal de salida (caudal de permeado), ambos volúmenes de reacción permanecen constantes a lo largo del tiempo.

- ✚ La reacción del 4-clorofenol con el peróxido de hidrógeno sigue el mecanismo de radicales libres propuesto por Dunford y, de acuerdo con dicho mecanismo, la velocidad de consumo de 4-clorofenol obedece a una ecuación cinética del tipo bisubstrato Ping-Pong.
- ✚ Los productos de la reacción (dímeros, trímeros, etc.) reaccionan también siguiendo el mismo mecanismo, lo que determina un consumo adicional de peróxido. Como consecuencia, la velocidad de consumo de peróxido es mayor que la de compuesto fenólico siendo proporcional a esta.

10.1.3. Ecuaciones de balance de materia

Teniendo en cuenta los volúmenes de control y nomenclatura que se indican en la Figura 10.1, así como la forma en que se procede a la puesta en marcha del reactor, pueden formularse los siguientes balances de materia y condiciones iniciales.

10.1.3.1. Balance de materia para el compuesto fenólico en el tanque

En un instante dado la concentración total de enzima en el reactor es igual a $[E]_R$ y la velocidad de consumo de 4-clorofenol, de acuerdo con las hipótesis anteriores, viene dada por:

$$(r_{AH_2})_R = \frac{k_{cat1}[E]_R[AH_2]_R[H_2O_2]}{K_{M1}[AH_2]_R + K_{M2}[H_2O_2] + [AH_2]_R[H_2O_2]} \quad (10.1)$$

A su vez, los siguientes términos son aplicables para el balance de materia de 4-clorofenol en el tanque continuo, en la unidad de tiempo:

$$\text{Entrada} = F[AH_2]_0 + Q[AH_2]_R \quad (10.2)$$

$$\text{Salida} = (F + Q)[\text{AH}_2]_{\text{R}} \quad (10.3)$$

$$\text{Acumulación} = V_{\text{R}} \frac{d[\text{AH}_2]_{\text{R}}}{dt} \quad (10.4)$$

$$\text{Generación} = V_{\text{R}}(r_{\text{AH}_2})_{\text{R}} \quad (10.5)$$

Teniendo en cuenta cada uno de los términos, así como la relación general de balance:

$$\text{Salida} - \text{Entrada} + \text{Acumulación} - \text{Generación} = 0$$

se obtiene:

$$F[\text{AH}_2]_{\text{R}} - F[\text{AH}_2]_0 + V_{\text{R}} \frac{d[\text{AH}_2]_{\text{R}}}{dt} + V_{\text{R}}(r_{\text{AH}_2})_{\text{R}} = 0 \quad (10.6)$$

y la ecuación diferencial de balance de 4-clorofenol es:

$$\frac{d[\text{AH}_2]_{\text{R}}}{dt} = \frac{F}{V_{\text{R}}} ([\text{AH}_2]_0 - [\text{AH}_2]_{\text{R}}) - (r_{\text{AH}_2})_{\text{R}} \quad (10.7)$$

con la condición inicial: $t = 0$; $[\text{AH}_2]_{\text{R}} = [\text{AH}_2]_0$

10.1.3.2. Balance de materia para el 4-clorofenol en la membrana

Los siguientes términos son aplicables para el balance de materia de 4-clorofenol en la membrana, en la unidad de tiempo:

$$\text{Entrada} = (F + Q)[\text{AH}_2]_{\text{R}} \quad (10.8)$$

$$\text{Salida} = Q[\text{AH}_2]_{\text{R}} + F[\text{AH}_2]_{\text{P}} \quad (10.9)$$

$$\text{Acumulación} = V_{\text{M}} \frac{d[\text{AH}_2]_{\text{M}}}{dt} \quad (10.10)$$

$$\text{Generación} = V_R (r_{\text{AH}_2})_M \quad (10.11)$$

donde:

$$(r_{\text{AH}_2})_M = \frac{k_{\text{cat}1} [E]_M [\text{AH}_2]_R [\text{H}_2\text{O}_2]}{K_{M1} [\text{AH}_2]_R + K_{M2} [\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{AH}_2]_R [\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (10.12)$$

y, de forma análoga al apartado anterior, se obtiene la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[\text{AH}_2]_M}{dt} = \frac{F}{V_M} ([\text{AH}_2]_R - [\text{AH}_2]_P) - (r_{\text{AH}_2})_M \quad (10.13)$$

con la condición inicial: $t = 0$; $[\text{AH}_2]_M = [\text{AH}_2]_0$

10.1.3.3. Concentración de 4-clorofenol en el permeado

Como ya se ha indicado, el fenómeno de ensuciamiento de la membrana debido a la precipitación de los productos de la reacción (dímeros y polímeros) sobre su superficie, obstruye parcialmente sus poros, lo que disminuye la permeabilidad del 4-clorofenol y determina que la concentración de este compuesto en la corriente de permeado sea menor que la que existe en la membrana.

En un instante dado, si f_m es la fracción de poros de la membrana a través de la cual pasa el 4-clorofenol y $(1-f_m)$ la fracción de poros por la que no pasa, se verifica que:

$$F f_m [\text{AH}_2]_M + F(1-f_m) 0 = F [\text{AH}_2]_P \quad (10.14)$$

con lo que la relación entre la concentración de 4-clorofenol en el permeado y en la membrana es:

$$[\text{AH}_2]_P = f_m [\text{AH}_2]_M \quad (10.15)$$

Llevando esta relación a la ecuación (10.13) se obtiene la siguiente ecuación diferencial para la variación de la concentración de 4-clorofenol en el permeado:

$$\frac{d[AH_2]_P}{dt} = f_m \frac{F}{V_M} ([AH_2]_R - [AH_2]_P) - f_m (r_{AH_2})_M \quad (10.16)$$

Para la determinación de la fracción de poros de la membrana permeables al 4-clorofenol se formula la siguiente hipótesis:

En un instante dado, la fracción de poros no obstruidos en la membrana es proporcional a alguna potencia de la fracción de enzima no depositada en la membrana en ese instante, es decir:

$$f_m = k_f \left(\frac{V_R [E]_R}{V_M [E]_M + V_R [E]_R} \right)^{n_E} \quad (10.17)$$

Donde los parámetros k_f y n_E deberán ser obtenidos por ajuste de los datos experimentales al modelo y, en particular, k_f debe ser un valor próximo a la unidad ya que f_m tiende, inicialmente, a dicho valor al no existir obstrucción de los poros de la membrana.

10.1.3.4. Balance global de materia para el peróxido de hidrógeno

Puesto que, de acuerdo con las hipótesis formuladas, la concentración de peróxido de hidrógeno en el permeado es la misma que en la membrana y en el reactor, se puede realizar un balance global de este compuesto para todo el conjunto biorreactor-membrana. Asimismo, en la velocidad de consumo de peróxido en un instante dado deberá incluirse la totalidad de la enzima presente en el conjunto biorreactor-membrana en dicho instante. Con estas premisas, los términos de dicho balance son los siguientes:

$$\text{Entrada} = F[H_2O_2]_0 \quad (10.18)$$

$$\text{Salida} = F[H_2O_2] \quad (10.19)$$

$$\text{Acumulación} = (V_R + V_M) \frac{d[H_2O_2]}{dt} \quad (10.20)$$

$$\text{Generación} = (V_R + V_M)(r_{H_2O_2})_{R+M} \quad (10.21)$$

donde, de acuerdo con la hipótesis de proporcionalidad entre la velocidad de consumo de peróxido y la de fenol, se verifica que:

$$(r_{H_2O_2})_{R+M} = k_{H_2O_2} (r_{AH_2})_{R+M} \quad (10.22)$$

siendo:

$$(r_{AH_2})_M = \frac{k_{cat1} [E]_{R+M} [AH_2]_R [H_2O_2]}{K_{M1} [AH_2]_R + K_{M2} [H_2O_2] + [AH_2]_R [H_2O_2]} \quad (10.23)$$

y:

$$[E]_{R+M} = \frac{V_R [E]_R + V_M [E]_M}{V_R + V_M} \quad (10.24)$$

Procediendo de forma análoga a los apartados anteriores, se llega a la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[H_2O_2]}{dt} = \frac{F}{V_R + V_M} ([H_2O_2]_0 - [H_2O_2]) - (r_{H_2O_2})_{R+M} \quad (10.25)$$

con la condición inicial: $t = 0$; $[H_2O_2] = [H_2O_2]_0$

10.1.3.5. Balance global de enzima en la membrana

Se adoptan las siguientes hipótesis adicionales:

- Los productos de la reacción (dímeros, oligómeros y polímeros de mayor grado), al depositarse sobre la superficie de la membrana, retienen una fracción de la enzima, la cual conserva su actividad.

- ✚ La velocidad de deposición de la enzima sobre la membrana, por unidad de superficie de membrana, es proporcional a la concentración de la enzima en la fase líquida y al caudal que atraviesa la membrana (caudal de permeado = F). Si k es la constante de proporcionalidad y A el área de la membrana (la cual es constante), dado que $k A = \text{constante} = k_{ad}$, la cantidad total de enzima depositada sobre la membrana por unidad de tiempo, equivalente a la entrada neta de enzima a la membrana, viene dada por:

$$\text{Entrada de enzima} = k_{ad} F [E]_R \quad (10.26)$$

Y los restantes miembros del balance vienen dados por:

$$\text{Salida de enzima} = 0 \quad (10.27)$$

$$\text{Acumulación de enzima} = V_M \frac{d[E]_M}{dt} \quad (10.28)$$

$$\text{Generación de enzima} = 0 \quad (10.29)$$

con lo que la ecuación diferencial de balance de enzima en la membrana es:

$$\frac{d[E]_M}{dt} - \frac{F}{V_M} k_{ad} [E]_R = 0 \quad (10.30)$$

con la condición inicial: $t = 0$; $[E]_M = 0$

10.1.3.6. Balance global de enzima en el sistema

Adicionalmente a las hipótesis que se han ido enumerando en las secciones anteriores, se considera que:

La suma del volumen del conducto que conecta el reactor con la membrana y del volumen del conducto de retorno del rechazo al reactor, es despreciable frente al volumen del reactor.

Con lo que, para todo el sistema, se tiene:

$$\text{Entrada de enzima} = F[E]_F \quad (10.31)$$

$$\text{Salida de enzima} = 0 \quad (10.32)$$

$$\text{Acumulación de enzima} = V_R \frac{d[E]_R}{dt} + V_M \frac{d[E]_M}{dt} \quad (10.33)$$

$$\text{Generación de enzima} = 0 \quad (10.34)$$

y la ecuación diferencial de balance global de enzima en todo el sistema es:

$$\frac{d[E]_R}{dt} + \frac{V_M}{V_R} \frac{d[E]_M}{dt} - \frac{F}{V_R} [E]_F = 0 \quad (10.35)$$

Combinando las ecuaciones (10.30) y (10.35) se llega, finalmente, a:

$$\frac{d[E]_R}{dt} + \frac{F}{V_R} (k_{ad}[E]_R - [E]_F) = 0 \quad (10.36)$$

con la condición inicial: $t = 0$; $[E]_R = [E]_0$

La solución de la ecuación (10.36) conduce a:

$$[E]_R = \frac{1}{k_{ad}} \left[[E]_F + (k_{ad}[E]_0 - [E]_F) e^{-\frac{k_{ad}F}{V_R}t} \right] \quad (10.37)$$

Una vez obtenido el valor de $[E]_R$, no es preciso resolver la ecuación diferencial (10.30) para calcular $[E]_M$, sino que este valor se puede obtener teniendo en cuenta que, para un tiempo de operación t , la cantidad total de enzima contenida en el sistema es igual a la inicial más la incorporada en la corriente de alimentación, es decir:

$$V_M[E]_M + V_R[E]_R = V_R[E]_0 + Ft[E]_F \quad (10.38)$$

de donde se llega a:

$$[E]_M = \frac{V_R}{V_M} [E]_0 + \frac{Ft}{V_M} [E]_F - \frac{V_R}{V_M} [E]_R \quad (10.39)$$

10.2. Resolución y ajuste del modelo

10.2.1. Método de resolución y algoritmo de cálculo

Con la única excepción de la ecuación (10.36), que tiene solución analítica, las ecuaciones diferenciales obtenidas anteriormente en cada uno de los balances precisan de la utilización de métodos numéricos para su resolución. Se ha utilizado el método de diferencias finitas y de la aplicación de dicho método, se obtienen las siguientes ecuaciones discretas para las diferentes concentraciones:

$$([AH_2]_R)_{t+\Delta t} = ([AH_2]_R)_t + \left(\frac{F}{V_R} ([AH_2]_0 - [AH_2]_R) - (r_{AH_2})_R \right) \Delta t \quad (10.40)$$

$$([H_2O_2])_{t+\Delta t} = ([H_2O_2])_t + \left(\frac{F}{V_R + V_M} ([H_2O_2]_0 - [H_2O_2]) - (r_{H_2O_2})_{R+M} \right) \Delta t \quad (10.41)$$

$$([AH_2]_P)_{t+\Delta t} = ([AH_2]_P)_t + \left(f_m \frac{F}{V_M} ([AH_2]_R - [AH_2]_P) - f_m (r_{AH_2})_M \right) \Delta t \quad (10.42)$$

con las condiciones iniciales:

$$t = 0; [AH_2]_R = [AH_2]_0; [AH_2]_P = [AH_2]_0; [H_2O_2] = [H_2O_2]_0$$

Las ecuaciones (10.40), (10.41) y (10.42) constituyen un conjunto de leyes de recurrencia que permiten el cálculo de las distintas concentraciones en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo. En el proceso de ajuste de los datos experimentales al modelo se han determinado todos los parámetros del mismo: k_{cat} , K_{M1} , K_{M2} , $K_{H_2O_2}$, k_{ad} , k_f y n_E , estos valores a determinar son en realidad, un valor promedio de los mismos entre el correspondiente al reactor,

donde la enzima está en su forma soluble, y a la membrana, donde la enzima está atrapada por el polímero. Para ello se ha elaborado un programa en lenguaje Visual Basic, que lleva incorporada una rutina de minimización del error mediante un algoritmo Simplex en la versión modificada por Nelder y Mead [276]. Los valores obtenidos para los diferentes parámetros se muestran en la Tabla 10.1, y la desviación típica del ajuste ha sido igual a un 2.92%, valor que puede considerarse bastante bueno dada la complejidad del sistema en estudio.

Tabla 10.1. Parámetros del modelo del reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana.

Parámetro	Valor	Unidades
k_{cat}	276.22	mmoles/g min
K_{M1}	0.05	mM
K_{M2}	3.50	mM
$k_{\text{H}_2\text{O}_2}$	1.33	adimensional
k_{ad}	0.44	adimensional
k_f	1.01	adimensional
n_E	0.92	adimensional
V_M	4.22	ml

En las Figuras 10.2 a 10.5 se representan los valores experimentales (marcadores) de conversión y los calculados (líneas continuas) por el modelo a lo largo del tiempo para las series experimentales donde se ha estudiado la concentración inicial de enzima en el reactor, la concentración de enzima en la corriente de alimentación, la concentración inicial de peróxido de hidrógeno y por último la variación conjunta de la concentración inicial de enzima en el reactor y el tiempo espacial respectivamente. Asimismo en la Figura 10.6 se presenta una comparación de los valores calculados de conversión frente a los experimentales para todas las series.

❖ Variación de la concentración inicial de enzima en el reactor

Las condiciones de operación experimentales han sido las siguientes

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ y } 0.08 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

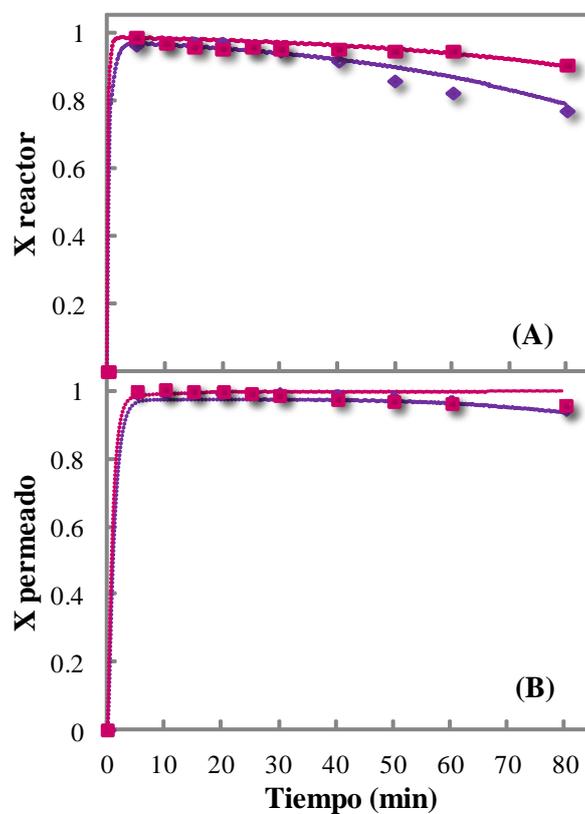


Figura 10.2. Valores teóricos y experimentales de la conversión en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo en la serie de la variación de la concentración inicial de enzima. Ajuste del modelo para el sistema 4-clorofenol/SBP en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana. $[\text{SBP}]_0 = \blacklozenge$ (exp) - (cal) 0.04 mg/ml y \blacksquare (exp) - (cal) 0.08 mg/ml.

❖ Variación de la concentración de enzima en la corriente de alimentación

Las condiciones de operación experimentales han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.000, 0.001, 0.002 \text{ y } 0.004 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

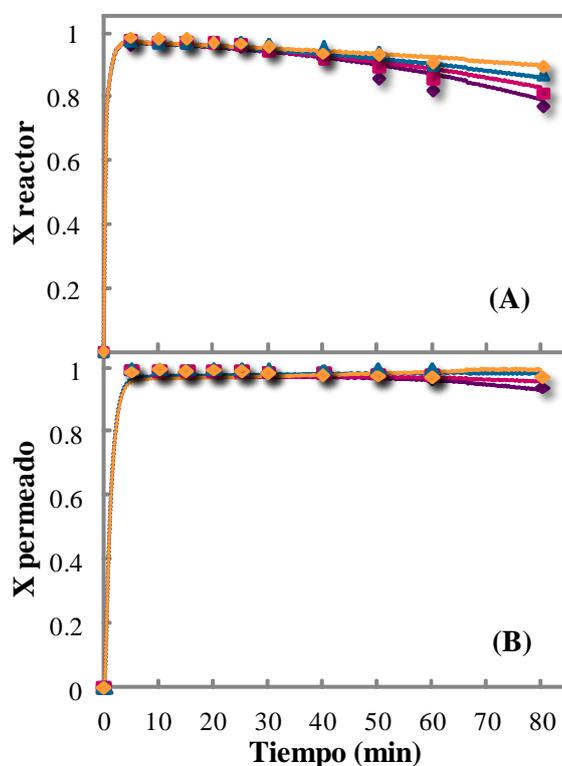


Figura 10.3. Valores teóricos y experimentales de la conversión en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo en la serie de la variación de la concentración de enzima en la corriente de alimentación. Ajuste del modelo para el sistema 4-clorofenol/SBP en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana. $[\text{SBP}]_F = \blacklozenge$ (exp) - (cal) 0.000 mg/ml, \blacksquare (exp) - (cal) 0.001 mg/ml, \blacktriangle (exp) - (cal) 0.002 mg/ml y \blacklozenge (exp) - (cal) 0.004 mg/ml.

❖ Variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno

Las condiciones de operación experimentales han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = 2.0 \text{ mM} \quad [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = 2.0 \text{ mM} \quad [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

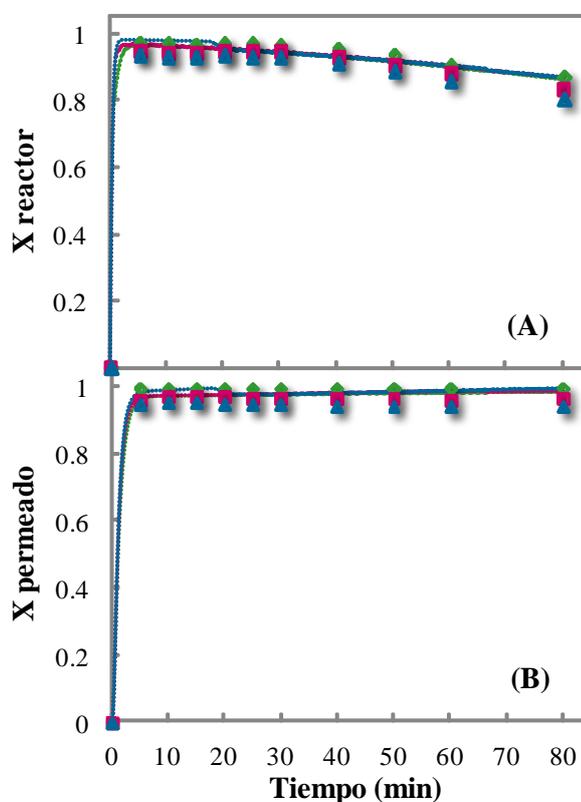


Figura 10.4. Valores teóricos y experimentales de la conversión en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo en la serie de la variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno. Ajuste del modelo para el sistema 4-clorofenol/SBP en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana. $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = \blacklozenge$ (exp) - (cal) 2.0 mM, \blacksquare (exp) - (cal) 2.5 mM y \blacktriangle (exp) - (cal) 3.0 mM.

- ❖ Variación conjunta de la concentración de enzima en el reactor y el tiempo espacial

Las condiciones de operación experimentales han sido las siguientes:

$$V_R = 50, 75 \text{ y } 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.08, 0.053 \text{ y } 0.04 \text{ mg/ml}$$

$$[\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

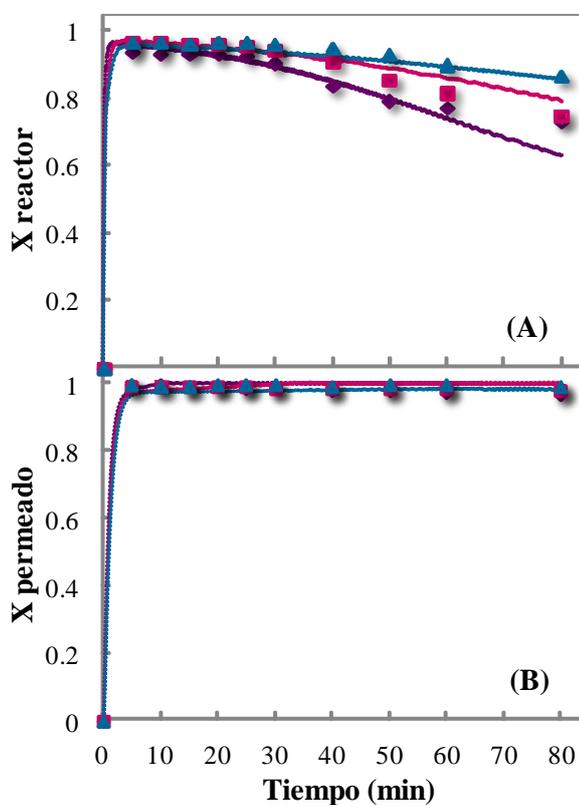


Figura 10.5. Valores teóricos y experimentales de la conversión en el reactor (A) y en el permeado (B) a lo largo del tiempo en la serie de la variación conjunta de la concentración de enzima en el reactor y el tiempo espacial. Ajuste del modelo para el sistema 4-clorofenol/SBP en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana. \blacklozenge (exp) – (cal) $\tau = 10$ min; $[\text{SBP}]_0 = 0.08$ mg/ml, \blacksquare (exp) – (cal) $\tau = 10$ min; $[\text{SBP}]_0 = 0.053$ mg/ml \blacktriangle (exp) – (cal) y $\tau = 20$ min; $[\text{SBP}]_0 = 0.040$ mg/ml.

- ❖ Comparación de los valores calculados de conversión frente a los experimentales para todas las series

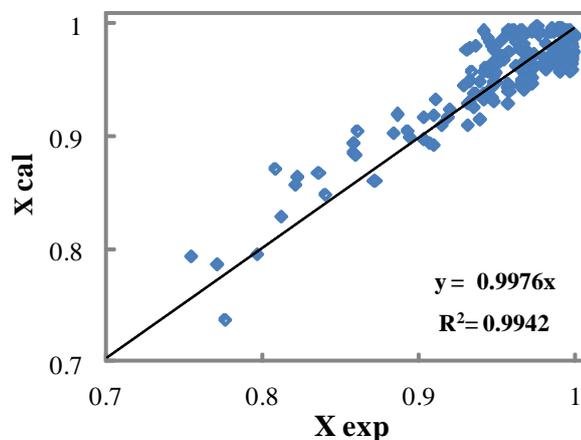


Figura 10.6. Representación de los valores de conversión calculados con el modelo frente a los experimentales, para el sistema 4-clorofenol/SBP en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana.

10.2.2. Discusión

De acuerdo a los parámetros obtenidos en el ajuste del modelo se puede decir que el valor de k_f , cercano a la unidad ($k_f = 1.01$), tal y como se comentó en una de las hipótesis del modelo y el bajo volumen equivalente de la cámara de permeado obtenido ($V_M = 4.22$ ml) como era de esperarse, junto con la desviación típica del orden del 2.92% reflejan el buen ajuste alcanzado del modelo, a pesar de la heterogeneidad y complejidad del sistema, lo que confirma la validez del modelo y de las hipótesis que lo soportan, incluidas el mecanismo cinético Ping-Pong y la proporcionalidad entre la fracción de poros no obstruidos de la membrana y la fracción de enzima no retenida en la misma.

Asimismo, el valor obtenido para la k_{cat} (276 U/mg) de la enzima, prácticamente igual al obtenido mediante las medidas de actividad enzimática (278 U/mg), confirma la validez de ambos procedimientos utilizados en la determinación de la actividad enzimática y, por otra parte, evidencia una muy buena aproximación del modelo matemático al comportamiento de la peroxidasa de soja utilizada en esta investigación.

Por otro lado, para los demás parámetros cinéticos intrínsecos de la enzima, se ha obtenido un valor de 0.05 mM para K_{M1} indicando que la enzima presenta una gran afinidad por el peróxido de hidrógeno, comportamiento que es de esperarse ya que es el agente oxidante iniciador de la reacción, mientras que para K_{M2} se ha obtenido un valor de 3.50 mM lo que indica una menor afinidad de la enzima por el 4-clorofenol.

Todo lo antes mencionado hace que se pueda considerar el presente modelo como adecuado para describir el comportamiento del conjunto biorreactor-módulo de membrana, y como una buena base teórica para posteriores estudios a una mayor escala, previos a su utilización a escala industrial.

10.3 Nomenclatura

Las expresiones que han sido utilizadas y su respectivo equivalente en el desarrollo del modelo matemático, en reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie y la peroxidasa de soja soluble se exponen a continuación:

$[AH_2]_0$	concentración de 4-clorofenol en la alimentación, mM
$[AH_2]_R$	concentración de 4-clorofenol en el reactor, mM
$[AH_2]_M$	concentración de 4-clorofenol en el módulo de membrana, mM
$[AH_2]_P$	concentración de 4-clorofenol en el permeado, mM
$[E]_F$	concentración de enzima en la alimentación, g/l
$[E]_R$	concentración de enzima en el reactor tanque, g/l
$[E]_M$	concentración de enzima en el módulo de membrana, g/l
$[E]_{R+M}$	concentración de enzima en todo el sistema, g/l
F	caudal de alimentación y de permeado, ml/min
f_m	fracción de poros no obstruidos en la membrana, adimensional
$[H_2O_2]_0$	concentración de peróxido de hidrógeno en la alimentación, mM
$[H_2O_2]$	concentración de peróxido de hidrógeno en el reactor, en el módulo de membrana y en el permeado, mM
K_{M1}	constante de Michaelis-Menten para el peróxido de hidrógeno, mM

K_{M2}	constante de Michaelis-Menten para el 4-clorofenol, mM
k_{ad}	parámetro definido en la ecuación (10.26), adimensional
k_f	parámetro definido en la ecuación (10.17), adimensional
n_E	potencia definida en la ecuación (10.17), adimensional
Q	caudal de reciclo, ml/min
$(r_{AH2})_R$	velocidad de consumo de 4-clorofenol en el reactor tanque, mM/min
$(r_{AH2})_M$	velocidad de consumo de 4-clorofenol en la membrana, mM/min
$(r_{AH2})_{R+M}$	velocidad de consumo de 4-clorofenol en todo el sistema, mM/min
$(r_{H2O2})_{R+M}$	velocidad de consumo de peróxido de hidrógeno en todo el sistema, mM/min
V_R	volumen del reactor tanque, ml
V_M	volumen de reacción en el módulo de membrana, ml



11. ELIMINACIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS CLORADOS

11. ELIMINACIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS FENÓLICOS CLORADOS

Son numerosas las industrias que generan compuestos fenólicos, entre ellas se encuentran la fabricación de conservas vegetales, plásticos, resinas, pinturas, industrias papeleras, textiles, etc, de ahí que la presencia de dichos compuestos es sus distintas estructuras es muy alta siendo todas ellas perjudiciales, tanto para el medio ambiente, como para la salud humana, al tratarse de sustancias tóxicas y corrosivas difíciles de degradar. Debido a eso en este capítulo se presenta la influencia de la ubicación del cloro en posiciones *orto*, *meta* y *para* del anillo fenólico en la eliminación de dichos compuestos en presencia de enzima. Así se ha llevado a cabo un estudio del comportamiento de la enzima (SBP) frente a la eliminación en continuo de fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol utilizando el reactor tanque continuo asociado al módulo de membrana en serie y la enzima soluble.

11.1. Determinación de la actividad enzimática

Las medidas de actividad suministran un valor aproximado de la capacidad relativa de eliminación de los distintos sustratos por efecto de las enzimas. Debido a esto se han realizado medidas de actividad enzimática de SBP en cubeta, de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.2. Determinación de la actividad enzimática*)

sobre el fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol bajo las mismas condiciones. Como ha sido mencionado en el Capítulo 4 (*sección 4.1. Determinación de la actividad enzimática*), la unidad de actividad enzimática ha sido definida como los μ moles de sustrato convertidos por minuto y por miligramo de enzima. Esta determinación tiene como objetivo establecer la preferencia de eliminación de SBP sobre cada uno de los compuestos en estudio

Las condiciones en la cubeta de vidrio para cada medida fueron:

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[\text{Compuesto fenólico}] = 10 \text{ mM}$$

$$[\text{AAP}] = 2.4 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.2 \text{ mM}$$

$$[\text{Tampón}] = 0.1 \text{ M pH } 7.0$$

$$[\text{SBP}] = 0.041, 0.083 \text{ y } 0.125 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Los resultados de las medidas de actividad (U/mg) obtenidos para cada compuesto se recogen en la Tabla 16.38 del Anexo 8.

Tabla 11.1. Actividad enzimática (U/mg) de la SBP frente a distintos compuestos fenólicos

Compuestos fenólico				
	2-Clorofenol	4-Clorofenol	3-Clorofenol	Fenol
Actividad enzimática (U/mg)	378	227	71	63

En la Tabla 11.1 se aprecia que la SBP presenta una mayor actividad enzimática sobre el 2-clorofenol, luego para 4-clorofenol, seguido del 3-clorofenol y por último para el fenol. El comportamiento observado de un mayor valor en las medidas de actividad para 2 y 4 clorofenol pueden deberse a que las estructuras de resonancia más estables para el anillo fenólico se corresponde con las posiciones *orto* y *para*, como se puede apreciar en la Figura 11.1, lo que hace que SBP actué con mayor eficacia sobre estos

compuestos. Adicionalmente los sustituyentes que son aceptores de electrones, como en nuestro caso el cloro, ofrecen un mayor carácter reactivo al anillo fenólico, lo que a su vez puede explicar por qué la enzima tiene una mayor actividad frente al 3-clorofenol que frente al fenol.

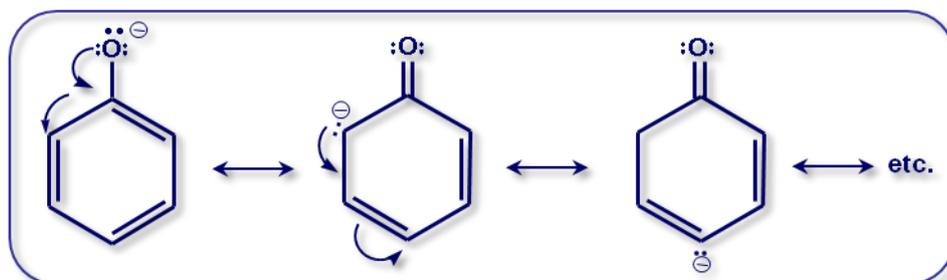


Figura 11.1. Estructuras de resonancia para el ión fenóxido

11.2. Serie experimental

Las medidas de actividad, tal y como están realizadas en el apartado anterior, no proporcionan información más que de los primeros instantes del proceso, obviando los posibles efectos de la presencia de producto en el medio de reacción o de desactivación enzimática, entre otros. En el Capítulo 5. *Resultados en el Reactor Tanque Continuo Asociado a un Módulo de Membrana en Serie* han sido expuestos los resultados obtenidos para 4-clorofenol. Por lo tanto a efectos de mantener las mismas condiciones y disminuir en mayor medida factores externos que puedan influir en los datos del presente capítulo, se han realizado, los experimentos con fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol en el tanque continuo con módulo de membrana en serie y la enzima soluble, utilizando los protocolos descritos en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9.2. Puesta en marcha y modo de operación*).

Se ha llevado a cabo una serie experimental para cada compuesto variando la concentración inicial de enzima en el reactor y manteniendo constantes el resto de condiciones.

11.2.1. Variación de la concentración de SBP en el reactor

Para el estudio de la influencia de la ubicación del cloro en posiciones *orto*, *meta* y *para* del anillo fenólico en la eliminación de dichos compuestos en presencia de peroxidasas. Ha sido escogida la variación de la concentración inicial de enzima en el reactor por ser un variable importante en las reacciones enzimáticas. Para ello se han llevado a cabo tres ensayos con concentraciones de enzima en el reactor de 0.04, 0.08 y 0.12 mg/ml para los cuatro compuestos en estudio.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[\text{Sustrato}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{Sustrato}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04, 0.08 \text{ y } 0.12 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.39 del Anexo 8. En la Figura 11.2 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado. La conversión en el reactor y en el permeado se ha definido mediante la relación:

$$X_R = \frac{[\text{sustrato}]_F - [\text{sustrato}]_R}{[\text{sustrato}]_F} * 100$$

$$X_P = \frac{[\text{sustrato}]_F - [\text{sustrato}]_P}{[\text{sustrato}]_F} * 100$$

donde $[\text{sustrato}]_F$ es la concentración del sustrato en cuestión en la alimentación al reactor y $[\text{sustrato}]_R$ y $[\text{sustrato}]_P$ es la concentración del sustrato en cuestión en el interior del reactor y en la salida del permeado respectivamente.

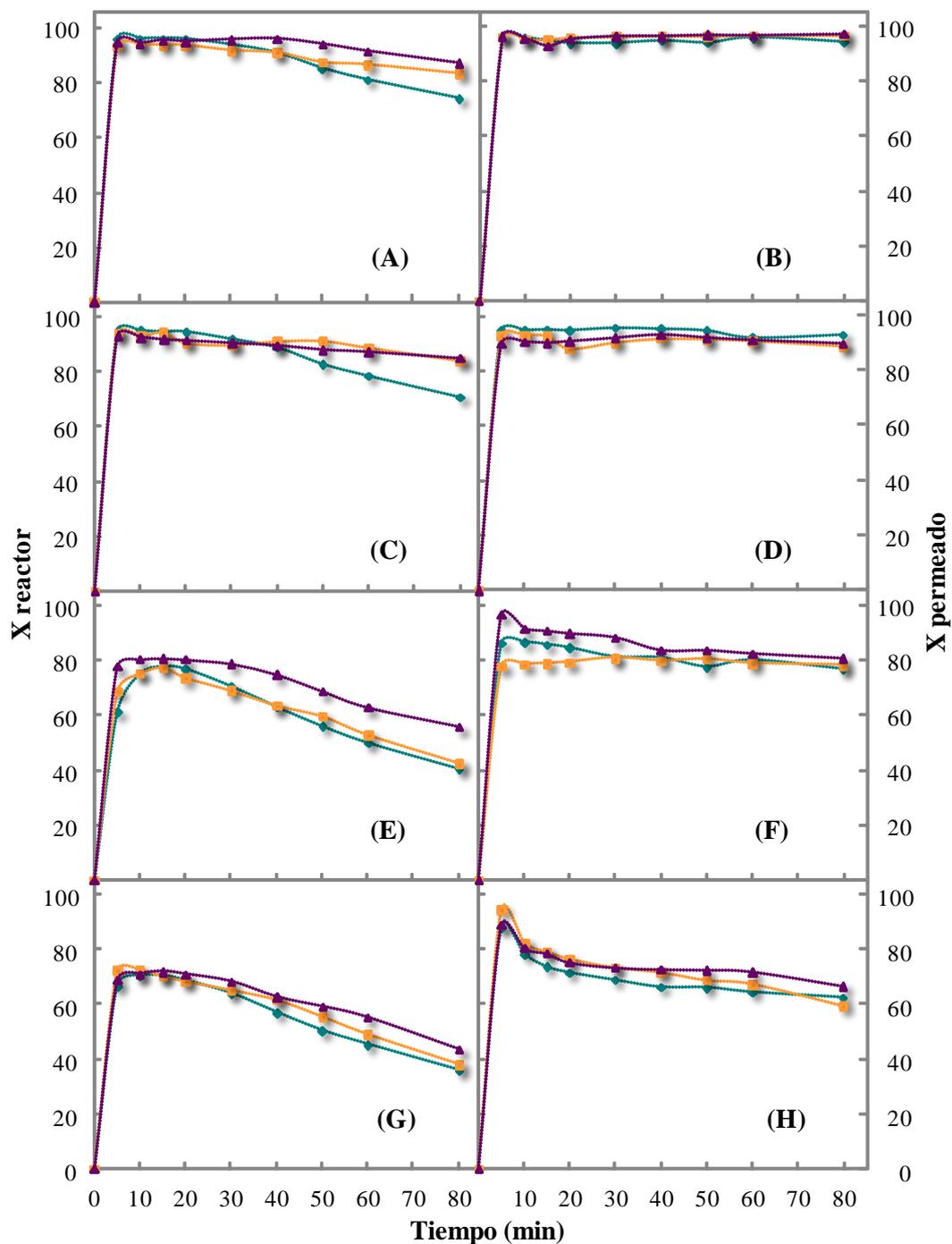


Figura 11.2. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de enzima en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado para 2-clorofenol; (C) reactor y (D) permeado para 4-clorofenol, (E) reactor y (F) permeado para 3-clorofenol y (G) reactor y (H) permeado para fenol. $[SBP]_0 = \blacklozenge 0.04 \text{ mg/ml}$, $\blacksquare 0.08 \text{ mg/ml}$ y $\blacktriangle 0.12 \text{ mg/ml}$.

En la Figura 11.2 se aprecia un incremento de la conversión al aumentar la concentración de enzima de 0.04 a 0.12 mg/ml para el reactor (series A, C, E y G), siendo más notoria esa influencia para 3-clorofenol con un incremento de un 16% de conversión, luego para 4-clorofenol con una mejora en la conversión del 14%, seguido del 2-clorofenol con aumento del 12% de conversión y por último para el fenol con un leve incremento del 8% de conversión, al final del tiempo de reacción.

También se puede observar que en el reactor, para los cuatro compuestos y para las tres concentraciones de enzima ensayadas, se aprecia una disminución de la conversión en el transcurso del tiempo, siendo más relevante dicha caída para la menor de las concentraciones de enzima en el reactor (0.04 mg/ml). Este comportamiento como ha sido mencionado en el Capítulo 5 (5.1.1. *Variación de la concentración de SBP en el reactor*) se debe a que parte de la enzima es retenida por el polímero que se forma en la reacción y se deposita en la superficie de la membrana. Esta retención de enzima genera una pérdida de peroxidasa en el reactor, que explicaría la caída de la conversión en el mismo.

Es importante mencionar que para 2-clorofenol y 4-clorofenol se han obtenido conversiones en el permeado por encima del 90%, durante todo el tiempo que dura el experimento y en las tres concentraciones de enzima ensayadas. Teniendo en cuenta de que la corriente de nuestro interés es la salida del permeado, no se hace necesario el uso de concentraciones elevadas de enzima para obtener las conversiones deseadas a lo largo del tiempo para estos compuestos

En el permeado del reactor de 3-clorofenol (serie F) se han obtenido conversiones estacionarias con un valor alrededor del 80% para las tres concentraciones ensayadas y en el caso del fenol (series H) se han obtenido conversiones estacionarias con un valor alrededor del 70% para los tres ensayos realizados, aunque menos estables que las anteriores.

11.2.2. Comparación y discusión

Teniendo en cuenta que el objetivo del presente capítulo es determinar el comportamiento que la enzima (SBP) presenta frente fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol en la Figura 11.3 se presenta una comparación de los cuatro sustratos en cada una de las concentraciones ensayadas.

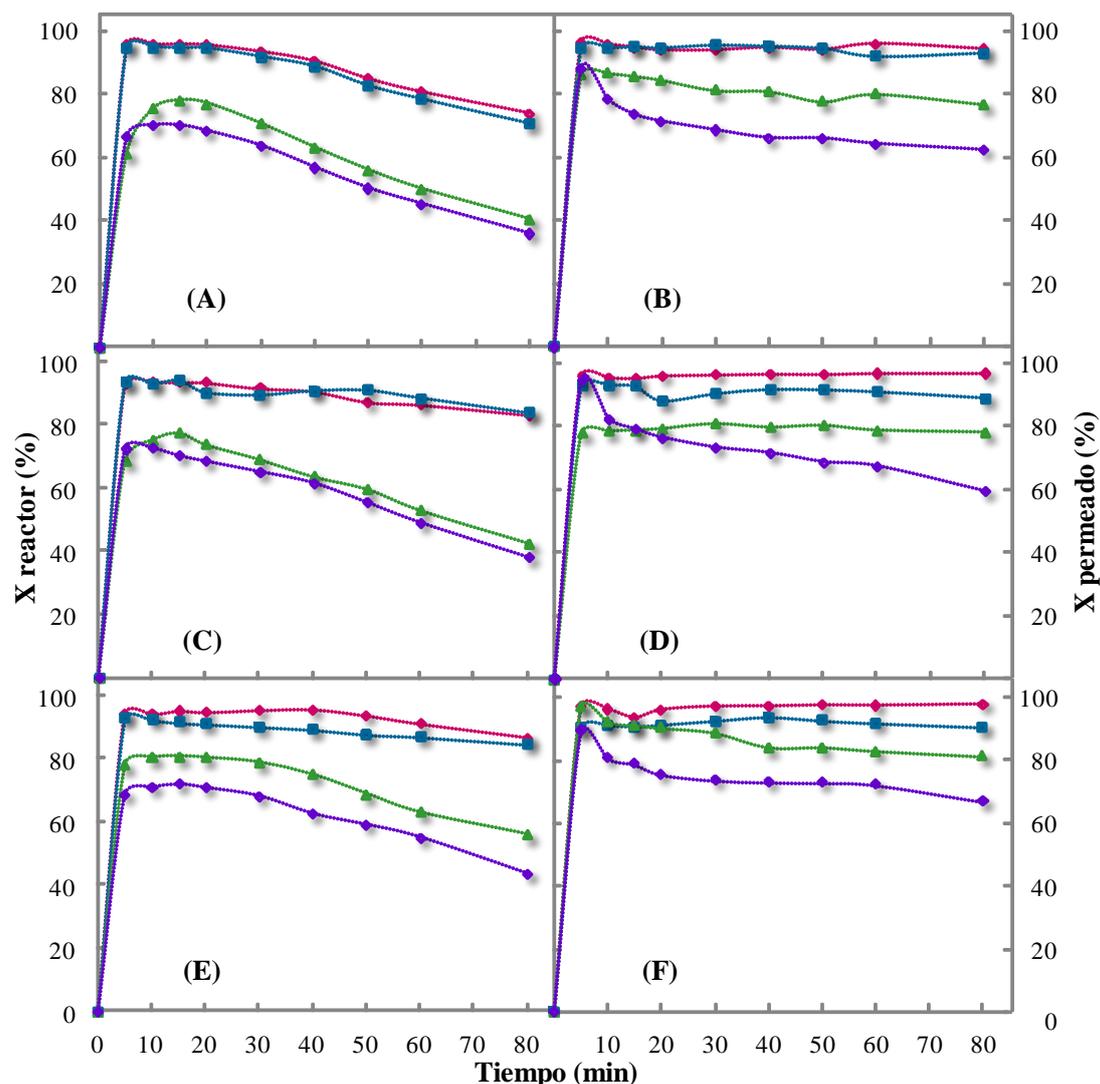


Figura 11.3. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie, para distintos compuestos fenólicos bajo las mismas condiciones de operación. (A) reactor y (B) permeado para una $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml; (C) reactor y (D) permeado para una $[SBP]_0 = 0.08$ mg/ml y (E) reactor y (F) permeado para una $[SBP]_0 = 0.12$ mg/ml. \blacklozenge 2-clorofenol, \blacksquare 4-clorofenol, \blacktriangle 3-clorofenol y \blacklozenge fenol.

En la Figura 11.3 se puede observar que la peroxidasa de soja presenta un mejor comportamiento de eliminación en continuo del 2 y 4-clorofenol, seguido de 3-clorofenol y por último para el fenol para las tres concentraciones de enzima ensayadas. Sin embargo para la mayor concentración de enzima en el reactor (0.12 mg/ml) se aprecia con más claridad que la SBP tiene un mejor comportamiento de eliminación sobre 2-clorofenol, luego para 4-clorofenol, seguido 3-clorofenol y por último para fenol tanto en el reactor como en el permeado (2-clorofenol > 4-clorofenol > 3-clorofenol > fenol).

El comportamiento que presentan los cuatro sustratos en estudio, se corresponde con el predicho a partir de las medidas de actividad enzimática, lo que ratifica que la reacción de eliminación de compuestos fenólicos monoclorados se encuentra influenciada por la estabilidad de la estructura resonante que ofrecen las posiciones *orto* y *para* en el anillo fenólico. Además también se ha corroborado el mayor carácter reactivo que proporciona la presencia del cloro en el anillo fenólico al observarse una mejor eliminación de 3-clorofenol que de fenol.



12. ELIMINACIÓN DE MEZCLAS DE FENOLES

12. ELIMINACIÓN DE MEZCLAS DE FENOLES

Para finalizar este estudio y con la intención de acercarnos cada vez más a la conducta que podría tener la enzima frente a una muestra real contaminada de compuestos fenólicos, en el presente capítulo se ha llevado a cabo un estudio del comportamiento de la enzima (SBP) frente a la eliminación de una mezcla de fenol y 4-clorofenol utilizando el reactor tanque continuo asociado al módulo de membrana en serie y la enzima soluble.

12.1. Series experimentales

Estos experimentos se han desarrollado siguiendo los protocolos descritos en el Capítulo de Materiales y Métodos (*sección 3.2.9.4.4. Ensayos para la eliminación de mezclas de fenol y 4-clorofenol*), y el análisis de la concentración residual de cada uno de los compuestos fenólicos en las muestras se ha llevado a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que el método colorimétrico utilizado hasta este momento no discrimina entre los distintos fenoles presentes en las mismas.

12.1.1. Variación de la concentración inicial de enzima en el reactor y la alimentación

En esta parte de la investigación la enzima debía enfrentarse a la eliminación de dos sustratos simultáneamente, para ello se han llevado a cabo

dos series experimentales variando la concentración inicial de enzima en el reactor y en la alimentación.

➤ Primera serie experimental

En la primera serie experimental se han realizado tres ensayos en los que se ha mantenido constante la concentración inicial de enzima en el reactor (0.08 mg/ml) y la concentración de enzima añadida en la alimentación a lo largo del ensayo (0.004 mg/ml), variándose la relación de las concentraciones de fenol y 4-clorofenol en una rango de 0.5 a 1.5 mM, de manera que la concentración de fenoles totales es 2.0 mM en todos los ensayos y la concentración de peróxido de hidrógeno se ha mantenido en 2.0 mM en todos los casos, conservando así una relación molar 1:1 con los fenoles totales.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = 0.5, 1.0 \text{ y } 1.5 \text{ mM}; [\text{fenol}]_0 = 1.5, 1.0 \text{ y } 0.5 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = 0.5, 1.0 \text{ y } 1.5 \text{ mM}; [\text{fenol}]_F = 1.5, 1.0 \text{ y } 0.5 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}; [\text{SBP}]_F = 0.004 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.40 del Anexo 9. En la Figura 12.1 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado. Las conversiones han sido definidas como,

$$X_R = \frac{[4\text{-clorofenol}]_F - [4\text{-clorofenol}]_R}{[4\text{-clorofenol}]_F} * 100$$

$$X_P = \frac{[4\text{-clorofenol}]_F - [4\text{-clorofenol}]_P}{[4\text{-clorofenol}]_F} * 100$$

$$X_R = \frac{[\text{fenol}]_F - [\text{fenol}]_R}{[\text{fenol}]_F} * 100$$

$$X_p = \frac{[\text{fenol}]_F - [\text{fenol}]_P}{[\text{fenol}]_F} * 100$$

donde $[\text{4-clorofenol}]_F$ y $[\text{fenol}]_F$ son las concentraciones de 4-clorofenol y fenol en la alimentación y $[\text{4-clorofenol}]_R$, $[\text{fenol}]_R$ y $[\text{4-clorofenol}]_P$, $[\text{fenol}]_P$ son las concentraciones de 4-clorofenol y fenol en el interior del reactor y en la salida del permeado respectivamente.

De acuerdo al trabajo llevado a cabo a lo largo de la tesis, y partiendo del hecho que la peroxidasa de soja (SBP) ha sido utilizada hasta ahora mayoritariamente para la eliminación de un solo sustrato (4-clorofenol), es importante mencionar que al someterla a la eliminación simultanea de dos sustratos (4-clorofenol y fenol) la conversión de cada sustrato se mantienen elevada. Así vemos que en el permeado (series B y D) las conversiones son del orden del 90% para 4-clorofenol y del 70% para fenol, indicando el buen comportamiento de la enzima incluso en mezclas de compuestos.

Por otro lado en la Figura 12.1 se puede apreciar una disminución de la conversión en la mayor parte de las curvas de 4-clorofenol (serie A y B), fenol (serie C y D) y fenoles totales (serie E y F) al aumentar la concentración de fenol, no obstante se mantienen constantes los fenoles totales para la relación de sustratos con menor contribución de fenol. Excepto de la serie para fenoles totales, las conversiones más elevadas, tanto para 4-clorofenol como para fenol, se obtienen con la relación equimolar ($[\text{4-clorofenol}] = [\text{fenol}] = 1.0 \text{ mM}$) de ambos fenoles en la alimentación. Sin embargo, en las curvas de conversión para fenoles totales, la mayor conversión se obtiene para la concentración inicial de sustratos $[\text{4-clorofenol}] = 1.5 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}] = 0.5 \text{ mM}$, debido sin duda a que el 4-clorofenol tiene una mayor participación en la relación de sustratos.

De todo lo antes mencionado se puede decir que un aumento de fenol en la relación de los sustratos afecta negativamente la eliminación de la mezcla de los fenoles en estudio, mientras que un aumento de la proporción de 4-clorofenol la favorece ligeramente o no la altera.

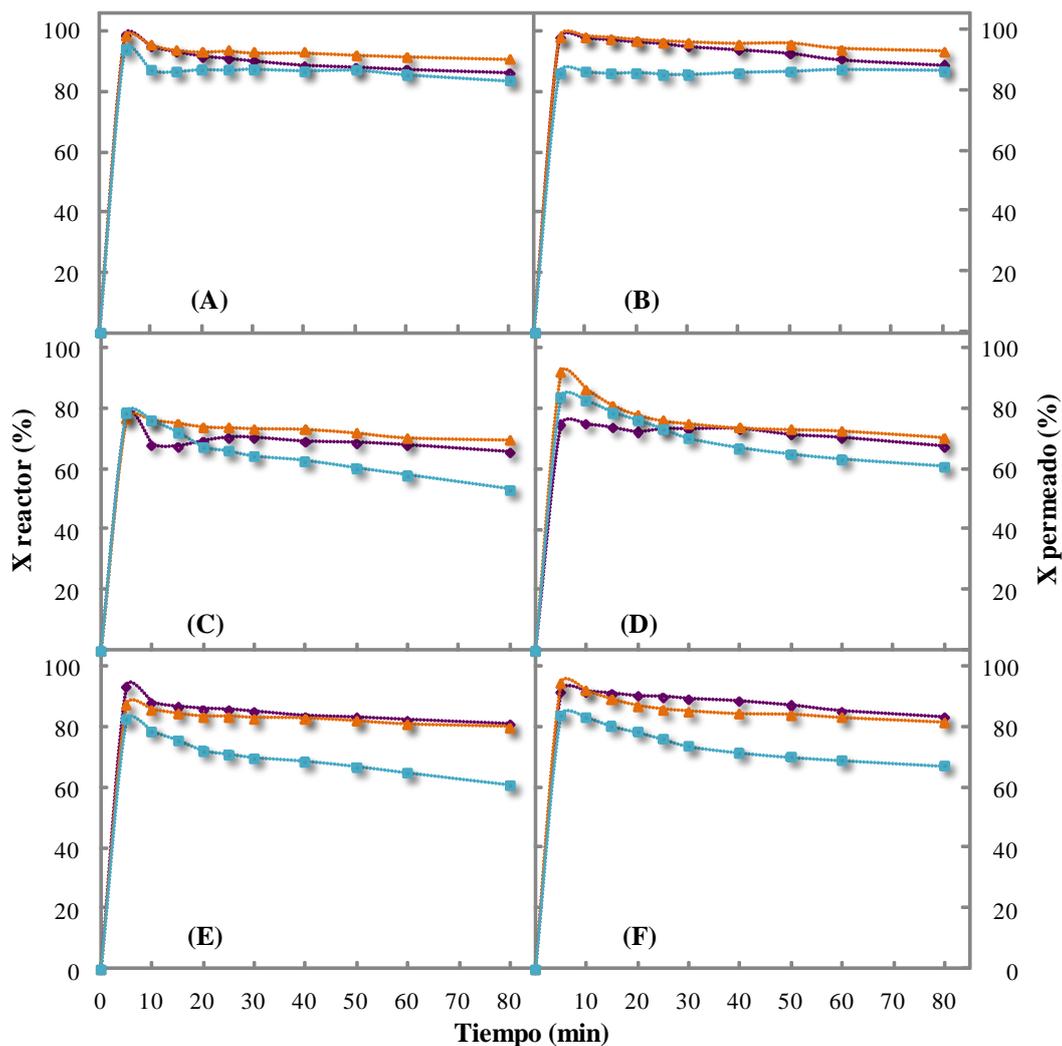


Figura 12.1. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado para 4-clorofenol; (C) reactor y (D) permeado para fenol, (E) reactor y (F) permeado para fenoles totales. Concentración inicial de fenoles: \blacklozenge $[4\text{-clorofenol}]_0 = 1.5 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}]_0 = 0.5 \text{ mM}$, \blacktriangle $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{fenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$; y \blacksquare $[4\text{-clorofenol}]_0 = 0.5 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}]_0 = 1.5 \text{ mM}$

➤ Segunda serie experimental

En la segunda serie experimental se han realizado tres ensayos con una menor concentración inicial de enzima tanto en el reactor de 0.04 mg/ml , como en la alimentación 0.002 mg/ml . Las demás condiciones se han mantenido iguales a las de la primera serie.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = 0.5, 1.0 \text{ y } 1.5 \text{ mM}; [\text{fenol}]_0 = 1.5, 1.0 \text{ y } 0.5 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = 0.5, 1.0 \text{ y } 1.5 \text{ mM}; [\text{fenol}]_F = 1.5, 1.0 \text{ y } 0.5 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}; [\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.41 del Anexo 9. En la Figura 12.2 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

Comparando la Figura 12.2 con la Figura 12.1 se puede observar que al disminuir la concentración de enzima las conversiones para 4-clorofenol, fenol y fenoles totales son, en la mayor parte de los casos, más bajas. Por ejemplo, en el permeado (series B y D) se obtienen conversiones por el orden del 80% para 4-clorofenol y del 55% para fenol, lo que indica que la disminución de enzima en el sistema incide más notoriamente en la eliminación de fenol.

Con respecto a la relación de fenoles, en la Figura 12.2 se aprecia la misma tendencia de la primera serie experimental, es decir, una disminución de la conversión de 4-clorofenol (serie A y B), fenol (serie C y D) y fenoles totales (serie E y F) al aumentar la concentración de fenol.

Excepto en la serie de fenoles totales las conversiones más elevadas, tanto de 4-clorofenol como de fenol, se obtienen con la relación equimolar de ambos fenoles y con la de menor concentración de fenol. Sin embargo, en las figuras correspondientes a fenoles totales, las mayores conversiones se obtienen para las alimentaciones con menor contenido en fenol, debido probablemente a que contienen una mayor participación en la relación de los sustratos de 4-clorofenol. Esto corrobora, lo mencionado en la primera serie experimental: que un aumento de la concentración de fenol en la relación de sustratos afecta negativamente la eliminación de la mezcla de los sustratos, mientras que un aumento de 4-clorofenol la favorece ligeramente o no la altera.

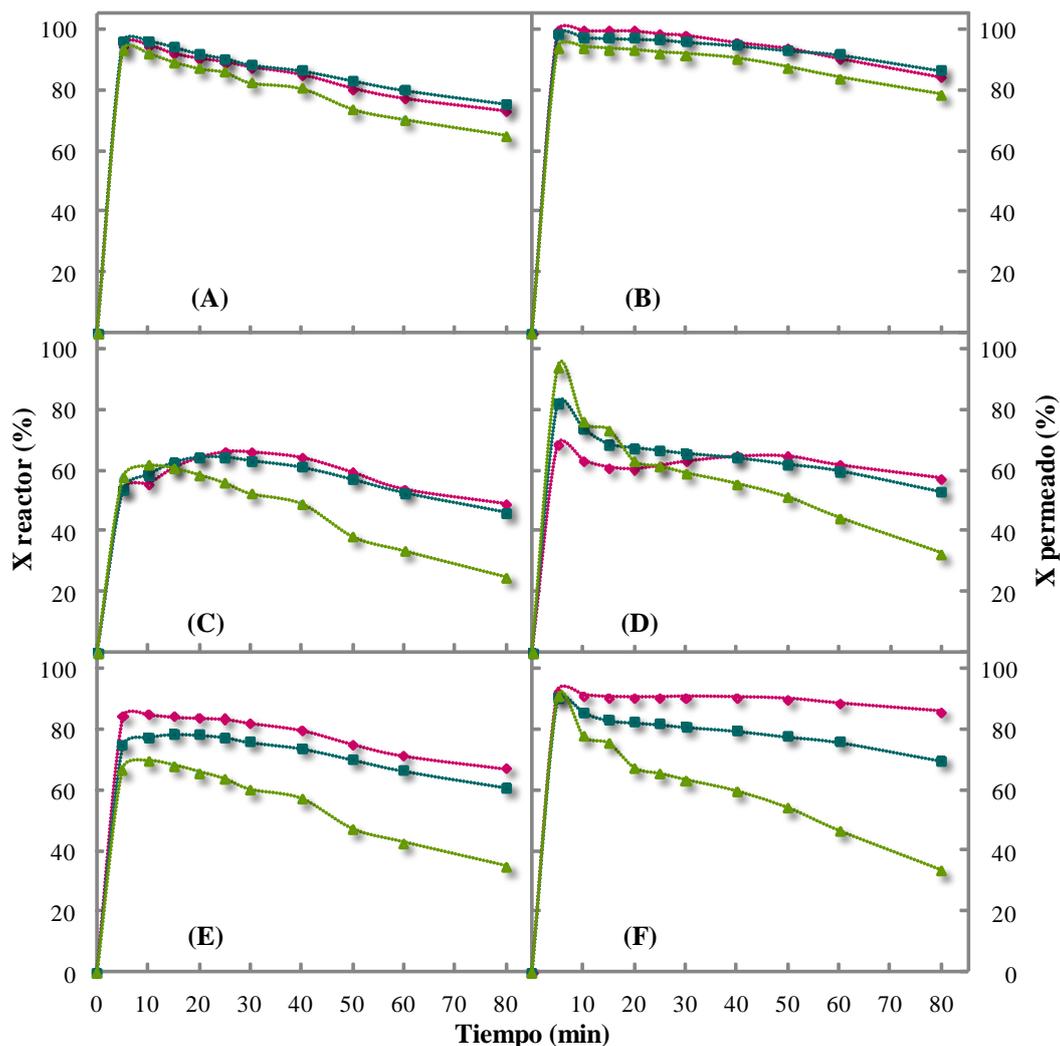


Figura 12.2. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado para 4-clorofenol; (C) reactor y (D) permeado para fenol, (E) reactor y (F) permeado para fenoles totales. Concentración inicial de fenoles: \blacklozenge $[4\text{-clorofenol}]_0 = 1.5 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}]_0 = 0.5 \text{ mM}$, \blacksquare $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{fenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$; y \blacktriangle $[4\text{-clorofenol}]_0 = 0.5 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}]_0 = 1.5 \text{ mM}$

- Comparación de la influencia de la concentración inicial de enzima en el reactor y en la alimentación

A continuación se presenta una comparación entre las series de fenoles totales para los ensayos a distintas concentraciones de enzima. Los datos numéricos se muestran en la Tabla 16.42 del Anexo 9.

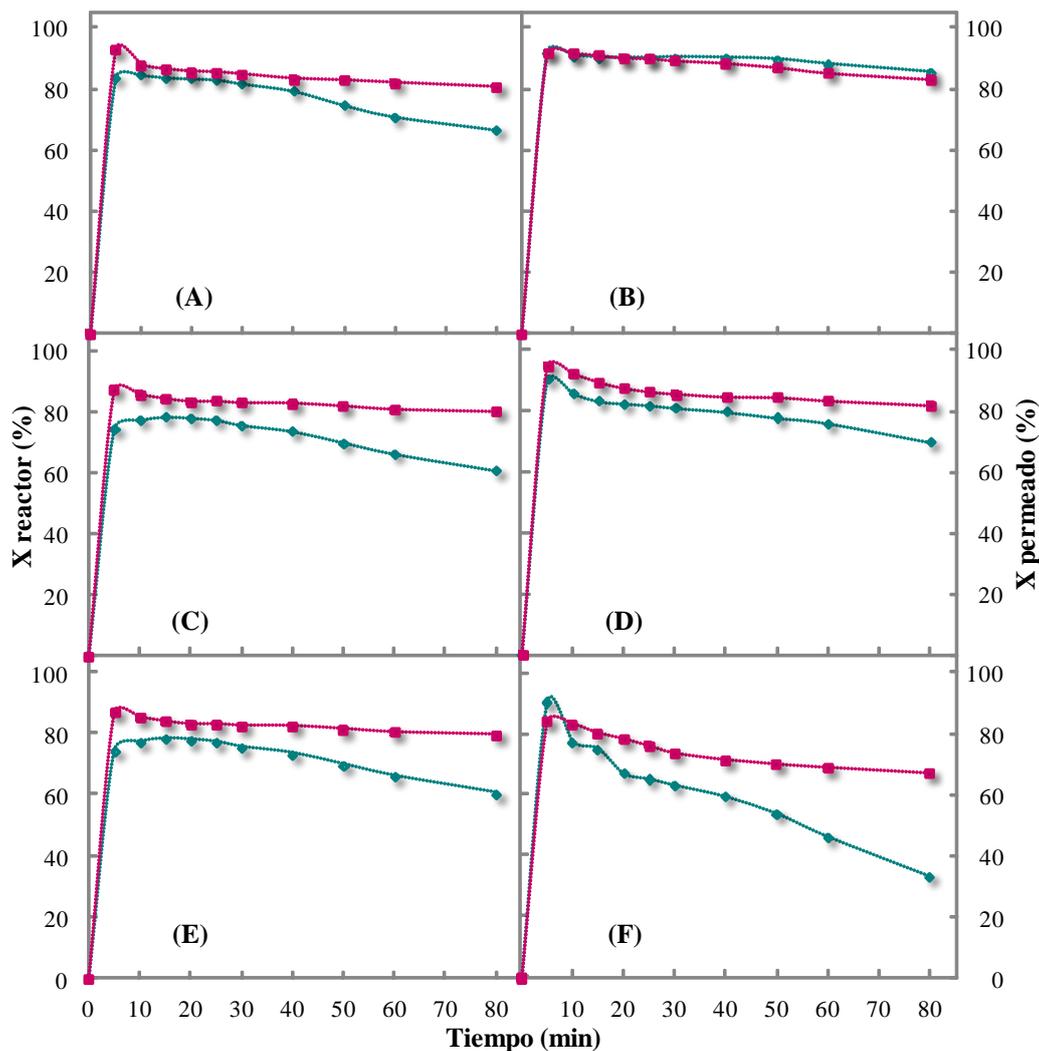


Figura 12.3. Comparación de la conversión en fenoles totales alcanzada a lo largo del tiempo para distintas concentraciones de enzima en el reactor y alimentación en tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado, para $[4\text{-clorofenol}]_0 = 1.5 \text{ mM}$ y: $[\text{fenol}]_0 = 0.5 \text{ mM}$; (C) reactor y (D) permeado para $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{fenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$, (E) reactor y (F) permeado para $[4\text{-clorofenol}]_0 = 0.5 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}]_0 = 1.5 \text{ mM}$. \blacklozenge $[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}$ y $[\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$ y, \blacksquare $[\text{SBP}]_0 = 0.08 \text{ mg/ml}$ y $[\text{SBP}]_F = 0.004 \text{ mg/ml}$

En la Figura 12.3 se observa que un aumento de la concentración de enzima incrementa la conversión en la mayor de las situaciones ensayadas siendo más notoria esta incidencia para relación equimolar de los sustratos (series C y D) y para la relación de sustratos con mayor proporción de fenol (series E y F). Por el contrario, para la relación de sustratos con mayor

contribución de 4-clorofenol (series A y B) dicho incremento se aprecia solo en el reactor (serie A). Esto indica que en una mezcla de fenol y 4-clorofenol donde el mayor aporte lo proporcione el fenol, se requerirá de una mayor concentración de enzima para el tratamiento de la mezcla resultante. En cambio, en una mezcla de fenol y 4-clorofenol, donde el mayor aporte lo proporcione el 4-clorofenol, se requerirá de una menor concentración de enzima, para tratar la mezcla resultante.

12.1.2. Influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol

Las series experimentales que se presentan a continuación se han realizado con una concentración inicial de enzima en el reactor de 0.04 mg/ml y 0.002 mg/ml en la alimentación con el fin de que, al haber una menor concentración de enzima en el sistema, se pueda observar con mayor claridad la posible influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol o viceversa.

Se ha llevado a cabo una primera serie experimental para estudiar la posible influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol. Se han realizado cinco ensayos en los que la concentración de fenol se mantuvo constante en 1.0 mM y se varió la concentración de 4-clorofenol entre 0.0 y 2.0 mM. La concentración de peróxido de hidrógeno se varió entre 1.0 y 3.0 mM para mantener una relación molar 1:1 con los compuestos fenolicos totales en cada ensayo.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[\text{fenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}; [\text{4-clorofenol}]_0 = 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{fenol}]_F = 1.0 \text{ mM}; [\text{4-clorofenol}]_F = 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}; [\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tablas 16.43 del Anexo 9. En la Figura 12.4 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

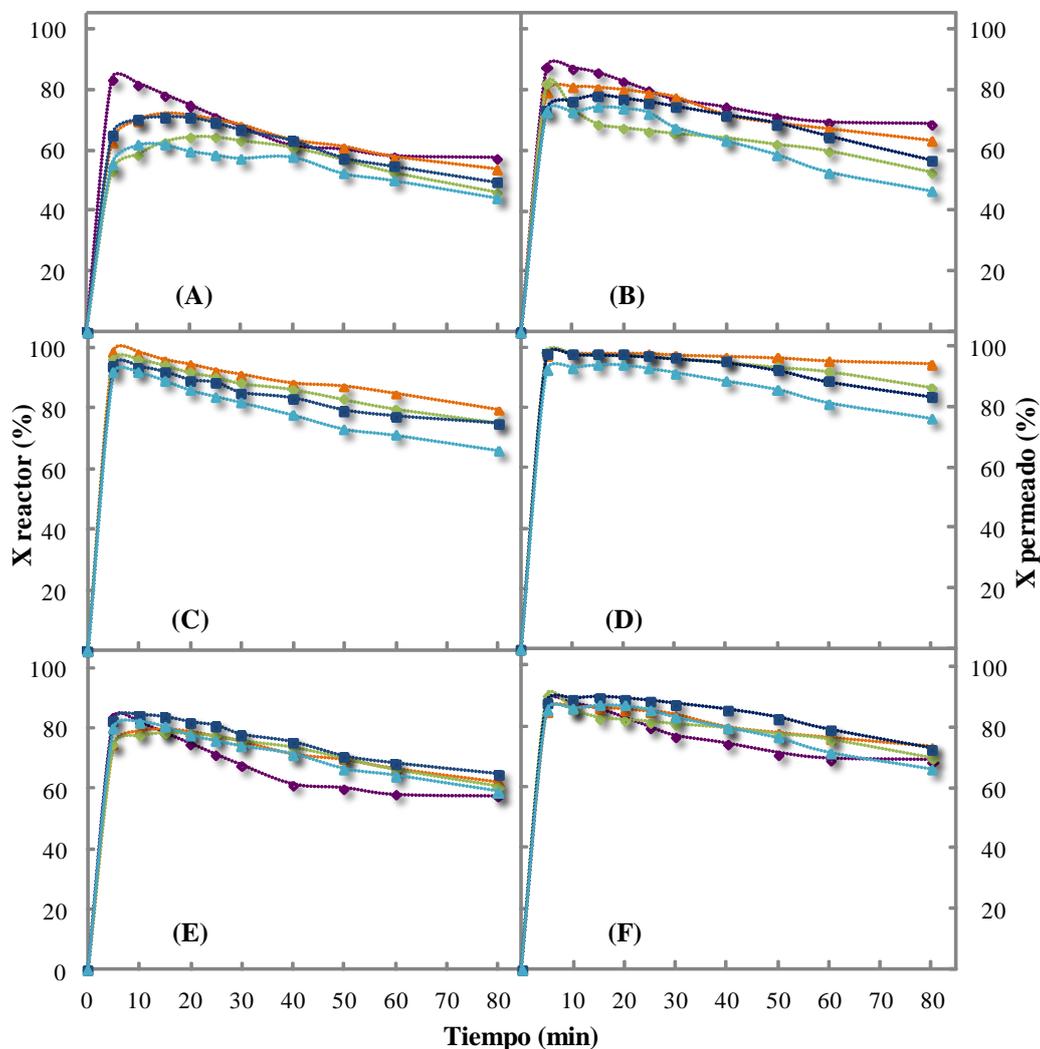


Figura 12.4. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado para fenol; (C) reactor y (D) permeado para 4-clorofenol, (E) reactor y (F) permeado para fenoles totales. Concentración de fenoles: $[\text{fenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$, $[\text{4-clorofenol}]_0$ \blacklozenge 0.0 mM , \blacktriangle 0.5 mM , \blacklozenge 1.0 mM , \blacksquare 1.5 mM y \blacktriangle 2.0 mM .

En la Figura 12.4 se observa que un aumento de la concentración de 4-clorofenol en la composición de la mezcla de fenoles tratada, conlleva a una menor eliminación tanto de fenol (series A y B) como de 4-clorofenol (serie C y D). En el caso de fenol, como se trabaja a una concentración

constante, el descenso de su conversión se corresponde a la influencia que ejerce el aumento de la concentración de 4-clorofenol en la mezcla. Este hecho genera que la enzima (SBP) deba eliminar una mayor cantidad de fenoles totales, originando así, una disminución de la conversión de ambos sustratos fenólicos.

Por otro lado, en la serie de fenoles totales (serie E y F) se aprecia una mayor conversión al aumentar la concentración de 4-clorofenol en la composición de la mezcla, lo que parece indicar que la presencia de 4-clorofenol no afecta la eliminación de la mezcla de fenoles.

12.1.3. Influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol

Al igual que en la sección anterior, se ha llevado a cabo una serie experimental con el objetivo de estudiar la posible influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol. Se han realizado cinco ensayos con una concentración inicial de enzima en el reactor de 0.04 mg/ml y 0.002 mg/ml en la alimentación. La concentración de 4-clorofenol se mantuvo constante en 1.0 mM y se varió la concentración de fenol entre 0.0 y 2.0 mM. Igualmente la concentración de peróxido de hidrógeno se varió entre 1.0 y 3.0 mM para mantener una relación molar 1:1 con los compuestos fenólicos totales en cada ensayo.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 100 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 20 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}; [\text{fenol}]_0 = 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[4\text{-clorofenol}]_F = 1.0 \text{ mM}; [\text{fenol}]_F = 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ y } 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$[\text{SBP}]_0 = 0.04 \text{ mg/ml}; [\text{SBP}]_F = 0.002 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Caudal de alimentación} = 5 \text{ ml/min}$$

Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la Tabla 16.44 del Anexo 9 y en la Figura 12.5 se representa la conversión a lo largo del tiempo en el interior del reactor y en el permeado.

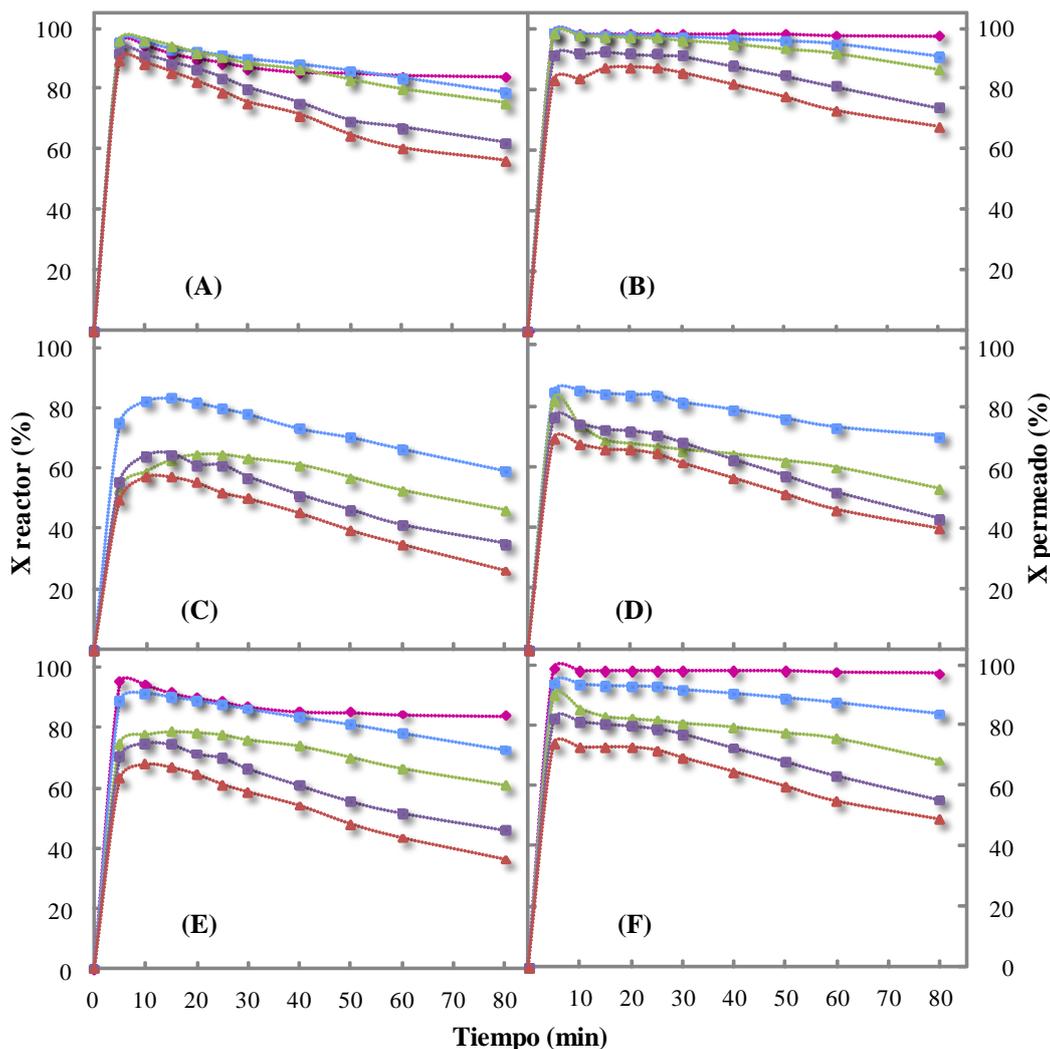


Figura 12.5. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado para 4-clorofenol; (C) reactor y (D) permeado para fenol, (E) reactor y (F) permeado para fenoles totales. Concentración de fenoles: $[4\text{-clorofenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$, $[\text{fenol}]_0 = \blacklozenge 0.0 \text{ mM}$, $\blacksquare 0.5 \text{ mM}$, $\blacktriangle 1.0 \text{ mM}$, $\blacksquare 1.5 \text{ mM}$ y $\blacktriangle 2.0 \text{ mM}$.

En la Figura 12.5 se observa que un aumento de la concentración de fenol en la relación molar de la mezcla, implica una eliminación significativamente menor tanto de 4-clorofenol (series A y B) como para el fenol (serie C y D), exceptuando en estas últimas series el ensayo para la concentración de fenol de 0.5 mM. Asimismo en la serie de fenoles totales (series E y F) se aprecia una menor conversión al aumentar la concentración de fenol en la relación molar de la mezcla, lo que indica que la presencia de

fenol afecta negativamente la eliminación de 4-clorofenol y de la mezcla de fenoles.

12.1.4. Comparación y discusión

En la Figura 12.6 se representa una comparación entre las series de fenoles totales para los ensayos del estudio de la influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol y del estudio de la influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol.

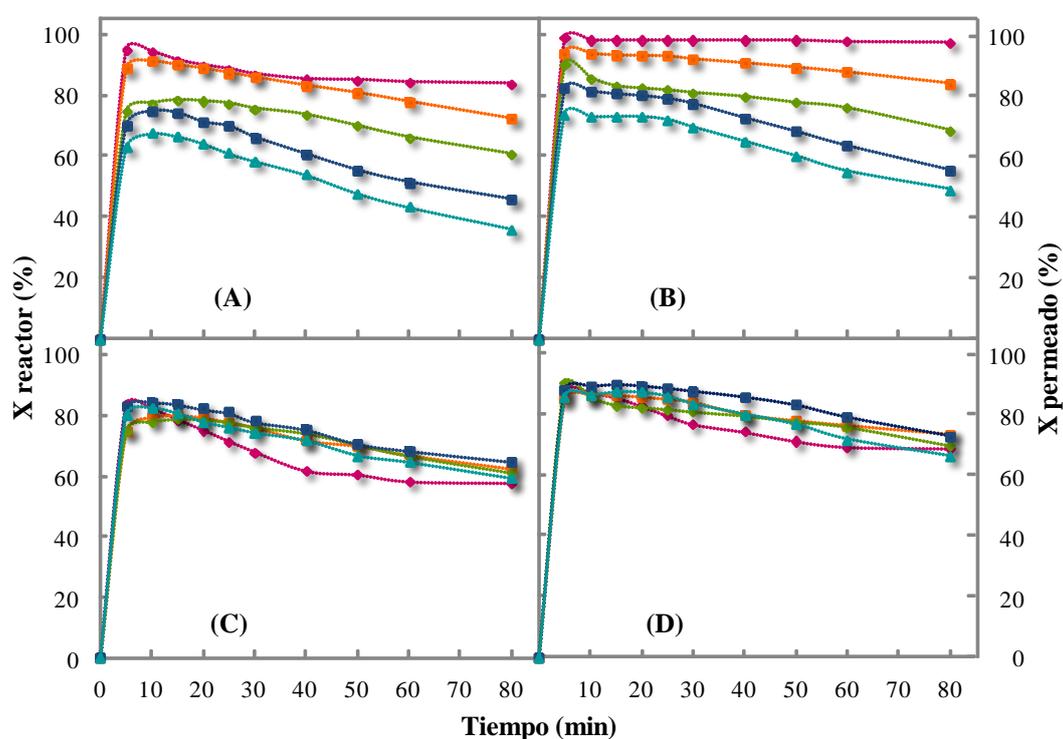


Figura 12.6. Comparación de la conversión, en términos de fenoles totales, alcanzada a lo largo del tiempo para distintas relaciones de concentración en mezclas de fenol y 4-clorofenol en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana en serie. (A) reactor y (B) permeado, concentración de sustratos: $[4\text{-clorofenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$ y $[\text{fenol}]_0 = \blacklozenge 0.0 \text{ mM}$, $\blacksquare 0.5 \text{ mM}$, $\blacklozenge 1.0 \text{ mM}$, $\blacksquare 1.5 \text{ mM}$ y $\blacktriangle 2.0 \text{ mM}$. (C) reactor y (D) permeado, concentración de sustratos: $[\text{fenol}]_0 = 1.0 \text{ mM}$ y $[4\text{-clorofenol}]_0 = \blacklozenge 0.0 \text{ mM}$, $\blacksquare 0.5 \text{ mM}$, $\blacklozenge 1.0 \text{ mM}$, $\blacksquare 1.5 \text{ mM}$ y $\blacktriangle 2.0 \text{ mM}$.

En dicha figura se observa a simple vista que, en las series en las que se muestra la influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol (serie A y B), éstas se ven influenciadas negativamente por la presencia de fenol, pasando en el reactor de una conversión de 83% para una concentración de fenol de 0.0 mM, al 36% para una concentración de fenol de 2.0 mM y en el permeado de una conversión de 97% al 49% para los fenoles totales.

En cambio en las series en las que se muestra la influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol (serie C y B), se puede apreciar un ligero incremento de la conversión de los fenoles totales al aumentar la concentración de 4-clorofenol, pasando en el reactor de una conversión de 57% para una concentración de 4-clorofenol 0.0 mM, al 64% para una concentración de 4-clorofenol 1.5 mM y en el permeado de una conversión de 69% al 72%.

A modo de conclusión del presente capítulo se puede decir que, en una mezcla de compuestos fenólicos (fenol y 4-clorofenol), el aumento de la proporción de fenol afecta negativamente la eliminación de los compuestos fenólicos de la mezcla, mientras que un aumento de la proporción de 4-clorofenol la favorece o no la altera.



13. OTRAS ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO

13. OTRAS ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO

Como ha sido mencionado en el capítulo de los antecedentes, en la actualidad la fito y bioremediación se muestran como una alternativa atractiva para el tratamiento de distintos contaminantes del entorno. En este sentido, y con miras a estudiar otras opciones que permitan la eliminación de compuestos fenólicos, dentro de mi proceso de formación he desarrollado una estancia predoctoral en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Argentina). Una de las líneas de investigación en la que vienen trabajando en dicho departamento se encuentra íntimamente relacionada con el tema de mi Tesis Doctoral [146-148], lo que ha permitido hacer un estudio comparativo entre la peroxidasa de soja liofilizada utilizada en la presente investigación con extractos de peroxidases totales, a partir de cultivos de raíces transformadas de nabo y tabaco wt para la eliminación de 4-clorofenol en reactor tanque discontinuo, utilizando disoluciones modelo y un efluente residual de una curtiduría. Adicionalmente se ha realizado la caracterización de las diferentes isoenzimas de peroxidases, tanto de los extractos enzimáticos como de la peroxidasa comercial de soja (SBP).

13.1. Caracterización de las diferentes isoenzimas de peroxidasas

Para llevar a cabo la caracterización de las isoenzimas de peroxidasas presentes en las raíces transformadas (RT) de nabo y tabaco wt al igual que de la peroxidasa comercial de soja, en primer lugar se han obtenido los extractos crudos totales (ECT) a partir de sus RT. Con ellos, y con una disolución de SBP, se han realizado la determinación de la actividad enzimática frente a la *o*-dianisidina, estabilidad al almacenamiento, punto isoeléctrico (pI), índice de Reinheitszahl (RZ), y peso molecular (PM).

13.1.1. Obtención de extracto crudo total de peroxidasas

Para la obtención de los ECT se han utilizado cultivos *in vitro* de RT obtenidos por infección con *Agrobacterium rhizogenes* cepa LBA 9402, a partir de explantos de hojas de nabo (*Brassica napus*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) salvaje (wt) [277, 278]. A partir de estos cultivos *in vitro* se han realizado homogenatos con solución amortiguadora de pH de alta fuerza iónica (acetato de sodio/ácido acético 50 mM, pH 5, conteniendo KCl 1.0 M), en proporción 1:3 (una parte de material vegetal:tres partes de solución amortiguadora) [278]. Las muestras homogeneizadas han sido centrifugadas a 5000 rpm 30 min. El sobrenadante ha constituido el ECT de peroxidasas.

13.1.2. Determinación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de tres peroxidasas procedentes de RT de nabo y tabaco wt junto con la peroxidasa comercial de SBP utilizando como sustrato la *o*-dianisidina (bis (3,3'-dimetoxi-4-amino) azo-bifenilo) [279, 280]. La actividad fue medida siguiendo el aumento de absorbancia a 470 nm resultado de la aparición de un producto coloreado originado por la oxidación de *o*-dianisidina ($\epsilon_{460} = 11.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con H_2O_2 a 35 °C por las peroxidasas de los diferentes extractos y de la disolución de SBP comercial. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de formar 1 μmol de producto durante un minuto.

Las condiciones experimentales para cada medida han sido:

$$T^a = 35 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$[o\text{-dianisidina}] = 0.63 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.23 \text{ mM}$$

Tampón de acetato/acético 0.1 M de pH 5.5

ECT de RT de nabo y tabaco wt

Una disolución de SBP comercial de 50 $\mu\text{g/ml}$

Con el fin de comparar de forma apropiada la actividad de los ECT de RT de nabo y tabaco wt con la SBP comercial, se ha determinado también la concentración de proteína, tanto de los ECT como de la disolución preparada de SBP por el método de Bradford [281]. De esta forma se ha obtenido la actividad tanto en U/ml como en U/mg las cuales se exponen en la Tabla 13.1. En dicha tabla se observa que los extractos obtenidos en este trabajo presentan alta actividad (U/ml) frente a la *o*-dianisidina y alta concentración de proteína. Además, las tres peroxidasa presentan una alta actividad enzimática (U/mg) siendo superior está con la enzima purificada de soja, seguida del ECT de RT de tabaco wt y por último el ECT de RT de nabo.

Tabla 13.1. Valores de actividad para las tres peroxidasa en estudio

Peroxidasa	[Proteína] (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad (U/mg)
SBP	0.046	236 x 10 ³	509 x 10 ⁴
Tabaco wt	0.508	289 x 10 ³	569 x 10 ³
Nabo	0.551	239 x 10 ³	434 x 10 ³

En los ensayos donde se ha comparado el comportamiento de las tres peroxidasa para la eliminación de 4-clorofenol en el reactor tanque discontinuo, se han adicionando el mismo número de unidades al reactor (U/ml).

13.1.3. Estabilidad al almacenamiento

Utilizando como criterio las medidas de actividad se ha llevado a cabo el estudio de la estabilidad al almacenamiento. Así, para cada una de las peroxidasa se han realizado medidas de actividad que se repitieron a los 15 y

30 días en las mismas condiciones. Los ECT de RT de nabo y tabaco wt han sido almacenados a 4 °C, y la SBP comercial ha sido almacenada en disolución acuosa en una concentración de 50 µg/ml a la misma temperatura (4 °C).

En la Figura 13.1 se representan para las tres peroxidadasas, las medidas de actividad en U/ml (A) y el tanto por ciento de esta medida (B) a los respectivos días del ensayo. En la Tabla 16.45 del Anexo 10 se recogen los valores numéricos.

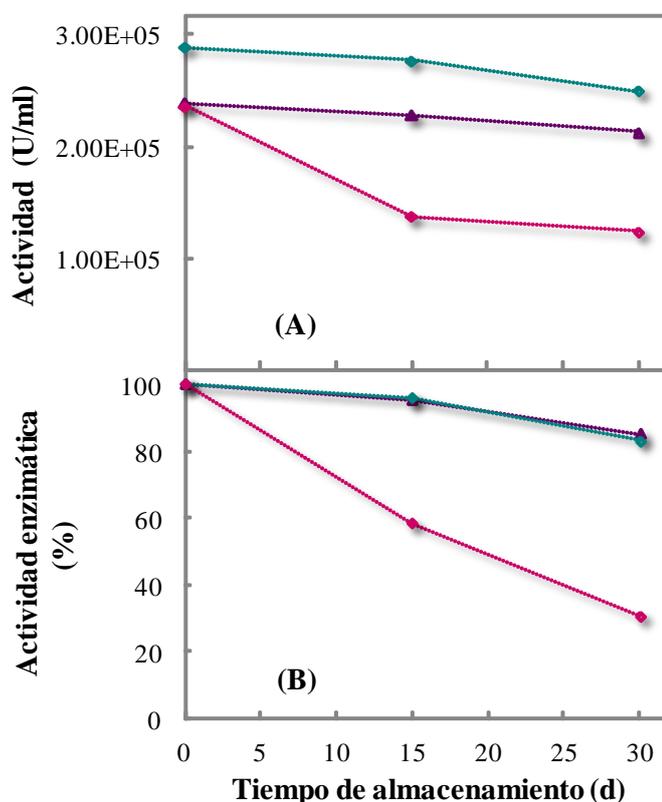


Figura 13.1. Estudio de la estabilidad al almacenamiento para las tres peroxidadasas. E = ♦ ECT de tabaco wt, ▲ ECT de nabo y ♦ SBP. (A) Medidas de actividad en U/ml y (B) % de medidas de actividad tras el almacenamiento.

En dicha figura se puede apreciar que las isoenzimas de peroxidadasas del ECT de RT de tabaco wt y nabo son las que presentan una mejor estabilidad al almacenamiento. Dicha conducta se observa de forma más notoria en la representación del tanto por ciento (%) de las medidas de actividad (B), en la que vemos que pasados 30 días de almacenamiento los ECT mantienen un

80% de su actividad enzimática, mientras que, la SBP comercial disminuye su actividad al 30%.

13.1.4. Determinación del punto isoeléctrico (pI) e índice de Reinheitszahl (RZ)

Otras de las caracterizaciones que han sido realizadas sobre los ECT de RT de nabo y tabaco wt, al igual que la SBP comercial han sido la determinación del punto isoeléctrico (pI) y el índice de Reinheitszahl (RZ). Este último es un parámetro de la caracterización peroxidasa, siendo considerado como un criterio de pureza [282], el cual establece la relación de absorbancia entre la longitud de onda de Soret (cerca a 400 nm) y el contenido de aminoácidos (280 nm). En las mediciones que han sido realizadas en este estudio se estableció la relación $RZ = A_{403} / A_{280}$.

Tabla 13.2. Valores de RZ y pI de las isoenzimas de las peroxidasa en estudio

Peroxidasa	RZ	pI
SBP	1.8	7.2
		6.7
		6.2
Nabo	0.16	10.1
		9.5
		8.6
		7.3
		5.3
Tabaco wt	0.59	10.0
		9.8
		8.7
		8.0
		6.7
		5.1
		4.9

Para la determinación del punto isoeléctrico (pI) se han realizado isoelectroenfoques verticales utilizando un equipo BioRad Mini Protean III; en minigeles de poliacrilamida al 7.5%, diseñados para separar proteínas de acuerdo a su pI (punto isoeléctrico, es decir, el pH al cual la carga neta de la proteína es nula). Los geles han sido teñidos con bencidina para detectar la

actividad de peroxidasa [283] y, con azul de Coomasie R-250 y croceína escarlata para detectar proteínas marcadoras [284]. En la Tabla 13.2 se recogen los resultados obtenidos en la determinación de RZ y pI.

De acuerdo al valor de RZ la SBP comercial presentaría un mayor grado de pureza que los ECT obtenidos a partir de RT de nabo y tabaco wt, lo cual es bastante lógico ya que estos últimos no han sido sometidos a ningún tratamiento de purificación.

En lo concerniente al punto isoeléctrico la preparación comercial de SBP presenta una isoenzima de peroxidasa mayoritaria con pI cercano a la neutralidad (6.7), mientras que, los ECT con dos bandas mayoritarias, RT de nabo (10.1 y 8.8) y RT de tabaco (10 y 8.0) presentan un predominio de isoenzimas básicas, como se observa en la Figura 13.2.

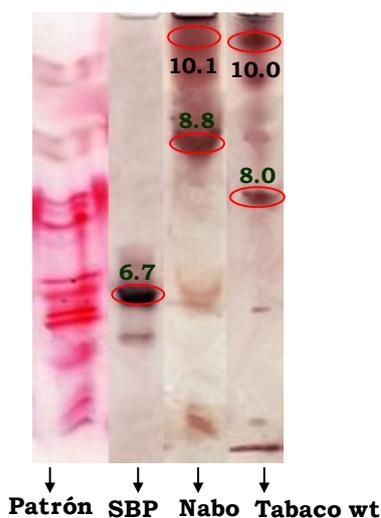


Figura 13.2. Gel de isoelectroenfoque (IEF) para la determinación del punto isoeléctrico (pI) de SBP comercial y ECT de RT de nabo y tabaco wt.

13.1.5. Determinación del peso molecular (PM)

Por último en el proceso de caracterización de las diferentes isoenzimas, tanto de los ECT como de la peroxidasa comercial, se ha determinado el peso molecular (PM) utilizando la técnica SDS-PAGE que es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada para este fin. Se trata de una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) que se realiza en presencia de dodecilsulfato

de sodio (SDS), siguiendo el método descrito por Laemmli [285]. Los geles han sido teñidos con azul de Coomassie R-250 para detectar proteínas marcadoras y nitrato de plata para colorear las proteínas de la SBP comercial y de los ECT, tinción descrita por Nesterenko y col. [286], que presenta mayor sensibilidad para este fin.

Tabla 13.3. Valores del peso molecular (PM) de la diferentes isoenzimas

Peroxidasa	PM (kDa)
SBP	44.91
Nabo	56.80
	47.62
Tabaco wt	39.93
	35.51
	31.57
	17.55
	12.34

En la Tabla 13.3 se pueden apreciar los valores obtenidos para la determinación del PM observándose a su vez en la Figura 13.3 que la SBP comercial tiene una banda mayoritaria de PM 44.9 kDa valor típico para la esta peroxidasa [183], mientras que el ECT de RT de nabo presentó dos bandas de PM con una mayoritaria de 56.8 kDa.

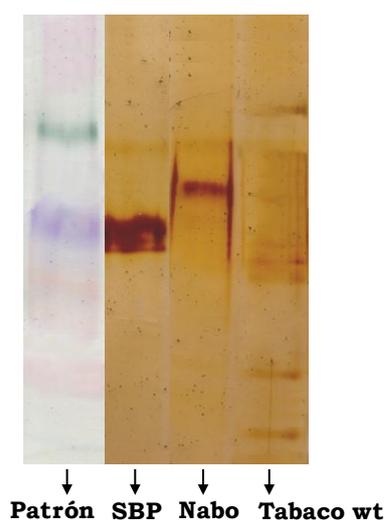


Figura 13.3. Gel de electroforesis SDS-PAGE para la determinación del peso molecular (PM) de SBP comercial; y ECT de RT de nabo y tabaco wt.

Por otra parte, en el ECT de RT de tabaco wt se detectaron al menos 5 bandas de PM comprendidas entre 12.34 a 39.93 kDa sin identificarse con claridad una banda mayoritaria. De acuerdo a datos bibliográficos, probablemente las bandas de 39.93 y 35.51 podrían corresponder a las isoenzimas de peroxidasa. Sin embargo, para confirmarlo se debería proceder a una purificación exhaustiva de estos extractos, que escapa a los objetivos de esta tesis.

En general se asume que las peroxidasa vegetales tienen PM comprendidos en el rango de aproximadamente 32.0 a 55.0 kDa, tal como se observó en este trabajo, lo cual depende del grado de glicosilación de las diferentes isoenzimas. Así por ejemplo se ha descrito que la isoenzima básica comercial de rábano picante (HRP) presenta un PM de 42.1 kDa [287] mientras que un grupo de isoenzimas de rábano de Korea tienen PM comprendidos entre 31.0 a 50.0 kDa [288].

13.2. Series experimentales en reactor tanque discontinuo

Se han llevado a cabo tres series experimentales para cada uno de los ECT de RT de nabo y tabaco wt junto con la SBP comercial. Así, se han estudiado la variación de la cantidad de unidades de peroxidasa en el reactor, la variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1 y la variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno. Adicionalmente se ha realizado un ensayo para cada peroxidasa en presencia de un efluente residual de una curtiduría.

Todos los experimentos se han realizado a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), en erlenmeyers de 50 ml con un volumen de reacción de 5 ml, y una velocidad de agitación orbital de 100 rpm. La concentración inicial de ambos sustratos (4-clorofenol y peróxido de hidrógeno) y la cantidad de peroxidasa en el reactor ha sido la correspondiente a cada serie experimental. El 4-clorofenol residual ha sido determinado por espectrofotometría, el método utilizado es el recomendado por el Standard Methods de 1995 [273], realizando previamente la respectiva recta de calibrado ($\text{Abs} = 7.98 [4\text{-Clorofenol}]$, $r = 0.9997$).

13.2.1. Variación de la cantidad de unidades de peroxidasa en el reactor

Se ha llevado a cabo el estudio de la influencia de las unidades de peroxidasa en el reactor, con el fin de determinar la cantidad mínima necesaria de enzima que permite obtener conversiones deseadas y por ende un menor coste del proceso. Así se realizaron cuatro ensayos variando las unidades de enzima en el reactor en un rango de 50×10^3 a 220×10^3 U/ml.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 5 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$\text{Unidades de enzima} = 50 \times 10^3, 75 \times 10^3, 100 \times 10^3 \text{ y } 220 \times 10^3 \text{ U/ml}$$

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 16.46 del Anexo 10. En la Figura 13.4 se representa la variación en el tiempo de la conversión. La conversión ha sido definida, como el 4-clorofenol consumido en cada instante, referido al que había inicialmente en el reactor:

$$X_R = \frac{[4\text{-clorofenol}]_0 - [4\text{-clorofenol}]_t}{[4\text{-clorofenol}]_0} * 100$$

En la Figura 13.4 se aprecia un incremento de la conversión al aumentar las unidades enzima en el reactor para las tres peroxidasa Sin embargo a diferencia de los ECT de RT de nabo y tabaco wt (series B y C), con la SBP comercial (serie A), no se alcanza el 100% de conversión con la mayor cantidad de unidades de enzima en reactor ensayadas (220×10^3 U/ml).

Para los ECT de RT de nabo y tabaco wt un aumento de 100×10^3 a 220×10^3 U/ml en el reactor se traduce en un incremento de la conversión en los primeros minutos. Sin embargo dicho incremento no se mantiene a lo largo de todo el proceso y con ambas cantidades de enzima se consiguen conversiones alrededor del 95% en el minuto 60.

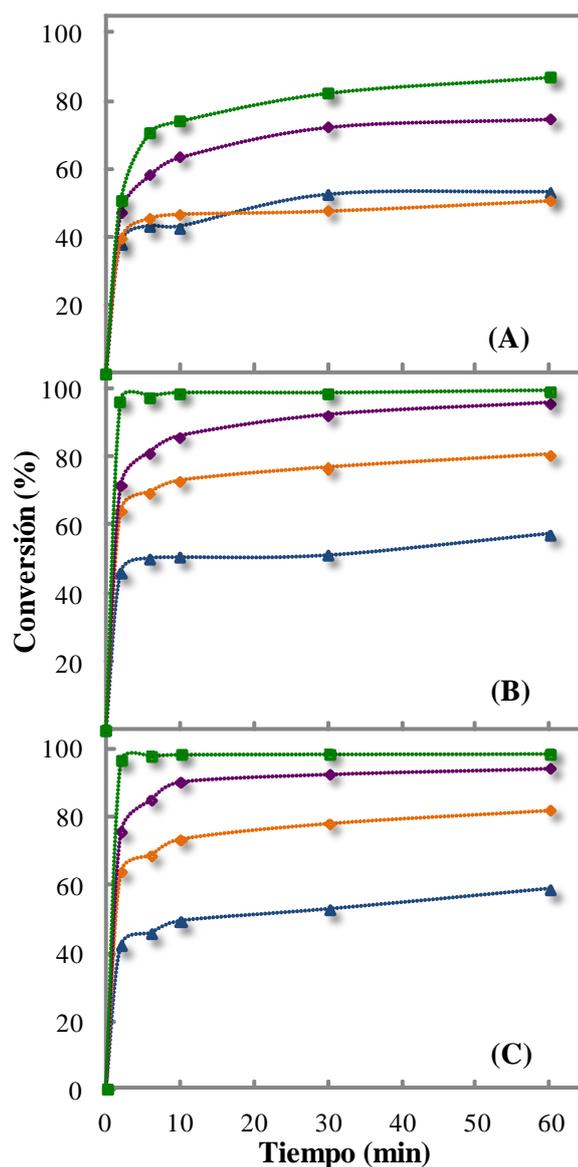


Figura 13.4. Conversión alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo, con distintas unidades de enzima inicial. ▲ 50 x 10³, ♦ 75 x 10³, ◆ 100 x 10³ y ■ 220 x 10³ U/ml. (A) SBP, (B) ECT de nabo y (C) ECT de tabaco wt.

Teniendo en cuenta que el principal objetivo de la estancia consistía en hacer un estudio comparativo de la SBP comercial con los ECT de RT de nabo y tabaco wt en las mismas condiciones de operación, se fijó el valor de 100 x 10³ U/ml de enzima en el reactor para el resto de las series experimentales que se presentan a continuación. Con esta cantidad de enzima (100 x 10³ U/ml) se consiguen conversiones de 4-clorofenol superiores al 90% para los ECT de RT de nabo y tabaco wt, y del 70% para SBP. Teniendo en

cuenta que las unidades de enzima adicionadas en el reactor han sido calculadas a partir de las medidas de actividad frente al sustrato *o*-dianisidina, es probable que no todas las enzimas ensayadas tengan la misma actividad frente al 4-clorofenol. Por otra parte, la diferencia en las conversiones logradas con la enzima purificada (SBP) respecto de los ECT podría ser atribuida a algunos componentes de los tejidos vegetales de los ECT, que actuarían como agentes estabilizantes protegiendo a la enzima de la inactivación. En este sentido, en un estudio previo realizado por Flock y col. [123], se describió que la peroxidasa purificada SBP sería más susceptible al H_2O_2 que las isoenzimas presentes en un extracto obtenido a partir de las vainas de soja.

13.2.2. Variación de la concentración inicial de ambos sustratos en relación 1:1

Se han realizado cuatro ensayos variando la concentración inicial de ambos sustratos en un rango de 0.5 a 4.0 mM manteniendo siempre una relación molar 1:1.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 5 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = [H_2O_2]_0 = 0.5, 1.0, 2.0 \text{ y } 4.0 \text{ mM}$$

$$\text{Unidades de enzima} = 100 \times 10^3 \text{ U/ml}$$

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 16.47 del Anexo 10. En la Figura 13.5 se representa la variación con el tiempo de la conversión de 4-clorofenol.

En dicha figura se aprecia un descenso de la conversión al aumentar la concentración inicial de ambos sustratos siendo más notoria la disminución de la conversión para la SBP. Mientras que, para los casos de los ECT de RT de nabo y tabaco wt el descenso de la conversión se hace solo evidente para la mayor concentración inicial de ambos sustratos (4.0 mM).

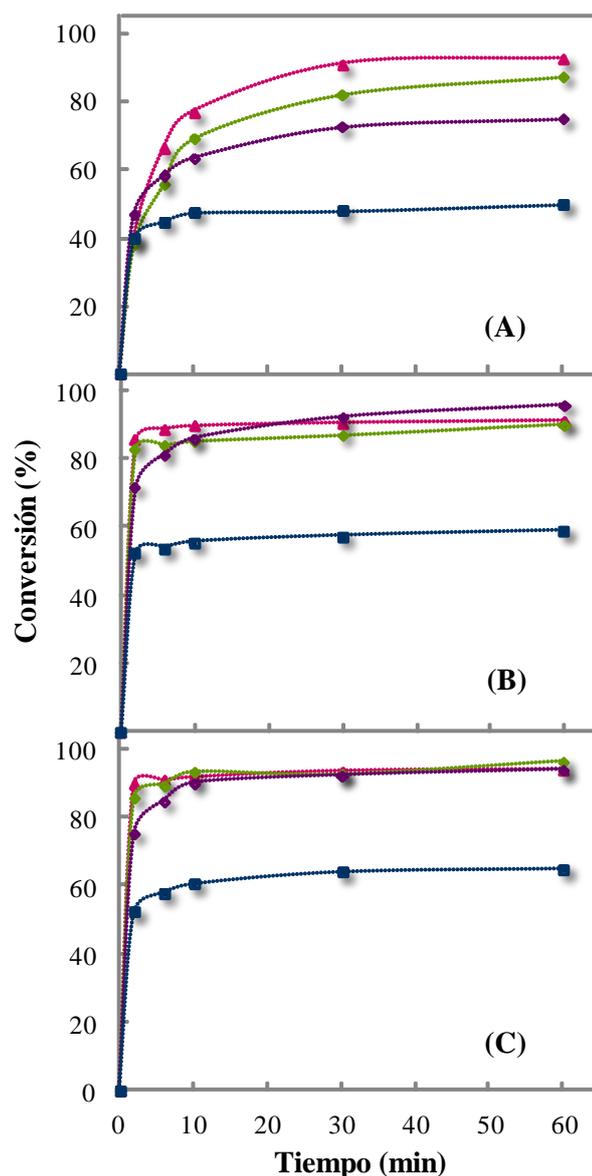


Figura 13.5. Conversión alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo, a distintas concentraciones iniciales de ambos sustratos. $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = \blacktriangle 0.5 \text{ mM}$, $\blacklozenge 1.0 \text{ mM}$, $\blacklozenge 2.0 \text{ mM}$ y $\blacksquare 4.0 \text{ mM}$ (A) SBP, (B) ECT de nabo y (C) ECT tabaco wt.

Para la SBP comercial (serie A) se observa una mayor conversión para la concentración equimolar de 0.5 mM con un 92% al minuto 60. No obstante a medida que se incrementa la concentración inicial de ambos sustratos, va apareciendo una disminución paulatina de la conversión, disminuyendo así al 87% para 1.0 mM, 74% para 2.0 mM y finalmente al 50% para la mayor de las concentraciones ensayadas, 4.0 mM, al minuto 60. Esta caída de la conversión puede ser debido a que a una mayor concentración equimolar de

los sustratos es mayor la formación del polímero que se genera en la reacción, el cual adsorbe la peroxidasa evitando así que continúe la eliminación de 4-clorofenol presente en el medio. Este proceso de adsorción es una de las principales causas que inhiben las reacciones de polimerización de fenoles. Además este fenómeno es más evidente cuando se utilizan isoenzimas de peroxidada purificadas, tal como se observó en este trabajo y como también ha sido descrito para otras peroxidadas, como las obtenidas de *Coprinus cinereus* (CIP) [289]. Por lo tanto para el tratamiento de concentraciones elevadas de 4-clorofenol con la SBP comercial se requeriría de una mayor cantidad de enzima en el reactor.

Para el caso de los ECT de RT de nabo y tabaco wt (series B y C) se aprecian conversiones por encima del 90% para las tres primeras concentraciones equimolares ensayadas (0.5, 1.0 y 2.0 mM) al minuto 60, siendo solo evidente el descenso de la conversión para la mayor de la concentración equimolar utilizada (4.0 mM) con un 60% de conversión al minuto 60. Este comportamiento indica que los ECT de RT de nabo y tabaco wt presentan una mayor actividad enzimática frente al 4-clorofenol al compararlos con la SBP comercial, ya que mantienen altas conversiones al variar el rango de la concentración inicial de ambos sustratos de 0.5 a 2.0 mM. Sin embargo, para tratar concentraciones más elevadas de 4-clorofenol, al igual que cuando se usa la SBP, se requeriría de una mayor cantidad de enzima en el reactor.

13.2.3. Variación de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno

Se han realizado cuatro ensayos con una concentración inicial de 4-clorofenol de 2.0 mM y utilizando distintas concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno (1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM), las cuales dan lugar a una relación molar 4-clorofenol:peróxido de hidrógeno de 1:0.75, 1:1, 1:1.25 y 1:1.5 respectivamente.

Las condiciones de operación han sido las siguientes:

$$V_R = 5 \text{ ml}$$

$$T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$[4\text{-clorofenol}]_0 = 2.0 \text{ mM}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.5, 2.0, 2.5 \text{ y } 3.0 \text{ mM}$$

$$\text{Unidades de enzima} = 100 \times 10^3 \text{ U/ml}$$

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 16.48 del Anexo 10. En la Figura 13.6 se representa la variación con el tiempo de la conversión de 4-clorofenol.

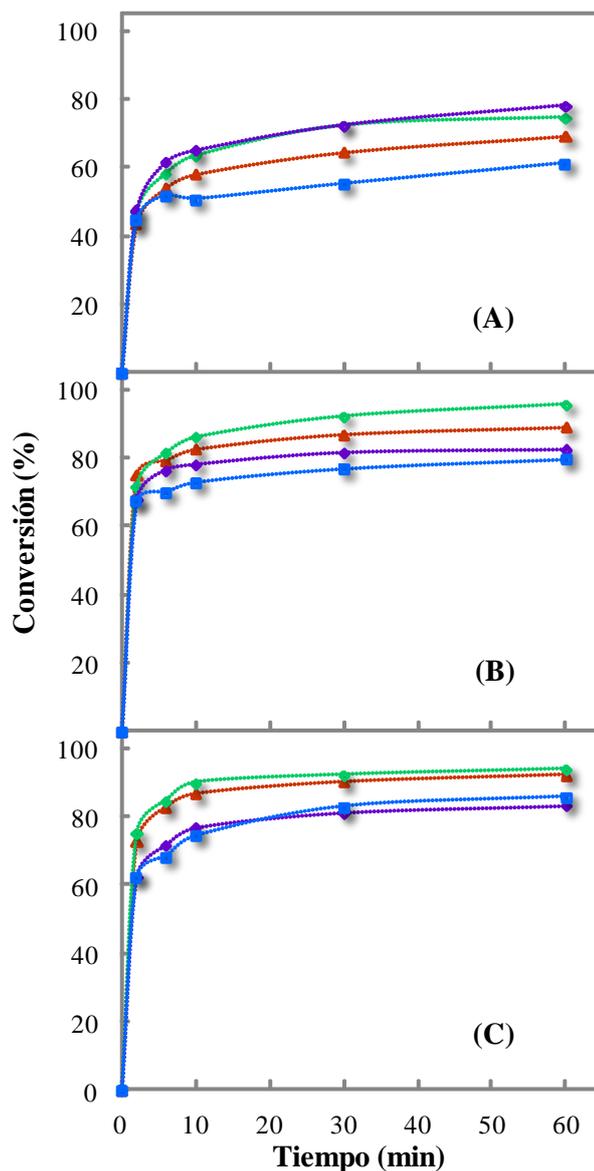


Figura 13.6. Conversión alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo, a distintas concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno. $[\text{4-clorofenol}]_0 = 2.0 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = \blacktriangle 1.5 \text{ mM}$, $\blacktriangle 2.0 \text{ mM}$, $\blacklozenge 2.5 \text{ mM}$ y $\blacksquare 3.0 \text{ mM}$. (A) SBP, (B) ECT de nabo y (C) ECT de tabaco wt.

En la Figura 13.6 se aprecia, para la SBP comercial (serie A), un aumento de la conversión de 4-clorofenol al pasar de una concentración inicial de peróxido de hidrógeno de 1.5 mM a 2.0 mM y prácticamente se mantienen las mismas conversiones para una concentración del agente oxidante de 2.5 mM, viéndose afectada negativamente la eliminación del sustrato al aumentar la concentración a 3.0 mM.

En lo concerniente a el ECT de RT de nabo (serie B), se puede observar un aumento de la conversión del sustrato al pasar de una concentración inicial de peróxido de hidrógeno de 1.5 mM a 2.0 mM, pero, el posterior aumento a una concentración de 2.5 y 3.0 mM reflejan una disminución paulatina de la conversión.

En el caso del ECT de RT de tabaco wt (serie C) presenta conversiones similares de 4-clorofenol para una concentración inicial del agente oxidante de 1.5 y 2.0 mM. A partir del aumento de estas concentraciones de peróxido de hidrógeno a 2.5 y 3.0 mM se ve afectado negativamente el proceso de eliminación de 4-clorofenol, traduciéndose en una caída de las conversiones.

El comportamiento distinto de la SBP comercial y de los ECT de RT de nabo y tabaco wt en esta serie experimental deja ver que los mecanismos de reacción de la eliminación de compuestos fenólicos son algo diferentes para las tres peroxidasas en estudio. A manera de ejemplo, para la SBP comercial la reacción se ve favorecida al aumentar la concentración de peróxido de hidrógeno hasta la relación molar 1:1.25, mientras que el uso de esa misma relación molar afecta negativamente la eliminación de 4-clorofenol en presencia de los ECT de RT de nabo y tabaco wt, lo que puede deberse a efectos de inhibición y/o desactivación de la enzima por el peróxido de hidrógeno. Asimismo cabe mencionar que, cualitativamente, la apariencia del polímero que se forma en la reacción es distinta en los tres casos, con coloración y aspectos físicos diferentes para cada uno de ellos, lo que podría indicar una diferente distribución y naturaleza de los dímeros y trímeros que se forman en el proceso de reacción.

De forma resumida se puede decir que un aumento de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno provoca un descenso de la conversión, siendo

más notoria dicha incidencia para los ECT de RT de tabaco y nabo que para la SBP comercial. Esto puede deberse a que la presencia de un oxidante en exceso en el medio de reacción, como es el peróxido de hidrógeno, puede afectar a las enzimas que al fin y al cabo son materia orgánica oxidable. Asimismo la relación molar 1:1 es la condición óptima de operación para las tres peroxidadasas estudiadas.

13.2.4. Estudio comparativo de las tres peroxidadasas

Todos los experimentos que han sido realizados en el desarrollo de la estancia se han llevado a cabo de forma simultánea tanto para los ECT de RT de nabo y tabaco wt, junto con la peroxidasa comercial. Para hacer una comparación de las tres enzimas se han utilizado los ensayos con 100×10^3 U/ml de enzima en reactor y una concentración inicial de 4-clorofenol y peróxido de hidrógeno de 2.0 mM. Aunque en los tres casos se han utilizado las mismas unidades de actividad (determinadas a partir de velocidades iniciales y utilizando como sustrato *o*-dianisidina) se observa que su eficacia para la eliminación de 4-clorofenol en reactores discontinuos es bastante diferente.

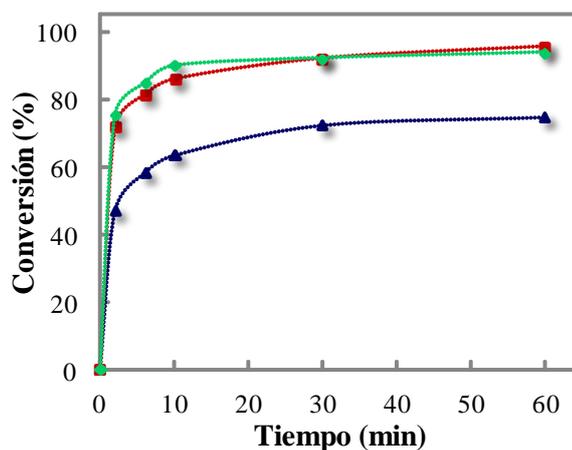


Figura 13.7. Conversión de 4-clorofenol alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo. ▲ SBP, ■ ECT de nabo y ◆ ECT de tabaco.

En la Figura 13.7 se aprecia un mejor comportamiento de los ECT de RT de nabo y tabaco wt seguido de la SBP en la eliminación de 4-clorofenol en un reactor en discontinuo. Esto puede deberse a que los ECT de RT presentan

una mayor cantidad de isoenzimas de peroxidasa que puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno, agente iniciador de la reacción, dando como resultado un mayor grado de polimerización sobre el sustrato fenólico de interés (4-clorofenol). En este sentido a continuación se mencionan algunos trabajos relacionados con este tema.

Coniglio y col. [290] realizaron un estudio de la eliminación de fenol utilizando RT de nabo (*Brassica napus*). En este trabajo llevaron a cabo una purificación y separación parcial de las isoenzimas presentes en los ECT de RT de nabo obteniendo dos fracciones, peroxidasas neutras y básicas (PBN) y peroxidasas ácidas (PA). Encontraron que las PA muestran una mayor afinidad por concentraciones mayores de fenol y tienen una superior eficiencia catalítica que las PBN, parámetros utilizados con frecuencia para evaluar la preferencia de una enzima por diferentes sustratos, y que representan la constante de velocidad de la reacción para formar el complejo enzima-sustrato.

No obstante, aunque las PA presenta una mayor afinidad por concentraciones altas de fenol, al ser utilizadas ambas fracciones en ensayos de remoción de fenol con las mismas unidades enzima, los porcentajes de eliminación logrados por ambas fracciones fueron similares, sugiriendo que probablemente ambas isoenzimas estarían involucradas en la eliminación de fenol.

Por otro lado Sosa y Col. [278] obtuvieron RT de tabaco (*Nicotiana tabacum*) salvajes (wt) y transgénicos para dos peroxidasas básicas del tomate (tpx1 y tpx2) que han sido asociadas a la eliminación de compuestos fenólicos [291], seleccionando 10 clones de RT e incluyendo entre ellos los transgénicos para tpx1 o tpx2 y los dobles transgénicos (DT que expresan simultáneamente tpx1 y tpx2) para utilizarlos en estudios de eliminación de fenol.

Las eficiencias de remoción fueron altas para todos los clones de las RT de tabaco, tanto wt como transgénicos, aunque algunos clones transgénicos mostraron significativamente más altas eficiencias de eliminación del contaminante. Los resultados demostraron, además que tpx1 (peroxidasa básica de pI alrededor de 9.6) está involucrada en la eliminación de fenol no

sólo cuando se encuentra presente en el tomate de forma natural, sino también cuando se expresan en otras plantas, como en el tabaco wt que no presenta esta peroxidasa, incrementando la remoción de fenol. Asimismo los altos porcentajes de eliminación de fenol (90%) de las RT de tabaco transgénico wt para tpx2 (peroxidasa básica de pI alrededor de 9.6) demostraron que esta peroxidasa también cumple un rol importante en el proceso de eliminación del fenol.

De acuerdo a los trabajos antes mencionados y retornando a la Figura 13.7 donde se observa claramente una mejor eliminación de 4-clorofenol por parte de los ECT de RT de nabo y tabaco wt que por parte de la SBP comercial. Esta diferencia pueden ser explicada a partir de los resultados obtenidos y expuestos en la *sección 12.1.4 (Determinación del punto isoeléctrico (pI) e índice de Reinheitszahl (RZ))*, ya que los ECT de RT de nabo y tabaco wt, aunque presentan peroxidasas básicas, neutras y ácidas, tienen un predominio de isoenzimas básicas con bandas mayoritarias de pI 10.1 y 8.8 para RT de nabo y pI 10 y 8.0 para RT de tabaco wt, mientras que, la peroxidasa comercial de SBP presentan isoenzimas cercanas a la neutralidad con una banda mayoritaria con pI 6.7. Por lo tanto, si bien es cierto que todas las isoenzimas están involucradas en la eliminación de 4-clorofenol, los resultados obtenidos con los ECT de RT de nabo y tabaco wt con presencia mayoritaria de isoenzimas básicas se muestran como las más vinculadas en el proceso catalítico oxidativo de 4-clorofenol, de ahí que presenten un mayor grado de eliminación del compuesto fenólico.

Por otro lado es probable que las enzimas purificadas, como en el caso de la SBP comercial, requieran más tiempo o más cantidad de enzima para alcanzar mayores eficiencias, principalmente por la adsorción del polímero que se forma en la reacción, mientras que los ECT pueden tener impurezas que inhiben en cierta medida dicho fenómeno [123, 289].

13.2.5 Comportamiento de las peroxidasas en estudio frente a un efluente industrial

Como había sido mencionado al inicio de este capítulo otro de los objetivos en el desarrollo de la estancia consintió en probar los ECT de RT de

nabo y tabaco wt, junto con la SBP comercial, en una muestra real. Para ello se ha llevado a cabo un ensayo bajo las mismas condiciones de operación. Así, se ha trabajado a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), utilizando 100×10^3 U/ml unidades de enzima en reactor y una concentración inicial de 4-clorofenol y peróxido de hidrógeno de 2.0 mM. En este caso en vez de utilizar agua destilada para alcanzar los 5 ml del volumen de reacción, se utilizó el efluente residual de una curtiduría, que en el momento de la toma de muestra presentó una concentración de fenoles totales de 10.84 mg/L. Los demás parámetros físico-químicos se presentan en el Anexo 10.1.

El efluente en cuestión ha sido recogido en la descarga al sistema de alcantarillado industrial de una empresa dedicada al curtido y comercialización de distintas clases de pieles, así como también al tratamiento de cueros para vestimenta en todas sus variedades y cueros para marroquinería.

Las etapas más importantes para convertir una piel en cuero se efectúan en medios acuosos, lo que genera residuos industriales líquidos con distintos grados de contaminación. Estas etapas son: ribera (curado y expedición), preparación, curtido y acabado. Las dos etapas en las que se utilizan o se pueden generar compuestos fenólicos se corresponde con la ribera y el acabado. En la ribera los cueros, suelen ser tratados con DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano), cloruro de zinc, cloruro de mercurio, tensoactivos (los más usados son los alquilfenoles etoxilados), clorofenoles u otros agentes desinfectantes. El acabado incluye tareas mecánicas para dar forma, métodos químicos para colorear (anilinas), lubricar, suavizar y aplicar un acabado superficial a la piel. Las anilinas utilizadas en esta etapa pueden ser precursoras de fenoles, haluros y nitrilos, así como de diazo-compuestos [292].

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 16.49 del Anexo 10. En la Figura 13.8 se representa una comparación de la variación con el tiempo de la conversión de 4-clorofenol en una disolución modelo y en el efluente industrial para los ECT de RT de nabo y tabaco wt, junto con la SBP comercial, cuando son tratadas en un reactor tanque discontinuo.

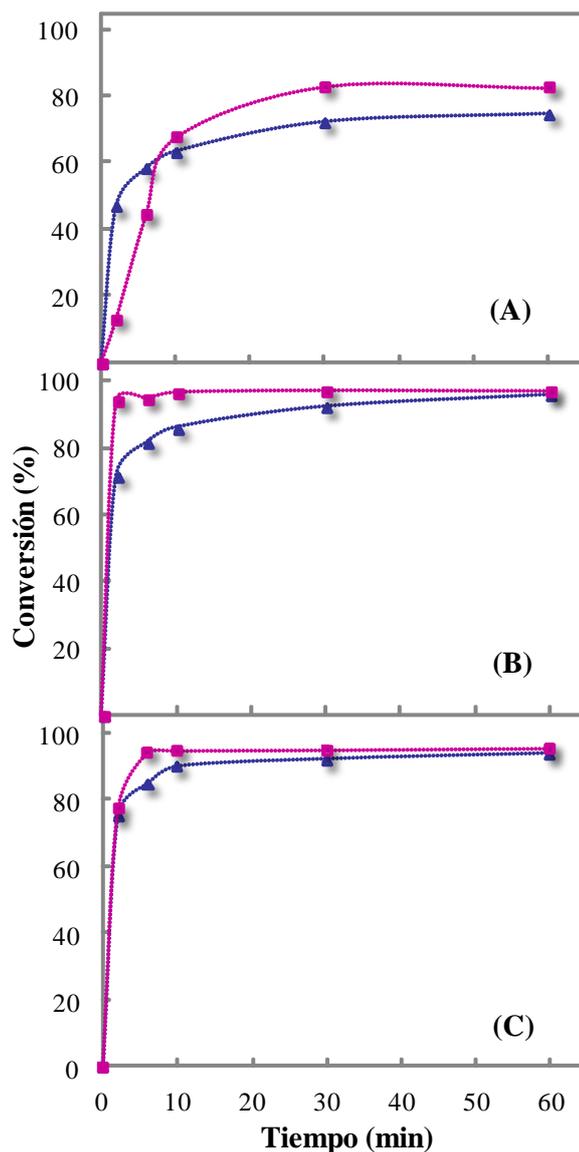


Figura 13.8. Conversión alcanzada en el reactor tanque discontinuo a lo largo del tiempo en una disolución modelo y en un efluente industrial. ▲ Disolución modelo y ■ efluente industrial. (A) SBP, (B) ECT de nabo y (C) ECT de tabaco wt.

En la figura se aprecia un incremento en la eliminación de 4-clorofenol en presencia del efluente industrial para los ECT de RT de nabo y tabaco wt, al igual que para la SBP comercial, siendo más significativo dicho incremento para SBP. Cabe mencionar que estos resultados abren la posibilidad del uso de las peroxidasas ensayadas para la eliminación de 4-clorofenol en efluentes industriales, ya que estas enzimas han demostrado no verse afectadas

negativamente por la presencia de otras sustancias presentes en la muestra real del estudio, sino que por el contrario se ven favorecidas.

Un comportamiento similar al aquí obtenido ha sido descrito por Flock y col. [123] que teniendo en cuenta la presencia de detergentes y tensioactivos de cualquier tipo en efluentes industriales y su posible efecto negativo en tratamientos de biorremediación, realizaron un estudio en el que encontraron que la presencia a baja concentración de SDS (dodecilsulfato sódico 0.1% w/v) tiene un efecto positivo en la actividad enzimática del extracto crudo de SBP, y que en elevada concentración (>1% w/v) no anulan su actividad. Una de las posibles explicaciones del aparente aumento de la actividad podría ser que pequeñas cantidades del detergente aumenta la exposición del sitio activo de la enzima, permitiendo un mayor acceso de los sustratos.

Usando como referencia la información antes mencionada se podría decir que el incremento de las conversiones de eliminación de 4-clorofenol que se observa en la Figura 13.8 con el uso del efluente residual, comportamiento más evidente para la SBP comercial, que también se aprecia pero en menos medida en los ECT de RT de nabo y tabaco wt, puede deberse a un aparente aumento de la actividad catalítica resultado de alguna sustancia presente en este efluente residual como podría ser la materia orgánica (proteínas no estructuradas, mucoproteínas, queratina, grasas), cal, sales, metales pesados y tensoactivos, entre otros.

Los resultados aquí obtenidos también indican que no se hace necesaria la purificación de los ECT de RT de nabo y tabaco wt ya que, de acuerdo a la información expuesta a lo largo de este capítulo, podrían constituir una alternativa de agentes enzimáticos para el tratamiento de compuestos fenólicos debido a su coste potencialmente menor.



14. CONCLUSIONES

14. CONCLUSIONES

1. El orden de actividad de las tres peroxidases estudiadas en esta Tesis Doctoral, para la eliminación de 4-clorofenol es, de mayor a menor, peroxidasa de soja (SBP), de rábano (HRP) y de alcachofa (AKPC). Para las dos primeras el pH óptimo es 7, mientras que AKPC presenta un pH óptimo en condiciones débilmente ácidas (pH = 6.5); este mismo comportamiento se observó en reactor tanque discontinuo. Asimismo en este reactor se encontró la temperatura óptima en torno a 30 °C para las tres enzimas ensayadas. En los ensayos realizados en reactor tanque continuo con módulo de ultrafiltración ha sido nuevamente la SBP la peroxidasa que presentó mejor comportamiento en la eliminación de 4-clorofenol. Por estas razones se selecciono la SBP para continuar el resto de la investigación.

El estudio, en ausencia de las especies reaccionantes, de la evolución con el tiempo de la cantidad de proteína y actividad enzimática, tanto en el reactor como en la corriente de permeado, ha puesto de manifiesto que, si bien en el reactor se produce un notable descenso de la actividad enzimática a lo largo del tiempo, esta disminución no se corresponde cuantitativamente con la cantidad de enzima presente en la corriente de permeado, notablemente inferior a dicho descenso para HRP y AKPC, y prácticamente nula para SBP. Este comportamiento es coherente con dos hipótesis, o bien la enzima sufre una desactivación

mecánica por el esfuerzo de cizalla al que es sometida cuando se bombea al módulo de ultrafiltración, o el descenso de actividad enzimática en el reactor es debido a fenómenos de adsorción sobre la membrana y/o del polímero depositado en la misma.

2. Las condiciones óptimas de operación para la eliminación de 4-clorofenol en reactor tanque continuo con módulo de ultrafiltración y la enzima soluble han sido: 0.04 mg/ml de enzima en el reactor, 0.002 mg/ml en la alimentación, relación molar $H_2O_2/4$ -clorofenol se sitúa en 1:1, con una concentración de 2.0 mM y tiempo de residencia de 20 minutos en el reactor.

En estos dispositivos la conversión en el reactor disminuyó de forma acusada con el tiempo de operación, mientras que la del permeado permaneció elevada y prácticamente constante a lo largo del tiempo. Este comportamiento refuerza la segunda hipótesis de las planteadas en la conclusión anterior, que la concentración de enzima en el reactor disminuye con el tiempo de operación debido a que el polímero que se forma en la reacción retiene en su interior moléculas de enzima que quedan también depositadas sobre la superficie de la membrana conservando su actividad catalítica. Esto ha sido demostrado en los experimentos adicionales en los que se evidenció que la enzima atrapada en el polímero depositado en la membrana conserva su actividad, presentando un comportamiento semejante al de una enzima inmovilizada.

3. El proceso de inmovilización de la peroxidasa de soja sobre el soporte PG 75-400 presentó un rendimiento de actividad de 72.18%, lo cual se considera un muy buen resultado para este tipo de inmovilizaciones en las que se implican residuos aminoácidos de la enzima que pueden estar cercanos a su centro activo.
4. Las condiciones óptimas de operación para la eliminación de 4-clorofenol en reactor tanque continuo con módulo de ultrafiltración y la enzima inmovilizada han sido: 0.08 mg/ml de enzima en el reactor, relación molar $H_2O_2/4$ -clorofenol 1:1, con una concentración de 2.0 mM

de ambos reactantes, y tiempo de residencia de 20 minutos en el reactor.

En estos sistemas experimentales independientemente de la concentración inicial de enzima utilizada, no se alcanza una conversión estacionaria en el reactor durante el tiempo del ensayo, sino que comienza a descender una vez alcanzado el máximo. Esta pérdida aparente de actividad enzimática es probablemente debida a la deposición sobre las partículas catalíticas del polímero que se forma durante la reacción, el cual limita la accesibilidad de 4-clorofenol a los sitios activos de la enzima, generando así una desactivación aparente de la enzima por la aparición de limitaciones difusionales.

5. Las condiciones óptimas de operación para la eliminación de 4-clorofenol en reactor de lecho fluidizado con módulo de ultrafiltración han sido: 12 mg de enzima en el reactor, relación molar $H_2O_2/4\text{-clorofenol}$ 1:1, con una concentración de 1.0 mM de ambos reactantes, y caudal de alimentación de 5 ml/min.

En estos dispositivos, a pesar del incremento de la cantidad de enzima en el reactor, no se alcanza una conversión estacionaria de 4-clorofenol. Esto es debido, por un lado, a que el polímero formado en la reacción se deposita en su mayor parte sobre las partículas del catalizador, provocando una barrera difusional al 4-clorofenol, y por otro, a que el polímero provoca la agregación de las partículas aumentando su tamaño y disminuyendo su desarrollo superficial.

6. De las diferentes configuraciones de reactor probadas para eliminar en un sistema en continuo 4-clorofenol, ya sea con la enzima soluble o inmovilizada, el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana y la enzima soluble fue la configuración más adecuada para dicho fin, puesto que permite trabajar con menos costes de operación, ofreciendo las conversiones estacionarias deseadas con una menor cantidad de enzima y evitando los costes derivados del proceso de inmovilización de la peroxidasa.

7. Se ha planteado y resuelto un modelo matemático que describe el comportamiento del dispositivo anterior. Una desviación típica del orden del 2.92% entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, y el valor calculado para la k_{cat} de la SBP (276 U/mg), prácticamente igual al obtenido a partir de medidas de actividad enzimática (278 U/mg), confirman la validez del modelo y de las hipótesis que lo soportan, incluidas el mecanismo cinético Ping-Pong y la proporcionalidad entre la fracción de poros no obstruidos de la membrana y la fracción de enzima no retenida en la misma.

8. Tanto en las medidas de actividad como en los ensayos en reactor tanque continuo con módulo de ultrafiltración la SBP presentó, de mayor a menor, el siguiente orden de eficacia de eliminación: 2-clorofenol 4-clorofenol, 3-clorofenol y por último fenol. Esta tendencia está determinada por la estabilidad de la estructura resonante que ofrecen las posiciones *orto* y *para* en el anillo fenólico, y por el mayor carácter reactivo que proporciona la presencia del cloro en el anillo fenólico.

9. Del estudio de la eliminación en continuo de una mezcla de compuestos fenólicos (fenol y 4-clorofenol) se concluye que al someter la SBP a la eliminación simultánea de los dos sustratos se alcanzan conversiones estacionarias con valores del orden del 90% para 4-clorofenol y del 70% para fenol, indicando el buen comportamiento de la enzima incluso en mezclas de compuestos. Asimismo se encontró que el aumento de la proporción de fenol afecta negativamente la eliminación de los compuestos fenólicos de la mezcla, mientras que un aumento de la proporción de 4-clorofenol la favorece o no la altera.

10. Del estudio comparativo de la SBP utilizada en esta investigación con los extractos crudos totales (ECT) de raíces transformadas (RT) de nabo y tabaco wt, se puede concluir que todas las isoenzimas (básicas neutras y ácidas) están involucradas en la eliminación de 4-clorofenol, aunque las isoenzimas básicas son las más vinculadas en el proceso catalítico oxidativo de 4-clorofenol.

Los resultados de la eliminación de 4-clorofenol en presencia del efluente industrial abren la posibilidad del uso de las peroxidasas ensayadas para la eliminación de 4-clorofenol en efluentes industriales, ya que han demostrado no verse afectadas negativamente por la presencia de otras sustancias presentes en la muestra real del estudio, sino que por el contrario se ve favorecida su actividad enzimática.

Asimismo, los extractos crudos totales (ECT) de raíces transformadas (RT) de nabo y tabaco wt podrían constituir una alternativa interesante a las peroxidasas purificadas para el tratamiento de compuestos fenólicos.



15. BIBLIOGRAFÍA

15. BIBLIOGRAFÍA

[1] Marin R. (1995). Compuestos orgánicos en las aguas, presencia e importancia. *Ingeniería Química*. **314**, 159-165.

[2] Reisch M.S. (1994). Top 50 chemicals production stagnered last year. *Chemical Engineering News*. **72**, 12-16.

[3] McMurry J. (1994). Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamérica. México.

[4] Extraído el 19 de septiembre de 2011 de Ambient water quality criteria for chlorinated phenol. Disponible en internet: http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2001_10_12_criteria_ambientwqc_chlorinatedphenols80.pdf

[5] Extraído el 19 de septiembre de 2011 de las fichas internacionales de seguridad química. Disponible en internet: <http://www.grupoprevenir.es/fichas-seguridad-sustancias-quimicas/0850.htm>

[6] Extraído el 19 septiembre de 2011 de las fichas internacionales de seguridad química. Disponible en internet: <http://www.grupoprevenir.es/fichas-seguridad-sustancias-quimicas/0150.htm>

[7] Extraído el 19 septiembre de 2011 de las fichas internacionales de seguridad química. Disponible en internet: <http://www.grupoprevenir.es/fichas-seguridad-sustancias-quimicas/0849.htm>

[8] Leyva S., Crispin I. (1998). Oxidación química de los clorofenoles presentes en agua mediante agentes oxidantes fuertes. *Información Tecnológica*. **9**, 317-325.

[9] Extraído el 19 septiembre de 2011 del Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. Disponible en internet: <http://www.prtr-es.es/>

[10] Extraído el 19 septiembre de 2011 del Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. Disponible en internet: <http://www.prtr-es.es/registros-de-emisiones-en-el-mundo/prtr-europa-de-eper-a,15480,10,2007.html>

[11] Autenrieth R.L., Bonner J.S. (1991). Biodegradation of phenolic wastes. *Journal of Hazardous Materials*. **28**, 29-53.

[12] Krijgsheld K.R., Van Der Gen A. (1986). Assesment of impact of the emission of certain organochlorine compounds on the aquatic environment. Part 1: Monochlorophenols and 2, 4-Dichlorophenol. *Chemosphere*. **15**, 825-860.

[13] Lahaniatis E.S., Bergheim W., Kotzias D., Pilidis G. (1994). Formation of chlorinated hydrocarbons by water chlorination. *Chemosphere*. **28**, 229-235.

[14] Busca G., Berardinelli S., Resini C., Arrighi L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials*. **160**, 265-288.

[15] El-Hendawy A.N.A., Samra S.E., Girgis B.S. (2001). Adsorption characteristics of activated carbons obtained from corncobs. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **180**, 209-221.

[16] Tay J.H., Chen X.G., Jeyaseelan S., Graham N. (2001). Optimising the preparation of activated carbon from digested sewage sludge and coconut husk. *Chemosphere*. **44**, 45-51.

[17] Arafat H.A., Hebatpuria V.M., Rho H.S., Pinto N.G., Bishop P.L., Buchanan R.C. (1999). Immobilization of phenol in cement-based solidified/stabilized hazardous wastes using regenerated activated carbon: role of carbon. *Journal of Hazardous Materials*. **70**, 139-156.

[18] García-Mendieta A., Solache-Rios M., Olguin M.T. (2003). Comparison of phenol and 4-chlorophenol adsorption in activated carbon with different physical properties. *Separation Science and Technology*. **38**, 2549-2564.

[19] Namasivayam C., Kavitha D. (2003). Adsorptive removal of 2-chlorophenol by low-cost coir pith carbon. *Journal of Hazardous Materials B*. **98**, 257-274.

[20] Radices M., Palanivelu K. (2006). Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent-Kinetics and isotherm analysis. *Journal of Hazardous Materials B*. **138**, 116-124.

[21] Aksu Z., Yener J. (2001). A comparative adsorption/biosorption study of monochlorinated phenols onto various sorbents. *Waste Management*. **21**, 695-702.

[22] Rengaraj S., Seug-Hyeon M., Sivabalan R., Arabindoo B., Murugesan V. (2002). Agricultural solid waste for the removal of organics: adsorption of phenol from water and wastewater by palm seed coat activated carbon. *Waste Management*. **22**, 543-548.

[23] Rengaraj S., Moon S.H., Sivabalan R., Arabindoo B., Murugesan V. (2002). Removal of phenol from aqueous solution and resin manufacturing industry wastewater using an agricultural waste: rubber seed coat. *Journal of Hazardous Materials*. **89**, 185-196.

[24] Podkoscielny P., Dabrowski A., Marijuk O.V. (2003). Heterogeneity of active carbons in adsorption of phenol aqueous solutions. *Applied Surface Science*. **205**, 297-303.

[25] Namasivayam C., Thamaraiselvi K. (1998). Adsorption of 2-chlorophenol by waste red mud. *Fresenius Environmental Bulletin*. **7**, 314-319.

[26] Gupta V.K., Ali I., Saini V.K. (2004). Removal of chlorophenols from wastewaters using red mud: an aluminium industry waste. *Environmental Science and Technology*. **38**, 4012-4018.

[27] Ajay K., Vinod K.G., Shubhi J., Suhas. (2004). Removal of chlorophenols using industrial wastes. *Environmental Science and Technology*. **38**, 1195-1200.

[28] Srivastava S.K., Tyagi R. (1994). Removal of substituted phenols by activated carbon (developed from fertilizer waste) and some thermodynamic aspects. *Fresenius Environmental Bulletin*. **3**, 12-17.

[29] Bratek K., Bratek W., Kulazynski M., Suszynska S., Brodzik K. (2004). Removing of p-chlorophenol by sorbents from biomass. *Polish Journal of Chemical Technology*. **6**, 5-8.

[30] Achak M., Hafidi A., Ouazzani N., Sayadi S., Mandi L. (2009). Low cost biosorbent "banana peel" for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials*. **166**, 117-125.

[31] Brasquet C., Subrenat E., Le Cloirec P. (1999). Removal of phenolic compounds from aqueous solution by activated carbon cloths. *Water Science and Technology*. **39**, 201-205.

[32] Bilgili M.S. (2006). Adsorption of 4-chlorophenol from aqueous solutions by XAD-4 resin: Isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis. *Journal of Hazardous Materials*. **137**, 157-164.

[33] Farajzadeh M.A., Rasoul F.M. (2005). Study of phenolic compounds removal from aqueous solution by polymeric sorbent. *Journal of the Chinese Chemical Society*. **52**, 295-301.

[34] Ku Y., Lee K.C. (2000). Removal of phenols from aqueous solution by XAD-4 resin. *Journal of Hazardous Materials*. **80**, 59-68.

[35] Li A., Zhang Q., Wu H., Zhai Z., Liu F., Fei Z., Long C., Zhu Z. (2004). A new amine-modified hypercrosslinked polymeric adsorbent for removing phenolic compounds from aqueous solutions. *Adsorption Science and Technology*. **22**, 807-819.

[36] Li A., Long C., Sun Y., Zhang Q., Liu F., Chen J. (2002). A new phenolic hydroxyl modified polystyrene adsorbent for the removal of phenolic compounds from their aqueous solutions. *Separation Science and Technology*. **37**, 3211-3226.

[37] Oh C., Ahn J., Ihm S. (2003). Adsorptive removal of phenolic compounds by using hypercrosslinked polystyrenic beads with bimodal pore size distribution. *Reactive and Functional Polymers*. **57**, 103-111.

[38] Yousef R. I., Tutunji M.F., Derwish G.A.W., Musleh S.M. (1999). Chemical and structural properties of Jordanian zeolitic tuffs and their admixtures with urea and thiourea: potential scavengers for phenolics in aqueous medium. *Journal of Colloid and Interface Science*. **216**, 348-359.

[39] Okolo B., Park C., Keane M.A. (2000). Interaction of phenol and chlorophenols with activated carbon and synthetic zeolites in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*. **226**, 308-317.

[40] Solache-Rios M., Olguin M.T., Garcia-Sosa I., Jimenez-Becerril J. (2004). Evaluation of the sorption properties of a Mexican organo clinoptilolite-rich tuff for phenol and 4-chlorophenol. *Environmental Technology*. **25**, 819-824.

[41] Wibulswas R., White D., Rautiu R. (1999). Adsorption of phenolic compounds from water by surfactant-modified pillared clays. *Process Safety and Environmental Protection*. **77**, 88-92.

[42] Banat F.A., Al-Bashir B., Al-Asheh S., Hayajneh O. (2000). Adsorption of phenol by bentonite. *Environmental Pollution*. **107**, 391-398.

[43] Akcay M., Akcay G. (2004). The removal of phenolic compounds from aqueous solutions by organophilic bentonite. *Journal of Hazardous Materials*. **113**, 189-193.

[44] El-Nabarawy T., Khedr S.A. (2000). Removal of pollutants from water using untreated and treated sawdust and water hyacinth. *Adsorption Science and Technology*. **18**, 385-398.

[45] Aksu Z., Akpinar D. (2001). Competitive biosorption of phenol and chromium (VI) from binary mixtures onto dried anaerobic activated sludge. *Biochemical Engineering Journal*. **7**, 183-193.

[46] Akbal F. (2005). Sorption of phenol and 4-chlorophenol onto pumice treated with cationic surfactant. *Journal of Environmental Management*. **74**, 239-244.

[47] Lin Y., Fugetsu B., Terui N., Tanaka S. (2005). Removal of organic compounds by alginate gel beads with entrapped activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*. **120**, 237-241.

[48] Denizli A., Cihangir N., Tuzmen N., Alsancak G. (2004). Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor caju*. *Bioresource Technology*. **96**, 59-62.

[49] Yin J., Chen R., Ji Y., Zhao C., Zhao G., Zhang H., Akbal F. (2010). Adsorption of phenols by magnetic polysulfone microcapsules containing tributyl phosphate. *Chemical Engineering Journal*. **157**, 466-474.

[50] Greninger D.C., Burns G.P., Gary P., Lynn S., Hanson D., Donald N., King C.J. (1982). Solvent extraction of phenols from water. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*. **21**, 51-54.

[51] American Water Works Association Research Foundation, Lyonnaise des Eaux, Water Research Commission of South Africa. (1999). Tratamiento del agua por procesos de membrana. Mc Graw Hill. Madrid.

[52] Extraído el 23 de septiembre de 2011 de Aplicaciones en alimentos y bebidas. Disponible en internet: www.geafiltration.com/Espanol/mercados-aplicaciones/aplicaciones-alimentos-bebidas.htm

[53] Extraído el 23 de septiembre de 2011 de Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. Capítulo 19: La Reutilización de las Aguas Residuales. (2003). Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. Disponible en internet:<http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/contenido/capitulo19.html>

[54] Goswami A.N.; Sharma S.K.; Sharma A.; Gupta T.C.S.M. (1992). Removal of phenol from refinery waste waters using liquid surfactant membranes in a continuous column contactor. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Bio-inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry*. **31A**, 361-365.

[55] Ozaki H., Li Huafang. (2001). Rejection of organic compounds by ultra-low pressure reverse osmosis membrane. *Water Research*. **36**, 123-130.

[56] Laine J-M., Glucina K., Malleret L., Bruchet A., Baudin I., Jacangelo J.G. (2001). Assessment of membrane processes for taste and odour removal. *Water Science and Technology: Water Supply*. **1**, 19-24.

[57] Alemán Pérez, A. (2004). “Estudios de osmosis inversa y de evaporación sobre la corriente de salida del biorreactor de membrana, en el proceso de tratamiento de los vertidos de la industria del curtido”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Universidad de Murcia.

[58] Park Y., Skelland A.H.P., Forney L.J., Kim J-H. (2006). Removal of phenol and substituted phenols by newly developed emulsion liquid membrane process. *Water Research*. **40**, 1763-1772.

[59] Kuntiya A., Silva S.F.J., Nicolella C., Pyle D.L. (2005). Phenol degradation using a membrane biofilm reactor. World Congress of Chemical Engineering, 7th.

[60] Ng Y.S., Jayakumar N.S., Hashim M.A. (2011). Behavior of hydrophobic ionic liquids as liquid membranes on phenol removal: Experimental study and optimization. *Desalination*. **278**, 250-258.

[61] Extraído el 25 de septiembre de 2011 de Catalizadores para purificación de aguas industriales que contengan compuestos resistentes a la biodegradación. Disponible en internet: <http://www.icp.csic.es/cyted/Monografias/Monografias1998/B2-259.pdf>

[62] Hussain S.T., Sayari A., Larachi F. (2001). Novel K-doped Mn-Ce-O wet oxidation catalysts with enhanced stability. *Journal of Catalysis*. **201**, 153-157.

[63] Hu X., Lam F.L.Y., Cheung L.M., Chan K.F., Zhao X.S., Lu G.Q. (2001). Copper/MCM-41 as catalyst for photochemically enhanced oxidation of phenol by hydrogen peroxide. *Catalysis Today*. **68**, 129-133.

[64] Christoskova S.G., Stoyanova M., Georgieva M. (2001). Low-temperature iron-modified cobalt oxide system–Part 2. Catalytic oxidation of phenol in aqueous phase. *Applied Catalysis A: General*. **208**, 243-249.

[65] Shin E.J., Keane M.A. (1999). Detoxification of dichlorophenols by catalytic hydrodechlorination using a nickel/silica catalyst. *Chemical Engineering Science*. **54**, 1109-1120.

[66] Shin E.J., Keane M.A. (2000). Structure sensitivity in the hydrodechlorination of chlorophenols. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*. **69**, 3-8.

[67] Kulkarni U.S., Dixit S.G. (1991). Destruction of phenol from wastewater by oxidation with $\text{SO}_3\text{-O}_2$. *Industrial Engineering Chemistry Research*. **30**, 1916-1920.

[68] Ioffe I.I., Rubinskaya E.V. (1997). Reaction of catalytic by liquid water and its application to waste water purification. *Industrial Engineering Chemistry Research*. **30**, 1293-1300.

[69] Conway B.E., Ayranci E., Al-Maznai H. (2001). Used of quasi-3-dimensional porous electrodes for adsorption and electrocatalytic removal of impurities from wastewaters. *Electrochimia Acta*. **47**, 705-718.

[70] Al-Maznai H., Conway B.E. (2001). Auto-inhibition effects in anodic oxidation of phenols for electrochemical waste-water purification. *Journal of the Serbian Chemical Society*. **66**, 765-784.

[71] Rodríguez, F. X. (2003). "Síntesis, caracterización y actividad catalítica de nuevas formulaciones de catalizadores de cobre, níquel y zinc, estables en la reacción de oxidación de fenol y 2-clorofenol en fase acuosa en reactores trifásicos". *Tesis Doctoral*. Universidad Rovira y Virgili, Tarragona.

[72] Gutiérrez M., Pina P., Torres M., Cauqui M.A., Herguido J. (2010). Catalytic wet oxidation of phenol using membrane reactors: A comparative study with slurry-type reactors. *Catalysis Today*. **149**, 326-333.

[73] Botas J.A., Melero J.A., Martínez F., Pariente M.I. (2010). Assessment of $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ catalysts for the continuous treatment of phenol aqueous solutions in a fixed bed reactor. *Catalysis Today*. **149**, 334-340.

[74] Ding J., Chen F., Wu S., Rong S., Feng C. (2000). Treatment of phenolcontaining wastewater by supercritical water oxidation process. *Huanjing Wuran Yu Fangzhi*. **22**, 1-3. (Abstract disponible en Scifinder scholar).

[75] Yunzheng Pi., Jianlong W. (2006). The mechanism and pathway of the ozonation of 4-chlorophenol in aqueous solution. *Science in China, Series B: Chemistry*. **49**, 379-384.

[76] Chamarro E., Marco A., Esplugas S. (2001). Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Research*. **35**, 1047- 1051.

[77] Benitez F.J., Beltran-Heredia J., Acero J.L., Rubio F.J. (2000). Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation processes. *Chemosphere*. **41**, 1271-1277.

[78] Shan Z., Chuanwen C. (2004). Treatment of wastewater containing 4-chlorophenol by E-Fenton technique. *Huanjin Wurang Zhili Jishu Yu Shebei*. **5**, 56-59. (Abstract disponible en Scifinder scholar).

[79] Iniesta J., González- García. J., Expósito E., Montiel V., Aldaz A. (2001). Influencié of chloride ion on electrochemical degradation of phenol in alkaline medium using bismuth doped and pure PbO₂ anodes. *Water Research*. **35**, 3291-3300.

[80] De A.K., Chaudhuri B., Bhattacharjee S. (1999). A kinetic study of the oxidation of phenol, o-chlorophenol and catechol by hydrogen peroxide between 298 K and 333K: the effect of pH, temperature and ratio of oxidant to substrate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **74**, 162-168.

[81] Lefèvre S., Boutin O., Ferrasse J. H., Malleret L., Faucherand R., Viand A. (2011). Thermodynamic and kinetic study of phenol degradation by a non-catalytic wet air oxidation process. *Chemosphere*. **84**, 1208-1215.

[82] Jakob L., Hashem T.M., Bürki S., Guindy M.N., Braun A.M. (1993). Vacuum-ultraviolet (VUV) photolysis of water oxidative degradation of 4-chlorophenol. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **75**, 97-103.

[83] Matafonova G., Shirapova G., Zimmer C., Gifforn F., Batoev V., Kohring G. (2006). Degradation of 2, 4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. Isolated from an aeration pond in the Baikalsk pulp and paper mill (Russia). *International Biodeterioration and Biodegradation*. **58**, 209-212.

[84] Matafonova G., Christofi N., Batoev V., Sosnin E. (2008). Degradation of chlorophenols in aqueous media using UV XeBr excilamp in a flow through reactor. *Chemosphere*. **70**, 1124-1127.

[85] Gomez M., Murcia M.D., Gomez J.L., Matafonova G., Batoev V., Christofi N. (2010). Testing a KrCl excilamp as new enhanced UV source for 4-chlorophenol degradation: Experimental results and kinetic model. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **49**, 113-119.

[86] Gómez M., Murcia M.D., Gómez E., Gómez J.L., Christofi N. (2011). Degradation of phenolic pollutants using KrCl and XeBr excilamps in the presence of dye: A comparative study. *Desalination*. **274**, 156-163.

[87] Murcia M.D., Gómez M., Gómez E., Gómez J.L., Christofi N. (2011). Photodegradation of Congo red using XeBr, KrCl and Cl₂ barrier discharge excilamps: A kinetics study. *Desalination*. **281**, 364-371.

[88] Raja P., Bozzi A., Jardim W.F., Mascolo G., Renganathan R., Kiwi J. (2005). Reductive/oxidative treatment with superior performance relative to oxidative treatment during the degradation of 4-chlorophenol. *Applied Catalysis B: Environmental*. **59**, 249-257.

[89] Torrades F., Pérez M., Mansilla H.D., Peral J. (2003). Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of cellulose bleaching effluents. *Chemosphere*. **53**, 1211-1220.

[90] Glaze W., Kenneke J., Ferry J. (1993). Chlorinated by-products from the TiO₂ mediated photodegradation of trichloroethylene and tetrachloroethylene in water. *Environmental Science and Technology*. **27**, 177-184.

[91] Almehmet B., Inel Y. (1993). Photocatalytic degradation of 4-chlorophenol in aqueous titanium dioxide suspensions: the influence of hydrogen peroxide on the photocatalytic mineralization rate. *Turkish Journal of Chemistry*. **17**, 125-132.

[92] Enriquez R., Pichat P. (2006). Different net effect of TiO₂ sintering temperature on the photocatalytic removal of 4-chlorophenol, 4-chlorobenzoic acid and dichloroacetic acid in water. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. **41**, 955-966.

[93] Yang Y., Sun Z., Chen Y. (2004). Photocatalytic degradation of phenol and chlorinated phenols using nanometer TiO₂ thin films. *Taiyangneng Xuebao*. **25**, 63-67. (Abstract disponible en Scifinder scholar).

[94] Luenloi T., Chalermssinsuwan B., Sreethawong T., Hinchiranan N. (2011). Photodegradation of phenol catalyzed by TiO₂ coated on acrylic sheets: Kinetics and factorial design analysis. *Desalination*. **274**, 192-199.

[95] Houari M., Saidi M., Tabet D., Pichat P., Khalaf H. (2005). The removal of 4-chlorophenol and dichloroacetic acid in water using Ti-, Zr- and Ti/Zr- pillared bentonites as photocatalyst. *American Journal of Applied Sciences*. **2**, 1136-1140.

[96] Orlov A., Chan M.S., Jefferson D.A., Zhou D., Lynch R.J., Lambert R.N. (2006). Photocatalytic degradation of water-soluble organic pollutants on TiO₂ modified with gold nanoparticles. *Environmental Technology*. **27**, 747-752.

[97] Guillard C., Disdier J., Monnett C., Dussaud J., Malato S., Blanco J., Maldonado M.I., Herrmann J-M. (2003). Solar efficiency of a new deposited titania photocatalyst: chlorophenol, pesticide and dye removal applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. **46**, 319-332.

[98] Moonsiri M., Rangsunvigit P., Chavadej S., Gulari E. (2004). Effects of Pt and Ag on the photocatalytic degradation of 4-chlorophenol and its by-products. *Chemical Engineering Journal*. **97**, 241-248.

[99] Pichat P., Khalaf H., Tabet D., Houari M., Saidi M. (2005). Timontmorillonite as photocatalyst to remove 4-chlorophenol in water and methanol in air. *Environmental Chemistry Letters*. **2**, 191-194.

[100] Mantilla A., Tzompantzi F., Fernández J.L., Díaz J.A.I., Gómez R. (2010). Photodegradation of phenol and cresol in aqueous medium by using Zn/Al + Fe mixed oxides obtained from layered double hydroxides materials. *Catalysis Today*. **150**, 353-357.

[101] Bauer R. (1994). Applicability of solar irradiation for photochemical wastewater treatment. *Chemosphere*. **29**, 1225-1233.

[102] Beltran F.J., Rivas F.J., Gimeno O. (2005). Comparison between photocatalytic ozonation and other oxidation processes for the removal of phenols from water. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **80**, 973-984.

[103] Ruppert G., Bauer R., Heisler G. (1994). UV-O₃, UV-H₂O₂, UV-TiO₂ and the photo-Fenton reaction-comparison of advanced oxidation processes for wastewater treatment. *Chemosphere*. **28**, 1447-1454.

[104] Ahmed S., Rasul M.G., Martens W.N., Brown R., Hashib M.A. (2010). Heterogeneous photocatalytic degradation of phenols in wastewater: A review on current status and developments. *Desalination*. **261**, 3-18.

[105] Ince N.H., Apikyan I.G. (2000). Combination of activated carbon adsorption with light-enhanced chemical oxidation via hydrogen peroxide. *Water Research*. **34**, 4169-4176.

[106] Extraído el 25 de septiembre de 2011 de Ciencias de la tierra y del medio ambiente. Disponible en internet: <http://www.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/11CAgu/180Depur.htm>

[107] Zamocky M., Godocikova J., Koller F., Polek B. (2001). Potential application of catalase-peroxidase from *Comamonas terrigena* N3H in the biodegradation of phenolic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*. **79**, 109-117.

[108] Luke A.K., Burton S.G. (2001). A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. *Enzyme and Microbial Technology*. **29**, 348-356.

[109] Lu Y., Yan L., Wang Y., Zhou S., Fu J., Zhang J. (2009). Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials* **165**, 1091-1097.

[110] García García I., Jiménez Peña P.R., Bonilla Venceslada J.L., Martín Martín A., Martín Santos M.A., Ramos Gómez E. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. **35**, 751-758.

[111] Juárez Ramírez C., Ruíz Ordaz N., Cristiani Urbina E., Galíndez Mayer J. (2001). Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **17**, 697-705.

[112] González G., Herrera M.G., García M.T., Peña M.M. (2001). Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*. **80**, 137-142.

[113] Chin W.C., Mei L.C., Jen L.C., Shang C.N., Zong H.C. (2000). Biodegradation of 2, 4, 6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria. *Chemosphere*. **41**, 1873-1879.

[114] Soda S., Uesugi K., Ike M., Fujita M. (1999). Application of a floccforming genetically engineered microorganism to a sequencing batch reactor for phenolic wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **88**, 85-91.

[115] Cordova-Rosa S.M., Dams R.I., Cordova-Rosa E.V., Radetski M.R., Corrêa A.X.R., Radetski C.M. (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*. **164**, 61-66.

[116] Gallego A., Gemini V., Rossi S., Fortunato M. S., Planes E., Gómez C. E., Korol S. E. (2009). Detoxification of 2, 4, 6-trichlorophenol by an indigenous bacterial community. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **63**, 1073-1078.

[117] Kaushik G., Gopal M., Thakur I. S. (2010). Evaluation of performance and community dynamics of microorganisms during treatment of distillery spent wash in a three stage bioreactor. *Bioresource Technology*. **101**, 4296-4305.

[118] León-Santiestebán H., Meraz M., Wrobel K., Tomasini A. (2011). Pentachlorophenol sorption in nylon fiber and removal by immobilized *Rhizopus oryzae* ENHE. *Journal of Hazardous Materials*. **190**, 707-712.

[119] Olaniran A. O., Igbinsola E. O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*. **83**, 1297-1306.

[120] Duran, N., y Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*. **28**, 83-99.

[121] Wright H., Nicell J.A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*. **70**, 69-79.

[122] Henriksen. A. Mirza O., Indiani C., Teilum K, Smulevich G, Welinder J.G., Gajhede M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, **10**, 108-115.

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

[124] Kennedy K., Alemanyn K., Warith M. (2002). Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2, 4-dichlorophenol. *Water SA*. **28**, 149-158.

[125] Wilberg K., Assenhaimer C., Rubio J. (2002). Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **77**, 851-857.

[126] Caza N., Bewtra J.K., Biswas N., Taylor K.E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research*. **33**, 3012-3018.

[127] Zhang G.P., Nicell J.A. (2000). Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxidases. *Water Research*. **34**, 1629-1637.

[128] Bhunia A., Durani S., Wangikar P.P. (2001). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*. **72**, 562-567.

[129] Wagner M., Nicell J.A. (2002). Detoxification of phenolic solutions with peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research*. **36**, 4041-4052.

[130] López D., Hiner N.P., Tudela J., García F., Rodríguez J.N. (2003). Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus L.*) extracts. *Enzyme and Microbial Technology*. **33**, 738-742.

[131] Cardinali A., Tursi N., Ligorio A., Giuffrida M. G., Napolitano L., Caliandro R., Sergio L., Di Venere D., Lattanzio V., Sonnante G. (2011). Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry*. **49**, 395-403.

[132] Ikehata K., Buchanan I.D. (2002). Screening of *Coprinus* species for the production of extracellular peroxidase and evaluation of the enzyme for the treatment of aqueous phenol. *Environmental Technology*. **23**, 1355-1367.

[133] Sakurai A., Masuda M., Sakakibara M. (2003). Effect of surfactants on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalysed by *Coprinus cinereus* peroxidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **78**, 952-958.

[134] Ibrahim M.S., Ali H.I., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K. (1997). Removal of phenol from industrial wastewaters using *Arthromyces ramosus* peroxidase in a continuous system. *52nd Purdue Industrial Waste Conference Proceedings*, 271-277.

[135] Buchanan I.D., Han Y.S. (2000). Assessment of the potential of *Arthromyces ramosus* peroxidase to remove phenol from industrial wastewaters. *Environmental Technology*. **21**, 545-552.

[136] Greco G., Toscana G., Cioffi M., Gianfreda L., Sannino F. (1999). Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water Research*. **33**, 3046-3050.

[137] La Rotta-Hernandez C. E., Lütz S., Liese A., Bon E.P.S. (2005). Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. *Enzyme and Microbial Technology*. **37**, 582-588.

[138] Ikehata K., Nicell J.A. (2000). Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*. **74**, 191-199.

[139] Krastanov A. (2000). Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and Polyclar adsorption. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **24**, 383-388.

[140] Ispas C. R., Ravalli M. T., Steere A., Andreescu S. (2010). Multifunctional biomagnetic capsules for easy removal of phenol and bisphenol A. *Water Research*. **44**, 1961-1969.

[141] Yamagishi T., Leite j., Ueda S., Yamaguchi F., Suwa Y. (2001). Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Water Research*. **35**, 3089-3096.

[142] Edwards W., Leukes W.D., Rose P.D., Burton S.G. (1999). Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation-membrane reactor systems and modelling. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**, 769-773.

[143] Hamid M., Khalil-ur-Rehman. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*. **115**, 1177-1186.

[144] Hirooka T., Akiyama Y., Tsuji N., Nakamura T., Nagase H., Hirata K., Miyamoto K. (2003). Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **95**, 200-203.

[145] Extraído el 28 de septiembre de 2011 de Bioremediación. Disponible en internet: <http://www.ecologialapampa.gov.ar/agenda-ambiental/bioremediacion.html>

[146] González P.S, Capozucca C.E., Tigierm H.A., Milrad S.R., Agostini E. (2006). Phytoremediation of phenol from wastewater, by peroxidases of tomato hairy root cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**, 647-653.

[147] Talano M.A., Frontera S., González P., Medina M.I., Agostini E. (2010). Removal of 2, 4-diclorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *Journal of Hazardous Materials*. **176**, 784–791.

[148] Ibáñez S.G., Medina M.I., Agostini E. (2011). Phenol tolerance, changes of antioxidative enzymes and cellular damage in transgenic tobacco hairy roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Chemosphere*. **83**, 700-705.

[149] Siddique M.H., Pierre C.C., Biswas M., Bewtra J.K., Taylor K.E. (1993). Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. *Water Research*. **27**, 883-890.

[150] Brown. B.R. (1967). Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols. In: Taylor, W.I., A.R. Battersby (eds.), *Oxidative coupling of phenols*. 167-201. Marcel Dekker, New York.

[151] Nissum M., Schiodt C.B., Welinder K.G. (2001). Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2.4-12.0, and veratryl alcohol at pH 2.4. *Biochimica and Biophysica Acta*. **1545**, 339-348.

[152] Akkara J., Ayyagari M., Kaplan D. (2002). Large-scale production polyphenols or polyaromatics amines using enzyme-mediated reactions. United States Patents. Patent No. 6.444.450 B2. Extraído el 26 de Enero 2012, de <http://www.freepatentsonline.com/6444450.pdf>.

[153] Pardilla J. (2007). “Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación en electrocatálisis”. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.

[154] Buchanan I.D., Nicell J.A. (1997). Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and Bioengineering*. **54**, 251-261.

[155] Wu Y., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K. (1999). Kinetic model for removal of phenol by peroxidase-catalyzed treatment of phenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **77**, 419-428.

[156] Abelskov A.J., Smith A.T., Rasmussen C.B., Dunford H.B., Welinder K.G. (1997). pH dependence and structural interpretation of the reactions of *Coprinus cinereus* peroxidase with hydrogen peroxide, ferulic acid, and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). *Biochemical Journal*. **36**, 9453-9463.

[157] Al-Kassim L., Taylor K.E. (1994). Enzymic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from *Coprinus Macrorrhizus* in batch reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **61**, 179-182.

[158] Al-Kassim L., Taylor K.E., Bewtra J.K., Biswas N. (1994). Optimization of phenol removal by a fungal peroxidase from *Coprinus macrorrhizus* using batch, continuous, and discontinuous semibatch reactors. *Enzyme and Microbial Technology*. **16**, 120-124.

[159] Zhan Y., Yan Y., Zhang W., Chen M., Lu W., Ping S., Lin M. (2012). Comparative analysis of the complete genome of an *Acinetobacter calcoaceticus* strain adapted to a phenol-polluted environment. *Research in Microbiology*. **163**, 36-43.

[160] Yao P., Matsumoto Y., Tsujimura H., Takaya M., Toka K. (1995). Enhanced production of peroxidase in continuous culture of *Arthromyces ramosus* by selective bleeding of mycelium. *Journal of Fermentation Bioengineering*. **79**, 307-312.

[161] Villalobos D.A., Buchanan I.D. (2002). Removal of aqueous phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. *Journal of Environmental Engineering and Science*. **1**, 65-73.

[162] La Rotta-Hernandez C.E., Bon E.P.S. (2002). 4-Chlorophenol degradation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: formation of insoluble products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **98**, 191-203.

[163] Akhtar S., Husain Q. (2006). Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere*. **65**, 1228-1235.

[164] Santos de Araujo B., Dec J., Bollag J.M., Pletsch M. (2006). Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*. **63**, 642-651.

[165] Welinder K.G., Mauro J.M., Norskov L.L. (1992). Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions*. **20**, 337-340.

[166] Schomburg D., Saltzmann M., Stephan D. (1991). Enzyme Handbook. Vol 7, Springer-Verlag. Berlin.

[167] Wu J., Taylor K.E., Bewtra J.K., Biswas N. (1993). Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. *Water Research*. **12**, 1701-1706.

[168] González L.F. (2002). "Desarrollo de sistemas bioenzimáticos para automatización y control". *Trabajo Fin de Carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[169] Klivanov A.M., Alberty B.N., Morris E.D., Felshin L. (1980). Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *Journal of Applied Biochemistry*. **2**, 414-421.

[170] Klivanov A.M. (1982). Enzymatic removal of hazardous pollutants from industrial aqueous effluent. *Enzyme Engineering*. **6**, 319-323.

[171] Klivanov A.M., Tu T.M., Scott K.P. (1983). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science*. **221**, 259-260.

[172] Cooper V.A., Nicell J.A. (1996). Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research*. **30**, 954-964.

[173] Buchanan I.D., Nicell J.A., Warner M. (1998). Reactor models for horseradish peroxidase-catalyzed aromatic removal. *Journal of Environmental Engineering*. **124**, 794-802.

[174] Gillikin J.W., Graham J.S. (1991). Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. *Plant Physiology*. **96**, 214-220.

[175] Feis A., Howe B.D., Indiani C., Smulevich G. (1998). Resonance Raman and electronic absorption spectra of horseradish peroxidase isoenzyme A2: evidence for a quantum-mixed spin species. *Journal of Raman Spectroscopy*. **29**, 933-938.

[176] Howes B.D., Schiodt C.B., Welinder K.G., Marzocchi M.P., Ma J.G., Zhang J., Shelnut J.A., Smulevich G. (1999). The quantum mixed-spin heme state to Barley peroxidase. A paradigm for class III peroxidases. *Biophysical Journal*. **77**, 478-492.

[177] Nissum M., Feis A., Smulevich G. (1998). Characterization of soybean seed coat peroxidase resonance Raman evidence for a structure-based classification of plant peroxidases. *Biospectroscopy*. **4**, 335-364.

[178] Smulevich G., Paoli M., Burke J.F., Sanders S.A., Thorneley R.N.F., Smith A.T. (1994). Characterization of recombinant horseradish peroxidase C and three site-directed mutants, F41V, F41W, and R38K, by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*. **33**, 7398-7407.

[179] Kraus J.J., Munir I.Z., McEldoon J.P., Clark D.S., Dordick J.S. (1999). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons catalyzed by soybean peroxidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **80**, 221-230.

-
-
- [180] Geng Z., Rao K.J., Bassi A.S., Gijzen M., Krishnamoorthy N. (2001). Investigation of bio-catalytic properties of soybean seed hulls peroxidase. *Catalysis Today*. **64**, 233-238.
- [181] McEldoon J.P., Dordick J.S. (1996). Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnology Progress*. **12**, 555-558.
- [182] Bassi A., Geng Z., Gijzen M. (2004). Enzymatic removal of phenol and chlorophenols using soybean seed hulls. *Engineering in Life Sciences*. **4**, 125-130.
- [183] Gijzen M., Huystee R., Buzzell R.I. (1993). Soybean seed coat peroxidase. A comparison of high-activity and low-activity and low-activity genotypes. *Plant Physiology*. **103**, 1061-1066.
- [184] Trivedi U.J., Bassi A.S., Zhu J.X. (2006). Investigation of phenol removal using sol-gel/alginate immobilized soybean seed peroxidase. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. **84**, 239-247.
- [185] Trivedi U.J., Bassi A.S., Zhu J.X. (2006). Continuous enzymatic polymerization of phenol in a liquid-solid circulating fluidized bed. *Power Technology*. **169**, 61-70.
- [186] Extraído el 30 de septiembre de 2011 de Aprovechamientos de residuos de alcachofa. Disponible en internet: <http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6303/1/Aprovechamiento%20de%20Residuos%20de%20Alcachofa-Aspectos%20Teoricos.pdf>
- [187] Rodríguez J.N., Tudela, J., García F. (2000) Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados. Patente N° P200002544(7).
- [188] Arroyo M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. **39**, 23-39.
-
-

[189] Kennedy J.F., Cabral J.M.S. (1983). Solid-phase biochemistry. John Wiley and Sons. New York.

[190] Messing R.A. (1975). Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Academic Press. New York.

[191] Peralta-Zamora P., Esposito E., Pelegrini R., Groto R., Reyes J., Durán N. (1998). Effluent treatment of pulp and paper and textile industries using immobilized horseradish peroxidase. *Environmental Technology*. **19**, 55-63.

[192] Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vázquez M.A., García-Almendarez B.E., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R, Regalado C. (2008). Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresource Technology*. **99**, 8605-8611.

[193] Salis A., Pisano M., Monduzzi M., Solinas V., Sanjust E. (2009) Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **58**, 175-180.

[194] Shukla S.P., Modi K., Ghosh P.K., Devi S. (2003). Immobilization of horseradish peroxidase by entrapment in natural polysaccharide. *Journal of Applied Polymer Science*. **91**, 2063-2071.

[195] Cheng J., Yu S.M., Zuo P. (2006). Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research*. **40**, 283-290.

[196] Fernandes K.F., Lima C.S., Pinho H., Collins C.H. (2003). Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. *Process Biochemistry*. **38**, 1379-1384.

[197] Jin Z., Su Y., Duan Y. (2001). A novel method for polyaniline synthesis with the immobilized horseradish peroxidase enzyme. *Synthetic Metals*. **122**, 237-242.

-
-
- [198] Shen S., Tu S. (1999). Immobilization of horseradish peroxidase in cross-linked phyllosilicates: conditions and characterizations. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **29**, 185-189.
- [199] Alemzadeh I., Nejati S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*. **166**, 1082-1086.
- [200] Peralta-Zamora P., Gomes de Moraes S., Esposito E., Antunes R., Reyes J., Durán N. (1998). Decolorization of pulp mill effluents with immobilized lignin and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Technology*. **19**, 521-528.
- [201] Tatsumi K., Wada S., Ichikawa H. (1996). Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. **51**, 126-130.
- [202] Wang B. (1999). Sol-gel thin-film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium. *Analytical Chemistry*. **71**, 1935-1939.
- [203] Gacche R.N., Firdaus Q., Sagar A.D. (2003). Soybean (*Glycine max* L.) seed coat peroxidase immobilized on fibrous aromatic polyamide: A strategy for decreasing phenols from industrial wastewater. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **62**, 1090-1093.
- [204] Magri M., Miranda M., Cascone O. (2005). Immobilized of soybean seed coat peroxidase on polyaniline: Synthesis optimization and catalytic properties. *Biocatalysis and Biotransformation*. **23**, 339-346.
- [205] Caramori S.S., Fernandes K.F. (2004). Covalent immobilisation of horseradish peroxidase onto poly (ethylene terephthalate)-poly (aniline) composite. *Process Biochemistry*. **39**, 883-888.
- [206] Shukla S.P., Devi S. (2005). Covalent coupling of peroxidase to a copolymer of acrylamide (AAm)-2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and its use in phenol oxidation. *Process Biochemistry*. **40**, 147-154.
-
-

[207] Horoszewski D.N., Guadalupe A.R. (2001). Immobilization of horseradish peroxidase in poly(n-isopropyl acrylamide) derivatives. Abstracts of Papers, 221st ACS National Meeting, 1-5 April, San Diego, USA.

[208] Leiriao P.R.S., Fonseca L.J.P., Taipa M.A., Cabral J.M.S., Mateus M. (2003). Horseradish peroxidase immobilized through its carboxylic groups onto a polyacrylonitrile membrane: Comparison of enzyme performances with inorganic beaded supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **110**, 1-10.

[209] Azevedo A.M., Vojinovic V., Cabral J.M.S., Gibson T.D., Fonseca L.P. (2004). Operational stability of immobilised horseradish peroxidase in mini-packed bed bioreactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **28**, 121-128.

[210] Lai Y.C., Lin S.C. (2005). Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochemistry*. **40**, 1167-1174.

[211] Rogalski J., Dawidowicz A., Jóźwik E., Leonowicz A. (1999). Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **6**, 29-39.

[212] Dunford H.B., Stillman J.S. (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews*. **19**, 187-251.

[213] Nicell J.A., Bewtra J.K., Biswas N., Taylor K.E. (1993). Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Research*. **27**, 1629-1639.

[214] Yu J., Taylor K.E., Zou H., Biswas N., Bewtra J.K. (1994). Phenol conversion and dimeric intermediates in horseradish peroxidase-catalyzed phenol removal from water. *Environmental Science Technology*. **28**, 2154-2160.

[215] Nicell J.A., (1994). Kinetics of horseradish peroxidase-catalyzed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **60**, 203-215.

[216] Nicell J.A., Saadi K.W., Buchanan I.D. (1995). Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresource Technology*. **54**, 5-16.

[217] Wu Y., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K. (1999). Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG. *Journal of Environmental Engineering*. **125**, 451-458.

[218] Wagner M., Nicell J.A. (2002). Impact of dissolved wastewater constituents on peroxidase-catalyzed treatment of phenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **77**, 419-428.

[219] Mao X., Buchanan I.D., Stanley S.J. (2006). Phenol removal from aqueous solution by fungal peroxidases. *Journal of Environmental Engineering and Science*. **5**, 103-109.

[220] Rao S.V., Anderson K.W., Bachas L.G. (1999). Controller layer-by-layer immobilization of horseradish peroxidase. *Biotechnology Bioengineering*. **65**, 389-396.

[221] Wilberg K.Q., Nunes D.G., Rubio J. (2002). Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **17**, 907-913.

[222] Nicell J.A., Wright H. (1997). A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**, 302-310.

[223] Kulys J., Ivanec-Goranina R. (2009). Peroxidase catalyzed phenolic compounds oxidation in presence of surfactant Dynol 604: A kinetic investigation. *Enzyme and Microbial Technology*. **44**, 368-372.

[224] Kima H. S., Choa D. H., Wonb K., Kima Y. H. (2009). Inactivation of *Coprinus cinereus* peroxidase during the oxidation of various phenolic compounds originated from lignin. *Enzyme and Microbial Technology*. **45**, 150-155.

[225] Arnao M.B., Acosta M., Del Río J.A., Varón R., García-Cánovas F. (1990). A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1041**, 43-47.

[226] Arnao M.B., Acosta M., Del Río J.A., García-Cánovas F. (1990). Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1038**, 85-89.

[227] Nakamoto S., Machida N. (1992). Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reactions using additives. *Water Research*. **26**, 49-54.

[228] Wu J., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K. (1997). Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Research*. **31**, 2699-2704.

[229] Wu J., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K. (1998). A model for the protective effect of additives on the activity of HRP in the removal of phenol. *Enzyme and Microbial Technology*. **22**, 315-322.

[230] Ator M.A., Ortiz de Montellano P.R. (1987). Protein control of prosthetic heme reactivity. *Journal of Biochemical Chemistry*. **262**, 1542-1551.

[232] Flora J.R.V., Suidan M.T., Wuellner A.M., Boyer T.K. (1994). Anaerobic treatment of a simulated high-strength industrial wastewater containing chlorophenols. *Water Environmental Research*. **66**, 21-31.

[233] Suidan M.T., Flora J.R.V., Boyer T.K., Wuellner A.M., Narayanan B. (1996). Anaerobic dechlorination using a fluidized-bed GAC reactor. *Water Research*. **30**, 160-170.

[234] Wilson G.J., Khodadoust A.P., Suidan M.T., Brenner R.C., Acheson C.M. (1998). Anaerobic/aerobic biodegradation of pentachlorophenol using GAC fluidized bed reactors: optimization of the empty bed contact time. *Water Science and Technology*. **38**, 9-17.

[234] Khodadoust A.P., Wagner J.A., Suidan M.T., Brenner R.C. (1997). Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. *Water Research*. **31**, 1776-1786.

[235] Wang R.C., Kuo C.C., Shyu C.C. (1997). Adsorption of phenols onto granular activated carbon in a liquid-solid fluidized bed. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **68**, 187-194.

[236] Caldeira M., Heald S.C., Carvalho M.F., Vasconcelos I. (1999). 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52(5)**, 722-729.

[237] Garibay-Orijel C., Rios-Leal E., García-Mena J., Poggi-Varaldo H.M. (2005). 2, 4, 6-trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **80**, 1180-1187.

[238] Puhakka J.A., Järvinen K. (1992). Aerobic fluidized-bed treatment of polychlorinated phenolic wood preservative constituents. *Water Research*. **26(6)**, 765-770.

[239] Gallego A., Fortunato M.S., Foglia J., Rossi S., Gemini V., Gómez L., Gómez C.E., Higa L.E., Korol S.E. (2003). Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **52**, 261-267.

[240] Kim J.H., Oh K.K., Lee S.T., Kim S.W., Hong S.I. (2002). Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochemistry*. **37**, 1367-1373.

[241] Wilson G.J., Suidan M.T., Maloney S.W., Brenner R.C. (1997). The biodegradation of 2, 4-D industrial wastewater utilizing a pilot-scale anaerobic GAC-FBR in Eastern Europe. *Proceedings-WEFTEC'97, Water Environment Federation Annual Conference & Exposition*. 559-567.

[242] Loh K., Ranganath S. (2005). External-loop fluidized bed airlift bioreactor (EFBAB) for the cometabolic biotransformation of 4-chlorophenol (4-cp) in the presence of phenol. *Chemical Engineering Science*. **60**, 6313-6319.

[243] Fahmy M., Heinzle E., Kut O.M. (1990). Treatment of bleaching effluents in aerobic/anaerobic fluidized biofilm systems. *DECHEMA Biotechnology Conferences*. 547-550.

[244] Long-de Valliere C.L., Petrozzi S., Zuerrer D., Baier U., Dunn I.J. (1989). Methods of anaerobic degradation of toxic compounds in chemical and industrial wastewaters. *Advances in Biotechnological Processes*. **12**, 35-72.

[245] Graham L.J., Jovanovic G. (1999). Dechlorination of p-chlorophenol on a Pd/Fe catalyst in a magnetically stabilized fluidized bed; implications for sludge and liquid remediation. *Chemical Engineering Science*. **54**, 3085-3093.

[246] Graham L.J., Atwater J.E., Jovanovic G.N. (2006). Chlorophenol dehalogenation in a magnetically stabilized fluidized bed reactor. *AIChE Journal*. **52**, 1083-1093.

[247] Bettmann H., Rehm H.J. (1985). Continuous degradation of phenol(s) by *Pseudomonas putida* P8 entrapped in polyacrylamide-hydrazide. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **22**, 389-393.

[248] Ensuncho L., Alvarez-Cuenca M., Legge R.G. (2005). Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **27**, 185-191.

[249] Trivedi U.J., Bassi A.S., Zhu J. (2005). Investigation of continuous phenol removal in a liquid-solid circulating fluidized bed (LSCFD) using immobilized soybean seed hull peroxidases. *Proceedings of the Seventh World Congress of Chemical Engineering*.

[250] Montiel M.C. (2002). “Obtención de L-butilina por vía enzimática en un reactor tanque continuo con módulo de ultrafiltración”. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[251] Ruíz A. (2006). “Modelización y simulación de biorreactores de membrana. Aplicación a distintos sistemas enzimáticos”. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[252] Cerezo J.M. (2002). “Eliminación de fenol por oxidación enzimática con peroxidasa de soja”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[253] Chico F. (2002). “Eliminación de 4-clorofenol por oxidación enzimática con peroxidasa de soja”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[254] Zapata M. (2002). “Eliminación de compuestos fenólicos con diferentes peroxidases comerciales. Condiciones óptimas”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[255] Sánchez E. (2003). “Eliminación de fenoles con peroxidasa de rábano”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[256] López N. (2003). “Eliminación de mezclas de fenoles con peroxidases”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[257] Gómez M. (2003). “Inmovilización de peroxidasa: Una alternativa mejorada en la eliminación de fenol. Modelo cinético del proceso”. Trabajo fin de carrera. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[258] Murcia M.D. (2003). “Cinética de polimerización de fenoles: aplicación a la peroxidasa de rábano inmovilizada”. Trabajo fin de carrera. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[259] Sánchez E. (2003). “Extensión del mecanismo cinético de eliminación de fenol al sistema peroxidasa inmovilizada-clorofenol”. Trabajo fin de carrera. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[260] Yelo A.M. (2004). “Eliminación de 4-clorofenol con peroxidasa de soja en reactor tanque continuo: cinética del proceso y modelo del reactor”. *Trabajo fin de carrera*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[261] Bódalo A., Gómez J.L., Gómez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Yelo A.M. (2006). Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. *Desalination*. **195**, 1-3.

[262] Bódalo A., Gómez J.L., Gómez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Yelo A.M. (2007). Elimination of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide: Kinetic model and intrinsic parameters. *Biochemical Engineering Journal*. **34**, 242-247.

[263] Gómez J.L., Gómez J., Bastida J., Hidalgo A.M., Gómez M., Murcia M.D. (2008). Experimental behaviour and design model of a continuous tank reactor for removing 4-chlorophenol with soybean peroxidase. *Chemical Engineering and Processing*. **47**, 1786-1792.

[264] Gómez M. (2007). “Tratamiento de efluentes fenólicos con peroxidasa inmovilizada: estudio cinético y diseño del proceso”. *Tesis Doctoral*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[265] Gómez J.L., Bódalo A., Gómez E., Hidalgo A.M., Gómez M. (2005). A new method to estimate intrinsic parameters in the ping-pong bisubstrate kinetic: Application to the oxipolymerization of phenol. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. **1**, 115-120.

[266] Gómez J.L., Bódalo A., Gómez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Murcia M.D. (2007). Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. *Chemical Engineering Journal*. **127**, 47-57.

[267] Gómez J.L., Bódalo A., Gómez E., Hidalgo A.M., Gómez M., Murcia M.D. (2008). A transient design model of a continuous tank reactor for removing phenol with immobilized soybean peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal*. **145**, 142-148.

[268] Gómez J.L., Bódalo A., Gómez E., Bastida J., Hidalgo A.M., Gómez M. (2006). Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology*. **39(5)**, 1016-1022.

[269] Murcia M.D. (2008). “Aplicación de reactores continuos con peroxidasa inmovilizada y de reactores continuos con módulo de ultrafiltración a la eliminación de 4-clorofenol”. *Tesis Doctoral*. Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Murcia.

[270] Murcia M.D., Gomez M., Gomez E., Bodalo A., Gomez J.L., Hidalgo A.M. (2009). Assessing combination treatment, enzymatic oxidation and ultrafiltration in a membrane bioreactor, for 4-chlorophenol removal: Experimental and modelling. *Journal of Membrane Science*. **342**, 198-207.

[271] Gómez J.L., Gomez E., Máximo M.F., Gomez M., Murcia M.D., Ortega S. (2011). A diffusion-reaction kinetic model for the removal of aqueous 4-chlorophenol with immobilized peroxidasa. *Chemical Engineering Journal*. **166**, 693-703.

[272] Standard Methods for the Examination of water and wastewater. (1995). 19th Edition (Eaton A.D.; Clesceri L.S.; Greenberg A.E.; Eds.) método 5530, sección 5, 36-39. American Public Health Association. Washigton.

[273] Hartree E.F. (1972). Protein determination: an improved modification of Lowry's method which gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. **42**, 422-427.

[274] Máximo M.F., Gómez M., Murcia M.D., Ortega S., Barbosa D.S., Vayá G. (2012). Screening of three commercial plant peroxidases for the removal of phenolic compounds in membrane bioreactors. *Environmental Technology*. **33**, 1071-1079.

[275] Gómez M., Murcia M.D., Ortega S., Barbosa D.S., Vayá G., Hidalgo A.M. (2012). Removal of 4-chlorophenol in a continuous membrane bioreactor using different commercial peroxidasas. *Desalination and Water Treatment*. **37**, 97-107.

[276] Nelder J.A., Mead R. (1965). A simplex method for function minimization. *Computer Journal*. **7**, 308-313.

[277] Agostini E., Milrad S.R., Tigier H.A. (1997). Production of peroxidases by hairy roots of (*Brassica napus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **47**, 177-182.

[278] Sosa L.G., Talano M.A., Ibáñez S.G., Purro S., Agostini E., Milrad S.R., Medina M.I. (2009). Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *Journal of Biotechnology*. **139**, 273-279.

[279] Agostini E., Coniglio M.S., Milrad S.R., Tigier H.A., Giulietti A.M. (2003a). Phytoremediation of 2, 4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy roots cultures. *Biotechnology Applied Biochemistry*. **37**, 139-144.

[280] Gaspar T., Thorpe C., Greppin H. (1982). Peroxidase. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Chap 4. Université de Geneve, Centre de Botanique, Geneva.

[281] Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.

[282] Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. (1966). Peroxidase isoenzymes from Horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *Journal Biological Chemistry*. **241**, 2166-2172.

[283] De Forchetti S.M., Tigier H.A. (1990). Indole-3-acetic acid oxidase and syringaldazine oxidase activities of peroxidase isozymes in soybean root nodules. *Physiologia Plantarum*. **79**, 327-330.

[284] Agostini E., Medina M.I., Milrad S.R., Tigier H.A. (1997). Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**, 596-598.

[285] Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

[286] Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 min detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **28**, 239-242.

[287] Dunford H.B. (1991). Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. Everse J, Everse K.E., Grisham M.B. Eds., Peroxidases in Chemistry and Biology. vol 2, 1-24. CRC Press. Boca Raton.

[288] Lee M.Y., Kim S.S. (1994) Characteristics of six isoperoxidases from Korean-radish root. *Phytochemistry*. **35**, 287-290.

[289] Masuda M., Sakurai A., Sakakibara M. (2001). Effect of enzyme impurities on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase. *Applied Microbiology Biotechnology*. **57**, 494-499.

[290] Coniglio M.S., Busto V.D., González P.S., Medina M.I., Milrad S., Agostini E. (2008). Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. *Chemosphere*. **72**, 1035-1042.

[291] Wevar A.L., Agostini E., Talano M., Capozucca C., Milrad S., Tigier H.A., Medina M.I. (2005). Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Science*. **169**, 1102-1111.

[292] Extraído el 2 de febrero de 2012 de Curtiembre. Disponible en internet: http://www.revistavirtualpro.com/files/TIE04_200703.pdf



16. ANEXOS

Anexo 1. Rectas de calibrado

Tabla 16.1. Valores de la recta de calibrado para la determinación de la concentración de 4-clorofenol, método colorimétrico de la AAP.

[4-Clorofenol] (mM)	Absorbancia (505 nm)
0.000	0.000
0.020	0.208
0.040	0.426
0.060	0.633
0.080	0.840
0.100	1.051
0.120	1.258
0.140	1.474
0.160	1.659
0.180	1.871
0.200	2.069

Tabla 16.2. Valores de la recta de calibrado para la determinación de la concentración de 3-clorofenol, método colorimétrico de la AAP.

[3-Clorofenol] (mM)	Absorbancia (505 nm)
0.000	0.000
0.020	0.231
0.040	0.460
0.060	0.693
0.080	0.924
0.100	1.155
0.120	1.370
0.140	1.620
0.160	1.850
0.180	2.079

Tabla 16.3. Valores de la recta de calibrado para la determinación de la concentración de 2-clorofenol, método colorimétrico de la AAP.

[2-Clorofenol] (mM)	Absorbancia (505 nm)
0.000	0.000
0.020	0.202
0.040	0.404
0.060	0.607
0.080	0.808
0.100	1.010
0.120	1.202
0.140	1.405
0.160	1.606
0.180	1.808
0.200	1.996

Tabla 16.4. Valores de la recta de calibrado para la determinación de la concentración de fenol, método colorimétrico de la AAP.

[Fenol] (mM)	Absorbancia (505 nm)
0.000	0.000
0.020	0.201
0.040	0.400
0.060	0.609
0.080	0.803
0.100	1.018
0.120	1.240
0.140	1.452
0.160	1.649
0.180	1.877
0.200	2.080

Tabla 16.5. Valores de la recta de calibrado para la determinación de la concentración de 4-clorofenol mediante HPLC.

[4-Clorofenol] (mM)	Área
0.00	0
0.20	1132274
0.40	2358242
0.60	3441511
0.80	4635605
1.00	5729897
1.20	6944121
1.40	8092730
1.60	9300705
1.80	10298229
2.00	11539289

Tabla 16.6. Valores de la recta de calibrado para la determinación de la concentración de fenol mediante HPLC.

[Fenol] (mM)	Área
0.00	0
0.20	708206
0.40	1426724
0.60	2140094
0.80	2823825
1.00	3502478
1.20	4195809
1.40	4857113
1.60	5585219
1.80	6252772
2.00	6832376

Tabla 16.7. Valores de la recta de calibrado de albúmina de suero bovino, para la determinación de proteína por el método de Lowry.

[Proteína] (mg/ml)	Absorbancia
0.0000	0.0000
0.0153	0.0333
0.0229	0.0534
0.0305	0.0842
0.0458	0.1371
0.0610	0.1888
0.0763	0.2306
0.0915	0.2839
0.1068	0.3301
0.1220	0.3828
0.1373	0.4238
0.1525	0.4651

Tabla 16.8. Valores de la recta de calibrado de la bomba de alimentación de 4-clorofenol al reactor tanque continuo.

rpm	Caudal (ml/min)
1.0	2.0
1.5	2.9
2.5	5.0
5.0	10.0
7.5	14.8
10.0	19.5
12.5	24.5
15.0	29.0
17.5	34.7
20.0	38.5

Tabla 16.9. Valores de la recta de calibrado de la bomba de alimentación de H₂O₂ al reactor tanque continuo.

rpm	Caudal (ml/min)
1.0	2.0
1.5	3.0
2.5	5.2
5.0	10.0
7.5	15.0
10.0	20.0
12.5	25.0
15.0	29.5
17.5	35.0
20.0	40.0

Tabla 16.10. Valores de la recta de calibrado de la bomba de evacuación de productos del reactor tanque continuo asociado al módulo de membrana.

rpm	Caudal (ml/min)
1.0	1.5
1.5	2.8
2.5	4.6
5.0	9.8
7.5	14.2
10.0	19.0
12.5	23.3
15.0	27.5
17.5	32.0
20.0	36.5

Tabla 16.11. Valores de la recta de calibrado de la bomba situada a la salida del primer tanque en el sistema experimental reactor tanque continuo asociado al módulo de membrana con la enzima inmovilizada.

rpm	Caudal (ml/min)
1.0	1.8
1.5	2.9
2.5	4.9
5.0	9.9
7.5	14.7
10.0	19.5
12.5	24.3
15.0	28.7
17.5	33.9
20.0	38.3

Anexo 2. Comparación de peroxidasas comerciales en la eliminación de 4-clorofenol

Tabla 16.12. Medidas de la actividad de SBP, HRP y AKPC a distintos pH de tampón fosfato 0.1 M. $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $V_{\text{cubeta}} = 3$ ml, $[4\text{-clorofenol}] = 10$ mM, $[AAP] = 2.4$ mM, $[H_2O_2] = 0.2$ mM y $[SBP] = [HRP] = 0.041, 0.083$ y 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y $[AKPC] = 0.083, 0.16$ y 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

Tampón Fosfato (pH)	SBP		HRP		HRP	
	Actividad (U/mg)	Media (U/mg)	Actividad (U/mg)	Media (U/mg)	Actividad (U/mg)	Media (U/mg)
6.0	260.02		89.74		51.77	
	254.27	257.59	93.19	91.66	51.20	51.58
	258.49		92.04		51.77	
6.5	266.92		98.95		62.13	
	265.77	265.77	97.79	98.31	61.55	61.81
	264.62		98.18		61.74	
7.0	278.43		142.67		41.42	
	278.43	278.17	141.51	142.03	38.54	39.69
	277.66		141.90		39.12	
7.5	276.13		112.75		37.97	
	274.98	275.23	111.60	112.37	36.24	36.50
	274.59		112.75		35.28	
8.0	269.22		105.85		29.91	
	268.07	268.58	107.00	104.95	25.89	27.55
	268.46		102.01		26.85	

Tabla 16.13. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque discontinuo a distintos valores de pH, para las tres peroxididasas. $V_R = 25$ ml, $T^a = 30$ °C, $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[\text{E}]_0 = 10$ µg/ml y tampón fosfato 0.1 M.

Tiempo (min)	SBP				
	X (%)				
	pH = 6.0	pH = 6.5	pH = 7.0	pH = 7.5	pH = 8.0
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	69.15	66.67	68.10	65.57	56.97
4	74.53	73.84	77.54	73.58	66.36
6	78.22	78.70	82.39	77.69	73.16
8	80.07	79.96	84.87	81.28	76.69
10	81.75	82.02	87.34	83.81	79.38
15	83.71	85.02	91.51	87.92	84.71
20	85.23	87.40	93.83	89.77	87.66
25	86.40	89.08	95.36	91.56	90.56
40	88.19	91.09	98.05	95.25	94.20
50	89.40	92.46	98.05	96.26	95.68
60	90.40	93.20	98.05	97.31	97.10

Tiempo (min)	HRP				
	X (%)				
	pH = 6.0	pH = 6.5	pH = 7.0	pH = 7.5	pH = 8.0
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	56.76	59.03	65.51	62.51	61.87
4	56.92	60.08	66.46	63.51	62.88
6	57.87	60.40	67.41	64.51	63.88
8	58.24	60.77	67.62	65.14	64.09
10	58.66	61.24	67.89	65.51	64.83
15	59.13	61.66	68.52	66.36	65.25
20	59.66	61.82	68.99	66.62	65.62
25	60.50	62.51	69.15	66.73	66.04
40	61.35	62.82	69.47	67.09	66.25
50	61.72	64.09	69.68	67.46	66.36
60	62.61	64.35	71.52	67.94	67.15

Tiempo (min)	AKPC				
	X (%)				
	pH = 6.0	pH = 6.5	pH = 7.0	pH = 7.5	pH = 8.0
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	46.48	52.09	42.84	42.52	36.51
4	49.38	54.86	45.69	45.16	42.05
6	50.43	55.70	47.16	46.53	43.58
8	50.96	56.05	49.11	48.06	45.16
10	51.75	56.36	49.38	49.01	46.05
15	52.28	56.68	49.96	49.32	47.32
20	52.54	56.86	50.17	49.48	47.58
25	53.07	56.97	50.43	49.64	47.69
40	53.60	57.44	51.22	50.22	47.95
50	53.91	57.73	51.75	50.80	48.11
60	54.65	58.24	52.33	51.06	49.75

Tabla 16.14. Comparación del valor de pH óptimo, a partir de medidas de actividad y de conversión en el reactor tanque discontinuo en el minuto 60, para las tres peroxidetasas.

Tampón Fosfato (pH)	SBP		HRP		AKPC	
	Actividad (U/mg)	*X _{máx} (%)	Actividad (U/mg)	*X _{máx} (%)	Actividad (U/mg)	*X _{máx} (%)
6.0	257.59	90.40	91.66	62.61	51.58	54.65
6.5	265.77	93.20	98.31	64.35	61.81	62.03
7.0	278.17	98.05	142.03	71.52	39.69	52.33
7.5	275.23	97.31	112.37	67.94	36.50	51.06
8.0	268.58	97.10	104.95	67.15	27.55	49.75

*Conversión en el minuto 60

Tabla 16.15. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque discontinuo a distintas temperaturas, para las tres peroxidases. $V_R = 25$ ml, $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[\text{E}]_0 = 10$ $\mu\text{g/ml}$ y tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 para SBP y HRP; y pH 6.5 para AKPC.

Tiempo (min)	SBP				
	X (%)				
	$T^a = 25$ °C	$T^a = 30$ °C	$T^a = 35$ °C	$T^a = 40$ °C	$T^a = 45$ °C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	59.03	68.10	69.31	69.89	68.89
4	67.99	77.54	78.54	76.80	75.74
6	73.32	82.39	82.86	81.02	79.96
8	76.27	84.87	85.55	83.07	82.07
10	77.80	87.34	87.77	86.45	84.18
15	81.54	91.51	90.56	88.50	88.40
20	85.08	93.83	92.72	90.24	90.56
25	87.19	95.36	94.04	91.77	92.04
40	90.14	98.05	96.15	94.09	94.09
50	91.35	98.05	96.94	95.20	95.04
60	92.72	98.05	98.05	95.83	95.57

Tiempo (min)	HRP				
	X (%)				
	$T^a = 25$ °C	$T^a = 30$ °C	$T^a = 35$ °C	$T^a = 40$ °C	$T^a = 45$ °C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	58.13	65.51	58.02	57.44	55.76
4	58.82	66.46	58.76	57.71	56.02
6	59.71	67.41	59.29	57.92	56.34
8	60.45	67.78	59.55	58.02	56.60
10	61.19	68.20	59.71	58.13	56.92
15	62.45	68.62	59.82	58.34	57.02
20	62.56	69.05	60.50	58.50	57.13
25	62.72	69.15	60.93	58.71	57.23
40	64.19	69.57	62.03	59.40	57.81
50	64.51	69.68	62.19	59.50	58.29
60	64.83	71.52	62.51	59.82	58.45

Tiempo (min)	AKPC				
	X (%)				
	T ^a = 25 °C	T ^a = 30 °C	T ^a = 35 °C	T ^a = 40 °C	T ^a = 45 °C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	48.32	52.09	45.63	43.63	43.31
4	48.85	54.86	46.53	43.95	43.58
6	49.17	55.70	46.79	44.05	43.89
8	49.38	56.05	47.58	44.16	44.05
10	49.64	56.36	48.06	44.37	44.26
15	49.96	56.68	48.53	44.58	44.68
20	50.43	56.86	48.74	44.89	44.74
25	50.70	56.97	49.06	44.95	44.84
40	51.17	57.44	49.43	45.26	45.16
50	51.59	57.73	49.53	45.42	45.32
60	52.28	58.24	49.80	45.53	45.32

Tabla 16.16. Comparación de la conversión en el reactor tanque discontinuo en el minuto 60 para las tres peroxidasas a distintas temperaturas.

T ^a (°C)	*X _{máx} (%)		
	SBP	HRP	AKPC
25	92.72	64.83	52.28
30	98.05	71.52	58.24
35	98.05	62.51	49.80
40	95.83	59.82	45.53
45	95.57	58.45	45.32

*Conversión en el minuto 60

Tabla 16.17. Estabilidad al almacenamiento. Conversión alcanzada en el reactor en el minuto 60 y el tanto por ciento de esta conversión a los respectivos días del ensayo, para las tres peroxidasas. V_R = 25 ml, T^a = 30 °C, [4-clorofenol]₀ = [H₂O₂]₀ = 2.0 mM, [E]₀ = 10 µg/ml y tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

Tiempo (d)	SBP		HRP		AKPC	
	*X _{máx} (%)	**% X _{máx}	*X _{máx} (%)	**% X _{máx}	*X _{máx} (%)	**% X _{máx}
0	97.98	100	63.27	100	41.97	100
14	96.81	98.80	58.69	92.76	37.24	88.73
28	95.90	97.88	55.17	87.21	34.94	83.26

*Conversión en el minuto 60

**Tanto por ciento de la conversión en el minuto 60

Tabla 16.18. Variación de la actividad enzimática (U) a lo largo del tiempo en el reactor tanque continuo con módulo de membrana, para las tres peroxididasas. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[E]_0 = 0.08$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	Actividad enzimática en el reactor (U)					
	SBP		HRP		AKPC	
	*Membrana sin polímero	Membrana con polímero	*Membrana sin polímero	Membrana con polímero	*Membrana sin polímero	Membrana con polímero
0	1165	1249	1102	1077	2175	1880
10	705	573	696	425	923	448
20	550	499	438	247	679	254
30	509	368	364	132	455	143
40	410	310	283	82	316	96
60	410	232	166	61	152	57
80	278	154	121	21	84	30

*Membrana nueva

Tabla 16.19. Determinación de proteína por el método de Lowry en la disolución patrón, para las tres peroxididasas.

SBP		HRP		AKPC	
Absorbancia (605 nm)	[Proteína] *(mg/ml)	Absorbancia (605 nm)	[Proteína] *(mg/ml)	Absorbancia (605 nm)	[Proteína] *(mg/ml)
0.1184	0.7688	0.1991	0.6464	0.1528	0.6614
0.1763	0.7632	0.3124	0.6761	0.2071	0.6724
0.2396	0.7779	0.3700	0.6864	0.3172	0.6865
0.3024	0.7854	0.4177	0.6780	0.3677	0.6821
0.4216	0.7821	0.6099	0.6600	0.6210	0.6720
Media [Proteína] (mg/ml)	0.7755		0.6694		0.6749

*Datos obtenidos sobre una solución de enzima de una concentración de 1 mg/ml

Tabla 16.20. Determinación de proteína por el método de Lowry en el permeado, en los experimentos de membrana sin y con polímero, para las tres peroxidases.

SBP			
Membrana sin polímero		Membrana con polímero	
Absorbancia (605 nm)	**[Proteína] (mg/ml)	Absorbancia (605 nm)	**[Proteína] (mg/ml)
0.0089	0.0094	0.0063	0.0034
0.0267	0.0097	0.0107	0.0035
0.0382	0.0124		
Media [Proteína] (mg/ml)	0.0105		0.0035

* Membrana nueva

** Datos sobre una disolución de permeado, concentrada hasta 10 ml

HRP			
*Membrana sin polímero		Membrana con polímero	
Absorbancia (605 nm)	**[Proteína] (mg/ml)	Absorbancia (605 nm)	**[Proteína] (mg/ml)
0.1304	0.2426	0.1499	0.2788
0.2372	0.2574	0.1811	0.2948
0.3958	0.2577	0.2707	0.2937
		0.4351	0.2833
Media [Proteína] (mg/ml)	0.2526		0.2877

* Membrana nueva

** Datos sobre una disolución de permeado, concentrada hasta 2 ml

AKPC			
*Membrana sin polímero		Membrana con polímero	
Absorbancia (605 nm)	**[Proteína] (mg/ml)	Absorbancia (605 nm)	**[Proteína] (mg/ml)
0.0607	0.2635	0.0699	0.3034
0.0848	0.2760	0.1007	0.3278
0.0969	0.2523	0.1163	0.3029
0.1300	0.2821	0.1537	0.3336
0.1355	0.2520	0.1970	0.3664
		0.2133	0.3472
Media [Proteína] (mg/ml)	0.2652		0.3302

* Membrana nueva

** Datos sobre una disolución de permeado, concentrada hasta 2 ml

Tabla 16.21. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, en el reactor tanque continuo con módulo de membrana, para las tres peroxidasas. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0$ mM, $[E]_0 = 0.08$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	SBP		HRP		AKPC	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	93.88	95.15	94.04	92.20	86.13	92.83
10	93.09	94.30	89.14	91.98	82.16	92.73
15	92.25	92.99	89.51	91.88	80.56	91.18
20	91.93	92.78	92.51	92.09	78.91	90.10
25	91.98	92.51	92.51	91.30	73.24	88.40
30	90.82	92.30	90.82	90.40	69.17	86.34
40	90.14	91.77	84.60	90.14	62.00	84.02
50	86.82	91.72	75.32	91.04	55.66	81.75
60	79.07	91.67	67.15	90.46	50.50	79.17
80	69.89	91.40	48.85	89.45	41.12	63.60
100	59.45	91.04	38.46	89.61	35.14	50.45
120	51.91	90.51	31.45	62.93	30.19	35.14
150	46.53	89.14	24.07	40.25	24.46	26.84
180	41.15	87.82	24.86	29.87	21.99	26.78
210	35.88	85.08	19.16	19.90	19.72	25.08
240	33.56	78.27	20.69	19.00	17.50	23.79
270	35.82	71.21	11.99	16.26	17.40	20.39
300	32.71	62.30	9.25	13.52	15.96	17.04
360	31.08	46.69	11.67	13.84	11.37	17.61
420	27.65	41.10	10.41	12.67	12.55	13.64

Anexo 3. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana con peroxidasa de soja en soluble

Tabla 16.22. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de enzima en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0$ mM y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	96.47	99.00	98.68	99.74
10	96.89	99.05	96.84	100.00
15	96.89	99.05	95.73	99.68
20	96.57	99.05	95.25	99.63
25	95.57	99.00	95.36	99.00
30	94.57	98.89	95.15	98.52
40	91.77	98.63	94.88	97.31
50	85.66	98.10	94.78	96.52
60	82.23	96.84	94.57	95.99
80	76.96	94.15	90.56	95.68

Tabla 16.23. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones de enzima en la corriente de alimentación, en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0$ mM, $[\text{SBP}]_0 = 0.04$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[SBP] _F = 0.000 mg/ml		[SBP] _F = 0.001 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	96.47	99.00	97.94	99.58
10	96.89	99.05	97.21	99.42
15	96.89	99.05	97.05	99.21
20	96.57	99.05	96.99	99.21
25	95.57	99.00	96.41	99.26
30	94.57	98.89	94.09	99.05
40	91.77	98.63	91.93	98.68
50	85.66	98.10	89.24	98.52
60	82.23	96.84	85.87	97.89
80	76.96	94.15	81.07	97.31
Tiempo (min)	[SBP] _F = 0.002 mg/ml		[SBP] _F = 0.004 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	97.15	99.84	98.58	99.05
10	96.99	99.74	98.00	99.84
15	96.73	99.74	98.10	99.21
20	97.15	99.79	96.89	99.58
25	97.21	99.79	96.63	99.42
30	96.73	99.84	95.62	98.63
40	95.57	99.74	93.57	98.05
50	93.83	99.79	93.14	97.79
60	90.30	99.84	90.88	97.36
80	87.13	99.74	89.40	97.47

Tabla 16.24. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de sustratos en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml, $[SBP]_F = 0.002$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	$[4\text{-clorofenol}]_0 = [H_2O_2]_0$ $[4\text{-clorofenol}]_F = [H_2O_2]_F$ 0.5 mM		$[4\text{-clorofenol}]_0 = [H_2O_2]_0$ $[4\text{-clorofenol}]_F = [H_2O_2]_F$ 1.0 mM		$[4\text{-clorofenol}]_0 = [H_2O_2]_0$ $[4\text{-clorofenol}]_F = [H_2O_2]_F$ 2.0 mM	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	67.98	86.60	90.94	89.82	97.15	99.84
10	60.04	85.61	89.08	90.20	96.99	99.74
15	58.06	84.86	87.09	90.32	96.73	99.74
20	57.81	84.12	86.35	90.07	97.15	99.79
25	57.81	75.93	85.36	89.45	97.21	99.79
30	57.56	72.95	84.61	89.20	96.73	99.84
40	64.01	70.96	82.38	88.58	95.57	99.74
50	66.74	70.47	77.66	85.85	93.83	99.79
60	65.50	69.72	76.42	84.86	90.30	99.84
80	65.75	69.23	72.82	84.61	87.13	99.74

Tabla 16.25. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [4\text{-clorofenol}]_F = 2.0$ mM, $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml, $[SBP]_F = 0.002$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	$[H_2O_2]_0 = [H_2O_2]_F$ 2.0 mM		$[H_2O_2]_0 = [H_2O_2]_F$ 2.5 mM		$[H_2O_2]_0 = [H_2O_2]_F$ 3.0 mM	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	97.15	99.84	94.73	96.20	93.61	94.67
10	96.99	99.74	94.22	97.15	93.18	95.36
15	96.73	99.74	94.36	97.10	93.04	95.62
20	97.15	99.79	94.70	97.26	93.28	95.04
25	97.21	99.79	94.85	96.78	93.16	94.88
30	96.73	99.84	94.64	96.63	92.77	94.73
40	95.57	99.74	93.16	96.36	90.96	94.62
50	93.83	99.79	90.28	96.57	88.61	94.52
60	90.30	99.84	88.25	96.10	85.96	94.25
80	87.13	99.74	83.46	96.57	80.69	94.15

Tabla 16.26. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo para distintas concentración inicial de enzima en el reactor y distintos tiempos espaciales, en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0$ mM, $[\text{SBP}]_F = 0.002$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.053 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml	
	$\tau = 10$ min, $V_R = 50$ ml		$\tau = 15$ min, $V_R = 75$ ml		$\tau = 20$ min, $V_R = 100$ ml	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	94.09	99.89	96.94	99.74	97.15	99.84
10	93.78	99.79	97.05	99.47	96.99	99.74
15	93.51	99.37	96.78	99.37	96.73	99.74
20	93.36	99.16	96.68	99.21	97.15	99.79
25	93.14	98.95	95.73	99.31	97.21	99.79
30	90.93	98.58	94.67	99.10	96.73	99.84
40	83.92	98.37	91.35	99.10	95.57	99.74
50	79.59	98.26	85.71	99.00	93.83	99.79
60	77.54	97.73	82.02	98.89	90.30	99.84
80	73.63	97.21	75.32	98.47	87.13	99.74

Tabla 16.27. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo con distintas concentraciones de enzima en la corriente de alimentación en la primera etapa del ensayo en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. Estudio de comprobación de la actividad de la enzima retenida en el polímero depositado en la membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0$ mM, $[\text{SBP}]_0 = 0.04$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[SBP] _F = 0.000 mg/ml		[SBP] _F = 0.002 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	95.04	96.57	91.77	94.15
10	93.83	96.36	92.04	94.04
15	92.56	96.31	89.61	93.99
20	90.51	96.20	88.29	93.51
25	88.82	96.15	87.77	93.30
30	86.71	96.15	87.40	93.04
40	81.28	96.05	85.02	91.88
50	77.11	95.25	83.18	90.93
60	72.63	94.25	80.54	89.35
80	67.36	88.40	77.48	87.34
85	39.41	87.50	32.98	79.38
90	48.32	78.49	36.25	66.94
95	51.91	74.69	38.94	64.83
100	53.49	72.21	39.36	64.35
105	54.07	68.94	39.62	63.72
110	53.70	67.31	39.88	60.98
120	53.07	65.93	37.30	57.71
130	51.54	64.46	37.20	54.54
140	51.01	61.29	37.14	50.22
160	50.01	59.08	32.87	48.27

Anexo 4. Caracterización del derivado inmovilizado de soja

Tabla 16.28. Estudio del porcentaje de actividad retenida por la peroxidasa de soja inmovilizada en reactor tanque discontinuo. $V_R = 25$ ml, $T^a = 30$ °C, $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM y tampón fosfato = 0.1 M pH 7.0.

Enzima (mg)	$r_{2.5}$ (mM/min)	
	Soluble	Inmovilizada
0.125	0.365	0.211
0.250	0.576	0.268
0.375	0.697	0.301
0.500	0.810	0.424
0.625	0.846	0.565

Anexo 5. Reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana con peroxidasa de soja inmovilizada

Tabla 16.29. Conversión alcanzada en el reactor y permeado a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de enzima inmovilizada en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0$ mM y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.06 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	94.09	99.89	96.94	99.74	97.15	99.84
10	93.78	99.79	97.05	99.47	96.99	99.74
15	93.51	99.37	96.78	99.37	96.73	99.74
20	93.36	99.16	96.68	99.21	97.15	99.79
25	93.14	98.95	95.73	99.31	97.21	99.79
30	90.93	98.58	94.67	99.10	96.73	99.84
40	83.92	98.37	91.35	99.10	95.57	99.74
50	79.59	98.26	85.71	99.00	93.83	99.79
60	77.54	97.73	82.02	98.89	90.30	99.84
80	73.63	97.21	75.32	98.47	87.13	99.74
40	83.92	98.37	91.35	99.10	95.57	99.74
50	79.59	98.26	85.71	99.00	93.83	99.79
60	77.54	97.73	82.02	98.89	90.30	99.84
80	73.63	97.21	75.32	98.47	87.13	99.74

Tabla 16.30. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de sustratos en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[SBP]_0 = 0.08$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[4-clorofenol] ₀ = [H ₂ O ₂] ₀ [4-clorofenol] _F = [H ₂ O ₂] _F 0.5 mM		[4-clorofenol] ₀ = [H ₂ O ₂] ₀ [4-clorofenol] _F = [H ₂ O ₂] _F 1.0 mM		[4-clorofenol] ₀ = [H ₂ O ₂] ₀ [4-clorofenol] _F = [H ₂ O ₂] _F 2.0 mM	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	83.30	68.19	97.18	98.65	95.43	56.74
10	78.57	54.20	94.59	39.65	95.77	50.19
15	78.34	49.24	95.04	51.15	95.77	47.43
20	78.34	49.91	95.60	55.89	95.04	54.99
25	78.11	50.36	95.60	60.29	95.09	55.72
30	78.34	51.04	95.60	64.01	94.87	61.70
40	78.34	57.13	95.37	73.49	94.53	69.26
50	79.92	60.74	95.49	76.87	93.68	76.14
60	80.60	62.32	95.04	81.95	93.29	80.43
80	80.37	69.32	93.12	86.35	91.43	85.45
100	81.95	72.47	83.30	90.07	84.77	88.10
120	77.89	74.73	67.74	90.30	69.32	89.17
140	77.21	76.54	48.22	89.73	52.00	87.14
160	70.44	77.89	36.94	88.15	41.00	81.16
180	59.61	79.02				
200	54.65	75.63				

Tabla 16.31. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintos caudales de alimentación en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0$ mM y $[\text{SBP}]_0 = 0.08$ mg/ml.

Tiempo (min)	Q = 5 ml/min		Q = 7.5 ml/min		Q = 10 ml/min	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	97.18	98.65	93.91	58.26	89.40	49.46
10	94.59	39.65	93.80	47.99	90.86	51.94
15	95.04	51.15	92.89	51.27	90.75	60.74
20	95.60	55.89	92.44	59.50	90.98	67.06
25	95.60	60.29	91.99	65.14	89.51	73.38
30	95.60	64.01	92.10	69.99	89.40	77.10
40	95.37	73.49	91.76	78.00	88.38	81.84
50	95.49	76.87	91.54	83.98	87.93	86.24
60	95.04	81.95	90.64	85.45	86.35	88.27
80	93.12	86.35	88.72	88.38	78.45	86.46
100	83.30	90.07	82.97	89.06	60.29	80.60
120	67.74	90.30	73.94	86.58	41.90	65.82
140	48.22	89.73	55.33	79.13	37.39	48.67
160	36.94	88.15	40.21	66.61	24.08	38.52

Tabla 16.32. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas adiciones sucesivas de SBP inmovilizada en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1.0$ mM, $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0$ mM, $[\text{SBP}]_0 = 0.08$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	Sin adición		1ª adición sucesiva		2ª adición sucesiva	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	97.18	98.65	90.07	66.00	93.17	73.20
10	94.59	39.65	88.34	52.22	94.91	55.45
15	95.04	51.15	90.20	47.01	94.79	49.37
20	95.60	55.89	91.44	45.03	94.91	51.36
25	95.60	60.29	92.43	52.72	94.79	55.95
30	95.60	64.01	93.17	57.31	94.42	61.04
40	95.37	73.49	93.30	66.50	93.67	69.47
50	95.49	76.87	90.20	71.09	92.55	75.80
60	95.04	81.95	89.45	73.94	90.20	79.52
80	93.12	86.35	90.94	79.77	90.82	83.25
100	83.30	90.07	90.07	81.76	91.07	86.35
120	67.74	90.30	89.82	81.14	91.07	87.84
140	48.22	89.73	88.58	84.86	90.07	86.72
160	36.94	88.15	81.39	86.60	90.20	88.46
180			55.58	85.36	90.94	89.45
200			50.49	83.87	89.95	89.82
220					90.82	90.07
240					84.12	90.44

Anexo 6. Reactor de lecho fluidizado asociado a un módulo de membrana

Tabla 16.33. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas alturas de lecho fijo inicial en el reactor lecho fluidizado con módulo de membrana. $V_R = 12$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0$ mM y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	Altura del lecho = 0.8 cm ($\cong 8$ mg de SBP)		Altura del lecho = 1.2 cm ($\cong 12$ mg de SBP)	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	90.41	86.12	84.54	81.05
10	92.67	69.43	73.15	59.73
15	96.05	64.01	87.14	54.65
20	97.18	64.58	94.02	54.76
25	98.20	66.95	95.37	58.94
30	96.73	70.56	94.92	62.10
40	95.83	76.65	96.16	70.44
50	94.70	82.29	95.94	76.31
60	93.46	85.33	95.71	80.82
80	86.24	89.85	94.59	86.91
100	53.07	90.30	95.04	89.62
120	38.29	87.37	76.31	90.75
140	28.93	82.40	40.55	88.72
160	26.79	78.34	29.94	84.21

Tabla 16.34. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas concentraciones iniciales de sustratos en el reactor lecho fluidizado con módulo de membrana. $V_R = 12$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), altura inicial del lecho = 0.8 cm ($\cong 8$ mg de SBP) y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[4-clorofenol] _F = [H ₂ O ₂] _F 0.5 mM		[4-clorofenol] _F = [H ₂ O ₂] _F 1.0 mM		[4-clorofenol] _F = [H ₂ O ₂] _F 2.0 mM	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	59.84	14.04	90.41	86.12	98.08	92.44
10	32.31	17.42	92.67	69.43	95.32	63.51
15	54.65	15.39	96.05	64.01	96.95	55.72
20	70.22	18.10	97.18	64.58	96.33	59.84
25	74.73	21.03	98.20	66.95	95.94	64.86
30	76.54	28.48	96.73	70.56	95.26	68.58
40	80.37	38.18	95.83	76.65	91.20	76.03
50	81.50	47.88	94.70	82.29	74.05	78.79
60	80.15	53.97	93.46	85.33	45.34	81.61
80	80.37	60.97	86.24	89.85	36.32	77.72
100	79.69	68.86	53.07	90.30	27.29	73.83
120	69.77	69.77	38.29	87.37	24.08	62.15
140	44.72	69.32	28.93	82.40	20.86	50.53
160	30.51	65.93	26.79	78.34	20.52	45.17

Tabla 16.35. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintos caudales de alimentación en el reactor lecho fluidizado con módulo de membrana. $V_R = 12$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0$ mM y altura inicial del lecho = 0.8 cm ($\cong 8$ mg de SBP).

Tiempo (min)	Q = 5 ml/min		Q = 7.5 ml/min		Q = 10 ml/min	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	90.41	86.12	71.35	77.33	58.82	87.82
10	92.67	69.43	77.55	62.77	87.48	56.57
15	96.05	64.01	89.17	54.65	94.13	61.87
20	97.18	64.58	91.43	55.78	93.23	67.28
25	98.20	66.95	91.54	61.64	92.10	72.70
30	96.73	70.56	91.09	65.93	88.04	78.11
40	95.83	76.65	91.54	73.94	77.21	82.63
50	94.70	82.29	88.38	79.24	32.09	75.52
60	93.46	85.33	73.72	83.42	20.92	61.08
80	86.24	89.85	32.99	80.93	18.21	32.31
100	53.07	90.30	22.95	69.54	13.47	26.33
120	38.29	87.37	23.06	60.18	13.70	20.36
140	28.93	82.40	17.20	52.73	11.89	17.20
160	26.79	78.34	16.41	40.55	10.09	14.04

Anexo 7. Comparación de las distintas configuraciones de reactor

Tabla 16.36. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas configuraciones de reactor en continuo asociando a un módulo de membrana. $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 2.0$ mM, cantidad de enzima en el reactor $\cong 8$ mg de SBP y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	Tanque continuo, SBP soluble		Tanque continuo, SBP inmovilizada		Lecho fluidizado, SBP inmovilizada	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	93.88	95.15	95.43	56.74	98.08	92.44
10	93.09	94.30	95.77	50.19	95.32	63.51
15	92.25	92.99	95.77	47.43	96.95	55.72
20	91.93	92.78	95.04	54.99	96.33	59.84
25	91.98	92.51	95.09	55.72	95.94	64.86
30	90.82	92.30	94.87	61.70	95.26	68.58
40	90.14	91.77	94.53	69.26	91.20	76.03
50	86.82	91.72	93.68	76.14	74.05	78.79
60	79.07	91.67	93.29	80.43	45.34	81.61
80	69.89	91.40	91.43	85.45	36.32	77.72
100	59.45	91.04	84.77	88.10	27.29	73.83
120	51.91	90.51	69.32	89.17	24.08	62.15
140	48.32	89.60	52.00	87.14	20.86	50.53
160	44.73	88.70	41.00	81.16	20.52	45.17

Tabla 16.37. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo, para distintas configuraciones de reactor en continuo asociando a un módulo de membrana. $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[4\text{-clorofenol}]_F = [\text{H}_2\text{O}_2]_F = 1.0$ mM, cantidad de enzima en el reactor $\cong 4$ mg de SBP para la enzima soluble y $\cong 8$ mg de SBP para la enzima inmovilizada y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	Tanque continuo, SBP soluble (4 mg)		Tanque continuo, SBP inmovilizada (8 mg)		Lecho fluidizado, SBP inmovilizada (8 mg)	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	92.43	98.92	97.18	98.65	90.41	86.12
10	91.69	98.17	94.59	39.65	92.67	69.43
15	90.32	97.93	95.04	51.15	96.05	64.01
20	87.96	97.55	95.60	55.89	97.18	64.58
25	85.36	97.18	95.60	60.29	98.20	66.95
30	83.37	97.06	95.60	64.01	96.73	70.56
40	81.63	96.31	95.37	73.49	95.83	76.65
50	79.28	96.82	95.49	76.87	94.70	82.29
60	73.57	96.07	95.04	81.95	93.46	85.33
80	67.03	96.98	93.12	86.35	86.24	89.85
100	43.41	96.35	83.30	90.07	53.07	90.30
120	27.16	94.74	67.74	90.30	38.29	87.37
140	20.46	92.02	48.22	89.73	28.93	82.40
160	19.22	91.31	36.94	88.15	26.79	78.34

Anexo 8. Eliminación de diferentes compuestos fenólicos clorados

Tabla 16.38. Medidas de actividad (U/mg) de la SBP frente a distintos compuestos fenólicos. $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $V_{\text{cubeta}} = 3$ ml, [Compuesto fenólico] = 10 mM, [AAP] = 2.4 mM, [H₂O₂] = 0.2 mM y tampón fosfato 0.1 M de pH 7.0.

Compuesto fenólico	[SBP] (mg/ml)	Actividad (U/mg)	Media (U/mg)
	0.041	373.28	
2-Clorofenol	0.083	382.85	378.07
	0.125	378.07	
	0.041	228.13	
4-Clorofenol	0.083	230.46	227.87
	0.125	225.02	
	0.041	72.48	
3-Clorofenol	0.083	71.44	71.90
	0.125	71.79	
	0.041	62.67	
Fenol	0.083	63.83	63.31
	0.125	63.44	

Tabla 16.39. Conversión alcanzada en el reactor y en el permeado a lo largo del tiempo para distintas concentraciones iniciales de enzima en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. En la eliminación de distintos compuestos. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), [4-clorofenol]₀ = [H₂O₂]₀ = 2.0 mM, [4-clorofenol]_F = [H₂O₂]_F = 2.0 mM y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	2-Clorofenol					
	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.12 mg/ml	
	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)	X_{reactor} (%)	X_{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	95.65	96.27	93.09	96.05	94.52	96.55
10	95.73	95.70	93.80	95.45	94.08	95.61
15	95.88	94.82	93.58	95.23	95.23	92.98
20	95.61	93.91	93.53	96.05	94.79	95.45
30	93.54	93.91	91.67	96.33	95.45	96.55
40	90.55	94.76	90.79	96.60	95.71	96.60
50	84.95	94.05	87.33	96.49	93.75	96.93
60	80.78	95.97	86.48	96.82	91.17	96.82
80	74.06	94.33	83.28	96.82	86.82	97.26

4-Clorofenol						
Tiempo (min)	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.12 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	94.80	94.56	93.87	92.66	93.06	89.81
10	94.80	94.77	92.96	92.90	92.53	90.56
15	94.45	95.01	94.19	92.64	91.68	90.18
20	94.44	94.77	90.34	88.00	91.28	90.77
30	91.76	95.63	89.54	90.26	90.42	91.97
40	88.72	95.25	90.90	91.65	89.49	93.17
50	82.61	94.64	91.06	91.49	87.94	92.05
60	78.34	92.02	88.61	90.88	87.14	91.20
80	70.62	93.09	83.89	88.96	84.80	89.92

3-Clorofenol						
Tiempo (min)	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.12 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	61.49	86.24	68.92	77.70	78.15	96.65
10	75.37	86.64	75.25	78.46	80.52	91.55
15	77.98	85.72	77.48	78.79	80.88	90.63
20	77.10	84.53	73.76	79.24	80.42	89.70
30	70.72	81.21	69.08	80.80	78.93	88.28
40	63.18	80.95	63.61	79.69	74.99	83.58
50	56.08	77.65	59.70	80.28	68.92	83.60
60	50.08	80.05	52.95	78.81	63.01	82.42
80	40.55	76.82	42.60	78.15	56.03	80.69

Fenol						
Tiempo (min)	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.12 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	66.72	88.09	72.55	94.49	68.78	89.02
10	70.09	78.24	72.69	82.39	71.04	80.35
15	70.09	73.54	70.29	79.08	71.99	78.38
20	68.33	71.41	68.54	76.40	70.90	75.13
30	63.71	68.67	65.27	73.24	68.27	73.24
40	56.83	66.17	61.73	71.56	62.61	72.63
50	50.25	66.04	55.56	68.65	59.15	72.45
60	45.28	64.34	49.15	67.32	55.13	71.81
80	35.92	62.37	38.22	59.36	43.54	66.57

Anexo 9. Eliminación de mezclas de fenoles

Tabla 16.40. Conversión alcanzada en el reactor, en el permeado y para los fenoles totales a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[H_2O_2]_0 = [H_2O_2]_F = 2.0$ mM, $[SBP]_0 = 0.08$ mg/ml, $[SBP]_F = 0.004$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.5 mM [Fenol] ₀ = 0.5 mM		[4-Clorofenol] _F = 1.5 mM [Fenol] _F = 0.5 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	98.23	97.32	77.67	74.49	93.09	91.62
10	94.52	97.32	68.17	74.61	87.94	91.64
15	92.83	96.87	67.47	73.60	86.49	91.05
20	91.34	96.09	69.16	72.16	85.79	90.11
25	90.57	95.61	70.34	73.12	85.51	89.99
30	89.72	94.60	70.23	73.12	84.85	89.23
40	88.31	93.50	68.95	73.22	83.47	88.43
50	87.71	92.35	68.59	71.20	82.93	87.07
60	86.91	90.19	67.71	70.24	82.11	85.20
80	85.81	88.38	65.48	67.38	80.73	83.13

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 1.0 mM		[4-Clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 1.0 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	97.82	97.27	76.65	91.65	87.24	94.46
10	95.03	97.51	76.05	86.25	85.54	91.88
15	93.39	97.11	75.16	80.98	84.27	89.04
20	92.82	96.37	73.86	77.66	83.34	87.01
25	93.17	95.94	73.66	75.72	83.41	85.83
30	92.51	95.58	73.33	74.82	82.92	85.20
40	92.51	95.06	73.06	73.36	82.79	84.21
50	91.78	95.23	71.85	72.88	81.81	84.06
60	91.27	93.50	70.25	72.40	80.76	82.95
80	90.40	92.61	69.52	70.24	79.96	81.43

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 0.5 mM [Fenol] ₀ = 1.5 mM		[4-Clorofenol] _F = 0.5 mM [Fenol] _F = 1.5 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	93.58	85.85	78.69	83.45	82.42	84.05
10	86.73	86.06	75.92	82.26	78.62	83.21
15	86.19	85.51	72.28	78.56	75.76	80.30
20	86.97	85.91	67.34	75.85	72.25	78.36
25	86.65	85.31	65.92	72.97	71.10	76.05
30	87.06	85.18	64.24	69.81	69.94	73.65
40	86.50	85.89	62.83	66.70	68.75	71.50
50	86.73	86.23	60.37	64.63	66.96	70.03
60	85.17	86.85	58.07	63.02	64.85	68.97
80	83.08	86.56	53.41	60.63	60.83	67.11

Tabla 16.41. Conversión alcanzada en el reactor, en el permeado y para los fenoles totales a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[H_2O_2]_0 = [H_2O_2]_F = 2.0$ mM, $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml, $[SBP]_F = 0.002$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.5 mM [Fenol] ₀ = 0.5 mM		[4-Clorofenol] _F = 1.5 mM [Fenol] _F = 0.5 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	94.28	99.52	53.22	68.34	84.02	91.96
10	94.47	99.52	55.49	63.18	84.72	90.68
15	91.66	99.52	60.70	60.89	83.92	90.10
20	90.13	99.52	64.00	60.35	83.60	89.97
25	89.05	98.56	65.91	61.47	83.26	90.01
30	87.29	98.08	65.79	62.79	81.92	90.22
40	84.80	95.68	63.95	64.48	79.59	90.04
50	80.24	93.76	59.04	64.48	74.94	89.56
60	76.94	90.40	53.57	61.60	71.10	88.00
80	72.79	84.16	48.77	57.28	66.79	85.36

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 1.0 mM		[4-Clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 1.0 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	95.92	98.32	53.20	82.00	74.56	90.16
10	96.16	97.60	58.48	73.60	77.32	85.60
15	94.24	97.36	62.56	68.56	78.40	82.96
20	91.84	97.12	64.24	67.36	78.04	82.24
25	90.40	96.88	64.24	66.40	77.32	81.64
30	88.24	96.16	63.04	65.44	75.64	80.80
40	86.32	94.96	60.88	64.00	73.60	79.48
50	82.96	93.28	56.80	61.84	69.88	77.56
60	79.84	91.84	52.48	59.68	66.16	75.76
80	75.28	86.56	46.00	52.72	60.64	69.64

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 0.5 mM [Fenol] ₀ = 1.5 mM		[4-Clorofenol] _F = 0.5 mM [Fenol] _F = 1.5 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	93.22	93.65	57.60	93.60	66.51	90.44
10	92.09	94.01	61.44	75.84	69.10	77.39
15	89.16	93.51	60.64	73.28	67.77	75.09
20	87.00	93.07	58.40	62.88	65.55	66.96
25	85.80	92.26	55.68	61.28	63.21	65.16
30	82.32	91.78	52.16	59.04	59.70	63.12
40	80.47	90.33	48.80	55.52	56.72	59.39
50	73.55	87.41	37.92	51.04	46.83	53.84
60	70.26	84.06	33.28	44.32	42.53	46.28
80	65.00	78.40	24.64	32.64	34.73	33.28

Tabla 16.42. Comparación de la conversión en fenoles totales alcanzada en diferentes relaciones de fenol/4-clorofenol a lo largo del tiempo para distintas concentraciones de enzima en el reactor y alimentación en el reactor tanque continuo asociado a un módulo de membrana. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[H_2O_2]_0 = [H_2O_2]_F = 2.0$ mM y caudal de alimentación = 5 ml/min.

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.5 mM [Fenol] ₀ = 0.5 mM		[4-Clorofenol] ₀ = 1.5 mM [Fenol] ₀ = 0.5 mM	
	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml	
	[SBP] _F = 0.002 mg/ml		[SBP] _F = 0.004 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	84.02	91.96	93.09	91.62
10	84.72	90.68	87.94	91.64
15	83.92	90.10	86.49	91.05
20	83.60	89.97	85.79	90.11
25	83.26	90.01	85.51	89.99
30	81.92	90.22	84.85	89.23
40	79.59	90.04	83.47	88.43
50	74.94	89.56	82.93	87.07
60	71.10	88.00	82.11	85.20
80	66.79	85.36	80.73	83.13

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 1.0 mM		[4-Clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 1.0 mM	
	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml	
	[SBP] _F = 0.002 mg/ml		[SBP] _F = 0.004 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	74.56	90.16	87.24	94.46
10	77.32	85.60	85.54	91.88
15	78.40	82.96	84.27	89.04
20	78.04	82.24	83.34	87.01
25	77.32	81.64	83.41	85.83
30	75.64	80.80	82.92	85.20
40	73.60	79.48	82.79	84.21
50	69.88	77.56	81.81	84.06
60	66.16	75.76	80.76	82.95
80	60.64	69.64	79.96	81.43

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 0.5 mM [Fenol] ₀ = 1.5 mM		[Fenol] ₀ = 1.5 mM	
	[4-Clorofenol] _F = 1.0 mM		[Fenol] _F = 1.0 mM	
	[SBP] ₀ = 0.04 mg/ml [SBP] _F = 0.002 mg/ml		[SBP] ₀ = 0.08 mg/ml [SBP] _F = 0.004 mg/ml	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	66.51	90.44	82.42	84.05
10	69.10	77.39	78.62	83.21
15	67.77	75.09	75.76	80.30
20	65.55	66.96	72.25	78.36
25	63.21	65.16	71.10	76.05
30	59.70	63.12	69.94	73.65
40	56.72	59.39	68.75	71.50
50	46.83	53.84	66.96	70.03
60	42.53	46.28	64.85	68.97
80	34.73	33.28	60.83	67.11

Tabla 16.43. Conversión alcanzada en el reactor, en el permeado y para los fenoles totales a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. Influencia de la concentración de 4-clorofenol en la eliminación de fenol. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[H_2O_2]_0 = 1.0, 1.5, 2.0, 2.5$ y 3.0 mM, $[H_2O_2]_F = 1.0, 1.5, 2.0, 2.5$ y 3.0 mM, $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml; $[SBP]_F = 0.002$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min

Tiempo (min)	[Fenol] ₀ = 1.0 mM [4-Clorofenol] ₀ = 0.0 mM		[Fenol] ₀ = 1.0 mM	
	[Fenol] _F = 1.0 mM		[4-Clorofenol] _F = 0.0 mM	
	Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	83.31	87.71	83.31	87.71
10	81.72	87.25	81.72	87.25
15	78.23	85.70	78.23	85.70
20	74.76	82.76	74.76	82.76
25	71.06	79.67	71.06	79.67
30	67.60	76.78	67.60	76.78
40	61.23	74.26	61.23	74.26
50	60.07	71.16	60.07	71.16
60	57.80	69.30	57.80	69.30
80	57.28	68.80	57.28	68.80

Tiempo (min)	[Fenol] ₀ = 1.0 mM [4-Clorofenol] ₀ = 0.5 mM		[Fenol] _F = 1.0 mM [4-Clorofenol] _F = 0.5 mM			
	Fenol		4-Clorofenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	62.56	79.12	98.56	97.12	74.56	85.12
10	69.52	80.80	98.08	97.60	79.04	86.40
15	71.68	80.56	95.68	97.60	79.68	86.24
20	71.20	79.84	94.24	97.60	78.88	85.76
25	69.76	78.64	92.32	97.60	77.28	84.96
30	68.08	77.44	90.88	97.12	75.68	84.00
40	63.04	71.44	88.00	96.64	71.36	79.84
50	60.88	68.80	87.04	96.16	69.60	77.92
60	57.52	66.88	84.64	95.20	66.56	76.32
80	53.44	63.04	79.36	94.24	62.08	73.44
Tiempo (min)	[Fenol] ₀ = 1.0 mM [4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM		[Fenol] _F = 1.0 mM [4-Clorofenol] _F = 1.0 mM			
	Fenol		4-Clorofenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	53.20	82.00	95.92	98.32	74.56	90.16
10	58.48	73.60	96.16	97.60	77.32	85.60
15	62.56	68.56	94.24	97.36	78.40	82.96
20	64.24	67.36	91.84	97.12	78.04	82.24
25	64.24	66.40	90.40	96.88	77.32	81.64
30	63.04	65.44	88.24	96.16	75.64	80.80
40	60.88	64.00	86.32	94.96	73.60	79.48
50	56.80	61.84	82.96	93.28	69.88	77.56
60	52.48	59.68	79.84	91.84	66.16	75.76
80	46.00	52.72	75.28	86.56	60.64	69.64
Tiempo (min)	[Fenol] ₀ = 1.0 mM [4-Clorofenol] ₀ = 1.5 mM		[Fenol] _F = 1.0 mM [4-Clorofenol] _F = 1.5 mM			
	Fenol		4-Clorofenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	65.20	73.36	93.92	97.76	82.43	88.00
10	70.24	76.24	93.44	97.60	84.16	89.06
15	71.20	77.92	91.84	97.60	83.58	89.73
20	70.96	76.96	89.12	97.44	81.86	89.25
25	69.28	75.76	88.32	96.96	80.70	88.48
30	66.88	74.32	84.96	96.32	77.73	87.52
40	63.28	71.44	83.20	95.04	75.23	85.60
50	57.52	68.80	79.20	92.48	70.53	83.01
60	54.64	64.48	77.28	88.64	68.22	78.98
80	49.36	56.56	74.88	83.68	64.67	72.83

Tiempo (min)	[Fenol] ₀ = 1.0 mM [4-Clorofenol] ₀ = 2.0 mM		[Fenol] _F = 1.0 mM [4-Clorofenol] _F = 2.0 mM			
	Fenol		4-Clorofenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	55.60	72.88	91.96	92.32	79.84	85.84
10	61.84	72.64	91.96	93.04	81.92	86.24
15	62.08	74.32	89.32	93.88	80.24	87.36
20	59.92	73.84	86.08	93.88	77.36	87.20
25	58.72	72.40	84.04	92.68	75.60	85.92
30	57.52	67.60	82.00	91.36	73.84	83.44
40	58.00	63.04	77.92	88.48	71.28	80.00
50	52.48	58.48	73.24	85.72	66.32	76.64
60	50.08	52.72	71.20	81.28	64.16	71.76
80	44.32	46.48	66.16	76.12	58.88	66.24

Tabla 16.44. Conversión alcanzada en el reactor, en el permeado y para los fenoles totales a lo largo del tiempo para distintas relaciones fenol/4-clorofenol en el reactor tanque continuo con módulo de membrana. Influencia de la concentración de fenol en la eliminación de 4-clorofenol. $V_R = 100$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 20 °C), $[H_2O_2]_0 = 1.0, 1.5, 2.0, 2.5$ y 3.0 mM, $[H_2O_2]_F = 1.0, 1.5, 2.0, 2.5$ y 3.0 mM, $[SBP]_0 = 0.04$ mg/ml; $[SBP]_F = 0.002$ mg/ml y caudal de alimentación = 5 ml/min

Tiempo (min)	[4-clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 0.0 mM		[4-clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 0.0 mM	
	4-Clorofenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	94.96	98.80	94.96	98.80
10	94.00	98.08	94.00	98.08
15	91.36	98.08	91.36	98.08
20	89.68	98.08	89.68	98.08
25	88.48	98.08	88.48	98.08
30	86.80	98.08	86.80	98.08
40	85.12	98.08	85.12	98.08
50	84.88	98.08	84.88	98.08
60	84.16	97.60	84.16	97.60
80	83.68	97.36	83.68	97.36

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 0.5 mM		[4-clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 0.5 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	95.68	98.56	75.04	84.64	88.80	93.92
10	95.44	97.84	82.24	85.12	91.04	93.60
15	93.28	97.60	83.20	84.16	89.92	93.12
20	92.32	97.60	81.76	83.68	88.80	92.96
25	91.12	97.36	79.84	83.68	87.36	92.80
30	89.92	97.12	77.92	81.28	85.92	91.84
40	88.24	96.40	73.12	78.88	83.20	90.56
50	86.08	95.68	70.24	76.00	80.80	89.12
60	83.68	94.72	66.40	73.12	77.92	87.52
80	78.88	90.64	59.20	70.24	72.32	83.84

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 1.0 mM		[4-clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 1.0 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	95.92	98.32	53.20	82.00	74.56	90.16
10	96.16	97.60	58.48	73.60	77.32	85.60
15	94.24	97.36	62.56	68.56	78.40	82.96
20	91.84	97.12	64.24	67.36	78.04	82.24
25	90.40	96.88	64.24	66.40	77.32	81.64
30	88.24	96.16	63.04	65.44	75.64	80.80
40	86.32	94.96	60.88	64.00	73.60	79.48
50	82.96	93.28	56.80	61.84	69.88	77.56
60	79.84	91.84	52.48	59.68	66.16	75.76
80	75.28	86.56	46.00	52.72	60.64	68.44

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 1.5 mM		[4-clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 1.5 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	91.82	91.38	55.52	76.32	70.04	82.34
10	90.90	91.83	63.84	74.24	74.66	81.28
15	88.53	92.67	64.64	72.32	74.20	80.46
20	86.38	91.90	60.96	71.84	71.13	79.86
25	83.42	91.52	60.80	70.56	69.85	78.94
30	80.05	91.21	56.96	68.00	66.20	77.28
40	75.18	87.91	51.04	62.40	60.70	72.60
50	69.26	84.63	46.08	57.12	55.35	68.12
60	67.03	81.02	41.12	51.68	51.49	63.42
80	62.04	74.00	35.04	43.04	45.84	55.43

Tiempo (min)	[4-Clorofenol] ₀ = 1.0 mM [Fenol] ₀ = 2.0 mM		[4-clorofenol] _F = 1.0 mM [Fenol] _F = 2.0 mM			
	4-Clorofenol		Fenol		Fenoles Totales	
	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)	X _{reactor} (%)	X _{permeado} (%)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	89.47	82.96	49.84	69.40	63.05	73.92
10	88.23	83.20	57.28	67.60	67.60	72.80
15	85.37	86.80	57.28	65.92	66.64	72.88
20	82.26	87.28	55.36	65.68	64.33	72.88
25	78.93	86.80	52.00	64.48	60.98	71.92
30	75.26	85.36	50.08	61.48	58.47	69.44
40	71.26	81.52	45.28	56.44	53.94	64.80
50	64.48	77.44	39.52	51.28	47.84	60.00
60	60.16	72.88	34.84	46.12	43.28	55.04
80	56.08	67.60	26.20	39.88	36.16	49.12

Anexo 10. Otras alternativas de tratamiento

Tabla 16.45. Medidas de actividad de la SBP comercial (disolución de 50 µg/ml) y extractos crudos totales (ECT) de raíces transformadas (RT) de nabo y tabaco wt para el estudio de la estabilidad al almacenamiento. T^a = 35 °C, V_{cubeta} = 1 ml, [o-dianisidina] = 0.63 mM, [H₂O₂] = 0.23 mM y tampón de acetato/acético 0.1 M de pH = 5.5.

Tiempo (d)	Nabo			Tabaco wt			SBP		
	Act. U/ml	Media (U/ml)	Act. (%)	Act. U/ml	Media (U/ml)	Act. (%)	Act. U/ml	Media (U/ml)	Act. (%)
0	229737			283421			236868		
	248355	239050	100	289605	289013	100	262697	236283	100
	239057			294013			209297		
15	221578			273618			137565		
	235000	228289	96	277184	277401	96	136907	137566	58
	228287			281401			137223		
30	223421			249110			116440		
	197828	213421	85	242202	250132	83	132828	124441	31
	219013			259089			124052		

Tabla 16.46. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque discontinuo adicionando distintas unidades de enzima en el reactor, para las tres peroxididasas. $V_R = 5 \text{ ml}$, $T^a = T^a \text{ ambiente } (\approx 25 \text{ }^\circ\text{C})$ y $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \text{ mM}$.

Tiempo (min)	SBP			
	X (%)			
	50×10^3 U/ml	75×10^3 U/ml	100×10^3 U/ml	220×10^3 U/ml
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	38.16	39.38	46.99	50.58
6	42.91	45.61	58.23	70.54
10	42.72	46.71	63.41	73.72
30	52.01	47.61	72.29	81.92
60	52.78	50.61	74.66	86.53

Tiempo (min)	Nabo			
	X (%)			
	50×10^3 U/ml	75×10^3 U/ml	100×10^3 U/ml	220×10^3 U/ml
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	46.24	64.16	71.64	96.48
6	50.21	69.49	81.27	97.47
10	50.44	72.83	85.92	98.38
30	51.03	76.65	92.09	98.39
60	57.33	80.42	95.60	99.05

Tiempo (min)	Tabaco wt			
	$X_{\text{Tabaco wt}}$ (%)			
	50×10^3 U/ml	75×10^3 U/ml	100×10^3 U/ml	220×10^3 U/ml
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	41.76	63.46	75.25	96.21
6	45.31	68.25	84.57	97.61
10	48.86	73.05	89.84	97.97
30	52.31	77.62	92.09	98.06
60	58.28	81.44	93.77	98.20

Tabla 16.47. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque discontinuo a distintas concentraciones iniciales de sustratos, para las tres peroxididasas. $V_R = 5$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 25 °C) y unidades de enzima = 100×10^3 U/ml.

Tiempo (min)	SBP			
	X (%)			
	[4-clorofenol] ₀ = [H ₂ O ₂] ₀			
	0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM	4.0 mM
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	40.42	38.05	46.99	39.64
6	66.17	55.50	58.23	44.65
10	76.84	69.02	63.41	47.31
30	90.68	81.97	72.29	47.76
60	92.22	87.18	74.66	49.67

Tiempo (min)	Nabo			
	X (%)			
	[4-clorofenol] ₀ = [H ₂ O ₂] ₀			
	0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM	4.0 mM
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	85.56	83.09	71.64	52.39
6	88.70	83.94	81.27	54.03
10	89.61	85.07	85.92	55.66
30	90.51	86.80	92.09	57.43
60	91.15	90.04	95.60	58.91

Tiempo (min)	Tabaco wt			
	X (%)			
	[4-clorofenol] ₀ = [H ₂ O ₂] ₀			
	0.5 mM	1.0 mM	2.0 mM	4.0 mM
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	89.79	85.64	75.25	52.22
6	90.70	89.36	84.57	57.90
10	91.63	93.07	89.84	60.45
30	93.46	92.31	92.09	63.96
60	93.97	96.18	93.77	64.88

Tabla 16.48. Conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque discontinuo a distintas concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno, para las tres peroxidadas. $V_R = 5$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 25 °C), unidades de enzima = 100×10^3 U/ml y $[4\text{-clorofenol}]_0 = 2.0$ mM.

		SBP			
Tiempo (min)	X (%)				
	$[\text{H}_2\text{O}_2]_0$				
	1.5 mM	2.0 mM	2.5 mM	3.0 mM	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	43.50	46.99	47.34	44.51	
6	54.03	58.23	61.53	51.72	
10	58.03	63.41	64.88	50.71	
30	64.46	72.29	72.32	55.07	
60	69.21	74.66	78.08	61.09	

		Nabo			
Tiempo (min)	X (%)				
	$[\text{H}_2\text{O}_2]_0$				
	1.5 mM	2.0 mM	2.5 mM	3.0 mM	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	74.93	71.64	67.74	67.19	
6	79.11	81.27	76.42	70.04	
10	82.36	85.92	77.98	72.91	
30	86.70	92.09	81.43	76.82	
60	88.76	95.60	82.29	79.53	

		Tabaco wt			
Tiempo (min)	X (%)				
	$[\text{H}_2\text{O}_2]_0$				
	1.5 mM	2.0 mM	2.5 mM	3.0 mM	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	72.51	75.25	62.30	62.24	
6	82.72	84.57	71.51	68.22	
10	86.60	89.84	76.56	74.19	
30	90.06	92.09	80.93	82.82	
60	92.17	93.77	82.94	85.66	

Tabla 16.49. Comparación de la conversión alcanzada a lo largo del tiempo en el reactor tanque discontinuo en una disolución modelo y en un efluente industrial, para las tres peroxidasas. $V_R = 5$ ml, $T^a = T^a$ ambiente (≈ 25 °C), $[4\text{-clorofenol}]_0 = [\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0$ mM y unidades de enzima = 100×10^3 U/ml.

Tiempo (min)	SBP		Nabo		Tabaco wt	
	X (%)		X (%)		X (%)	
	Disolución modelo	Efluente industrial	Disolución modelo	Efluente industrial	Disolución modelo	Efluente industrial
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	46.99	13.12	71.64	94.05	75.25	77.43
6	58.23	44.38	81.27	94.57	84.57	94.35
10	63.41	67.69	85.92	96.41	89.84	94.87
30	72.29	83.06	92.09	96.89	92.09	95.07
60	74.66	82.67	95.60	96.72	93.77	95.58

Anexo 10.1 Análisis de los parámetros fisicoquímicos del efluente industrial



LABORATORIO RÍO CUARTO

ANÁLISIS DE PRODUCTOS Y SUB. PROD. AGROPECUARIOS
BRASIL 334 – TEL/FAX: 0358 – 4632224
5800 – RÍO CUARTO – (CÓRDOBA)

Solicitante:	UNRC – María Inés Medina
Datos de la muestra:	Agua curtiembre
Fecha de Solicitud:	30 de Agosto de 2011
Nº de Protocolo:	1709

RESULTADOS

ANÁLISIS FÍSICO Y ORGANOLÉPTICO	
COLOR:	Amarillento
OLOR:	Putrefacto
SEDIMENTOS:	Presenta
TURBIDEZ:	Propia del sedimento

ANÁLISIS QUÍMICO					
ANIONES		Valores Normales	CATIONES		Valores Normales
Bicarbonatos (mg/L)	922,2	200,0-300,0	Calcio (mg/L)	142,0	Max. 200
Carbonatos (mg/L)	216,0		Magnesio (mg/L)	95,3	Max. 50
Cloruros (mg/L)	35,3	Máx. 350	Sodio (mg/L)	325,0	Máx. 200
Sulfatos (mg/L)	176,6	Máx. 500	Potasio (mg/L)	28,8	Max. 120

OTRAS DETERMINACIONES		Valores Normales
SOLIDOS DISUELTOS (gr./L)	21,2	Max. 1,5
pH	9,79	6,0 – 9,0
CONDUCTIVIDAD ELECTRICA (µS/cm)	10100	2500 µS/cm 20°C
DUREZA TOTAL (mg/L CaCO ₃)	750,0	Máx. 400
ALCALINIDAD TOTAL (mg/L Ca CO ₃)	756,2	Máx. 400
ARSÉNICO (mg/L As ³⁺⁵⁺)	No detectable	Máx. 0,01

OBSERVACIONES
No detectable por presencia de interferentes.

Nota 1: Los valores normales que aparecen en este informe son de referencia para *Agua Potable* según capítulo XII del CAA Art. 983 – (Res Conj. SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007)

Nota 2: La extracción, identificación y transporte de la muestra fue responsabilidad del cliente. Los resultados corresponden a la fracción de muestra analizada.

Lugar y Fecha: Río Cuarto 31 de Agosto de 2011

LABORATORIO RÍO CUARTO
Ing. Agr. YOLETA BENITEZ
Mat. CAUCONP 3336

Firma y Sello



IACA
LABORATORIOS

LABORATORIO INDUSTRIAL

Corresponde a : UNIV.NAC.DE RIO CUARTO
Solicitado por: UNIV. NAC. DE RIO CUARTO
Fecha de admisión: 06/09/11

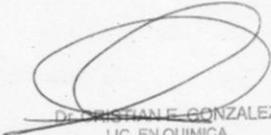
N° de Informe: 109062266
Fecha de emisión: 16/09/11
Hoja: 1

ANALISIS FISICOQUIMICO DE AGUAS RESIDUALES

Material examinado....: EFLUENTE CURTIEMBRE
Muestra procedente de.: RIO CUARTO
Sitio de extracción...: PRE-TRATAMIENTO
Fecha extracción.....: -
Fecha recepción.....: 06/09/11
Fecha emisión informe.: 16/09/11

Extracción realizada por el solicitante.

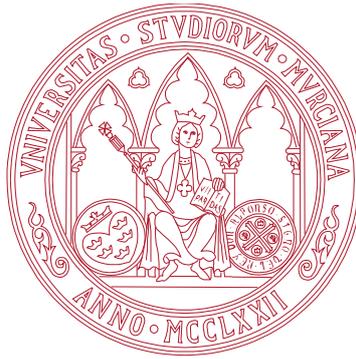
D.B.O (Diluciones múltiples).....:	1422	mg/l
D.Q.O (dicromato-espectrofotométrico)....:	4320	mg/l


~~DR. CRISTIAN E. GONZALEZ~~
LIC EN QUIMICA
LABORATORIO INDUSTRIAL BROMATOLOGICO
MPCPQ 5469

San Martin 68 - B8000FIB - Bahía Blanca
Tel.: 0291-459 9950 - Fax: 0291-459 9998
laboratorios@iaca.com.ar - www.iaca.com.ar



**17. RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL
EN INGLÉS**



UNIVERSITY OF MURCIA

FACULTY OF CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

**Design, Operation and Modeling of Continuous Processes,
Enzymatic Bioreactors-Membrane Module, Application to
the Removal of Phenolic Contaminants from Industrial
Wastewater**

DALJE SUNITH BARBOSA TRILLOS

Murcia, 2012

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION.....	371
1.1 Phenols and chlorophenols: description and environmental issues	371
1.2. Treatments for the removal of phenolic compounds in wastewaters	372
1.3. Phenolic compounds removal using enzymatic treatment	372
1.4. Continuous reactors for the removal of phenolic compounds	375
2. OBJECTIVES OF THE STUDY	379
3. METHODOLOGY	381
4. RESULT	383
4.1 Comparison of the performances of various commercial peroxidases for the removal of 4-chlorophenol	383
4.2. Comparison of the various studied reactor configurations	385
4.3. Design model for the continuous tank reactor associated with an ultrafiltration Module	386
4.4. Removal of various chlorinated phenolic compounds	388
4.5. Enzymatic removal of phenolic compounds blends	389
4.6. Other removal alternatives	391
5. GENERAL CONCLUSIONS	395
6. REFERENCES.....	399

1. INTRODUCTION

1.1 Phenols and chlorophenols: description and environmental issues

Phenols are chemical compounds used widely, for example, in the pharmaceutical, papermaking, plastic, textile and petroleum industries. Due to their intensive use, phenolic compounds are extremely common industrial contaminants which are present in numerous wastewaters. The U.S. Environmental Protection Agency (US-EPA) considers that the following eleven phenolic compounds are gilt-edged contaminants and may be at the origin of important environmental issues: pentachlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2-chlorophenol, phenol, 4,6-dinitro-2-methylphenol, 2,4-dinitrophenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, 4-chloro-3-methylphenol and 2,4-dimethylphenol. Given their high toxicity and prevalence in water and soils, it becomes absolutely necessary to devote special attention to the study of environment contamination by phenols and their removal alternatives [1].

1.2. Treatments for the removal of phenolic compounds in wastewaters

Various processes are available today to carry out an efficient removal of phenols from wastewaters. Nevertheless, they present some drawbacks, such as a high operational cost, important energy consumption, a representative production of toxic byproducts which could have some significant repercussions on the environment, etc. For all these reasons, none of the existing processes is completely suited for the sustainable treatment of phenols in wastewaters and environmentally friendly new alternatives must be found.

Busca *et al.* [2] presented a complete review of the above alternatives, comparing the advantages and drawbacks of each one. According to them, enzymatic processes seem to be a very interesting option and, consequently, in the last decades a special effort has been made in the study of this kind of processes, mainly using peroxidases extracted from plants or microorganisms.

1.3. Phenolic compounds removal using enzymatic treatment

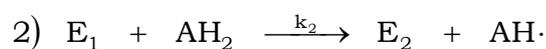
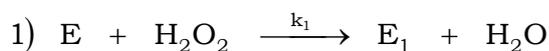
Enzymes derived from plants and microorganisms have been used since the 1970s to oxidize phenols. Table 1.1 presents some of the enzymes used and their possible applications for wastewater treatment [3].

The use of enzymes plays an increasingly important role in the removal of phenolic compounds from wastewaters. This removal takes place through the preliminary oxidation of phenolic compounds with hydrogen peroxide, forming aromatic free radicals which are able to combine together by polymerization reactions to form high molecular weight products [4]. Due to the low solubility in water of these products, they precipitate and are then easily separated from the reaction medium.

Table 1.1. Enzymes and their possible applications in water treatment

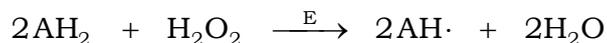
Enzyme	Origen	Application
Peroxidase	<i>Armoracia lapothifolia</i> [5-7] <i>Glycine max</i> [L.] Merr [4, 8-12] <i>Cynara scolymus</i> L. [13, 14] <i>Coprinus cinereus</i> [15, 16] <i>Artromyces ramosus</i> [17, 18]	Degradation of phenol, aniline, chlorophenols, polyaromatics and herbicides. Polymerization of humic acid. Biosensors for the detection of chlorophenols.
Chloroperoxidase	<i>Caldariomyces fumago</i> [19]	Oxidation of phenolic compounds. Biosensors for the detection of chlorophenols.
Lignin peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> [20]	Degradation of aromatic compounds.
Manganese peroxidase	<i>Lentinula edades</i> [3]	Degradation of chlorophenols.
Tyrosinase	<i>Agaricus bisporus</i> [3]	Oxidation of catechol.
Laccase	<i>Trametes versicolor</i> [3] <i>Cerrena unicolor</i> [3] Plants [3]	Degradation of chlorophenols and liquid effluents from textile industry. Degradation of 2,4-dichlorophenol. Degradation of chlorophenols.

It is well accepted, that the kinetic model of phenolic compounds oxidation reaction by vegetal peroxidases follows the steps described below (only the main cycle is presented). Although this one has been only validated for the horseradish peroxidase.



The native enzyme E is oxidized by the hydrogen peroxide producing an intermediate active enzyme E₁ which is able to accept an aromatic compound (AH₂) in its active center and to oxidize it. A free radical (AH·) is then produced and released in the reaction medium, leaving the enzyme under the E₂ form which is able to oxidize another aromatic molecule (AH₂), releasing another free radical in the reaction medium, and returning the enzyme to its native

form (E), completing the mechanism cycle. The global reaction can then be expressed as:



where: AH_2 is the phenolic contaminant and $\text{AH}\cdot$ is the free radical [21].

Finally, the free radicals formed during the steps 2 and 3 of the reaction mechanism polymerize to give a dimer:



The resulting dimer has quite low solubility in water, but not low enough to precipitate by itself; consequently the dimer stays water-soluble in the reaction medium and can be oxidized and polymerized again following the same successive steps previously described. The new polymer formed has a higher molecular weight than the dimer and consequently a lower water-solubility, favoring its precipitation [22].

Enzymes can be used to treat a large variety of compounds; they are able to work in the presence of toxic substances for microorganisms; they are active under a wide range of pH and temperature values; they do not need to become acclimatized, do not produce biomass and need very simple control processes. Furthermore, compared to other physical or chemical processes, processes involving enzymes have the advantages of limiting the use of corrosive products and of reducing the consumption of oxidant compounds. For all these reasons the use of enzyme catalyzed processes is a very interesting alternative compared to other treatments [23].

Nevertheless, it is important to notice that enzymatic processes do present some drawbacks, such as the need to use significant amounts of enzymes to reach high yields of compounds removal and the relatively short catalytic lifetime of enzymes [24, 25].

Peroxidases have the drawback of tending to become inactive very fast during phenolic compounds oxidation reactions, mainly because the polymer produced during the enzymatic reaction adsorbs the active protein. Nevertheless, knowing that when the peroxidases are anchored to a solid support the adsorption phenomenon of the latter by the polymer formed is almost eradicated it can be stated that the possibility of immobilizing the peroxidase presents a great advantage.

A classical example of support used for the immobilization of a huge variety of enzymes by covalent bondage using various immobilization techniques are glass beads. Lai *et al.* [26], for instance, report the anchor of horseradish peroxidase to a γ -APTES activated porous glass beads support. After a posttreatment with glutaraldehyde, the immobilized enzyme, using the optimal anchoring conditions, has shown a specific activity of about 50.7 U/g of support. The same authors studied the removal of 4-chlorophenol using the previously mentioned immobilized enzyme.

Another interesting study carried out by Siddique *et al.* concerning the use of immobilized horseradish peroxidase is reported in the literature [27]. According to the results reported in this article, the anchor of the horseradish peroxidase to a cellulose filter and its further use for the removal of 4-chlorophenol contaminants allows to remove almost 89% of the phenolic compounds, while the removal reaches 82% and 98% when the peroxidase is anchored to nylon beads or nylon tubes, respectively.

1.4. Continuous reactors for the removal of phenolic compounds

The use of a continuous process presents various advantages for the biological removal of phenolic compounds: the process can be easily automated; the operative costs are quite low; it is possible to work during quite a long period before stopping for maintenance purposes; and, finally, the continuous process is able to treat high initial concentrations of phenolic compounds contaminants.

Removal of phenolic compounds by enzymatic treatments has been carried out using different configurations of continuous reactors and, for most

of them, peroxidases of vegetal and microbial origin. In spite of the fact that peroxidases have a higher degree of specificity than microorganisms and can operate under a wider range of pH and temperature, the use of enzymes in continuous processes has not been extensively studied, even though it has taken an increasing importance over the past few years.

Concerning the reactor configuration, continuous tank reactors working with a fluidized enzymatic bed are generally used. For instance, Wilson *et al.* [28] reports the use of a continuous tank reactor pilot plant using a fluidized catalytic bed of granular activated carbon for the removal of phenolic contaminants from an industrial wastewater, reaching an elimination rate of up to 90% of chlorinated compounds. Loh and Ranganath [29] also report good results of 4-chlorophenol removal working with a fluidized bed bioreactor using a blend of granular activated carbon and *Pseudomonas putida* cultures immobilized on polystyrene beads as catalytic medium.

Trivedi *et al.* [30] investigated the continuous removal of phenol using soybean peroxidase immobilized on alginate-silica hybrid gel in a transported bed reactor which allows the simultaneous reaction step and the regeneration of the catalyst.

Enzyme immobilization also has the advantage of being an efficient way to keep the peroxidase inside the reactor when working with a continuous tank reactor. Nevertheless, other ways are possible, such as the use of an appropriate membrane (suitable pore size distribution) and in the specific case of enzymatic processes, the use of ultrafiltration membranes. Both methods have some advantages and drawbacks and the choice will depend on the specific application. Nevertheless, a review of the literature reveals very few studies have been devoted to the use of enzymatic reactors associated with an ultrafiltration module for the removal of phenolic contaminants in wastewaters. The few works available which talk about the use of ultrafiltration membranes, use these to directly catch the phenolic contaminants or as support for the immobilization of the enzyme.

The biological treatment of phenolic effluents has been extensively studied worldwide. Our Research Group “Análisis y Simulación de Procesos

Químicos, Bioquímicos y de Membrana” of the Chemical Engineering department of the University of Murcia (Spain), where this PhD thesis has been carried out, has participated and still participates in the international scientific effort, working on various projects aiming at studying the different systems available for the removal of phenolic compounds using enzymatic processes.

The use of soybean (SBP) and horseradish (HRP) peroxidases, under the free or immobilized form, for the removal of phenol and 4-chlorophenol has been studied by our group. In addition, an exhaustive comparative study of the distinct reactor configurations (batch reactor, continuous tank reactor, continuous tank reactors in series and fluidized bed reactor) for the removal of phenol and 4-chlorophenol compounds, using the previously cited enzymes, has been carried out, also developing a design model for each one of the alternatives [31-39].

My thesis work follows the previously mentioned investigations initiated a long time ago by our Research Group. Since the soybean peroxidase usually used in the previous research works is no longer commercialized, it has been necessary to look for another commercially available soybean peroxidase and to evaluate the efficiency of the new enzyme compared to the already tested horseradish peroxidase. Additionally, it was decided to study the use of a new type of peroxidase, the artichoke peroxidase, since the plant from which the peroxidase is derived is locally produced in the Murcia’s region at low cost. Thus, the present work is focused on the study of the enzymatic removal of 4-chlorophenol, using the three previously cited peroxidases. The first step of the investigation was dedicated to the comparison of the efficiency of the different peroxidases studied in order to determine which is the best for 4-chlorophenol removal purposes. On the base of the results of the first step, the second step was focused on the influence of the reactor configuration, studying two different reactor configurations, a continuous tank reactor and a fluidized tank reactor. In both cases, the enzymatic reactor was associated with an ultrafiltration membrane module and the peroxidase efficiency was studied under the free and immobilized form.

2. OBJECTIVES OF THE STUDY

The main objective of this work is the study and comparison of the use of two continuous reactor configurations (continuous tank reactor and fluidized bed reactor) associated with an ultrafiltration membrane module when processing phenol contaminated wastewaters by an enzymatic treatment involving free or immobilized peroxidases. The following specific objectives have been therefore investigated:

1. Parametric study of the most relevant variables of the biological elimination process of 4-chlorophenol, such as pH and temperature, using three different vegetal peroxidases (soybean, horseradish and artichoke). The study implies the measurement of the initial reaction rates in function of the reaction conditions in spectrophotometric cuvettes and the evolution of the conversions during the time course of the reaction in a continuous tank reactor. From these results it will be possible to determine the optimal conditions for each peroxidase and which one is the most suitable for the studied process.
2. Evaluation of the relative importance of the different ways of peroxidase activity loss during operations in a continuous tank reactor (dilution of the peroxidase concentration due to the outgoing enzyme of the reactor, deactivation of the enzyme and/or occurrence of other phenomena).

3. Study of the influence of the most relevant operational conditions on the 4-chlorophenol conversion reached in a continuous tank reactor associated with an ultrafiltration membrane module, using the selected peroxidase.
4. Immobilization of the selected enzyme through covalent bond on a porous glass support and its characterization, analyzing its behavior during 4-chlorophenol removal operations.
5. Study of the influence of the most relevant operational conditions on the 4-chlorophenol conversion reached in a continuous tank reactor associated with an ultrafiltration membrane module, using the prepared immobilized peroxidase.
6. Experimentation using a fluidized bed reactor configuration and the immobilized peroxidase. Study of the influence of the operational conditions on the 4-chlorophenol conversion.
7. Comparison of results obtained with the different continuous reactor configurations in order to determine which is the most suitable for the 4-chlorophenol removal process.
8. Design model of the best reactor configuration for the continuous removal of 4-chlorophenol.
9. Comparison of the behavior of the selected enzyme when processing other phenolic contaminants such as phenol, 2-chlorophenol and 3-chlorophenol in the continuous tank reactor associated in series with a membrane module.
10. Study of the behavior of the selected enzyme when processing a phenol/4-chlorophenol mixture in the continuous tank reactor associated in series with a membrane module.
11. Comparative study of the 4-chlorophenol removal performances of the freeze-drying soybean peroxidase previously used in the present work with those of Total Peroxidase Extracts (TPE) extracted from turnip and tobacco wt hairy roots (HR) in a batch reactor.

3. METHODOLOGY

In the course of the experimental procedures carried out during this work, four different phenolic substrates (phenol, 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol) have been used, monitoring the removal of phenolic contaminants through the use of a colorimetric method [40] when studying the removal of a unique phenolic compound and with HPLC when investigating the removal of a blend of phenolic compounds (phenol and 4-chlorophenol). Three different biocatalysts have been tested, soybean peroxidase (SBP), horseradish peroxidase (HRP) and artichoke peroxidase (AKPC). The enzyme immobilization has been carried out by covalent bonding of the amino groups of the protein over a porous glass bead support (PG 75-400) [37].

The various experimental bioreactor systems used during the different steps of the thesis are the following ones: a discontinuous tank reactor, a continuous tank reactor and a fluidized bed reactor, the last two configurations being associated in series with an ultrafiltration membrane module. In the case of the continuous tank reactor associated with ultrafiltration membrane module, the use of the soybean peroxidase under both the soluble and immobilized forms has been tested.

The last part of the work has been dedicated to the possibility of using vegetable peroxidases obtained from hairy root extraction. The produced peroxidases have been characterized and tested as biocatalysts for the removal of 4-chlorophenol contaminants in a discontinuous tank reactor.

4. RESULT

4.1 Comparison of the performances of various commercial peroxidases for the removal of 4-chlorophenol

With the aim of establishing which peroxidase is the most suitable for the removal of 4-chlorophenol contaminants from wastewater, the first step of the present thesis has been dedicated to the comparison of the performances of three commercial peroxidases derived from soybean, horseradish and artichoke (SBP, HRP and AKPC respectively).

The comparison is based on the determination of the enzymatic activity of each fresh peroxidase through the well-known enzymatic activity measurement protocol that uses an absorbance method [22]. In addition, working with the discontinuous tank reactor configuration, the determination of the optimal operational conditions (pH and temperature) and the storage stability of each peroxidase for the 4-chlorophenol removal has been carried out. Finally, the continuous tank reactor associated with an ultrafiltration module membrane has been used to determine the activity loss and operational stability of the three tested peroxidases under reaction conditions.

According to the results, using SBP and HRP peroxidases, the higher enzymatic activity (278 and 142 U/mg, respectively) is reached when working

at a pH level of 7.0, while when using AKPC peroxidase the optimal pH conditions correspond to a value of 6.5, reaching an enzymatic activity of 61 U/mg. Concerning the optimal temperature, results have shown that, independently of the tested peroxidase, the enzymatic reaction is favored when working at 30 °C. On the other hand, according to the storage stability study, it appears that SBP is the most stable peroxidase, keeping a relative activity (based on the activity of the fresh peroxidase) of 97% after 28 days of storage, while HRP and AKPC present, in the same conditions, a relative activity of respectively 87 and 83%. Consequently, from these preliminary results it can be stated that SBP peroxidase seems to be the most efficient tested enzyme for 4-chlorophenol removal purposes, while HRP peroxidase activity is significantly lower and AKPC peroxidase provides the worst results.

Results concerning the assessment of the activity loss of the three tested peroxidases under reaction conditions show that, independently of the used peroxidase, the enzymatic activity unit (U) in the reactor decreases with the time course of the reaction. Nevertheless, complementary protein determination of the permeate stream of the membrane module indicates that the amount of enzyme passing through the membrane is rather significant compared to the loss of enzymatic activity units observed in the reactor. It is then very likely that a significant part of the enzyme is adsorbed on the membrane and/or retained by the polymer deposited on the membrane surface.

In addition, the enzymatic behavior observed during the 7 hours experiments in a continuous tank reactor associated with an ultrafiltration membrane module, allowing to study the operational stability of the peroxidases, is in accordance with the ones previously observed during the enzymatic activity measurement and the discontinuous reactor experiments, which had shown that the SBP peroxidase is the more efficient enzyme for the 4-chlorophenol removal, followed by the HRP peroxidase and finally the AKPC enzyme [42, 43].

4.2. Comparison of the various studied reactor configurations

According to the previously exposed results, the soybean peroxidase is the most efficient enzyme for the removal of 4-chlorophenol contaminants from wastewater. It has been thus selected to carry out a complete and detailed study of the different reactor configurations proposed: a continuous tank reactor and a fluidized bed reactor, both associated in series with an ultrafiltration module membrane. Moreover, in the case of the continuous tank reactor, the possibility of using the selected peroxidase under the immobilized form has been also investigated in order to compare its catalytic performances with the ones of the soluble form of the enzyme. The overall experimental results set gathered during this part of the study makes possible the comparison of the different reactor configurations studied, allowing to determinate which one is the most suitable for the continuous enzymatic removal of 4-chlorophenol contaminants.

It appears that the trends of 4-chlorophenol removal observed in both the reactor and permeate stream, for the three tested configurations, are quite different and that the catalytic behavior of the enzyme is highly dependent of the reactor configuration and the enzyme form. Concerning reactor conversions, even if at the beginning of the reaction the three reactor configurations present high conversion levels (higher than 90%), during the course of the reaction, a decrease of the 4-chlorophenol conversion in the reactor is observed for the three tested configurations. In the case of the soluble enzyme, this trend is very likely due to the fact that a part of the peroxidase is trapped by the polymeric compound produced over the time course of the reaction and is furthermore “immobilized” on the surface of the membrane, leading to a progressive decrease of the concentration of the active enzyme in the reactor. On the other hand, in the case of the reactor configuration using the enzyme immobilized on porous glass beads, the observed trend is probably due to the progressive deposition of the polymeric compound over the catalytic particles which implies a decrease of the accessibility of the 4-chlorophenol to the active sites of the enzyme.

The only way to obtain a constant and high 4-chlorophenol conversion in the permeate stream is to work with the continuous tank reactor configuration

and the soluble enzyme. Indeed, as previously mentioned, when working with soluble enzyme, a part of it is trapped by the polymeric compound and is furthermore “immobilized” on the surface of the membrane. Nevertheless, it appears that the trapped enzyme is still quite active and a significant part of the remaining 4-chlorophenol molecules which have not been converted in the reactor can be converted in the membrane module, leading to a high and stable conversion in the permeate stream over the whole time course of the reaction.

In conclusion, from the comparison of the various reactor configurations and enzyme forms for the continuous removal of 4-chlorophenol from wastewater, it can be affirmed that the use of the continuous tank reactor configuration working with the soluble peroxidase is the most suitable alternative. Indeed, this configuration allows to obtain an overall removal yield higher than 90% which is constant over the time course of the reaction and to minimize the operational costs due to the lower consumption of enzyme and to the saving of the immobilization procedure.

4.3. Design model for the continuous tank reactor associated with an ultrafiltration module

In this part of the thesis, it was thus decided to take advantage as much as possible of the overall set of experimental data previously gathered and to complete our investigation with the development of a mathematical model for the reactor configuration which gives the best results of 4-chlorophenol removal (the continuous tank reactor associated in series with an ultrafiltration membrane module and using the soluble soybean peroxidase).

The modeling approach has been done taking into account the various experimental observations and is based on the Dunford mechanism. The mathematical model of the overall reactor-membrane module process has been developed according to the following general hypotheses:

1. All the species present in the tank (4-chlorophenol, hydrogen peroxide, dimers, polymers and enzyme) leave the reactor and re-enter in the recycling

flow. However, only the substrates that have not been consumed (4-chlorophenol and hydrogen peroxide) are able to pass through the membrane in the permeate stream.

2. As a result of the output of the tank and the transmembrane pressure, the insoluble compounds produced during the reaction (dimers and polymers) are gradually deposited on the membrane surface, trapping enzyme molecules inside. This is similar to “in situ” enzyme immobilization on the membrane, a phenomenon which determines a progressive decrease in the tank enzyme concentration while the enzyme concentration on the membrane surface increases. Both enzymes keep their initial specific activity.

3. Reaction products (dimers and polymers) cover the membrane pores, slowing the flow through the membrane, so that 4-chlorophenol concentration in the permeate stream, inside the membrane and in the reactor are different. The following relation can be established:

$$[AH_2]_R \geq [AH_2]_M \geq [AH_2]_P$$

However, the hydrogen peroxide molecule is smaller and its permeability is the same throughout, meaning that its concentration is the same in the reactor, membrane and in the permeate stream.

4. The bioreactor-membrane module behaves as an association of two continuous tank reactors in series.

5. The reaction between the phenolic compound and hydrogen peroxide follows the free radical mechanism proposed by Dunford. According to this mechanism, the phenol consumption rate follows a bisubstrate Ping-Pong kinetic equation.

6. The reaction products also follow the same reaction mechanism which causes additional hydrogen peroxide consumption. As a result, the hydrogen peroxide consumption rate is higher than the phenolic compound consumption rate.

According to the values obtained during the fitting of the mathematical model it can be mentioned that the value of the membrane open pore fraction parameter (k_f) is very close to 1.0, confirming one of the hypotheses stated for the development of the mathematical model, the value of the membrane reaction volume parameter is, as it was expected, relatively low ($V_M = 4.22 \text{ cm}^3$) and the theoretical value of the specific activity of the enzyme parameter ($k_{\text{cat}} = 276 \text{ U/mg}$) is very close to the specific activity of the enzyme determined experimentally through activity measurements (278 U/mg). The previously commented results, together with the very low standard deviation of the developed model (2.92%), support the good fitting of the theoretical model to the experimental data in spite of the heterogeneity and complexity of the modeled system. At the same time, it can be concluded that the various stated hypotheses, and among them, the use of the Ping-Pong kinetic mechanism and the proportionality between the fraction of open pores of the membrane and the fraction of enzyme which has not been deposited on the membrane, are confirmed.

4.4. Removal of various chlorinated phenolic compounds

After the detailed study of the enzymatic removal of 4-chlorophenol from wastewater, the next part of the research was to study the influence of the position of the covalently bonded chlorine atom of the aromatic ring (*ortho*, *meta* or *para*) on the efficiency of the enzymatic removal of this kind of contaminants using the soybean peroxidase. The complete study implies the comparison of the behavior of the soluble soybean peroxidase when removing in continuous different phenolic compounds such as phenol and other organochlorides of phenol (2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol), using a continuous tank reactor associated with an ultrafiltration membrane module, as previously described.

The preliminary approach consisted of the determination of the enzymatic activity of the soybean peroxidase in presence of each one of the phenolic compounds following the previously cited absorbance method, while, in a complementary way, the continuous removal of the different phenolic compounds has been experimentally studied under reaction conditions varying the initial enzyme concentration in the reactor.

The results of the enzymatic activity determination showed that the nature of the treated phenolic compound has a great influence on the activity of the soybean peroxidase, obtaining a higher enzymatic activity when processing chlorinated phenolic compounds. The ranking of activity in a decreasing order is: 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, 3-chlorophenol and finally phenol obtaining, respectively, 378, 227, 71 and 63 U/mg of specific activity.

The higher activity of the soybean peroxidase when processing 2- and 4-chlorophenol can be explained by the fact that the most stable resonance structures of the phenolic ring correspond to the *ortho* and *para* positions, leading to a higher efficiency of the soybean peroxidase. In addition, molecules which include electron acceptors functional groups, such as chlorine, are more reactive and this is very likely the reason why 3-chlorophenol presents a higher activity compared to the non-substituted phenolic ring.

In addition, the trends observed during the different assays of continuous removal of the different phenolic compounds under reaction conditions are fully in accordance with the data previously obtained for the study of the enzymatic activity of the SBP in function of the substrate nature; being the efficiency of the SBP higher for the chlorine substituted compounds compared to phenol and, among the chlorophenolic compounds, presenting for the most stable resonance structures (*ortho*- and *para*-chlorophenols) a higher removal efficiency compared to less stable resonance structure compounds (*meta*-chlorophenol).

4.5. Enzymatic removal of phenolic compounds blends

The last part of the thesis has been dedicated to the study of the behavior of the soybean peroxidase when treating water simultaneously contaminated by various phenolic pollutants. The main idea is to determine the efficiency of the proposed removal process when treating a contaminated solution which has properties as close as possible to the ones of a real phenolic contaminated industrial effluent. The processing of different bi-compounds blends (phenol/4-chlorophenol) in a continuous tank reactor associated with an

ultrafiltration membrane module using the soluble soybean peroxidase was thus investigated.

The complete study of the removal of different phenolic compounds blends has been carried out through the realization of four different experimental series. The first two experimental series were dedicated to the study of the influence of the initial enzyme concentration in the reactor and the feed flow, respectively, while the other two experimental series were devoted to the study of the relative influence of the concentration of one phenolic compound on the removal efficiency of the other one, (the influence of the phenol concentration on the 4-chlorophenol conversion and vice versa).

According to the results and knowing that the SBP has been used until now for the study of the removal of a unique phenolic compound (mainly 4-chlorophenol), it is firstly interesting to notice that when processing a blend of two different phenolic substrates (4-chlorophenol and phenol), the SBP is able to simultaneously provide high conversion levels for both substrates, obtaining a conversion in the permeate stream of about 90% for 4-chlorophenol and at the same time a conversion of about 70% for phenol

The results of the experimental assays varying the initial concentration of the enzyme in the reactor and the feed flow provide important information about the suitable strategy which is necessary to adopt when treating an industrial effluent using this kind of enzymatic process, being higher the amount of enzyme necessary to treat an effluent with a higher proportion of phenol.

From the results of the experimental assays dedicated to the study of the relative influence of the concentration of one phenolic compound on the removal efficiency of the other one, it can be mentioned that the relative composition of the treated blend is an important factor which has to be taken into account when treating phenolic blends. In details, the increase of the proportion of phenol in the treated blend has a negative impact on the total phenolic compounds conversion, while, on the contrary, the increase of the proportion of 4-chlorophenol in the treated blend is generally beneficial for the total phenolic compounds conversion.

4.6. Other removal alternatives

In the framework of my PhD thesis, I had the opportunity to carry out a two months pre-doctoral stay within the Molecular Biology Department of the National University of Río Cuarto (Argentina). One of the research lines of this group is directly interlocked with the issue of my PhD thesis [44-46], giving the opportunity to carry out a comparative study between the 4-chlorophenol removal efficiency of the soybean peroxidase (SBP) used until now in all my investigations and the 4-chlorophenol removal efficiency of two other peroxidases obtained from total enzyme extraction of turnip (*Brassica napus*) and tobacco wt (*Nicotiana tabacum cv. Wisconsin*) Hairy Roots (HR).

A comparison of the 4-chlorophenol removal efficiency has been carried out using a batch reactor configuration with synthetic samples and a real industrial effluent obtained from a tannery industry. In addition, a complete characterization (peroxidase activity [47, 48], storage stability, isoelectric point (pI) [49, 50], Reinheitszahl index (RZ) [51] and molecular weight (MW) [52, 53]) of all the tested enzymatic materials has been carried out.

The determination of the peroxidase isoenzymes activity has been carried out using *o*-dianisidine as substrate and in order to compare in a satisfactory manner the activity of the turnip and tobacco wt TPEs with the activity of the commercial SBP, protein concentration determination of all the prepared peroxidase solutions, has been carried out following the Bradford method [54], allowing to obtain at the same time the activity expressed in U/ml, and more interesting, the specific activity of the different studied peroxidases, expressed in U/mg.

According to the obtained results, the three tested peroxidases present high *o*-dianisidine enzymatic activity, being higher the activity observed for the purified SBP (509×10^4 U/mg), followed by the tobacco wt TPE (569×10^3 U/mg) and finally the turnip TPE (434×10^3 U/mg). The monitoring of the storage stability of the peroxidases, using as key parameter the observed changes of the enzymatic activity after 15 and 30 days of storage at 4 °C, has shown that after 30 days of storage both TPEs still have a quite high

enzymatic activity corresponding to more than 80% of the activity of the fresh peroxidases, while the SBP only maintains 30% of the enzymatic activity of the fresh soybean peroxidase.

Concerning the Reinheitszahl index (RZ), the results have shown that the commercial SBP presents the higher purity grade with a RZ index of 1.8, while the turnip and tobacco wt TPEs, with a RZ index of 0.16 and 0.59 respectively, have a quite low purity grade. These results are logical knowing that the commercial SBP has been previously purified, while the TPEs prepared at the laboratory do not have undergone any purification treatment. The results of the isoelectric point (pI) analysis of the different tested peroxidases. As it can be seen, the commercial SBP has a unique main pI which is close to the neutral point (6.7), while both TPEs present two main pIs which have pH values in the basic range (10.1-8.8 and 10.0-8.0 for the turnip and tobacco wt TPE, respectively).

The results of the determination of the molecular weight of the different tested peroxidases have shown that the commercial SBP has a unique band corresponding to 44.9 kDa which is a typical value for the soybean peroxidase [55]. On the other hand, two different bands are detected for the turnip TPE, the main band corresponding to a value of 56.8 kDa. Finally, at least five different bands, having values between 12.3 and 39.9 kDa, can be identified for the tobacco wt TPE, and it has been impossible to determine which one corresponds to the main band.

Comparing the results obtained during the study of the variation of the amount of enzyme in the reactor it can be concluded that turnip and tobacco wt TPEs have a much better behavior than the SBP for the removal of 4-chlorophenol contaminants in a batch reactor.

Moreover, according to the literature relative to the study of the influence of the use of various isoenzymes on the phenolic compounds removal efficiency [56-58], it can be said that the higher 4-chlorophenol removal efficiency observed for the turnip and tobacco wt TPEs can be originated by the fact that TPEs present principally predominant enzymes having a basic

character, while the commercial SBP only has isoenzymes with an almost neutral character.

It can be then concluded that even if all the isoenzymes which are present in the peroxidases are very likely active for the removal of 4-chlorophenol contaminants, the results obtained with the turnip and tobacco wt TPE tend to confirm, due to their higher degree of phenolic compounds removal, that basic isoenzymes are more efficient for the oxidative catalytic processing of 4-chlorophenol.

The results of the study of the removal of 4-chlorophenol from an industrial effluent seem to suggest that the 4-chlorophenol removal is favored in presence of the industrial effluent compared to the conversion obtained with synthetic samples. This trend is observed for all the tested peroxidases, even if the increase is more marked in the case of the SBP. These results open the opportunity to use the tested peroxidases for the removal of 4-chlorophenol contaminants in industrial effluents, arguing that the peroxidases activity is not negatively affected by the other compounds present in the industrial effluent sample. The unusual increase of 4-chlorophenol conversion observed for the assays implying the industrial effluent could be due to the apparent increase of the enzymatic activity of the peroxidases resulting from the presence in the effluent of one or several substances, such as for example organic matter (unstructured proteins, mucoprotein, keratin, fat), lime, salts, heavy metals or surfactants, as it has been shown by Flock et Al. [9].

It is also of great interest to notice that the results confirm that the preliminary purification of the turnip and tobacco wt TPE is not necessary and that TPEs, due to their very high removal efficiency and low unitary cost, could be an excellent alternative for the enzymatic removal of phenolic compounds.

5. GENERAL CONCLUSIONS

1. The decreasing order of enzymatic activity of the three peroxidases tested in the present PhD thesis for the 4-chlorophenol removal is as follows: Soybean peroxidase (SBP) > horseradish peroxidase (HRP) > artichoke peroxidase (AKPC). The study of the optimal operational conditions of the different peroxidases in a batch reactor has shown that the two peroxidases firstly cited are more efficient for the 4-chlorophenol removal when working at pH = 7.0, while the last peroxidase presents an optimal efficiency when working in a reaction medium slightly acid (pH = 6.5). Concerning the optimal reaction temperature, it has been determined that the three tested peroxidase yield higher 4-chlorophenol conversions when the reaction takes place at 30 °C. In addition, enzymatic assays carried out using a continuous tank reactor associated with an ultrafiltration membrane module have confirmed that the SBP is the peroxidase that presents the best activity for the removal of 4-chlorophenol contaminants. According to the preliminary results obtained in the first experimental part of the PhD thesis, it was thus decided to select the soybean peroxidase to develop the rest of the research work.

Moreover, the study in absence of reaction of the continuous tank reactor associated with the ultrafiltration membrane module has shown that the amount of enzyme which is initially present in the reactor progressively decreases over time, causing a significant decrease of the

enzymatic activity in the reactor. Nevertheless, arguing that very few enzymatic materials, or even no enzyme in the particular case of the soybean peroxidase, are detected in the permeate stream of the membrane module, it can be affirmed that the loss of enzyme in the reactor does not correspond to a definitive exit of the enzyme from the system, the membrane module plays thus well its role and maintains the enzyme in the reaction part of the process. Two different hypotheses can be then elaborated; the occurrence of an attrition phenomenon mainly due to the pumping implies a mechanical deactivation of the enzyme; a part of the enzyme is trapped in the membrane and/or the polymer deposited during the reaction on the membrane and is thus permanently fixed in this part of the process.

2. Working with the continuous tank reactor associated with the ultrafiltration membrane module has been possible to obtain a high (>90%) and almost constant 4-chlorophenol conversion in the permeate stream over the overall time course of the reaction, even though it has been observed that the 4-chlorophenol conversion monitored in the reactor progressively decreases over time. This particular result tends to confirm the previously exposed hypothesis that suggests that a part of the enzyme is trapped and fixed in the membrane module. Nevertheless, the trapped enzyme still seems to have an important activity and the fall of conversion observed in the reactor is fully compensated by the conversion which takes place in the membrane module. This particular phenomenon has been confirmed by some complementary experiments which have shown that the enzyme trapped by the polymeric compounds formed during the reaction and afterwards “immobilized” over the surface of the membrane has an enzymatic activity very similar to the one of the free enzyme.
3. From the detailed study of the different possible reactor configurations and enzyme forms (soluble versus immobilized) for the continuous enzymatic removal of 4-chlorophenol contaminants, it appears that the continuous tank reactor working with a soluble enzyme is the most suitable configuration because it allows to limit the operational costs, to reach the desired 4-chlorophenol conversion (>90%) in the permeate

stream limiting at the same time the enzyme consumption and to avoid the additional costs implied by the peroxidase immobilization.

4. The fitted model presents a standard deviation of about 2.92%. Taking into account the heterogeneity and complexity of the modeled system, it can be said that the standard deviation obtained is quite good and that the proposed model developed on the base of the stated work hypotheses is valid.
5. Concerning the influence of the nature of the phenolic contaminant treated in a continuous tank reactor associated with an ultrafiltration membrane module on the removal efficiency of the soybean peroxidase, the following removal efficiency ranking can be established: 2-chlorophenol > 4-chlorophenol > 3-chlorophenol > phenol. The observed trend is very likely linked with the stability of the resonance structures of the *ortho* and *para* phenolic rings and also with the higher reactivity provided by the chlorine group.
6. When removing a blend of phenolic compounds in a continuous system (phenol and 4-chlorophenol), the increase of the phenol proportion in the blend negatively affects the total phenolic compounds removal efficiency, while on the contrary the increase of the 4-chlorophenol proportion in the treated blend favors or at least does not disturb the total phenolic compounds removal efficiency.
7. Total Peroxidase Extracts (TPE) derived from turnip and tobacco wt Hairy Roots (HR) appear to be a viable and interesting alternative to purified peroxidases for the enzymatic removal of phenolic compounds due to their very high efficiency and probably lower cost of production.

6. REFERENCES

- [1] Available in internet: http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2001_10_12_criteria_ambientwqc_chlorinatedphenols80.pdf
- [2] *J. Hazard. Mater.* **160**, (2008), 265-288.
- [3] *Appl Catal. B: Environ.* **28**, (2000), 83-99.
- [4] *Bioresour. Technol.* **70**, (1999), 69-79.
- [5] *Water Res.* **34**, (2000), 1629-1637.
- [6] *Biotechnol. Bioeng.* **72**, (2001), 562-567.
- [7] *Water Res.* **36**, (2002), 4041-4052.
- [8] *Prot. Sci.* **10**, (2001) 108-115.
- [9] *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, (1999), 303-309.
- [10] *Water SA.* **28**, (2002), 149-158.
- [11] *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, (2002), 851-857.
- [12] *Water Res.* **33**, (1999), 3012-3018.
- [13] *Enzyme Microb. Technol.* **33**, (2003), 738-742.
- [14] *Plant Physiol. Biochem.* **49**, (2011), 395-403.
- [15] *Environ. Technol.* **23**, (2002), 1355-1367.
- [16] *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **78**, (2003), 952-958.
- [17] *52nd Purdue Industrial Waste Conference Proceedings.* (1997), 271-277.
- [18] *Environ. Technol.* **21**, (2000), 545-552.
- [19] *Enzyme Microb. Technol.* **37**, (2005), 82-588.
- [20] *J. Hazard. Mater.* **165**, (2009), 1091-1097.
- [21] *Water Res.* **27**, (1993), 1629-1639.
- [22] *Enzyme Microb. Technol.* **21**, (1997), 302-310.
- [23] Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols. (1967). 167-201. Marcel Dekker. New York.

- [24] *Biotechnol. Bioeng.* **54**, (1997), 251-261.
- [25] *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, (1999), 419-428.
- [26] *Process Biochem.* **40**, (2005), 1167-1174.
- [27] *Water Res.* **27**, (1993), 883-890.
- [28] *Water Environment Federation Annual Conference & Exposition.* (1997), 559-567.
- [29] *Chem. Eng. Sci.* **60**, (2005), 6313-6319.
- [30] *Proceedings of the Seventh World Congress of Chemical Engineering.* (2005).
- [31] *Desalination.* **195**, (2006), 1-3.
- [32] *Biochem. Eng. J.* **34**, (2007), 242-247.
- [33] *Chem. Eng. Process.* **47**, (2008), 1786-1792.
- [34] *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **1**, (2005), 115-120.
- [35] *Chem. Eng. J.* **127**, (2007), 47-57.
- [36] *Chem. Eng. J.* **145**, (2008), 142-148.
- [37] *Enzyme Microb. Technol.* **39**, (2006), 1016-1022.
- [38] *J. Membr. Sci.* **342**, (2009), 198-207.
- [39] *Chem. Eng. J.* **166**, (2011), 693-703.
- [40] Standard Methods for the Examination of water and wastewater. (1995). 19th Edition método 5530, sección 5, 36-39. APHA Washigton.
- [41] *Anal. Biochem.* **42**, (1972), 422-427.
- [42] *Environ. Technol.* **33**, (2012), 1071-1079.
- [43] *Desalin. Water Treat.* **37**, (2012), 97-107.
- [44] *Enzyme Microb. Technol.* **39**, (2006), 647-653.
- [45] *J. Hazard. Mater.* **176**, (2010), 784-791.
- [46] *Chemosphere.* **83**, (2011), 700-705.
- [47] *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, (2003a), 139-144.
- [48] *Peroxidase 1970-1980.* (1982) Chap 4. Centre de Botanique, Geneva.
- [49] *Physiol. Plant.* **79**, (1990), 327-330.
- [50] *J. Agric. Food Chem.* **45**, (1997), 596-598.
- [51] *J. Biol. Chem.* **241**, (1966), 2166-2172.
- [52] *Nature.* **227**, (1970), 680-685.
- [53] *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, (1994), 239-242.
- [54] *Anal. Biochem.* **72**, (1976), 248-254.
- [55] *Plant Physiol.* **103**, (1993), 1061-1066.
- [56] *J. Biotechnol.* **139**, (2009), 273-279.
- [57] *Chemosphere.* **72**, (2008), 1035-1042.
- [58] *Plant Sci.* **169**, (2005), 1102-1111.