

3

**Condicions
ambientals del
*Phanerochaete
chrysosporium*
per reduir la toxicitat
dels lleixius negres
amb enzims lignolítics
(Manganès peroxidasa)**

Condicions ambientals del *Phanerochaete chrysosporium* per reduir la toxicitat dels lleixius negres amb enzims ligninolítics

Aquest capítol se centrarà en les condicions ambientals del *Phanerochaete chrysosporium* que influeixen en l'activitat enzimàtica per reduir el color, els components aromàtics i la toxicitat en un efluent d'aigües residuals procedent de la indústria de la pasta de paper. Aquests estudis es realitzaren en bioreactors de tanc agitat carregats amb un volum de 300 ml.

Els resultats demostren que es pot establir una relació entre la quantitat d'enzim MnP i el percentatge de reducció de la toxicitat de la mostra; s'ha mesurat una activitat sensible al test de la lacasa -assimilada a altres peroxidases- que està relacionada amb la reducció d'una part important del color i els compostos aromàtics; finalment assenyalem que el procés de detoxificació no va lligat únicament a la detecció de l'enzim lignina peroxidasa.

Mots clau: *Phanerochaete chrysosporium*, lignina peroxidasa, manganès peroxidasa, test de toxicitat, distribució de pesos moleculars, lleixius negres.

Introducció

Els microorganismes ligninolítics, especialment els fongs white rot, han estat estudiats en nombrosos camps. A nivell molecular els gens que codifiquen els enzims més importants (Reddy, 1994; Jönsson, 1992; Jakob, 1993), els mecanismes de reacció en els que aquests enzims participen (Wariishi, 1992) i el seu metabolisme (Lundell, 1990) s'han començat a estudiar. Una altra àrea d'estudi està centrada en la producció d'aquests enzims (Feijoo, 1992; Jäger, 1985) per ser utilitzats en la implantació de processos indústria de la pasta i el paper- (Bajpai, 1992), o en la degradació de components tòxics i aromàtics o components naturals tals com la lignina (Davis, 1990; Hammel, 1991; Ferrer, 1991).

Un sistema enzimàtic complex és excretat pels white rot en la natura. El principal objectiu d'aquest sistema és degradar la lignina i permetre que el fong pugui accedir a la cel·lulosa, la qual és el seu principal aliment. La degradació de la lignina és un procés aerobi que està estretament connectat amb la presència del fong (Eriksson, 1993). Aquesta limitació i el fet que el sistema ligninolític és també actiu en cultius submergits obre un nou camp de recerca: la utilització dels fongs white rot (i no solament els seus enzims ligninolítics) pel tractament d'efluents de la indústria de la pasta i del paper (Bergbauer, 1992; Font, 1993; Mittarr, 1992), degradació de colorants (Paszczynski, 1991), insecticides (Abernethy, 1993), productes recalcitrants (Fejoo) i altres efluents procedents de les activitats polucionistes humanes (Sublette, 1992; Vyas, 1992).

Phanerochaete chrysosporium és un dels fongs white rot més estudiats. El seu sistema ligninolític és expressat sota condicions de limitació de carboni, nitrogen, o sulfur (Jeffries, 1981) i la síntesis enzimàtica és particularment activa a alta pressió parcial d'oxigen (Dosoretz, 1990) i poca agitació (Rajagopalan, 1990; Moyson, 1993). La degradació de la lignina és una reacció que necessita energia, per tant, *Phanerochaete chrysosporium*, a l'igual com d'altres fongs white rot, necessita un substrat per créixer per poder degradar i mineralitzar la lignina (Eriksson, 1993).

En aquest capítol vam estudiar l'efecte de les següents variables (figura 3.1): a) pèrdua de l'activitat enzimàtica de la soca de *Phanerochaete chrysosporium* després de tres anys de rebreses periòdiques; b) relació C/N que limiti un dels dos nutrients; c) manteniment d'una concentració de glucosa residual per tal d'augmentar la producció enzimàtica; d) el diferent comportament segons l'aeració subministrada al sistema; e) relació entre l'activitat enzimàtica i les reduccions del color, els compostos aromàtics i la toxicitat.

Materials i mètodes

Microorganisme i condicions de cultiu: es va treballar amb dues soques de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629: la primera anterior al març de 1991 i la segona posterior al gener de 1994. Havien estat mantingudes a 23°C en plaques de Petri en medi d'agar amb 2% de malta i sembrades periòdicament.

Indòcul: s'utilitzava com indòcul una solució d'espores de concentració coneguda -capítol primer-que, una vegada recollides es distribuïen en vials i es guardaven congelades a -15°C.

Cultius en bioreactor: un bioreactor múltiple model Biostat Q de Braun amb quatre vasos de cultiu de 500 ml de volum total cadascun, 330 ml de volum utilitzable, a 100 rpm i 37°C va ser utilitzat per realitzar els experiments. El disseny d'aquest equip manté les dimensions adequades pels quatre bioreactors per un posterior canvi d'escala i permet l'operació independent dels 4 vasos de cultiu. Estava equipat amb controls i mesura de temperatura, agitació, pH i només mesura de l'oxigen dissolt de forma independent per a cada vas. L'agitació es realitza per mitjà d'un agitador magnètic; cada bioreactor compta amb el seu rotàmetre per mesurar el cabal d'aire d'entrada amb un manoreductor central. La pèrdua d'humitat es minimitza amb l'ajuda d'un condensador de gasos per a cada vas; en el seu disseny l'aigua freda es subministrada a través d'un circuit obert d'aigua, ara bé, en el nostre cas, aquesta aigua se subministrava per mitjà d'un circuit extern per tal de garantir que la seva temperatura fos de 7°C i minimitzar encara més les pèrdues les pèrdues de volum.

En els bioreactors que es realitzava el subministrament de O₂ s'utilitzava un circuit extern, a partir d'una ampolla d'oxigen industrial, un manoreductor i un rotàmetre addicionals.

En cada bioreactor es fixaven les condicions de treball de forma específica i

independent. Connectat a la unitat digital d'instrumentació i control del Biostat Q hi havia una impressora que realitzava un registre del pH, l'oxigen dissolt en el medi, la temperatura i l'agitació durant tot el temps del procés.

Cada bioreactor s'inoculava amb la solució d'espores congelada fins a obtenir una concentració de 2.5×10^5 espores de *Phanerochaete chrysosporium* per ml de medi en el bioreactor.

Mètodes analítics: la glucosa, el color, els compostos aromàtics, la distribució de tamanys moleculars i la toxicitat s'analitzaven tal com s'ha descrit en els capítols anteriors.

Assaig enzimàtic: l'activitat de lignina peroxidasa (LiP) es mesurava amb veratril alcohol, segons el mètode descrit per Tien i Kirk (Tien i Kirk. Lignin Peroxidasa of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymology*, 161.....) Una unitat representa 1 μ mol d'alcohol veratrílic oxidat a veratril aldehid per minut. Els assaigs es van realitzar en un espectrofotòmetre UV/Vis Varian Cary3, amb una cubeta termostatitzada a 30 °C.

En els test enzimàtics les mostres es dilueixen en aigua de quinze a trenta cops, per tal que no hi hagués cap interferència del color de la mostra i es complís la llei de Lambert-Beer.

L'activitat de Manganès Peroxidasa (MnP) s'analitzava segons el mètode modificat de Paszczyński i col.(1988). En fer el test de la MnP primer mesuràvem l'activitat de la laccasa. Tant l'assaig de la laccasa com el de la MnP es basen en l'oxidació del 2,6-dimetoxifenol (DMP), que es fa servir com a substrat tipus. L'oxidació d'aquest compost es pot seguir perquè el producte que s'obté, el 2,6-dimetoxialdehid, té un màxim d'absorció de llum a 468 nm. Els assaigs es van realitzar en un espectrofotòmetre UV/Vis Varian Cary3, amb una cubeta termostatitzada a 30 °C. Com a tampó es fa servir malonat sòdic a una concentració final de 66,7 mM i a un pH de 4,5.

L'activitat de la MnP s'obté mesurant la transformació del DMP en presència de Mn^{2+} i H_2O_2 . La cubeta de reacció conté 200 μ l de malonat sòdic 250 mM, 50 μ l de DMP 20 mM, 50 μ l de $MnSO_4 \cdot H_2O$ 20 mM, 100 μ l de H_2O_2 4 mM i 500 μ l de mostra filtrada. Per restar l'efecte de les fenoloxidasas es repeteix l'assaig en les mateixes condicions però sense afegir-hi el H_2O_2 i el valor que s'obté es resta del primer. Per restar l'efecte de les peroxidases no dependents del manganès es repeteix l'assaig substituint el sulfat de manganès per 100 μ l de EDTA 10mM. Al valor obtingut se li resta el que s'obté quan es repeteix, de nou, l'assaig amb 200 μ l de malonat sòdic 250 mM, 50 μ l de DMP 20 mM, 100 μ l de EDTA 10 mM i 500 μ l de mostra per tal de restar l'efecte de de les fenoloxidasas en absència de Mn^{2+} .

Així doncs, el valor d'activitat de la MnP s'obté com :

$$\begin{aligned} & (\text{activitat peroxidasa en presència de } Mn^{2+} - \text{activitat fenoloxidasa en presència } Mn^{2+}) - \\ & - (\text{activitat peroxidasa } Mn^{2+} \text{ independent} - \text{activitat fenoloxidasa } Mn^{2+} \text{ independent}). \end{aligned}$$

Una unitat d'activitat representa 1 μ mol de dimetoxifenol oxidat per minut.

L'activitat de laccasa -en els microorganismes que la produeixen- s'obté mesurant durant dos minuts el canvi d'absorbància d'una solució que contenia malonat sòdic, DMP i mostra. En el nostre cas el resultat d'aquest test ens indicarà els equivalents d'activitat de laccasa, unitats equivalents d'activitat laccasa per litre.

Calcularem també la producció total de cadascun dels enzims a partir de les dades de l'activitat enzimàtica. Aquesta producció total d'un enzim correspondrà a l'àrea continguda durant tot el període d'activitat -o un període específic- de l'enzim. Per tal de facilitar els càlculs normalitzarem aquesta producció total d'enzim; per cada enzim calculem la producció total per cada experiment, i normalitzarem tots els valors respecte la producció més gran.

Efluent: l'efluent utilitzat s'ha descrit en el capítol 0. Es va utilitzar com a font de carboni i nitrogen glucosa a diferents concentracions finals i NH_4Cl per obtenir una concentració final de nitrogen de 75 i 550 ppm. El pH de la solució era acidificat fins pH 4.5. El volum final de medi era de 300 ml en el bioreactor; després s'esterilitzava a 120 C° durant 20 minuts.

Resultats i discussió

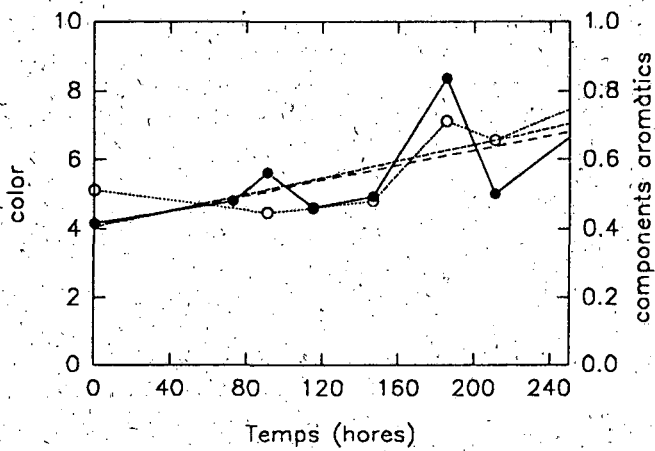
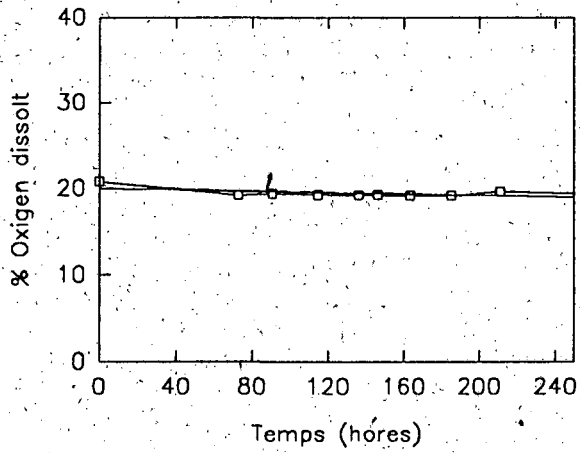
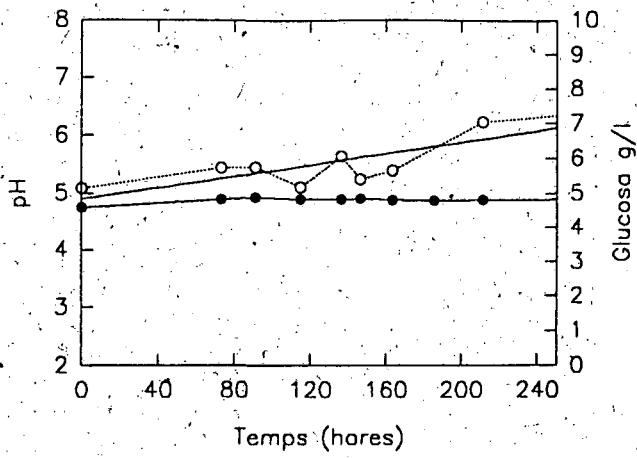
- Consideracions prèvies

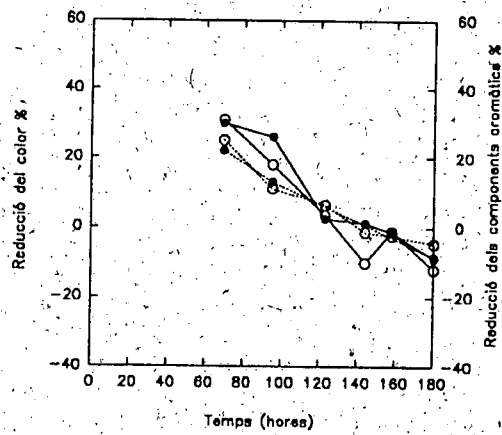
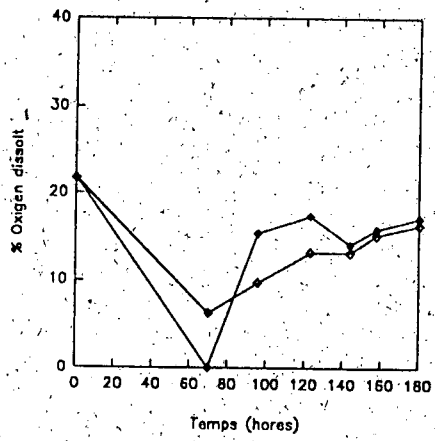
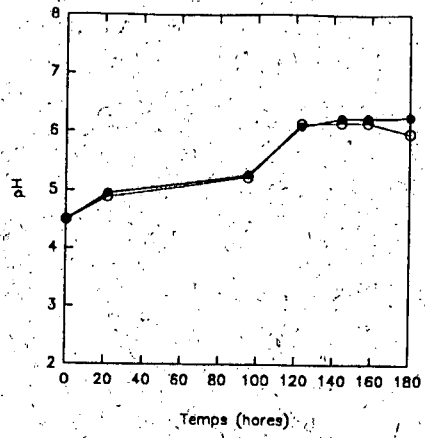
Bioreactor sense inocular

Per a analitzar la influència de l'oxigen, l'agitació, i la temperatura sobre els cultius ens interessava conèixer prèviament quin seria l'efecte de l'oxigen present en l'aire, l'agitació a la que sotmetriem el nostre medi, i la temperatura sobre els lleixius negres sense inocular.

En els nostres experiments intentariem treballar en les condicions òptimes per la inducció i producció, enzimàtica del *Phanerochaete chrysosporium*. Aquestes condicions ambientals per si soles ja podrien ocasionar algun canvi en els lleixius negres. Ens interessava conèixer sobretot el comportament del nostre medi a 37°C i l'efecte provocat per l'aireació i agitació.

Per això vam dur a terme el següent experiment -experiment 3.1- en un dels bioreactors del Biostat Q al qual se subministrava aire: 300 ml de lleixius negres esterilitzats, amb 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal, a 37°C i amb una agitació de 100 rpm el vam deixar sense inocular. En l'experiment 3.1, representat en la gràfica 3.1, vam poder observar l'evolució de les mateixes variables, pH, concentració d'oxigen dissolt en el medi, glucosa, que després controlariem en la resta d'experiments.





En analitzar el comportament del pH -gràfica 3.1a- i l'oxigen dissolt en el medi -gràfica 3.1b- ens adonem que les fluctuacions que hi ha són principalment degudes a l'error i la derivació de les sondes. El pH, per exemple, varia des de 4,75 fins 4,95, és a dir 4,75 +- 0,2 unitats. I l'oxigen dissolt del 20,6 % al 19 %, una variació relativa del 7 %. La desviació d'aquestes mesures no tota era deguda al sistema, però sí la principal part.

En treballar a 37°C, malgrat complementar el bioreactor amb un condensador que utilitzava aigua a 7°C, les pèrdues per evaporació no podien ser ignorades. Un bon indicador d'aquestes pèrdues podria ser la concentració de glucosa en el medi que hauria de restar constant en el temps.

Si suposem que l'efecte de la temperatura i l'evaporació és proporcional al temps transcorregut, podríem establir la següent relació, deduida a partir de la representació gràfica de la concentració de glucosa mesurada a diferents temps:

$G(t) = 5,15 + t * 0,008$ (eq. 3.1) on G representa la concentració de glucosa en g/l, i t el temps en hores

Aquesta evolució de la concentració de la glucosa en el temps la podem recalcular com percentatge de la glucosa inicial i, d'aquesta forma, aplicar aquest mateix percentatge al volum inicial. Així obtenim la taula 3.1, que ens indica que partint d'un volum inicial de medi en el bioreactor de 300 ml, després de 150 hores, s'haurà concentrat fins 230 ml, és a dir, un 23 % de variació. Aquestes dades -volum inicial i final per un determinat experiment- coincidirien amb els resultats experimentals en aquells casos que es va mesurar el volum final en el bioreactor.

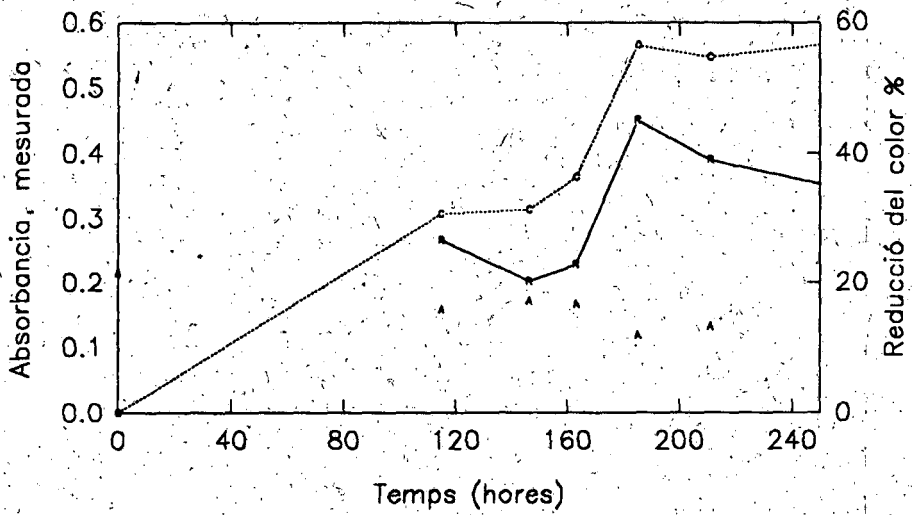
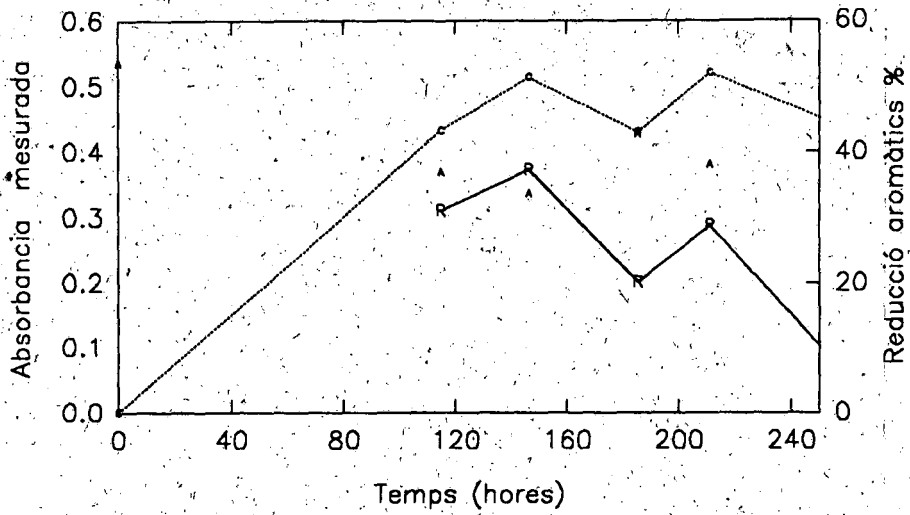
Hem aplicat l'equació 3.1 i la correcció del volum proposats en el paràgraf anterior a tots els experiments d'aquest capítol. Aquesta correcció del volum s'ha aplicat també al color i els compostos aromàtics. En la gràfica 3.2 hi ha representat l'evolució del color i els compostos aromàtics per aquest experiment

sense inocular. Hi podem veure que segueixen la mateixa tendència; ara bé, com ja hem vist en el capítol 0, les mesures del color i els compostos aromàtics tenen un error del 5% que justificaria en aquest cas la major dispersió en les dades. Però a més a més, en el cas del color i els compostos aromàtics no podem oblidar que tant l'agitació com l'aireació, són mètodes físic per reduir-los. En la gràfica 3.2 veiem clarament com les reduccions del color i els compostos aromàtics són superiors a les previstes per la concentració del volum: així, si a color i compostos aromàtics els apliquem la correcció del volum, encara tenim una reducció del color del 7% i dels compostos aromàtics del 13%. Per tant, en valorar les reduccions del color i dels compostos aromàtics dels diferents experiments haurem de recordar que com a màxim en 260 hores hi ha una part d'aquestes reduccions que no són degudes a l'acció del microorganisme, sinó que es deuen als mètodes físics de l'aireació i agitació.

Es va mesurar les toxicitats inicials i finals en l'experiment 3.1. Així, en 260 hores només aconseguírem reduir la toxicitat en un índex de 0,68 unitats. Si a aquesta reducció apliquéssim l'efecte de la concentració calculat prèviament només hauríem reduït per acció de la temperatura, l'agitació, i l'aireació la toxicitat en un índex de 1 en 260 hores. Per tant, les conseqüències d'aquesta pèrdua de volum a causa de l'evaporació del medi, fins i tot, en fermentacions llargues serien petites sobre la mesura de la toxicitat; no podem aplicar la correcció del volum abans proposada en la mesura de la toxicitat perquè només tenim valors de la toxicitat inicial i final, no tenim l'evolució de la toxicitat en el temps. A més a més, normalment prendrem els valors de les fermentacions a les primeres 150 hores. Per tant, sabem que estem aplicant les condicions més conservadores, i, en el pitjor dels casos, els valors reals seran millors als mesurats.

Aplicar la correcció del volum en el color i els compostos aromàtics mesurats es sumament important per poder interpretar correctament els experiments que es presenten en aquest capítol. A continuació, en la gràfica 3.3, presentem per un dels experiments realitzats -i que posteriorment seran analitzats en detall- els valors experimentals del color (absorbància a 460 nm) i els compostos

aromàtics (absorbància a 280 nm); hi apliquem en primer lloc la correcció del pH i posteriorment la correcció del volum. En la mateixa gràfica -gràfica 3.3- hem representat els valors de les reduccions del color i els compostos aromàtics calculades a partir de les absorbàncies corregides amb el pH primer i després amb la correcció del volum. Hi podem observar el pes que l'efecte de l'evaporació hi té.



Temps (hores)	Glucosa calculada	% de variació de la glucosa respecte la inicial	Volum calculat	Glucosamesurada
0	5.15	0	300	5.15
72.75	5.732	11.3	266	5.74
90.75	5.8876	14	257	5.76
136.25	6.24	21	236	6.06
163.5	6.458	25.4	224	5.66
211	6.838	32.8	202	7.05
259.5	7.226	40	179	7.28

Taula 3.1. Valors obtinguts en l'èxperiment 3.1 i volum corregit obtingut a partir de la variació de la glucosa segons l'equació 3.1

Anàlisi de la reproductibilitat experimental

Els experiments 3.2 i 3.3 corresponen a unes mateixes condicions de treball, és a dir: limitació de glucosa inicial, i aeració solament per aire durant les 180 hores que durà el cultiu. Els resultats de les variables mesurades es presenta en les gràfiques 3.4. L'evolució del pH -gràfica 3.4a- i l'oxigen dissolt -gràfica 3.4b- en el medi és la mateixa; les diferències dels valors obtinguts en el pH és mínima, i en la corba de l'oxigen dissolt podria estar causada per altres factors com la derivació de les sondes. Els resultats experimentals del color i els compostos aromàtics sense cap correcció, ni pH ni volum, representats en la gràfica 3.4c en les corbes de la reducció dels compostos aromàtics i el color també presenten unes diferències molt petites. Tots aquests resultats d'aquest experiment duplicat ens afermen que estem davant unes condicions del nostre sistema i un comportament del fong molt reproducible, i que, per tant, la resta d'experiments realitzats no caldrà fer-ho per duplicat.

En quant als resultats obtinguts d'activitat enzimàtica, l'anàlisi de l'enzim LiP dóna que la detecció -taula 3.2- en el primer cas era de 32 UA/l, i en el segon cas 40 UA/l, és a dir, de 36 ± 4 UA/l. Aquestes són activitats molt petites que

les hem d'analitzar juntament amb la resta de dades obtingudes en els altres experiments que es presentaran posteriorment, per tal de decidir si les podem considerar o no i, a més, cal fer algunes consideracions prèvies.

Experiment	LiP (UA/l)			
3.2	40			
3.3	32			

Taula 3.2. Activitat enzimàtica expressada com LiP a les 95.25 hores en els experiments 3.2 i 3.3.

En condicions de limitació de glucosa s'obté sempre test positiu de la LiP com podem veure en els experiments que es presentaran i que quedaran resumits en la taula resum 3.10, però en quantitats molt petites, que, fins i tot, podrien fer dubtar del seu valor. La nostra mostra, a causa dels compostos aromàtic de la qual està formada la lignina, absorbia tant a la longitud d'ona de 280 nm que calia realitzar una dilució important abans d'iniciar el test de la LiP que ens podria fer perdre el rang de detecció de la mateixa LiP. Per tant, quantitativament cal anar molt en compte amb aquests valors i, només considerar-los des del punt de vista qualitatiu.

L'activitat de LiP obtinguda és sempre inferior a les 40 unitats d'activitat per litre. En l'anàlisi enzimàtic es realitzaven diverses dilucions de la mostra (1/15, 1/30) necessàries perquè d'altres components de la mostra podrien emmascarar notablement el test. La mesura experimental del test de la LiP és la lectura de l'absorbància a 280 nm; a aquesta longitud d'ona la mostra ja presenta una gran absorbància deguda als compostos aromàtics (recordem que en mesurar els compostos aromàtics realitzem una dilució de 67.6 vegades); per tant, per diferenciar l'efecte dels compostos aromàtics de la mostra, de l'efecte del test de

la LiP havíem de realitzar el blanc amb la mostra sense els reactius del test. Aquest blanc perquè poguéssim aconseguir establir la mesura de l'absorbància havíem de diluir-lo de 15 a 30 cops. Una dilució molt elevada si tenim en compte que l'activitat de LiP era molt petita. Hem de destacar que no es treballa amb un medi sintètic i que, per tant, per tal de tenir la certesa qualitativa i quantitativa que la mostra contenia LiP hauria calgut realitzar en primer lloc l'aïllament, purificació i concentració de l'enzim.

D'altra banda, no podem oblidar tampoc:

- a) que altres autors ja s'han trobat amb problemes semblants en treballar amb medis no sintètics i que l'afirmació més correcta seria referir-se a la detecció de l'enzim, enlloc de referir-se a la seva presència; podríem no detectar la LiP, però en canvi sí que hagués estat produïda pel fong.
- b) Estem en condicions de nutrients per la producció de LiP; amb la limitació de la glucosa en el medi afavorim la producció de la LiP principalment, enfront de la MnP.
- c) Podem comparar els resultats obtinguts en els bioreactors duplicats - experiment 3.2 i 3.3-, i comprovar la coherència dels mateixos, ja que són totalment repetitius.

A partir d'aquestes tres darreres consideracions sobre el test de la LiP - bibliografia, condicions de treball i reproductibilitat en els experiments - i, malgrat que els valors de detecció de la LiP estan en el límit de l'error del mètode, donem una gran importància qualitativa als resultats de LiP obtinguts.

Activitat AP

Els principals enzims ligninolítics produïts pel fong *Phanerochaete chrysosporium* són la LiP i la MnP. Coneixem a través dels treballs publicats que el *Phanerochaete chrysosporium* no produeix l'enzim lacassa. Ara bé, com a pas previ de l'assaig per mesurar l'activitat de l'enzim MnP, mesuràvem l'equivalent a l'activitat lacassa. Per tant, ens cal determinar què mesuràvem. Un resultat positiu de l'assaig pot ser degut a: aigua oxigenada i/o altres

peroxidases no determinades. Al mateix temps, aquestes altres peroxidases podrien ser també productores d'aigua oxigenada. Nosaltres a aquesta activitat equivalent de lacassa l'anomenarem: Altres Peroxidases (AP) i representarà l'efecte d'altres enzims i/o altres espècies assimilable a la resposta de la lacassa en el test anteriorment descrit per mesurar-la.

La AP la detectàvem, tal com veurem en els experiments que es presenten i que quedaran resumits en la taula 3.11, en treballar en unes condicions en el medi de limitació del nitrogen, i, a més a més, teníem un gran consum d'oxigen -si bé no hem pogut establir cap relació entre oxigen consumit i AP-; aquestes condicions de limitació de la glucosa són també les més adients per la producció d'enzims productors de l'aigua oxigenada com la glioxal oxidasa. D'altra banda, vam realitzar unes proves per mesurar l'activitat de l'enzim MnP amb un altre test. És un test més sensible a la MnP que el realitzat normalment. Aquest test aplicat a l'experiment 3.15 donava, a les 185 hores, una activitat de MnP de 920 unitats; el mateix test a la mateixa mostra, però sense afegir l'aigua oxigenada com a reactiu donava solament 140 unitat. Aquest fet ens indicaria que en el nostre medi tindriem com a mínim una part d'aigua oxigenada.

- Comparació de l'activitat enzimàtica de dues soques en el temps

Diversos autors (E.Moyson, H.Verachtert. Ap. Micro. B. 1993. Factors influenciant) (Dosoretz) han advertit que el *Phanerochaete chrysosporium* podria disminuir l'activitat enzimàtica a mesura que s'anava sembrant; i que després d'alguns mesos s'hauria quasibé perdut. Després de llegir aquests articles i com que ja portàvem algun temps treballant amb la mateixa soca de *Phanerochaete chrysosporium* vam plantejar-nos comprovar l'activitat enzimàtica de la mateixa. Per això vam comparar el comportament de dues soques: a) la soca *Phanerochaete chrysosporium* 1 havia estat sembrada periòdicament durant més de tres anys, i b) la soca *Phanerochaete chrysosporium* 2 només duia una

resembla. Les condicions a les que es dugué a terme l'experiment 3.4 amb la soca *Phanerochaete chrysosporium* 1 i l'experiment 3.5 amb la soca *Phanerochaete chrysosporium* 2 foren les següents: 300 ml de lleixius negres amb 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal inicials, a 100 rpm d'agitació, 37 °C, subministrant aire, van ser inoculats amb espores de cadascuna de les dues soques. En els dos casos estàvem treballant en condicions favorables a la producció de l'enzim MnP.

En la gràfica 3.5 podem veure els resultats obtinguts de l'evolució en el temps a) del pH i la glucosa, c) l'activitat de LiP i MnP i b) la concentració d'oxigen dissolt en el medi, per cadascuna de les dues soques. El comportament del pH, el consum de la glucosa i el consum d'oxigen és el mateix en els dos experiment i les diferències són mínimes.

Finalment podem observar -gràfica 3.5c- com l'activitat enzimàtica de LiP i MnP és igual o lleugerament superior en la soca *Phanerochaete chrysosporium* 1, la que duia més de tres anys amb resembres periòdiques, que en la soca més nova.

A més a més, en les dues soques vam mesurar una activitat equivalent d'AP.

Per tant, podem concloure que en les nostres condicions de treball i en el nostre medi de lleixius negres l'activitat enzimàtica de MnP, AP i LiP que detectem no es veu alterada, almenys per períodes iguals o inferiors als quaranta quatre mesos, amb les resembres periòdiques del fong.

-Estudi de les condicions de producció dels enzims

- Relació C/N

En aquest apartat compararem el comportament del sistema en estar limitat per la glucosa -experiment 3.6- i en estar limitat pel nitrogen -experiment 3.7-. Des del punt de vista del nutrient limitant, la relació carboni-nitrogen del primer experiment era estimuladora de l'enzim LiP, mentre que la relació pel segon experiment ho hauria de ser per la detecció de la MnP. Les condicions en la que es realitzaren foren les següents: 300 ml de lleixius negres a 37°C, agitats a 100 rpm, als quals se subministrava aire, van ser inoculats amb espores de *Phanerochaete chrysosporium*. Les condicions inicials del medi de lleixius negres eren respectivament pels experiment 3.6 i 3.7 les següents: 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de nitrogen amoniacal, i 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal.

De la corba de l'oxigen dissolt -gràfica 3.6- podem observar com en l'experiment 3.6, a partir de les 70 hores, quan ja no queda glucosa en el medi, el consum d'oxigen disminueix considerablement, si bé, encara hi ha un cert consum. La manca de glucosa podria haver provocat la inactivitat (o bé mort) d'una part de fong, i, d'aquí, la disminució de l'activitat del fong.

Si en l'experiment 3.6 ens fixem amb l'evolució del pH -gràfica 3.6 a- veiem que s'alcalinitza molt ràpidament, situant-se finalment a 6.16. El salt més important de pH també el tenim entre les 95 i les 123 hores. Ara bé, és també a les 95 hores que detectem la lignin peroxidasa (LiP), tal com veurem posteriorment. El màxim de LiP el detectem quan ja no queda quasibé glucosa en el medi. Ens referim a quantitats molts petites, sense valor quantitatiu i només amb valor qualitatiu.

Per tant, en condicions de limitació de la glucosa -experiment 3.6- detectem la LiP quan ja s'ha consumit tota la glucosa en el medi i previsiblement encara hi

resta nitrogen, ja que en 180 hores el nitrogen -a partir de càlculs teòrics- no s'acabaria.

En el bioreactor corresponent a l'experiment 3.7 podem calcular la velocitat de consum de la glucosa, que estaria al voltant de 0.05 g/(l*h) de glucosa. En la gràfica 3.6 es comença a veure com mentre hi ha glucosa en el medi el pH no varia gaire, i es manté entre 4.4 i 4.5. Aquesta relació pH glucosa es repetirà i veurà més clarament en posteriors experiments.

Com es veu en les gràfiques 3.6 el consum més important d'oxigen en l'experiment 3.7 es produïa abans de detectar-se l'enzim MnP i immediatament després d'acabar-se el nitrogen amoniacal en el medi. Fixem-nos que per consumir tot el nitrogen necessitem uns 3 g/l de glucosa (Capítol 1, Introducció; Jeffries, T.W. i col. Nutritional Regulation of Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 1981. Vol 42, 2:290-296) I al mateix temps donava positiu el test de l'activitat AP que ens indicaria la presència de H₂O₂ o bé altres enzims sensibles al test de la lacassa. L'activitat enzimàtica del MnP augmentava fins que ja no quedava glucosa.

Per tant, en l'experiment 3.7 -medi limitat pel nitrogen- l'activitat enzimàtica MnP s'inicia quan s'acaba el nitrogen amoniacal en el medi, després d'un període d'alt consum d'oxigen, i continua fins que s'exhaureix la glucosa en el medi. Aquesta mateixa evolució seguiria la AP.

En la taula 3.4 presentem els valors finals de la reducció del color, dels components aromàtics i de la toxicitat pels dos experiments. Pel càlcul de la reducció dels compostos aromàtics i de la reducció del color s'ha aplicat la correcció per l'evaporació del sistema. Hem de fer notar que aquesta correcció hauria de ser superior per l'experiment 3.7 ja que no es va poder garantir que, en tot moment, el fluid refrigerant del condensador de sortida del bioreactor es mantingués constantment a 7°C.

	Reducció del color	Reducció dels compostos aromàtics	Reducció de la toxicitat	Activitat LiP (UA/l) a les 95.25 hores	Activitat MnP (UA/l) a les 137 hores	Activitat AP (UA/l) a les 137 hores
Experiment 3.6	44.99 %	31.45 %	1.36	40.8		
Experiment 3.7	-1.9 %	55.02 %	1		194	51

Taula 3.4. Reducció del color corregit el pH final i la disminució del volum; reducció dels compostos aromàtics corregida la disminució de volum i reducció de la toxicitat pels experiment 3.6 (limitació de la glucosa) i l'experiment 3.7 (limitació del nitrogen), a temps 169 hores, i activitat de LiP a les 95.25 hores, MnP a les 137 hores i AP a les 137 hores.

En l'experiment 3.6 12, malgrat no apreciar activitat de manganès peroxidasa (MnP), es produïa una disminució de la toxicitat de 1.36, més important que en l'experiment 3.7 7 que era solament 1. L'activitat de MnP i AP detectada en l'experiment 3.7 és molt petita, per això també la reducció de la toxicitat també és poca en aquest experiment. Però hem de destacar que en l'experiment 3.6 sense detectar MnP ni AP, i només detectant una petiússima quantitat de LiP, assolim una bona reducció de la toxicitat.

Veiem clarament que treballant amb condicions de limitació de nitrogen detectem activitat de MnP, mentre que en condicions de limitació de la glucosa no podíem detectar-la. Per altra banda, l'activitat de LiP només la detectem en molt baixes concentracions en condicions de limitació de la glucosa.

- Efecte de l'aireació

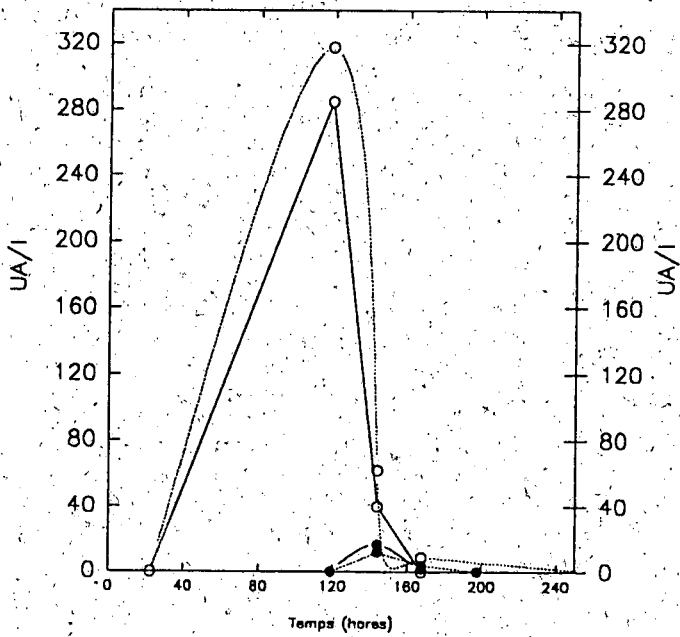
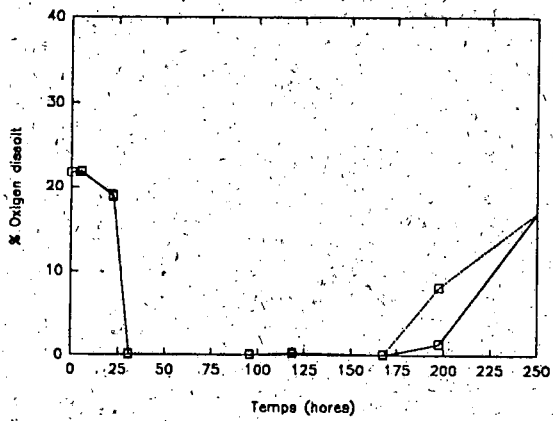
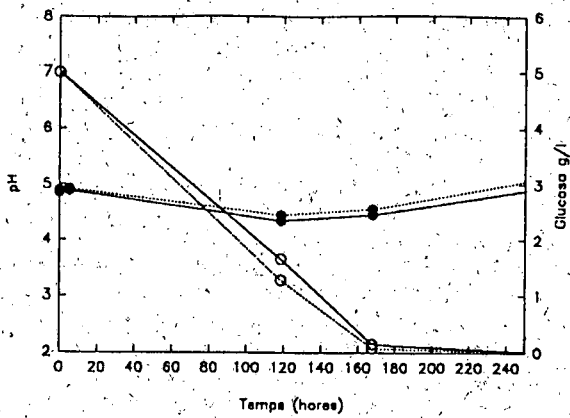
a) Condicions de limitació per la glucosa

Amb l'interès de conèixer la seva influència en la producció de l'enzim vam estudiar l'efecte de l'aireació en condicions de limitació del medi per la glucosa pròpies per la detecció de la LiP. Partint d'un medi inicial de 300 ml de lleixiu negres amb 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de nitrogen amoniacal, 100 rpm d'agitació, a 37 °C, inoculant espores de *Phanerochaete chrysosporium* vam assajar tres composicions de l'aire que se li subministrava al bioreactor: experiment 3.8 9 100 % d'oxigen, experiment 3.9 només 100 % d'oxigen durant una hora, la resta de la fermentació aire, i experiment 3.10, totalment amb aire.

Com es pot veure en la gràfica 3.7 l'activació del sistema enzimàtic afegint durant una hora oxigen -experiment 3.9- al bioreactor no dóna cap resultat destacable i el seu comportament és el mateix que el de l'experiment 3.10 que operava només amb aire. En ambdós casos el pH -gràfica 3.7a- evoluciona des de 4.5 unitats fins a 6 unitats de forma que es va alcalinitzant molt més ràpidament que si el reactor s'alimenta només amb oxigen -experiment 3.8-.

No podem passar per alt, de la gràfica 3.7b, la corba de l'oxigen dissolt en el medi de l'experiment 3.8. Correspon a l'experiment alimentat amb 100 % d'oxigen. A partir de les primeres vint hores, el consum d'oxigen creix considerablement. Si ho comparem amb els altres dos experiments, apreciem que el mateix oxigen estimula el consum d'oxigen i aquest es fa cada vegada més elevat. Sembla difícil acceptar que tot l'oxigen consumit pogui ser assimilat pel fong, ans al contrari, sembla més lògic que aquest consum tan elevat d'oxigen estigui originat per la seva utilització en alguna reacció química.

La taula 3.5 presenta també els valors de la reducció de la toxicitat, la reducció dels compostos aromàtics, la reducció del color, i l'activitat de MnP i LiP. Fixem-nos que vam detectar la LiP, quan el pH en el medi variava de 4.67 a



5.23 unitats, pels experiment 3.8, 3.9 i 3.10. En tots tres casos detectem la LiP quan ja s'ha acabat la glucosa. La màxima activitat de LiP l'assolim en l'experiment 3.9, però sense coincidir amb el màxim consum d'oxigen. En tots tres casos també l'activitat de LiP és molt petita, i, si bé hem alimentat diferents composicions d'oxigen en l'aire, el percentatge d'oxigen dissolt en el medi és sempre molt petit. Per obtenir activitats de LiP més elevades hauríem d'aconseguir augmentar la concentració d'oxigen en el medi (Ref. Kirk) i això, de moment, no ho hem aconseguit augmentant l'oxigen subministrat, perquè en augmentar l'oxigen aportat també es consumeix més ràpidament.

L'enzim MnP -taula 3.5- es detecta en l'experiment 3.8 un dia després d'haver-se assolit que tot l'oxigen dissolt -gràfica 3.7b- en el medi fos consumit pel fong, i que per tant, la concentració neta de oxigen fos zero, independentment de la quantitat aportada, i quan aquest consum comença a disminuir.

	Oxigen	aire	1h	100 %
Reducció de la toxicitat			1.36	285288
Reducció dels compostos aromàtics			31.45	28.66
27.74				
Activitat MnP UA/l a les 150 hores		0	<10	103.7
Reducció del color			44.99	46.77
43.37				
Activitat LiP UA/l a les 95.25 hores		40.8	34.04	14.64
Activitat LiP UA/l a les 144 hores		0		209.28
0				

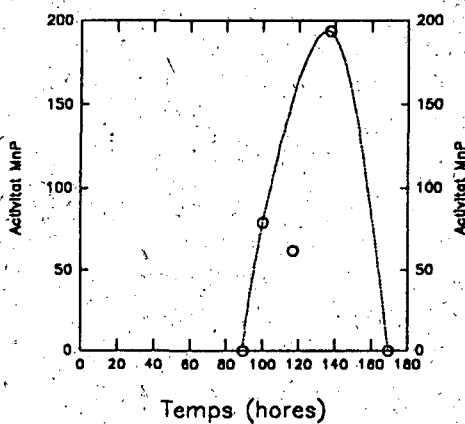
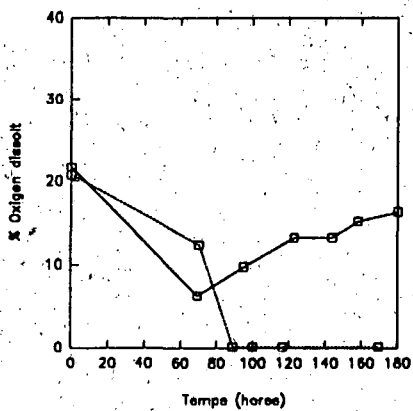
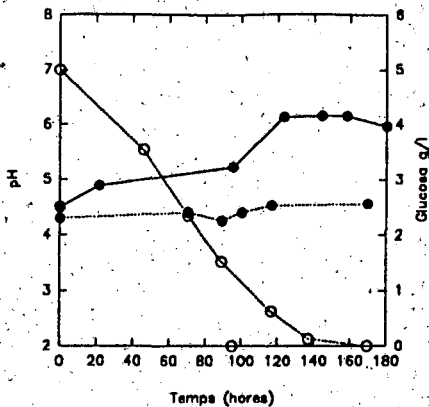
Taula 3.5. Reduccions de la toxicitat, els compostos aromàtics, i el color a les 150 hores pels experiments 3.8, 3.9 i 3.10 en condicions de limitació de la glucosa i variant la quantitat d'oxigen subministrat al bioreactor. Activitat enzimàtica, MnP i LiP a diferents temps pels mateixos experiments.

No trobem cap relació immediata entre la quantitat de LiP detectada i l'índex de reducció de la toxicitat de les mostres. Petites quantitats de LiP aconseguirien un índex de reducció de la toxicitat molt important. Tampoc podem determinar a partir dels experiments realitzats si aquestes reduccions es deuen solament, o en part, a la LiP, o bé a l'acció combinada amb la MnP, o altres enzims.

b) Condicions de limitació del nitrogen

Vam estudiar l'efecte de l'aïració en condicions de limitació del medi pel nitrogen pròpies per la detecció de la MnP. Partint d'un medi inicial de 300 ml de lleixius negres amb 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal, 100 rpm d'agitació, a 37 °C, inoculant espores de *Phanerochaete chrysosporium* vam assajar tres composicions de l'aire que se li subministrava al bioreactor: experiment 3.11 100 % d'oxigen, experiment 3.12 només 100 % d'oxigen durant una hora, la resta de la fermentació aire, i experiment 3.13, totalment amb aire.

Anteriorment ja havíem fet esment de la relació pH-concentració de glucosa en condicions de limitació de nitrogen i que podem tornar a veure en la gràfica 3.8a. Quan la concentració de glucosa està al voltant de 2 g/l el pH està al voltant de 4,3: 4,3 al bioreactor 3.11 amb 1,58 de glucosa, 4,28 a bioreactor 3.12 amb 1,92 de glucosa i 4,25 al bioreactor 3.13 amb 1,53 de glucosa. Arribem a aquestes condicions de pH i glucosa a diferents temps segons el bioreactor, com bé podem veure en la taula 3.6. Com més oxigen aportem al medi, més temps necessita el sistema a arribar a les condicions de pH i glucosa, a partir de les quals unes hores després detectarem l'enzim MnP. Al mateix temps, l'enzim



MnP el detectem immediatament després d'acabar-se el nitrogen, és a dir, després d'haver-se consumit 3 g/l de glucosa. Aquest fet el veiem clarament si comparem el comportament de l'experiment 3.11 amb els altres dos: en aquest experiment el consum dels 3 g/l de glucosa i, per tant, l'exhauriment del nitrogen, va endarrerit respecte els altres dos experiment, i igual succeeix amb la detecció de l'enzim MnP.

Detecció de MnP

	Oxigen aire	1 h oxigen	100 % oxigen
Temps previ pel pH i glucosa	89.05 h	89.05 h	116.5 h temps
Temps 100 h		100 h	137 h temps
pH	4.4	4.28	4.41

Taula 3.6. Detecció de MnP, en diferents condicions d'aport d'oxigen al medi.

Al mateix temps, la concentració d'oxigen dissolt -gràfica 3.8 b- en el medi va disminuint a mesura que avança el cultiu fins que arribem a la situació d'acumulació zero -igual consum que aportació d'oxigen-; unes hores després de l'acumulació zero comencem a detectar l'enzim MnP -gràfica 3.8c-. En el cas del bioreactor alimentat sempre únicament amb oxigen fixem-nos -gràfica 3.8b- que tenim el mateix procés. Altra vegada l'oxigen estimula el consum d'oxigen, i alimentar el bioreactor amb més oxigen comporta incrementar el consum de l'oxigen. Si tornem a relacionar-ho amb l'enzim MnP veiem que, independentment de l'oxigen subministrat l'enzim apareix després d'haver-se incrementat el consum d'oxigen.

En aquestes condicions no detectem l'enzim LiP, ni tan sols immediatament després d'haver-se acabat la glucosa.

La màxima activitat enzimàtica en els tres casos és de 200 unitats d'activitat MnP per litre independentment de la quantitat d'oxigen subministrada al bioreactor, però coincidint en els 3 experiments que en l'interval d'activitat enzimàtica la concentració d'oxigen dissolt és zero o molt propera. La màxima producció total (àrea) correspon a l'experiment 3.12 6 (1h d'oxigen), seguit pel realitzat solament amb aire, experiment 3.13.

La taula 3.7 presenta els valors obtinguts per les reduccions del color, els compostos aromàtics i la toxicitat pels tres experiments. Més endavant relacionarem l'activitat enzimàtica de MnP amb la disminució de la toxicitat.

Una altra dada significativa és la detecció de AP en realitzar el test de la lacassa que ens indicaria la presència de compostos enzimàtics o espècies químiques d'efecte assimilable a la lacassa, i que tindrien el mateix comportament que la MnP.

	Reducció del color	Reducció dels compostos aromàtics	Reducció de la toxicitat	Activitat MnP a les 137 hore	Activitat AP a les 137 hores
Experiment 3.11	-28.94	44.31	0.95	196	67
Experiment 3.12	57.4	61.92	1.87	201	119
Experiment 3.13	-1.9	55.02	1	194	51

Taula 3.7. Reducció de la toxicitat, i reduccions del color i els compostos aromàtics a les 169.5 hores pels experiments 3.11, 3.12 i 3.13, realitzats en condicions inicials de limitació del nitrogen i variant el contingut d'oxigen. Pels mateixos experiments es presenten els valors de l'activitat enzimàtica MnP i AP a les 137 hores.

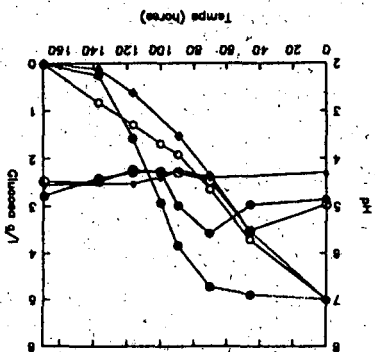
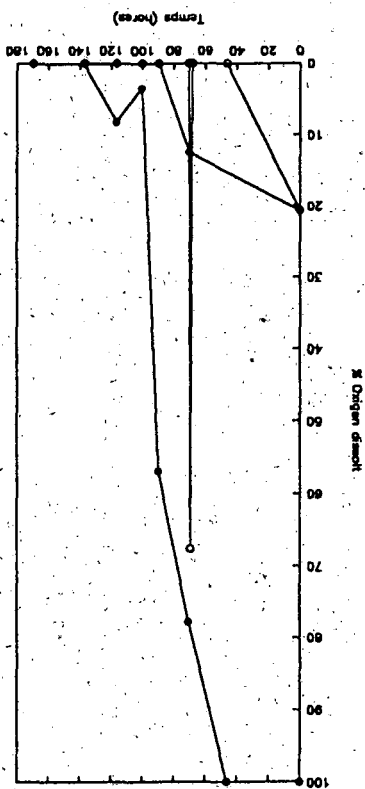
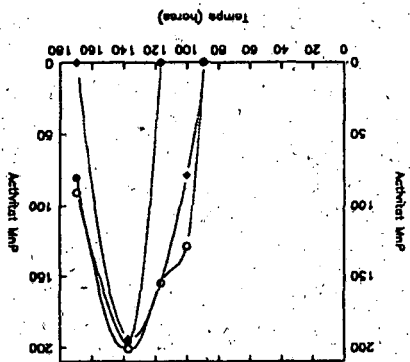
- Manteniment de la glucosa residual

L'estudi de l'efecte de la glucosa residual el vam realitzar partint de les condicions de 5 g/l de glucosa en el medi inicial i 75 ppm de nitrogen. Vam estudiar l'efecte de la glucosa residual en el cas que tota l'aeració era subministrada per l'aire, i en el cas que s'afegia 1 h d'oxigen. Recordem que aquestes dues formes d'aeració eren les que millors resultats proporcionaven per la reducció de la toxicitat treballant en condicions de limitació de la font de nitrogen. En aquestes condicions no vam detectar en cap cas l'enzim LiP però si MnP.

a) condicions: aire/aire/aire

En l'experiment 3.14 vam mantenir la concentració de glucosa -gràfica 3.9a- per sobre de 2 g/l. L'evolució del pH insisteix i corrobora les apreciacions fetes en experiments anteriors: el pH té tres etapes: una primera en la que augmenta lleugerament fins 5.5; a continuació retorna a 4.4 i resta al voltant de 4.4 mentre hi ha glucosa en medi, és a dir, en aquest cas, durant les darreres 240 hores; i finalment la tercera etapa en la que es basifica el medi i en la que la font de carboni s'hauria exhaurit.

Es començà a detectar l'activitat enzimàtica MnP -gràfica 3.9c- a les 100 hores d'haver inoculat. Arribarem a un màxim d'enzim a les 137 hores, després d'haver afegit en dues ocasions -indicat per la fletxa en la gràfica 3.9c- solució de glucosa concentrada en el medi. Veiem clarament com en deixar de mantenir la glucosa residual, l'oxigen dissolt -gràfica 3.9b- en el medi augmenta, i l'activitat enzimàtica decreix -gràfica 3.9c-.



Aconseguim mantenir l'activitat enzimàtica durant sis dies, i la seva detecció no finalitza fins que s'exhaureix la font de carbóni subministrada.

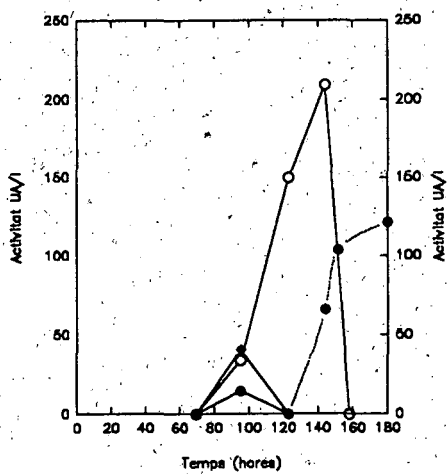
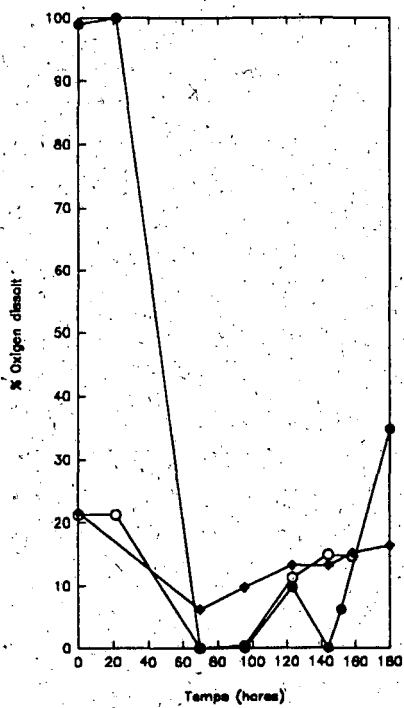
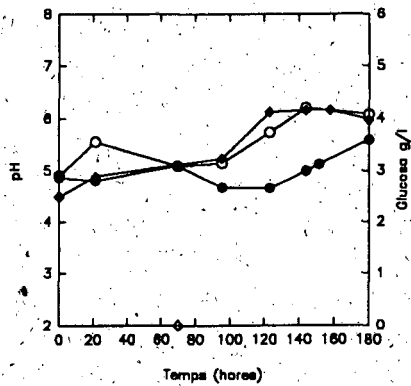
La taula 3.8 presenta els valors obtinguts per les reduccions del color, els compostos aromàtics i la toxicitat per l'experiment 3.14.

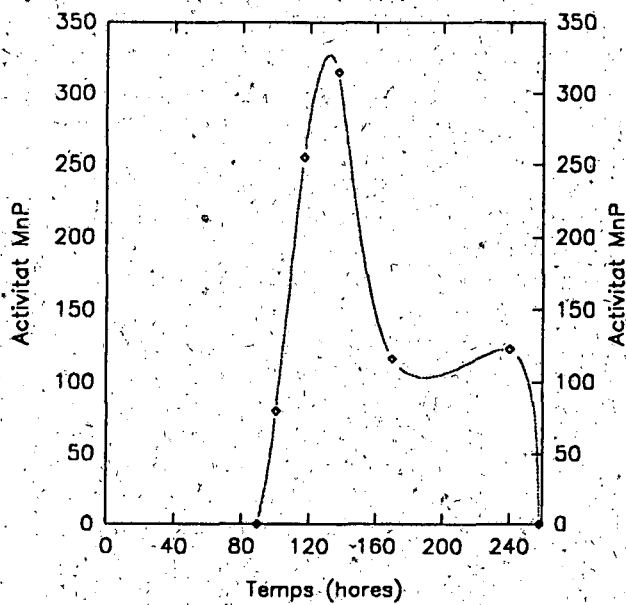
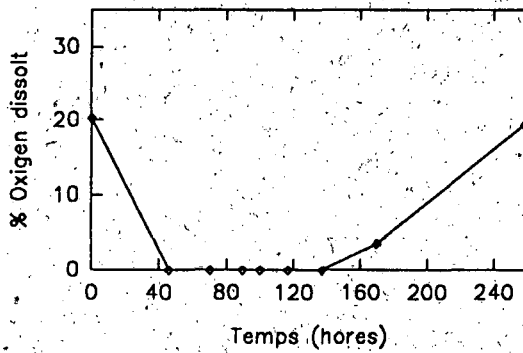
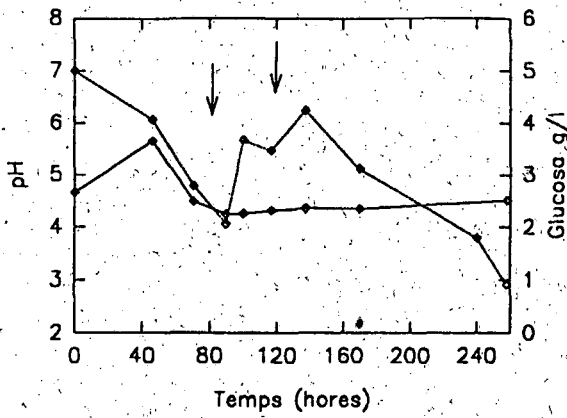
Compararem els resultats d'aquest experiment 3.14 amb els obtinguts en l'anterior experiment 3.13, realitzats en les mateixes condicions però sense mantenir la concentració de la glucosa. Igual com succeïa en l'experiment 3.13 detectem AP. Igual com succeeix amb la MnP en mantenir la concentració de glucosa mantenim la detecció de AP. El paral·lelisme entre els dos experiments és gran en les primeres 150 hores, mentre els dos tenen glucosa, i a les 169 hores, els dos han aconseguit reduccions de components aromàtics i increments en el color molt semblant-taules 3.7 i 3.8-

b) Condicions: alimentació 1 hora d'oxigen.

En l'experiment 3.15 vam mantenir una concentració residual de glucosa de com a mínim superior a 2g/l. L'evolució del pH seguida en la gràfica 3.10 confirma que a concentracions superiors a aquests 2 g/l, l'acidesa del medi resta al voltant de 4,4.

Podem comparar l'experiment 3.15 amb el 3.12. Les condicions inicials són les mateixes, solament que en el 3.15 hem mantingut la concentració de glucosa durant la fermentació. Els dos experiments 3.15 i 3.12, corresponents a les gràfiques 3.10 i 3.8 presenten el mateix comportament. La màxima activitat enzimàtica l'assolim en mantenir la glucosa per sobre de 3 g/l i la seva concentració és de 482,19 unitats -gràfica 3.10c- enfront les 201 unitats MnP de experiment 3.12. Aquest màxim l'assolim després d'haver afegit dues vegades solució de glucosa en el cultiu i quan l'activitat enzimàtica en l'experiment 3.12 6 ja decaïa. La MnP la tornem a detectar unes hores després que el consum d'oxigen s'hagi incrementat i tot just quan el nitrogen s'hauria d'acabar en el medi ja que portaria uns 2.5 g/l de glucosa consumida. Ara bé, fixem-nos en





la gràfica 3.10b com a les 75 hores l'oxigen dissolt en el cultiu era del 0%, i malgrat haver hagut un gran consum d'oxigen a aquell temps no detectàvem encara la MnP; llavors, tal com havíem fet en l'experiment 3.12, vam afegir oxigen al cultiu durant una hora. No vam detectar l'enzim MnP fins després d'un altre període de gran consum d'oxigen.

La gràfica de MnP en l'experiment 3.12 6 -gràfica 3.8c- presenta el seu màxim quan la glucosa s'acaba, s'aconsegueix mantenir l'activitat enzimàtica durant un temps, però immediatament inicia una fase descendent. Per contra, en mantenir la glucosa, -experiment 3.15, gràfica 3.10c- mantenim el pH i també l'activitat de MnP, i decau molt lentament.

L'activitat AP es comporta igual que en l'experiment 3.12, i mantenir la glucosa li suposa els mateixos efectes que per la MnP. Només hi ha una diferència: a les 211 hores, encara detectem AP a baixa concentració, 9.68 UAlacasa/l, i a les 259 hores aquesta activitat AP havia desaparegut. Si ara ens tornem a fixar en la gràfica 3.10b, en la corba de l'oxigen dissolt, veiem que a aquell temps, 211 hores, justament havíem tingut un màxim, en el que la concentració d'oxigen en el medi havia augmentat; després d'aquest pic, el consum d'oxigen torna a augmentar. Aquest màxim d'oxigen, produït sense modificar les condicions de l'aeració i suposadament amb el mateix consum per part del microorganisme, no va tenir efectes directes en l'activitat MnP, però en canvi sí que els va tenir en l'activitat AP. I podria indicar que la relació oxigen dissolt (o bé consum d'oxigen) és més forta amb la AP que en la MnP. A les 211 hores en l'experiment 3.15 va variar una altra variable, o millor dit, havia variat en les hores precedents: la concentració de glucosa; en mantenir una concentració mínima de glucosa d'uns 3 g/l, tal com indica la fletxa de la gràfica 3.10a, havíem afegit glucosa al medi. I a les 211 hores la concentració de glucosa en el medi era de 4.77 g/l, la més elevada fins llavors a la qual havíem detectat algun tipus d'activitat.

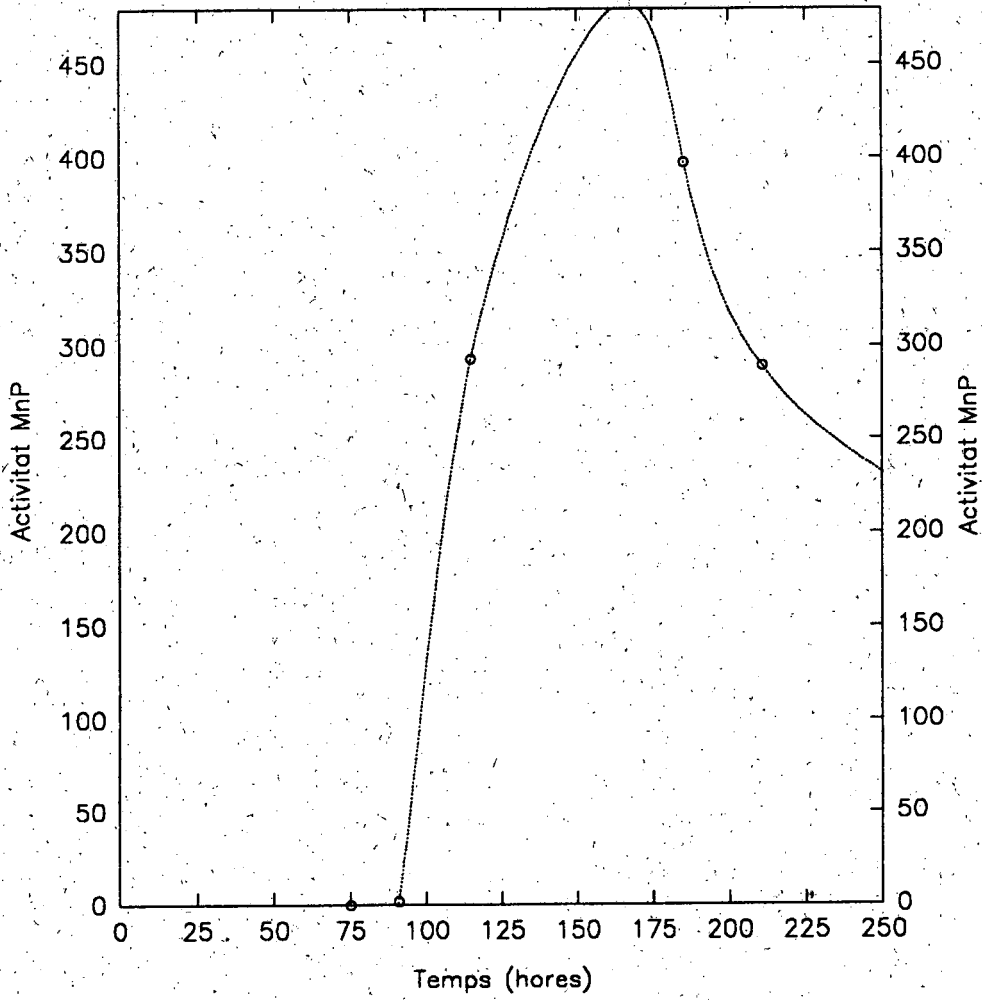
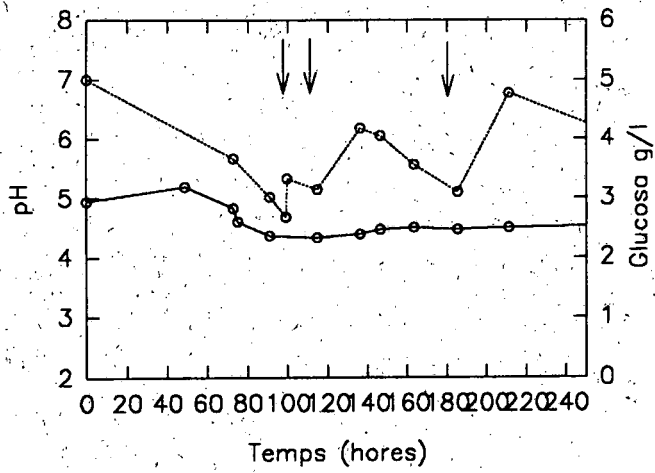
c) Condicions: aire/aire/aire amb una concentració inicial de glucosa de 10 g/l.

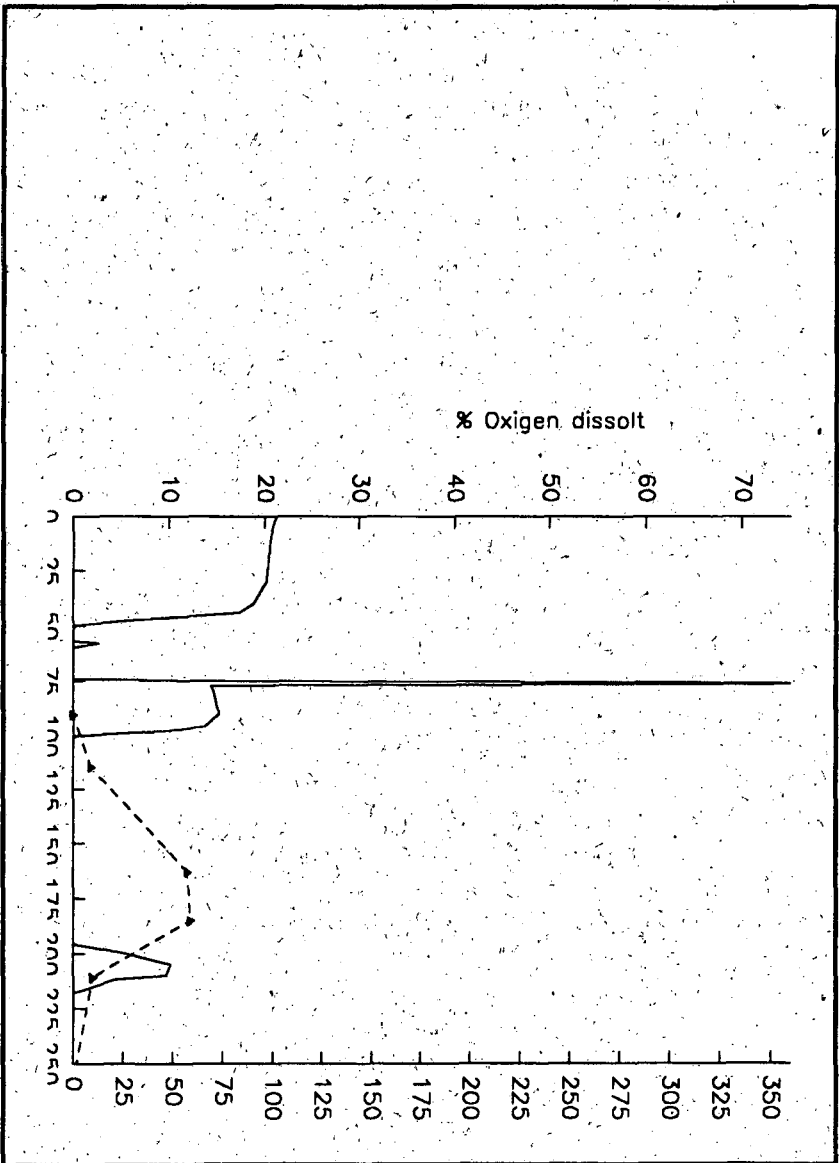
Finalment vam intentar millorar la producció enzimàtica de MnP partint d'un medi inicial de 300 ml de lleixius negres amb 10 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal, a 100 rpm i 37 °C (experiment 3.16 14). Al sistema se li subministrava aire i es va mantenir una concentració de glucosa residual superior als 4 g/l.

En l'experiment 3.16 -gràfica 3.11- comencarem a detectar l'activitat MnP més tard perquè tenim una fase de latència superior respecte altres experiments, una vegada el fong ja havia consumit uns 2,5 g/l de glucosa, -i de retruc s'hauria exhaurit la font de nitrogen- i en cap cas aconseguírem superar les 500 unitats d'activitat MnP. Igual com succeïa en els experiments iniciats amb 5 g/l de glucosa en el medi, amb 10 g/l l'inici de l'activitat MnP va anar precedida d'un augment del consum de l'oxigen, però en aquest cas sense arribar al consum total.

Incrementar molt la quantitat de glucosa inicialment no suposà produir més enzim MnP. Per la mateixa quantitat de glucosa consumida, produïm la mateixa quantitat d'enzim. D'entrada, i analitzat des del punt de vista de la producció de MnP, tant seria començar amb 5 g/l de glucosa o 10 g/l de glucosa, si en finalitzar aportem la mateixa quantitat de font de carboni. A més a més, el temps de latència augmenta -gràfica....- per concentracions elevades de glucosa.

També vam detectar AP en aquest experiment. La seva evolució no tindria cap particularitat si no fos que a les 211 hores l'activitat AP era només de 11 UA lacasa/l i a les 259 hores de 7.92 UA lacasa/l. Ens tornem a trobar amb el mateix fenomen observat en l'experiment anterior 3.13: després d'afegir la glucosa al medi, i en augmentar la concentració de glucosa per sobre de 6.74 g/l, l'activitat AP disminueix, ja que hi ha hagut prèviament una disminució en el consum d'oxigen en el medi. Per veure millor què passa en el moment d'afegir la glucosa en el medi, presentem la gràfica 3.11d, en la que hi ha les corbes de la



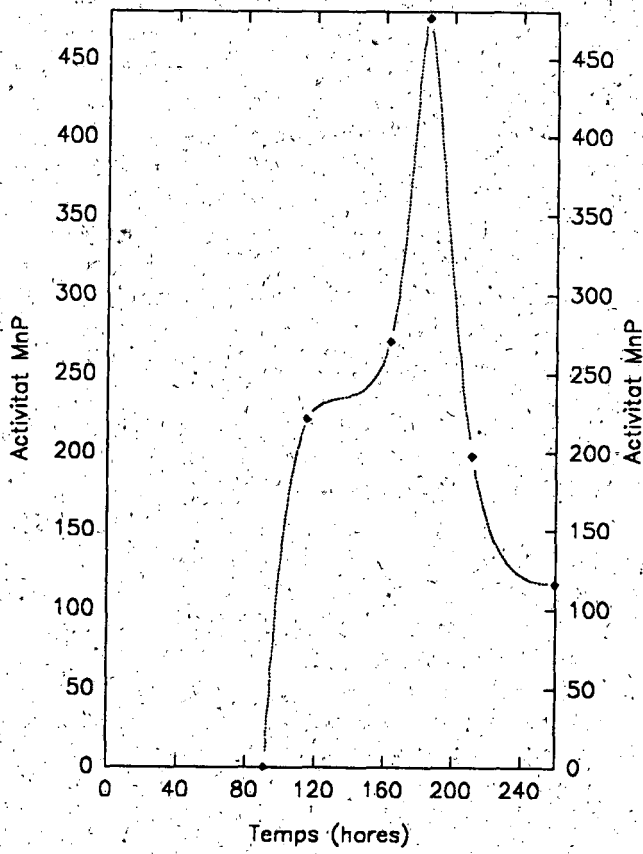
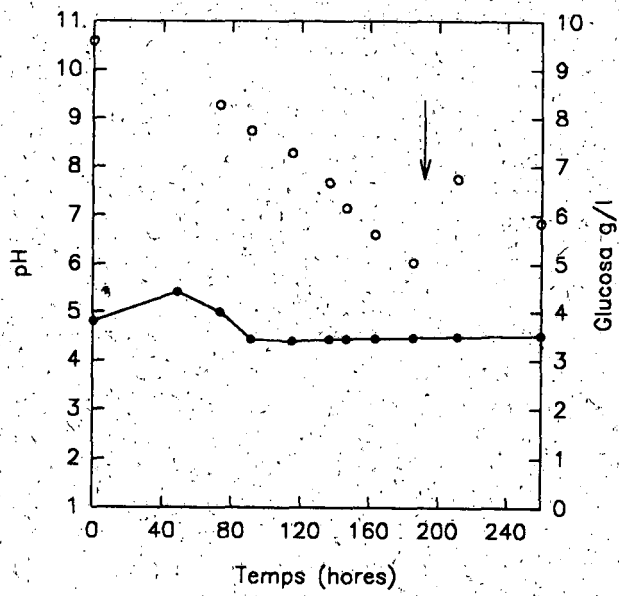


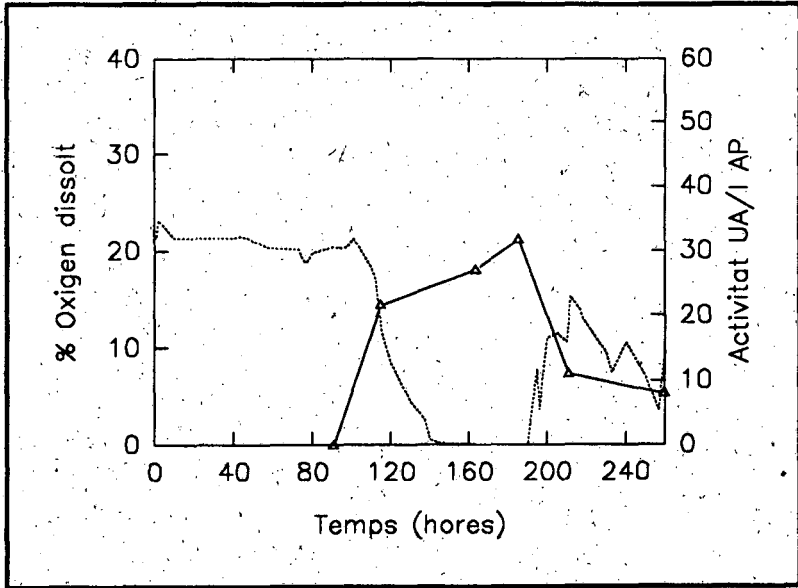
glucosa en el medi, l'oxigen dissolt i l'activitat AP.

La taula 3.8 presenta els valors obtinguts per les reduccions del color, els compostos aromàtics i la toxicitat pels experiments 3.14 8, 3.15 13 i 3.16 14. Més endavant relacionarem l'activitat enzimàtica de MnP amb la disminució de la toxicitat.

	ReduCCI ó del color	ReduCCIó dels compostos aromàtics	ReduCCIó de la toxicitat	Activitat MnP (UA/l)	Activitat AP (UAlacasa/l)
Experiment 3.14 a) (*)	-14.87	55.46		315	66
Experiment 3.14 b)	7.88	66.59	1.86	123	31
Experiment 3.15 a)	37.3	0.36		410	37
Experiment 3.15 b)	57.52	40.26	3.81	221	9.68 (**)
Experiment 3.16 a)	46.65			240	22
Experiment 3.16 b)	58.56	48.38	3.66	116	8

Taula 3.8. Reduccions de color, compostos aromàtics i toxicitat a les a) 169 hores i b) 258 hores. Activitat enzimàtica MnP i AP pels experiments 3.14 8, 3.15 13 i 3.16 14 a les a) 137 hores i b) 240 hores. (*) Experiment amb majors pèrdues per evaporació. (**) Corresponent a les 211 hores ja que a les 240 hores no es detectava.





Discussió i conclusions

En aquest capítol hem optimitzat les condicions per la producció de l'enzim MnP en lleixius negres a partir de *Phanerochaete chrysosporium*. Presentem a continuació els resultats complets obtinguts amb condicions ambientals optimitzades per la producció enzimàtica de MnP i per la reducció de la toxicitat dels lleixius negres.

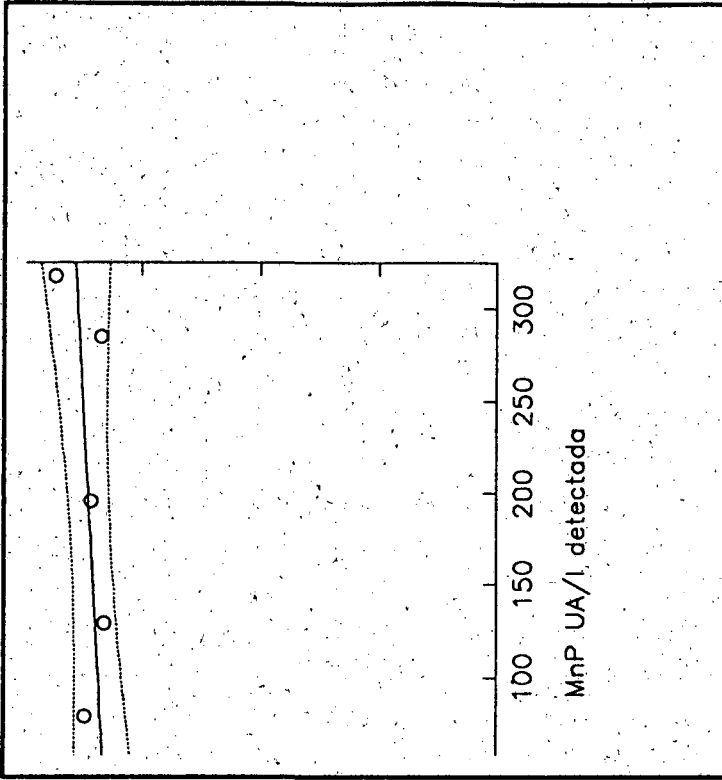
Aquestes condicions pel *Phanerochaete chrysosporium* són les de limitació de la font de nitrogen -5 g/l de glucosa i 75 ppm de N inicials-, manteniment d'una concentració de glucosa residual, agitació de 100 rpm, 37 °C, subministrament al sistema d'aire i només durant una hora oxigen. Corresponen a l'experiment 3.15 13, del qual ja hem vist en la taula 3.8 que aconseguíem una reducció de la toxicitat del 3.81.

Fixem-nos que s'aconsegueix reduir la toxicitat i també que el *Phanerochaete chrysosporium* redueixi també el color i els components aromàtics.

Podem treballar durant més de tres anys sense que la capacitat enzimàtica de la soca, que s'havia mantingut amb rebombres bimestrals, resti alterada, almenys en les condicions especificades i en un medi de lleixius negres.

C/N

Hem comprovat, primer a través de l'experiment 3.6, i després en els experiments 3.8, 3.9 i 3.10 que les condicions de nutrients per detectar l'enzim LiP havien de ser de limitació de la font de carboni. Aquest enzim apareixia quan tota la glucosa havia estat consumida. En canvi, per detectar l'enzim MnP i AP la relació carboni-nitrogen havia de ser favorable al carboni de forma que el nutrient limitant fos el nitrogen; en l'experiment 3.7, i també en els experiments 3.11 i 3.12, hem vist com era necessari consumir primer tot el



nitrogen, i just a partir de llavors es detectaven la MnP i la AP.

A partir dels experiments realitzats en condicions de limitació del nitrogen podem construir la taula resum 3.9, en la que hi anotem: la glucosa inicial en cada experiment; la glucosa en el medi en el moment de detectar-se per primera vegada l'enzim MnP; la glucosa consumida abans de detectar-se per primera vegada l'enzim MnP; i l'activitat de l'enzim MnP detectada per primera vegada en cada experiment. A partir d'aquesta taula 3.9 constatem que el fong necessita consumir aproximadament 2.5 - 3 g/l de glucosa per començar a produir l'enzim MnP. En la gràfica 3.12 ho podem veure representat: glucosa consumida fins la primera detecció de l'enzim MnP en funció de la concentració d'enzim detectada la primera vegada.

Aquesta quantitat de font de carboni implicaria que en els cultius limitats pel carboni, i en els que es partia d'una concentració inicial de 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de N podria no haver suficient carboni per produir i poder detectar l'enzim MnP. En condicions de limitació del nitrogen, aquests 3 g/l de glucosa equivalen aproximadament a la quantitat necessària de glucosa per exhaurir la font de nitrogen que en aquest cas és la limitant. Per tant, la MnP es independent de la concentració de glucosa inicial i, a partir d'una concentració mínima, depèn de l'exhauriment del nitrogen.

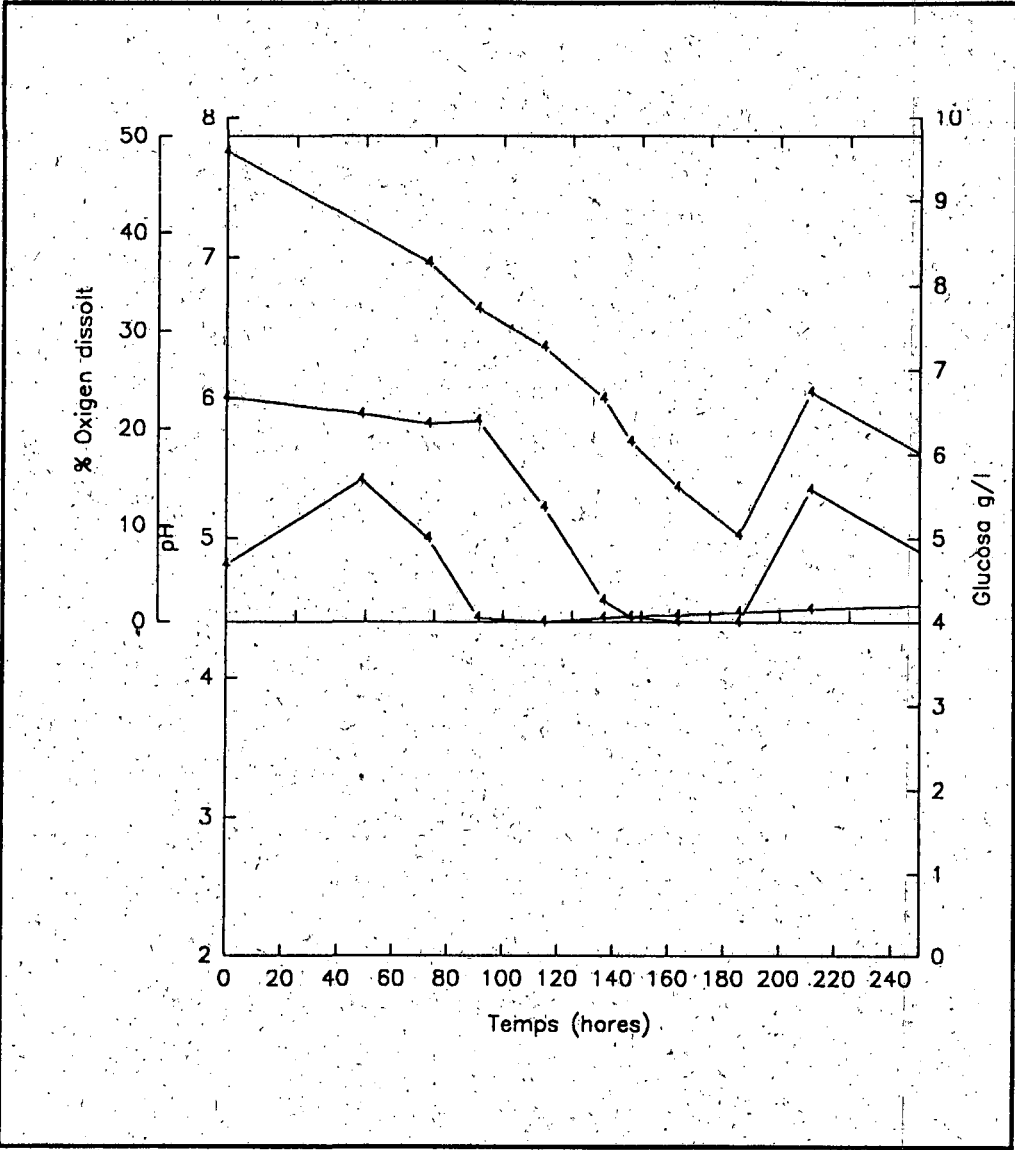
En general el comportament del pH en tots els experiments ha estat el mateix, i ho hem pogut comprovar millor en els experiments 3.14, 3.15 i 3.16: la glucosa manté el pH al voltant de 4.4 unitats. Així l'evolució del pH segueix tres etapes: una primera en la que augmenta lleugerament fins 5.5; a continuació retorna a 4.4 i resta al voltant de 4.4 mentre hi ha glucosa en medi, és a dir, en aquest cas, durant les darreres 240 hores; i finalment la tercera etapa en la que es basifica el medi i en la que la font de carboni s'hauria exhaurit. Bonarme i col. (Toward a control of Lignin and Manganese... Biotectnology and Bioengineering. Vol 41:440-450. 1993) afirmen haver trobat una relació directa entre la variació del pH i la quantitat de peroxidasa produïda ($r=1$ per l'activitat de l'enzim LiP i $r=0.95$ per l'activitat de l'enzim MnP), si bé també afegien, a continuació en el

mateix article, que encara no podien explicar la raó d'aquesta relació. En el seu treball diferenciaven dues fases; una primera fase pel creixement en la que el pH decreixia de 5.5-5.6 a 4.3-4.6; i una segona fase en la que el pH s'incrementava de 4.3 fins 6.3 després de 100 hores en un reactor air lift. En un reactor RTA el pH variava de 4.6 fins 5.1 després de 70 hores. Dels resultats que presenten es pot deduir que en el cas del RTA a les 70 hores els quedaria una concentració inferior a 3 g/l de font de carboni (glicerol), i a les 100 hores en el reactor air lift els quedaria menys de 2 g/l de font de carboni.

Amb els experiments realitzats amb limitació de la font de nitrogen no podem establir què és primer per detectar l'enzim MnP: tenir una concentració mínima de glucosa, o mantenir el pH del cultiu a 4.4 unitats. Sabem, perquè ho hem comprovat en els experiments 3.14, 3.15 i 3.16, que si mantenim una concentració mínima de glucosa en el medi el pH resta constant sense necessitat de controlar-lo; a més a més, només al voltant d'aquest pH detectem els enzims MnP i AP.

En el millor dels casos, controlant el pH a 4.5 unitats -experiment 3.17, condicions de limitants de la font de carboni-, i sense glucosa en el medi, aconseguiríem detectar MnP en molt baixa concentració, i estariem treballant en el límit de sensibilitat de detecció del mètode aplicat als lleixius negres.

En realitzar el test de l'enzim lacasa detectem l'activitat de l'aigua oxigenada i d'altres peroxidases; aquesta activitat assimilable a la lacasa l'hem anomenat a l'inici d'aquest capítol AP. Doncs bé, per detectar la AP hem de treballar també en condicions de limitació del nitrogen, i el seu comportament és totalment homòleg al de la MnP, amb l'excepció que altes concentracions de glucosa no l'afavoreixen i la desactiven. Així, com podem veure en la taula 3.11, la màxima producció de AP (àrea total) no s'obté en els cultius que hem mantingut una concentració mínima de glucosa, ni tampoc en el que vam iniciar amb 10 g/l de glucosa; ans al contrari, es necessita condicions de limitació del nitrogen però poca concentració de glucosa per produir la AP.



Oxigen

Els experiments realitzats aerant totalment amb oxigen pur, experiments 3.8 i 3.11, afermen la teoria que és el mateix oxigen el que estimula el seu propi consum, i aquest no depèn de la producció enzimàtica. Això fa pensar que l'oxigen podria veure's involucrat en algunes reaccions en cadena, i en les que el mateix oxigen actués de limitant. Aquest mecanisme podria ser independent, o paral·lel el seu efecte, a les reaccions enzimàtiques. Volem remarcar doncs, aquest fet: mai hem pogut mantenir l'oxigen al voltant del 20 %, ni tan sols afegint l'oxigen pur, recordem que en l'anterior capítol amb una barreja d'aire i oxigen ja ho assolíem.

Si comparem els experiments 3.8 -nutrient limitant la glucosa- i 3.11 -nutrient limitant el nitrogen- veiem que el consum d'oxigen és superior en el cultiu limitat per la glucosa. En els dos experiments la quantitat d'oxigen aportada al medi era la mateixa, però en el primer -iniciat amb 2.5 g/l de glucosa- és de suposar que la biomassa serà la meitat o com a mínim inferior que en el segon -iniciat amb 5 g/l de glucosa-; per tant, si tot l'oxigen el consumís el fong, en l'experiment 3.8 el seu consum seria del doble, és a dir, un consum encara més elevat. Això afermària l'explicació donada en el paràgraf anterior que l'oxigen es gastaria en altres reaccions. El més inquietant de tot, des del punt de vista de detecció de l'activitat enzimàtica LiP, és la necessitat de tenir cultius amb concentracions d'oxigen dissolt superiors. Segons la bibliografia l'activitat LiP es detecta sobretot en cultius amb elevades concentracions d'oxigen en l'aire, des del 20 % fins el 60%, i en el nostres experiments això ens ha estat impossible. La taula 3.10 resumeix l'activitat LiP detectada en els diferents experiments -experiments 3.2, 3.3-3.6-3.10, 3.4, 3.5, 3.8, 3.9 i 3.16-, i la concentració d'oxigen dissolt en el medi en el moment de realitzar-se la detecció, a més a més d'indicar la composició de l'aire per cada experiment. La màxima activitat LiP l'obtenim en l'experiment 3.9, quan teníem aprop d'un 20 % d'oxigen dissolt en el medi.

Per aconseguir major concentració d'oxigen dissolt en el medi s'ha proposat la utilització de tensoactius.

La mesura de l'oxigen dissolt en el medi té l'avantatge que es realitza amb un sonda submergida en el cultiu, i que per tant, tenim mesures a temps real. A més a més, tal com s'ha explicat en l'apartat de materials i mètodes en descriure el Biostat Q, registrem aquestes mesures cada 20 minuts (i si es desitja es podria fer per instants de temps molt més curts). A nivell de laboratori, i també a nivell industrial, la mesura de l'oxigen, malgrat tots els problemes que pogui tenir, és un tema resolt. Es una mesura que ens interessarà relacionar moltíssim amb l'activitat enzimàtica que no podem obtenir mesures (de moment) a temps real a escala laboratori.

En intentar relacionar l'activitat enzimàtica MnP i AP amb l'oxigen, un fet sembla clar: l'inici de la detecció de la MnP i la AP ve precedit per un alt consum d'oxigen i una alta velocitat de consum. Al mateix temps, quan el consum d'oxigen decreix, l'activitat de MnP i AP també decreix -gràfica 3.13-

-Relació microorganisme/enzim

Si analitzem en conjunt tots els experiments d'aquest capítol i hi intentem identificar les diferents fases del creixement d'un fong, arribem a la conclusió que el *Phanerochaete chrysosporium*, a l'igual que la resta de fongs, evolucionaria per tres fases: fase de latència, creixement i estacionaria. El metabolisme secundari en general apareixeria en la fase estacionaria, però no hi estaria lligat. Les característiques de cadascuna d'aquestes fases serien:

*Fase de latència: ve marcada per un augment del pH fins 5.5, molt poc consum d'oxigen, al mateix temps que se suposa molt poc consum de glucosa.

*Fase de creixement: s'iniciaria amb una disminució del pH fins 4.5, accentuat consum de glucosa, molt major que en la resta de les fases, i consum d'oxigen important.

*Fase estacionaria: el pH resta constant en 4.5, el consum d'oxigen seria el

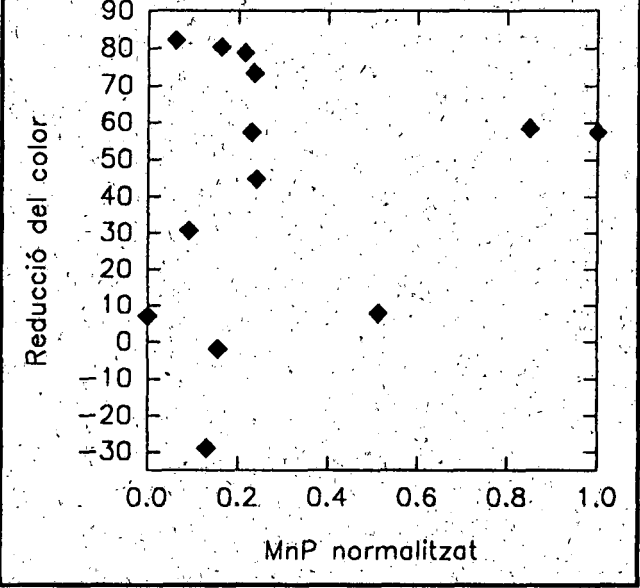
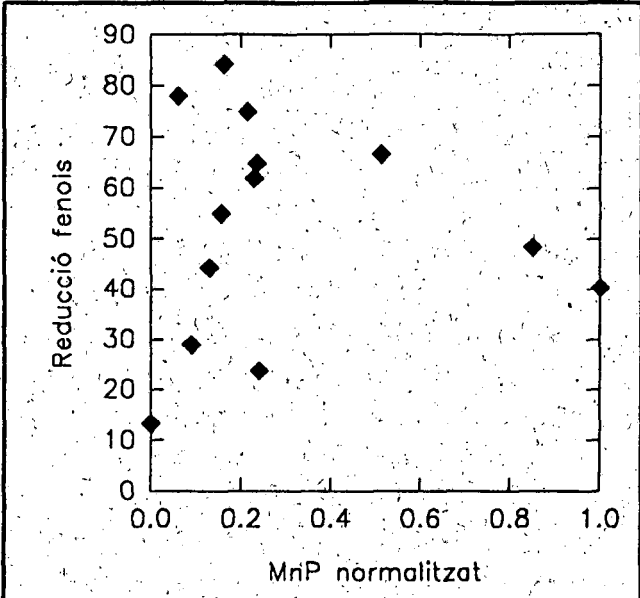
maxim, ja que la concentració d'oxigen dissolt restaria en el 0%, però el consum de la glucosa seria menor que en l'anterior fase.

El metabolisme secundari s'iniciaria en exhaurir-se la font de nitrogen amoniacal, després d'haver consumit el fong uns 3 g/l de glucosa. El pH del medi seria de 4.5 i tindriem un consum d'oxigen important. El metabolisme secundari pot iniciar-se en la fase de creixement, gràfica 3.11, llavors el pH ja el tenim a 4.5 unitats, però hem de partir de concentracions de glucosa més elevades.

En els experiments que hem mantingut una concentració mínima, estavem subministrant la glucosa que seria necessària pel manteniment del microorganisme, d'aquesta forma mantenim el metabolisme secundari dins la fase estacionària. Ara bé, és evident que no tot l'oxigen, ni tan sols la major part, es consumeix pel manteniment del microorganisme. En afegir un puls de glucosa en el medi, gràfica 3.11, immediatament a continuació la concentració d'oxigen dissolt augmentava i l'activitat enzimàtica decreixia. Aquest fet ens podria indicar, que el fong ha continuat consumint oxigen pel seu manteniment però ha reduït les seves funcions -metabolisme- i, per això, ha reduït el consum d'oxigen. El que no podem explicar és per què es produiria aquest canvi del metabolisme, o quines alteracions provoca augmentar la concentració d'oxigen, quan de fet el microorganisme hauria d'estar adaptat al consum de la glucosa.

- Reducció del color i dels components aromàtics.

Hem calculat la quantitat de MnP(l'àrea) UA/l totals en els experiments -3.11, 3.12, 3.13 i 3.14, 3.15, 3.16, 3.1 i 3.17 que l'havíem detectat. Per tal de relacionar l'efecte que causa l'enzim MnP i la seva relació amb la reducció del color i la reducció dels components aromàtics representem gràficament -gràfica 3.14- les reduccions del color i dels compostos aromàtics en funció d'aquesta quantitat d'enzim MnP normalitzada a la més gran.



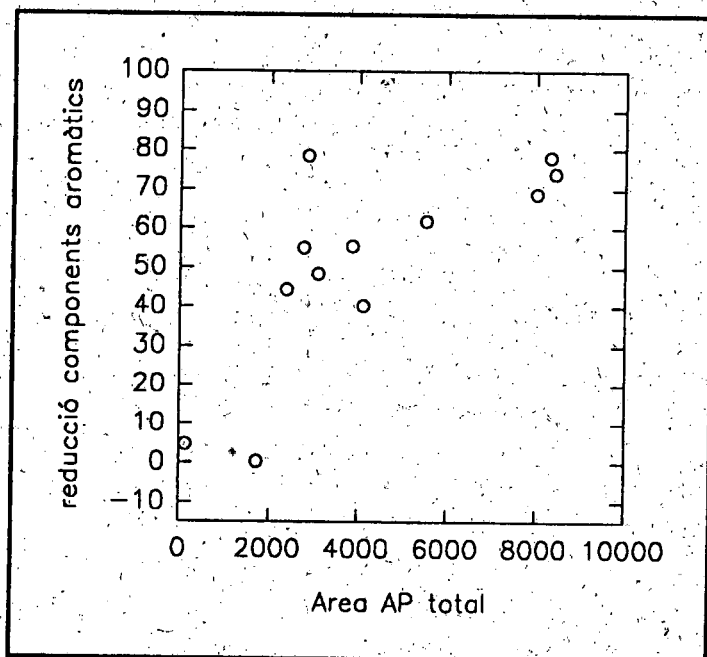
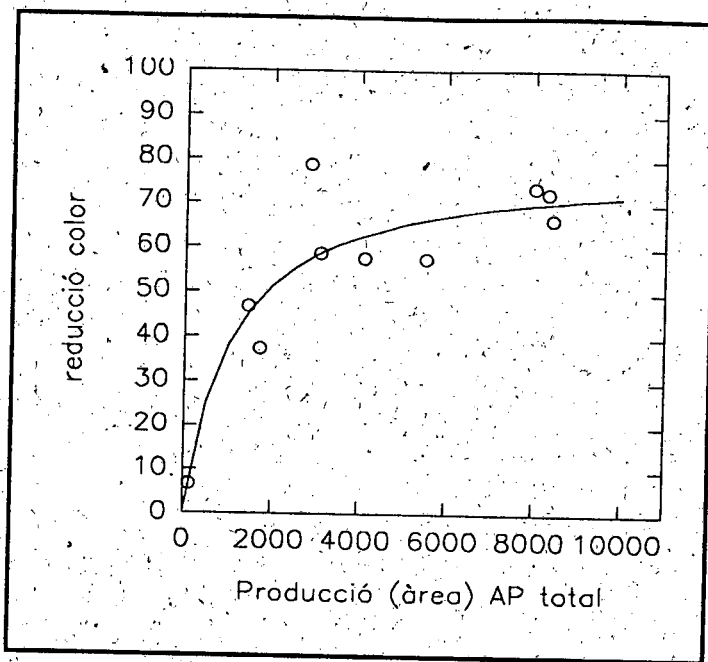
La gràfica 3.14a i 3.14b ens suggerixen altre cop, tal com ho havíem vist en les gràfiques de la reducció del color i els compostos aromàtics per cada experiment, que els dos paràmetres es comporten de forma molt semblant. També veiem clarament en les gràfiques 3.14 que establir una relació entre la MnP i el comportament del color o els compostos aromàtics no és possible.

Les reduccions del color i els compostos aromàtics són independents de l'enzim, i hauran de ser degudes a altres enzims diferents a la MnP i/o l'acció d'altres compostos com l'aigua oxigenada i radicals lliures. Els lleixius negres són un substrat molt complex i, segurament, la reducció del color i els compostos aromàtics no es deguda solament a una intervenció individualitzada, sinó que deu haver la suma d'actuacions de diferents espècies i/o enzims. No podem oblidar tampoc que en canviar les condicions ambientals i fer-les més favorables per la LiP, canvien les rutes metabòliques i canvia el funcionament del sistema.

Finalment podem afegir, que en condicions de limitació del nitrogen, és a dir, de producció de MnP, les reduccions del color i dels compostos aromàtics tenen molt poca aportació de la MnP i, a més, amb petítssimes quantitats d'aquest enzim n'hi ha prou.

Hem fet el mateix tractament de les dades per l'activitat equivalent lacassa de la AP. Hem calculat la quantitat de AP(l'àrea) UAlacasa/l totals en els experiments -3.11 5, 3.12 6, 3.13 7, 3.14 8, 3.15 13, 3.16 14, 3.17 16, 3.4 4, 3.5 3i xxx1xx i xxx2xx que l'havíem detectar a les 165-169 hores. Per tal de relacionar l'efecte que causa la AP i la seva relació amb la reducció del color i la reducció dels components aromàtics representem gràficament -gràfica 3.15- les reduccions del color i dels compostos aromàtics enfront la producció de AP. Pels experiment 3.15 i 3.16 -realitzats a temps final més grans- hem pres també els valors a les 259 hores.

En la gràfica 3.15a, del conjunt de 13 valors, 3 no els hem considerat perquè tenien reduccions negatives del color. Ja havíem dit en comentar els



experiments 3.11, 3.13 i 3.14 que probablement aquest augment del color fos més degut a problemes experimentals, -no poder mantenir el fluid refrigerant del condensador a 7 C- que a l'acció polimeritzadora del fong. Amb la resta de valors hem ajustat una corba que ens relaciona la reducció del color i la producció de AP -gràfica 3.15a-; només un punt es desviaria d'aquesta corba que vindria representada per la següent expressió:

$$\text{Reducció del color} = R_{\max} * A_{AP} / (A_{AP} + K) \quad (\text{eq. 3....})$$

en la que A_{AP} representa la producció de AP en un determinat temps pel qual es calcula la reducció del color i R_{\max} una constants que tindria el valor de 79.108 % i K una segona constant amb el valor de 1086.74 UAlacassa total.

La forma de l'equació anterior i el significat físic de les constant que hi intervenen ens donen una bona idea de l'efecte de la AP. La AP per si sola no seria suficient per reduir tot el color dels lleixius negres, i tindria un sostre al voltant del 80 % de la reducció del color; sense oblidar que solament amb unes 1100 unitats totals d'activitat equivalent de lacassa ja reduiríem la meitat del color. Per tant, no necessitem molta AP per reduir la meitat del color, i, en cultius de 150-200 hores en els que el nombre de mostres que podem obtenir cada dia es limitat ens podria haver passat inadvertit en les condicions que no la vam detectar.

En la gràfica 3.15b hem dibuixat la corba que relacionaria la reducció dels compostos aromàtics amb la producció de AP. La forma és molt semblant a l'obtinguda pel color. La relació no es tan precisa perquè també en la mesura dels compostos aromàtics fem més error. També és evident que encara que compostos aromàtics i color es comportin igual, no és difícil suposar que no tots els compostos aromàtics contribueixen d'igual forma en el color, i tampoc la AP ataca a tots els compostos aromàtics per igual. Recordem que no tenim identificada la AP, i que la AP correspon a l'efecte equivalent d'un conjunt -format per una única o moltes espècies- de substàncies que són assimilables a la lacasa en realitzar el test de la lacasa i que podria ser des de la mateixa aigua

oxigenada fins altres enzims peroxidases.

- Reducció de la toxicitat

Durant el treball, tant en aquest capítol com en l'anterior, s'ha donat molta importància a la reducció de la toxicitat. La reducció de la toxicitat dels lleixius negres era una de les principals fites a assolir. Els resultats obtinguts demostren que aquesta disminució de la toxicitat conseqüència de l'activitat del fong esta relacionada amb l'activitat de l'enzim MnP.

En la gràfica 3.16 hem representat la reducció de la toxicitat en funció de la quantitat d'enzim MnP total (àrea). La producció total d'enzim (UA/L totals) s'ha calculat en tot el període de producció de l'enzim per cada experiment, ja que la mesura de la toxicitat només la tenim a temps final. En la gràfica 3.16a hi ha representats tots els punts en els que es va detectar la MnP independentment que també es detectés LiP. Tres punts, amb reduccions de la toxicitat molt elevades, trenquen qualsevol possible relació. Si aquests tres punts no els considerem ens queda la gràfica 3.16b. Aquests tres punts que en la nova gràfica no hem dibuixat corresponien als experiments 3.5, xxx2xx, 3.8. El 3.5 i el xxx2xx tenen com a característica comuna el temps fins el qual s'allargà el tractament, 350 hores, i el 3.5 i el 3.8 tenen com a característica comuna que els dos van donar també positiu el test de la LiP. Ja havíem comentat que en els experiments que havíem detectat la LiP s'obtenia reduccions de la toxicitat elevades si ho comparàvem amb els que detectàvem la MnP. En aquests experiments la reducció de la toxicitat ha de ser deguda a algun element diferent a la MnP, perquè en tots tres la quantitat de MnP és molt petita.

Si ens centrem en els vuit experiments fets en condicions de MnP -dèficit de nitrogen- en els que no es va detectar LiP, l'experiment 3.1 -bioreactor sense inocular- i hi afegim l'experiment 3.17 -condicions de LiP però amb el pH controlat i que va produir una quantitat apreciable de MnP- podem dibuixar la recta de la gràfica 3.16b. La regressió que s'obté d'aquesta recta té un coeficient

r igual 0.95 força acceptable, si tenim en compte que dins el rang de confiança del 95 % hi entrarien les mesures dels 9 punts. L'expressió que ens relacionaria la quantitat de MnP amb la reducció de la toxicitat seria la següent,

$$\text{Reducció toxicitat} = A_{\text{MnP}} * 3.07847 + 0.6856 \quad (\text{Eq} \dots)$$

en la que A_{MnP} representa la producció de l'enzim MnP fins el temps al que es calcula la reducció de la toxicitat. Fixem-nos bé, un dels punts d'aquesta gràfica correspon al bioreactor sense inocular, per tant, correspon a una producció d'enzim igual a zero. I efectivament, l'ordenada en l'origen de la recta dibuixada coincideix amb la reducció de la toxicitat assenyalada en l'experiment 3.1.

Encara que l'equació... hagi estat obtinguda a partir d'una regressió de les dades acceptable però molt millorable, aquesta relació la podem millorar si deixéssim de considerar els experiments 3.17 -vam detectar també LiP-, el xxxlxx -el temps del cultiu era de 350 hores. Eliminats aquest dos punts el coeficient de regressió de la nova recta valdria 0.98, i el pendent i l'ordenada en l'origen no canviarien gaire: 3.186 i 0.548 respectivament.

Preferim quedar-nos amb l'equació primera com a relació de la reducció de la toxicitat i l'enzim MnP.

Hem intentat correlacionar també la quantitat de AP i la reducció de la toxicitat i com es dedueix de la gràfica 3.17, no estan directament relacionats.

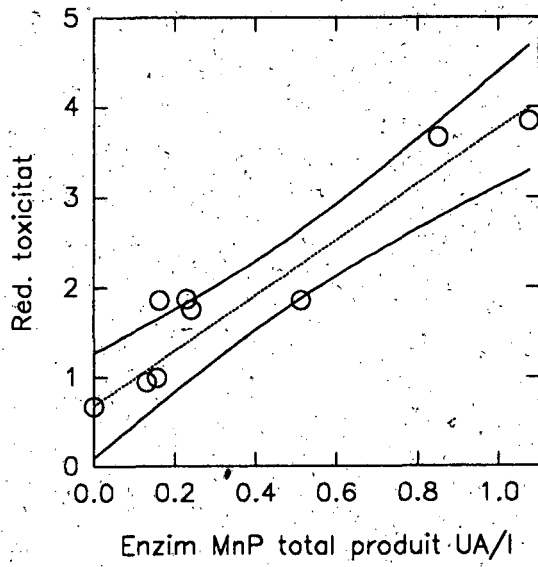
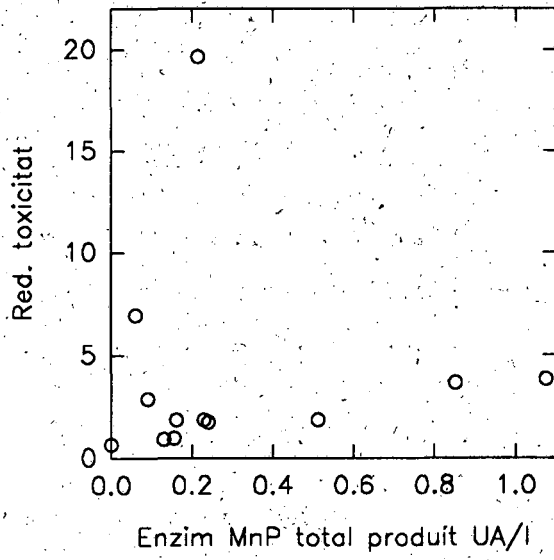
Per tant, podem relacionar la quantitat d'enzim MnP amb la reducció de la toxicitat dels lleixius negres, en condicions de limitació del nitrogen. En presència de MnP la reducció de la toxicitat anirà lligada amb la quantitat d'aquest enzim en el medi. Quan no detectem la MnP, i en canvi sí detectem quantitats molt petites de LiP, la reducció de la toxicitat no està gens clar que estigui causada per l'activitat detectada d'aquest enzim. La LiP podria no tenir cap efecte per si sol en la reducció de la toxicitat dels lleixius negres, ja que en condicions de detecció de la LiP -taula....- més enzim LiP no comporta més

reducció de la toxicitat.

Podem concloure que com a mínim l'enzim MnP intervé en la reducció de la toxicitat, i aquesta intervenció la tenim quantificada en l'equació....; a més, sembla que la AP no té cap efecte en la reducció de la toxicitat i en condicions de déficit de glucosa -detecció de la LiP- s'estimulen altre mecanismes més efectius per reduir la toxicitat que el mateix enzim MnP, però que podrien ben bé no ser la LiP.

Activitat	MnP	221.6	7.75	129	285	318
Glucosa/hora	Consum abans de detectar-se la MnP	2.32	3.25	3.31	3.34	3.72

Taula 3.9. El seguiment amb més precisió de la glucosa correspon a l'experiment 14, ja que per concentracions inferiors de 2 g/l l'aparell YSI augmenta l'error.



Experiment	Temps (hores)	LiP (UA/l)	Nutrient limitant	Condicions inicials d'aireació	Concentració d'oxigen en el medi: aproximada
3.2	95.25	32	Glucosa	aire/aire/aire	20 %
3.3 (3.6 i 3.10)	95.25	40.8	Glucosa	aire/aire/aire	20 %
3.4	143.75	12	nitrogen	aire/aire/aire	0%
3.4	167.5	<5			0%
3.5	143.75	17	nitrogen	aire/aire/aire	0 %
3.5	167.5	<5			0 %
3.8	95.25	14.64	glucosa	oxigen	0 %
3.9	95.25	34.04	glucosa	aire/1hoxigen/aire	0 %
3.9	151.5	209.28			20 %
3.16	259.5	12.97	nitrogen	aire/aire/aire	0%

Taula 3.10. Resum de l'enzim LiP (UA/l) detectat en els diferents experiments.

Experiment	Temps (hores)	Producció acumulada AP	Glucosa (g/l)
3.5	143.75	5987	
3.5	167.5	8422.25	
3.5	195.25	10642	
3.4	143.75	5806	
3.4	167.5	8002.9	
3.4	195.25	9876.75	
3.13	169.5	2753.9	
3.11	169.5	2386	
3.12	169.5	5519	
3.14	169.5	3847	
3.14	258	7122.25	
xx1xx	167.5	8313.75	
	195.25	10839	
	333.25	20860.75	
xx2xx	167.5	2845.75	
	195.25	3428.5	
	333.25	4744.125	
3.15	163.5	1725.75	
3.15	211	3869.47	
3.15	259	4101.8	
3.16	163.5	1443.95	6.16
3.16	211	2633.09	
3.16	259.5	3092	
3.17	163	137	
3.17	259.5	137	

Taula 3.11. Resum de l'activitat AP (UAlacassa/l) detectat en els diferents experiments.

-Revisio dels resultats obtinguts en el capítol dels reactors amb el fong immobilitzat

A partir de les conclusions sobre les activitats enzimàtiques obtingudes amb el fong lliure anem a analitzar quina ha pogut ser l'evolució dels nostres experiments del capítol 2, amb el fong immobilitzat. Ens centrarem només amb els més representatius. Evidentment, som totalment conscients que en tenir el fong immobilitzat el comportament no ha de ser necessàriament el mateix.

Per tant, si retornem altre cop a l'experiment 2.10 (discontinu, immobilitzat en cubs de nilo, 5 g/l de glucosa inicial i 75 ppm de nitrogen amoniacal també inicial, i afegint durant 24 hores oxigen pur), gràfica 2.3a, veiem que pH i glucosa segueixen el mateix comportament que el descrit pel fong lliure. On tenim les diferències es en l'evolució de la concentració d'oxigen dissolt en el medi. Amb el fong immobilitzat aconseguim mantenir una concentració d'oxigen del 20 %, mentre que amb els experiments amb el fong lliure això ens ha estat impossible, ni tan sols afegint oxigen pur. No sabem si això implica que amb el fong immobilitzat l'estimulació del consum d'oxigen es veuria afectada per la immobilització o altres factors. Si ara ens tornem a fixar en la glucosa i el pH esperariem que: després de consumir tot el nitrogen, és a dir, en restar 2 g/l de glucosa en el medi, per tant, a les 60 hores, apareixeria la MnP, i les AP amb menor activitat perquè hi ha menys consum d'oxigen. A partir de l'increment en el pH ja no detectariem cap enzim.

Si ara analitzem un dels experiments realitzats en continu, experiment 2.12 (procés en continu, iniciat amb 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal), gràfica 2.5a tornem a veure clarament que en exhaurir-se la font de carboni el pH augmenta ràpidament fins les 8 unitats. Per tant, teòricament només hauriem treballat amb bones condicions pels enzims en la primera fase que correspondria al procés en discontinu.

Efectivament, quan en l'experiment 2.13, gràfica 2.6, mantenim el pH (que seria

l'efecte equivalent a mantenir la glucosa) milloravem les reduccions de la toxicitat i els compostos aromatics, i, a mes a mes, les estabilitzabem.

Per tant, analitzats els resultats del conjunt del treball, proposem que caldria

- *estudiar l'efecte de l'estimulacio de l'oxigen sobre el fong immobilitzat per tal de comprovar si difereix respecte al mateix efecte amb el fong lliure.

- *Fer el seguiment enzimatic del proces en continu

- *Plantejar el tractament en continu afegint als lleixius negres una concentracio residual de glucosa, 2 g/l , o be, si en cas de mantenir el pH caldria diferenciar aquest hauria de ser 4.5 o 6.

Experiment	Temps (hores)	LiP (UA/l)	Nutrient limitant	Condicions inicials d'aireació	Concentració d'oxigen en el medi aproximada
3.2	95.25	32	Glucosa	aire/aire/aire	20 %
3.3 (3.6 i 3.10)	95.25	40.8	Glucosa	aire/aire/aire	20 %
3.4	143.75	12	nitrogen	aire/aire/aire	0%
3.4	167.5	<5			0%
3.5	143.75	17	nitrogen	aire/aire/aire	0 %
3.5	167.5	<5			0 %
3.8	95.25	14.64	glucosa	oxigen	0 %
3.9	95.25	34.04	glucosa	aire/1hoxigen/aire	0 %
3.9	151.5	209.28			20 %
3.16	259.5	12.97	nitrogen	aire/aire/aire	0%

Taula 3.10. Resum de l'enzim LiP (UA/l) detectat en els diferents experiments.

6

