

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE PROCESO EN LOS EFLUENTES DEL BIOBLANQUEO CON EL SISTEMA LACASA MEDIADOR

RESUMEN

La pasta de lino se blanquea mediante un tratamiento enzimático con lacasa y HBT como mediador (etapa L). El sistema lacasa mediador se optimiza aplicando un plan estadístico secuencial de cuatro variables. Los márgenes de variación de dichas variables son: dosis de lacasa (1 a 20 U·g⁻¹), dosis de HBT (0,1 a 2 %odp), tiempo de aplicación (0,5 a 6,5 h) y presión de oxígeno en el reactor (0,2 a 0,6 MPa). Se estudia la influencia de estas variables en las propiedades de los efluentes de esta etapa, DQO, color, toxicidad y actividad enzimática residual.

Los resultados obtenidos presentan valores que varían entre 129 y 491 kg·t⁻¹, 0 y 79 kg·t⁻¹ y entre 0 y 11 equitox·m⁻³ de DQO, color y toxicidad, respectivamente. Se han obtenido modelos matemáticos que predicen las propiedades de DQO, color y actividad enzimática residual en función de los factores del proceso. La DQO de los efluentes de blanqueo se debe a la preparación de enzima lacasa comercial, que presenta una DQO elevada. La toxicidad de los efluentes es inferior a los límites que marca la ley de vertidos del área metropolitana de Barcelona. La toxicidad de éstos se atribuye al efecto conjunto del sistema lacasa mediador, ya que la toxicidad al final del tratamiento es superior a la toxicidad del tratamiento realizado con HBT pero sin enzima. Se deduce también que durante el tratamiento sistema lacasa mediador se forma algún componente que aporta color a los efluentes.

9.1 INTRODUCCIÓN

La biotecnología tiene un alto potencial en diferentes aspectos de la fabricación de pasta y papel con el objetivo de reducir costes, mejorar los productos o limitar el impacto ambiental de una industria considerada tradicionalmente como altamente contaminante (Bajpai and Bajpai 1998). La producción de pasta TCF va en aumento

debido a las regulaciones medioambientales tanto para disminuir las descargas de organoclorados como por la necesidad del cierre de la planta de blanqueo a través del reciclado de los filtrados. La recirculación completa es difícil con secuencias en las que se utilicen cloro o derivados de éste por sus efectos corrosivos en los equipos, por lo que las secuencias TCF presentan un alto potencial para la reutilización de los filtrados en el ciclo de recuperación (Barascud et al. 1995; Cates et al. 1995; Johansson and Clark 1995; Kenealy and Jeffries 2003). Aunque en los efluentes de las secuencias de blanqueo TCF no existe la presencia de compuestos organoclorados, no obstante, se deben controlar propiedades como la DQO y el color para conseguir, en una futura aplicación industrial del bioblanqueo de pasta, el cierre de circuitos del sistema.

El sistema lacasa mediador permite desarrollar secuencias de blanqueo TCF, sustituir la etapa de deslignificación con oxígeno o la de ozono, ahorrar reactivos, blanquear la pasta y reducir el índice kappa. En la literatura de la última década se demuestra que existen muy buenas perspectivas en el blanqueo de pasta aplicando lacasas en presencia de mediadores (Bajpai 1999; Bourbonnais et al. 1997; Chakar and Ragauskas 2000a; Chakar and Ragauskas 2000b; Da Silva et al. 1997; Nelson et al. 1998; Paice et al. 1995).

Una de las características de un buen mediador, considerando su aplicación en la fábrica de pasta, es que debe estar accesible en grandes cantidades a bajo precio y que no debe ser peligroso para el medio ambiente (Rochefort et al. 2004). Los mediadores más efectivos para la deslignificación de pasta son aquellos que contienen el grupo $-N(OH)-$, como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Geng et al. 2004; Xu et al. 2000). En la bibliografía se menciona que las desventajas que presentan mediadores como el HBT, es su alto precio y su posible toxicidad (Amann et al. 2000) o la de sus productos de reacción (Camarero et al. 2004; Johannes and Majcherczyk 2000). Debido a esto, los investigadores focalizan sus estudios en la búsqueda de mediadores alternativos y en su recuperación (Camarero et al. 2007; Cañas et al. 2007; d'Acunzo and Galli 2003; Wong et al. 1999). En la bibliografía se ha encontrado un solo antecedente de la caracterización de los efluentes del sistema lacasa mediador y no se han encontrado datos relativos a la toxicidad del HBT con el método Microtox en las hojas de seguridad del producto. La inactivación de la enzima lacasa por las especies oxidadas de algunos mediadores también es un inconveniente de los sistemas lacasa mediador (Fillat et al. 2007; García 2003; Ibarra et al. 2006; Rochefort et al. 2004).

En trabajos anteriores se ha demostrado la eficacia del sistema lacasa mediador en el blanqueo de pasta de lino (Camarero et al. 2002; Camarero et al. 2004; Colom et al. 2005; García et al. 2003; García 2003). En este trabajo se pretende determinar la influencia de las variables de proceso del sistema lacasa mediador en las propiedades de los efluentes de proceso.

9.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se indican las materias primas utilizadas, las condiciones generales de aplicación de las distintas etapas y los análisis realizados en este capítulo. En el capítulo 2 “Materiales y Métodos” se describe la metodología de manera más detallada.

9.2.1 MATERIA PRIMA

La pasta inicial es la pasta cruda de lino después de un lavado ácido, sus propiedades se muestran en la Tabla 9-1. La enzima utilizada es una lacasa comercial de *Trametes villosa* proporcionada por Novozymes® (Ref. NS-51002) y tiene una actividad de 39,4 U·mL⁻¹. El mediador utilizado es el HBT (Fluka, Ref. 54802).

Tabla 9-1. Propiedades de la pasta inicial.

Índice kappa	10,4
Blancura (%ISO)	37,4
Viscosidad (mL·g ⁻¹)	952

9.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los diferentes tratamientos enzimáticos se realizan siguiendo un diseño secuencial, que consta de un diseño factorial 2⁴ con tres réplicas en el centro y una estrella de experiencias. Las cuatro variables o factores varían en los siguientes márgenes: X₁ ≡ dosis de lacasa (1 a 20 U·g⁻¹), X₂ ≡ dosis de HBT (0,1 a 2 %odp), X₃ ≡ tiempo de aplicación (0,5 a 6,5 h) y X₄ ≡ presión de oxígeno en el reactor (0,2 a 0,6 MPa).

Por cuestiones de estabilidad experimental y admitiendo que podría ser necesario en el estudio estadístico utilizar todas las experiencias previstas en el diseño secuencial, se decide realizar los tratamientos de la etapa L “en bloque” al inicio del estudio. La etapa E, P y los diferentes análisis de pastas y efluentes se realizan según los resultados estadísticos que se obtienen al realizar el estudio del diseño secuencial. Los resultados experimentales se analizan con el programa “EXCEL” mediante la “Herramienta para análisis: Regresión” y mediante el “Método de regresión paso a paso hacia atrás”.

9.2.3 TRATAMIENTO SISTEMA LACASA MEDIADOR (ETAPA L)

Los tratamientos se efectúan sobre 40 g de pasta inicial al 3 %odp de consistencia en una solución tamponada 50 mM de tartrato sódico a pH 4 a una temperatura de 30 °C. Se añade Tween 80 como tensoactivo. Las experiencias se llevan a cabo en un

reactor a presión. La dosis de lacasa, la dosis de mediador, el tiempo de tratamiento y la presión de oxígeno son las cuatro variables del diseño experimental y se especifican en su correspondiente apartado.

9.2.4 ETAPA DE EXTRACCIÓN ALCALINA (ETAPA E)

A las pastas obtenidas después de la etapa L se les realiza una etapa E de extracción alcalina. Mediante esta etapa se consigue solubilizar y extraer aquellas fracciones de lignina que no se han solubilizado durante la etapa de tratamiento enzimático ni en los correspondientes lavados. La etapa E se realiza en el reactor individual oscilante Easydye AHIBA de Datacolor, con 5 g de pasta al 5 %odp de consistencia. Las condiciones de esta etapa son 1,5 %odp de NaOH durante 120 min a una temperatura de 90 °C.

9.2.5 ETAPA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (ETAPA P)

A las pastas obtenidas después de la etapa L se les realiza una etapa de blanqueo P de peróxido de hidrógeno. La etapa P se realiza en el reactor individual oscilante Easydye AHIBA de Datacolor, con 5 g de pasta al 5 % de consistencia. Las condiciones de esta etapa son 3 %odp de H₂O₂, 1,5 %odp de NaOH, 1 %odp de DTPA, 0,2 %odp de MgSO₄ durante 120 min a una temperatura de 90 °C.

9.2.6 PROPIEDADES DE LOS EFLUENTES

Después de realizar la etapa L se caracterizan los efluentes, se miden las propiedades de DQO, color, toxicidad según las normativas ASTM D1252-95, ASTM D1209-79 y UNE-EN ISO 11348-3:1998, respectivamente. También se realizan las curvas espectrofotométricas de los efluentes y se determina la actividad enzimática residual.

La toxicidad se determina por el método Microtox que se basa en la medida de reducción de luz que produce el microorganismo *Vibrio fischeri* en contacto con tóxicos. Se define un equitox·m³ como la inversa de la dilución del agua residual (expresada como partes por uno) que provoca una inhibición del 50 % en 15 minutos en las condiciones del bioensayo. La corrección del color en las medidas de toxicidad se realizó según la norma que recomienda el equipo MicrotoxOmni de Azur Environmental.

La actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma 1 mmol de substrato ABTS por minuto y se mide a partir de medidas de absorbancia.

9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización del diseño factorial las variables se han codificado en factores de nivel -1, 0 y 1. En la Tabla 9-2 se muestra la relación entre las variables de proceso y los factores codificados de la etapa L.

Tabla 9-2. Valor de las variables para cada nivel.

Variables	Factores	Niveles		
		-1	0	1
Dosis lacasa ($U \cdot g^{-1}$)	x_1	1	10,5	20
Dosis HBT (%odp)	x_2	0,1	1,05	2,0
Tiempo (h)	x_3	0,5	3,5	6,5
Presión oxígeno (MPa)	x_4	0,2	0,4	0,6

El análisis estadístico de las propiedades de las pastas se ha realizado a partir de una planificación secuencial de las experiencias. Este diseño se basa en el análisis de las experiencias por etapas hasta completar el diseño. Después de cada una de las etapas se analizan los resultados obtenidos y se decide si es necesario realizar la siguiente etapa. La primera etapa en una planificación secuencial es el estudio del diseño factorial. Se requiere encontrar un modelo lineal que evalúe los efectos principales y sus interacciones (Etapa 1). Se realiza la prueba de homocedasticidad a partir de la variancia en el centro y el cuadrado medio residual del diseño factorial. Si la variancia es homogénea, el modelo es homocedástico, es decir, la variancia es constante en la región experimental estudiada y se puede continuar con el estudio de las posibles curvaturas (Etapa 2). Para ello se estima un modelo lineal a partir de los términos declarados significativos en el diseño factorial anterior y las repeticiones del centro para comprobar si alguno de los términos cuadráticos es significativo (Etapa 3). Si el término representativo cuadrático es significativo se amplía el diseño y se añade la estrella de experiencias para desconfundir los términos cuadráticos (Etapa 4). Por último se realiza la verificación del modelo obtenido (Etapa 5).

9.3.1.1 Análisis estadístico de la DQO en la etapa L

a) DQO. Estudio del diseño factorial 2^4

Se estudia el diseño factorial 2^4 a partir de las experiencias L1a L 8, L 12 a L 14 y L A a L E (Tabla 9-3). Se realiza el gráfico probabilístico del modelo saturado (Ec. 9-1, Tabla 9-4 y Fig. 9-1).

Tabla 9-3. DQO después de aplicar la etapa L.

x₁	x₂	x₃	x₄	Ref.	DQO
-1	-1	-1	-1	L 1	180
1	-1	-1	-1	L A	484
-1	1	-1	-1	L B	154
1	1	-1	-1	L 4	482
-1	-1	1	-1	L C	129
1	-1	1	-1	L 6	456
-1	1	1	-1	L 7	153
1	1	1	-1	L D	490
-1	-1	-1	1	L E	140
1	-1	-1	1	L 2	480
-1	1	-1	1	L 3	176
1	1	-1	1	L 12	484
-1	-1	1	1	L 5	186
1	-1	1	1	L 14	440
-1	1	1	1	L 13	160
1	1	1	1	L 8	481

Tabla 9-4. Coeficientes estimados del modelo saturado de DQO en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes	Sz
b ₁₂₄	0,0	0,00
b ₄	0,1	0,04
b ₂₄	1,2	0,13
b ₁₃	1,6	0,21
b ₃₄	2,6	0,30
b ₂₃	3,7	0,39
b ₁₂	3,8	0,48
b ₁₄	4,3	0,57
b ₂	4,6	0,67
b ₃	5,3	0,78
b ₁₂₃	5,3	0,90
b ₁₃₄	5,3	1,04
b ₂₃₄	6,6	1,19
b ₁₂₃₄	6,9	1,38
b ₁	7,1	1,64
b ₀	16	2,13

$$Y_{DQO-L} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{234}X_2X_3X_4 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{1234}X_1X_2X_3X_4 \quad \text{Ec. 9-1}$$

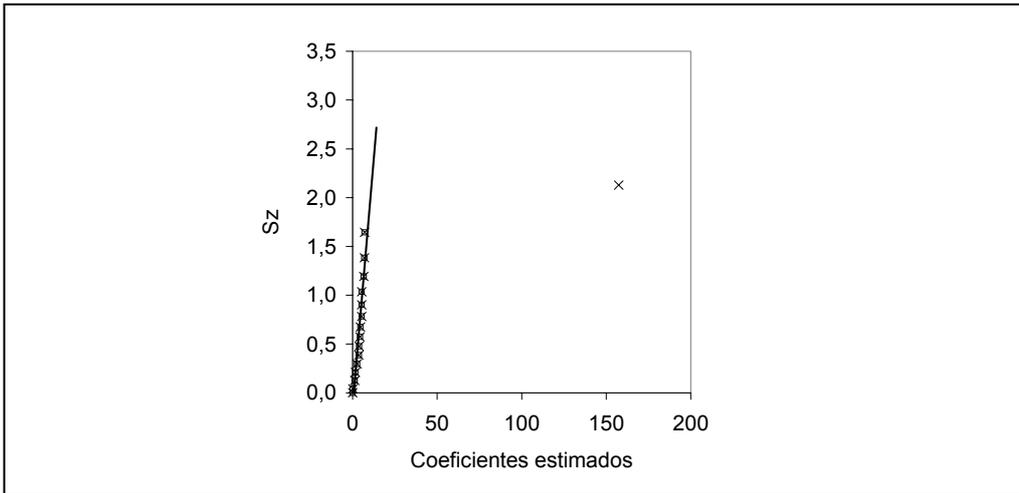


Fig. 9-1. Gráfico seminormal del modelo saturado de DQO.

A partir del análisis gráfico de este modelo saturado se eliminan los coeficientes considerados no significativos. Los coeficientes significativos son aquellos que se sitúan a la derecha de la recta de significación y se alejan de ella (Fig. 9-1).

b) DQO. Estudio del modelo obtenido con los coeficientes significativos

Se estudia el modelo con los coeficientes declarados significativos en el análisis gráfico anterior (Ec. 9-2) y se determinan los coeficientes y su significación. En la Tabla 9-5 se muestran los términos del modelo, se observa que todos ellos son significativos (Probabilidad < 0,05).

Tabla 9-5. Coeficiente del modelo (Ec. 9-2) estimado para la DQO en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	317	4,65	68,1	4,69·10 ⁻¹⁹
b ₁	157	4,65	33,8	8,01·10 ⁻¹⁵

$$Y_{DQO-L} = b_0 + b_1X_1 \quad \text{Ec. 9-2}$$

c) DQO. Estudio de la variancia

Para poder continuar con el estudio de las posibles curvaturas del modelo, se debe verificar si la variancia es constante en el campo experimental estudiado. A partir de la comparación del cuadrado medio residual (CMR) y la variancia de los tres puntos centrales (S_c^2) se realiza la prueba de homocedasticidad, obteniendo que $p \text{ value} > 0,05$, con lo que el modelo es homocedástico, es decir, la variancia es constante (Tabla 9-6).

Tabla 9-6. Análisis de variancia del modelo para la DQO en la etapa L.

n	16	SCR	4860
p	2	CMR	347
r	3	S_c^2	1010
v_R	14	F_{calc}	2,91
v_C	2	p value	0,22

d) DQO. ¿Influyen los términos cuadráticos?

Para realizar el estudio de las posibles curvaturas, en el modelo obtenido en el estudio del diseño factorial 2^4 anterior se incluyen los 2 coeficientes ya declarados significativos y el coeficiente representante de los términos cuadráticos, de modo que se obtiene el modelo de la Ec. 9-4. Se incluyen en la matriz de diseño las experiencias centrales L 9, L 10 y L 11 (Tabla 9-7), diseño 2^4 con tres respuestas centrales, y se analizan las posibles curvaturas. Según el análisis estadístico el término representativo cuadrático no resulta significativo (Probabilidad = 0,4).

$$Y_{\text{DQO-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1X_1 \quad \text{Ec. 9-3}$$

Tabla 9-7. DQO de las experiencias centrales después de aplicar la etapa L.

x_1	x_2	x_3	x_4	Ref.	DQO
0	0	0	0	L 9	340
0	0	0	0	L 10	301
0	0	0	0	L 11	277

$$Y_{\text{DQO-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1X_1 \quad \text{Ec. 9-4}$$

e) DQO. Obtención del modelo definitivo

Se dispone de los resultados de DQO de las experiencias L F a L I (Tabla 9-8), aunque ya se puede estimar el modelo sin ellas, se introducen en el análisis del modelo. El modelo definitivo se ha obtenido a partir de 23 respuestas y corresponde a la ecuación Ec. 9-2, con un índice de determinación (R^2) de 0,98 y una probabilidad asociada a F_{calc} de 10,4. Se presentan en la Tabla 9-9 los coeficientes del modelo y su significación.

Tabla 9-8. DQO de las experiencias LF a LI después de aplicar la etapa L.

x_1	x_2	x_3	x_4	Ref.	DQO
1	0	0	0	LF	491
0	1	0	0	LG	346
0	0	1	0	LH	320
0	0	0	-1	LI	334

Tabla 9-9. Coeficientes del modelo (Ec. 9-2) a partir de 23 respuestas de DQO de la etapa L.

Coeficientes modelo	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b_0	319	4,22	75,4	$4,7 \cdot 10^{-27}$
b_1	158	4,91	32,2	$2,3 \cdot 10^{-19}$

f) DQO. Verificación del modelo definitivo

En la Tabla 9-10 se presenta la DQO estimada y los residuos obtenidos en el modelo. En la Fig. 9-2 se muestran los gráficos de verificación del modelo. La distribución de los residuos en función de las respuestas estimadas no sigue ningún tipo de tendencia, ver Fig. 9-2 (a). En la Fig. 9-2 (b) se observa que las respuestas de DQO pronosticadas por el modelo y las respuestas experimentales se sitúan en torno a una recta, las diferencias entre ambas respuestas se encuentran entre -42 y $27 \text{ kg} \cdot \text{t}^{-1}$. En el Gráfico Probabilístico Normal los valores de $Z:N(0,1)$ en función de los residuos se ajustan a una recta (Fig. 9-2 c). Teniendo en cuenta estos resultados, el modelo se considera estadísticamente correcto.

Tabla 9-10. DQO estimada, residuos y valor de Z de la ley Normal para cada una de las experiencias del modelo de DQO en la etapa L.

Ref.	DQO estimada	Residuos	Z:N(0,1)
L 11	319	-42	-2,02
L 14	477	-37	-1,51
L C	160	-31	-1,23
L 6	477	-21	-1,03
L E	160	-20	-0,86
L 10	319	-18	-0,71
L 7	160	-7	-0,58
L B	160	-6	-0,45
L 13	160	0	-0,33
L H	319	1	-0,22
L 2	477	3	-0,11
L 8	477	4	0,00
L 4	477	5	0,11
L A	477	7	0,22
L 12	477	7	0,33
L D	477	13	0,45
L F	477	14	0,58
L I	319	15	0,71
L 3	160	16	0,86
L 1	160	20	1,03
L 9	319	21	1,23
L 5	160	26	1,51
L G	319	27	2,02
L 11	319	-42	-2,02
L 14	477	-37	-1,51
L C	160	-31	-1,23

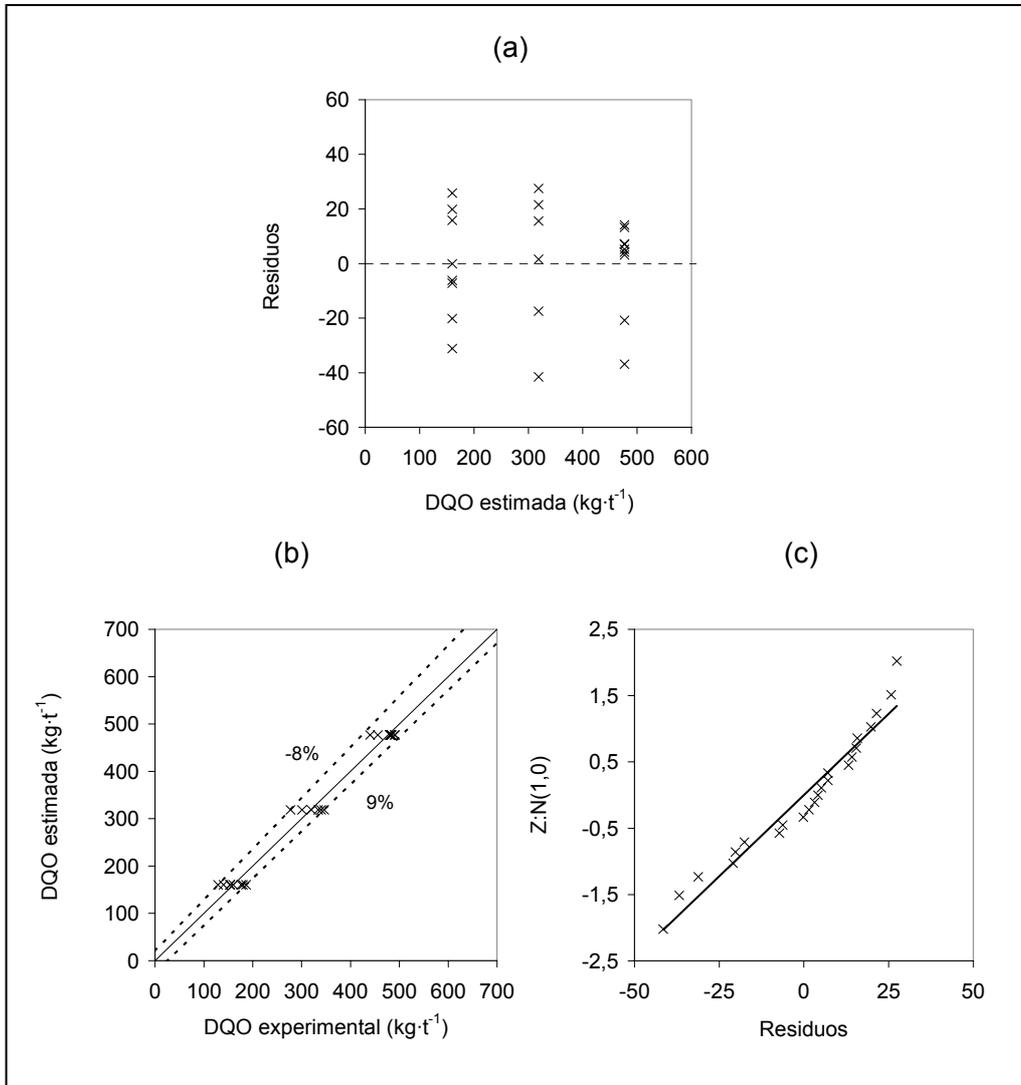


Fig. 9-2. Gráficos probabilísticos para el modelo DQO en la etapa L. Residuos frente a DQO estimada (a), DQO estimada frente a DQO experimental (b), residuos frente al valor de Z de la Ley Normal (c).

9.3.1.2 Análisis estadístico del color en la etapa L

a) Color. Estudio del diseño factorial 2⁴

Se estudia el diseño factorial 2⁴ a partir de las experiencias L 1a L 8, L 12 a L 14 y L A a L E (Tabla 9-11). Se realiza el gráfico probabilístico del modelo saturado (Ec. 9-5, Fig. 9-3 y Tabla 9-12).

Tabla 9-11. Color después de aplicar la etapa L.

X₁	X₂	X₃	X₄	Ref.	Color
-1	-1	-1	-1	L 1	1
1	-1	-1	-1	L A	1
-1	1	-1	-1	L B	7
1	1	-1	-1	L 4	27
-1	-1	1	-1	L C	0
1	-1	1	-1	L 6	1
-1	1	1	-1	L 7	10
1	1	1	-1	L D	74
-1	-1	-1	1	L E	1
1	-1	-1	1	L 2	1
-1	1	-1	1	L 3	5
1	1	-1	1	L 12	28
-1	-1	1	1	L 5	2
1	-1	1	1	L 14	2
-1	1	1	1	L 13	14
1	1	1	1	L 8	79

Tabla 9-12. Coeficientes estimados del modelo saturado de color en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes	Sz
b ₁₂₃₄	0,06	0,04
b ₁₄	0,19	0,13
b ₁₃₄	0,19	0,21
b ₂₄	0,31	0,30
b ₁₂₄	0,31	0,39
b ₂₃₄	0,44	0,48
b ₄	0,69	0,57
b ₃₄	0,81	0,67
b ₁₂₃	5,3	0,78
b ₁₃	5,4	0,90
b ₂₃	6,8	1,04
b ₃	6,9	1,19
b ₁₂	10,7	1,38
b ₁	10,8	1,64
b ₂	14,7	2,13
b ₀	15,8	0,04

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{color-L}} = & b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 \\
 & + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{234}X_2X_3X_4 + \\
 & b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{1234}X_1X_2X_3X_4
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 9-5}$$

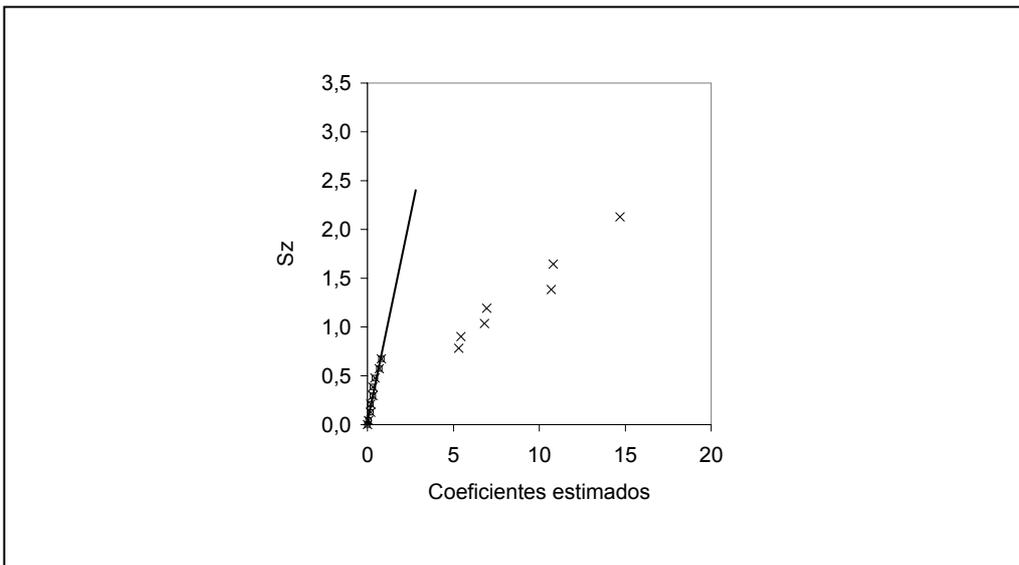


Fig. 9-3. Gráfico seminormal del modelo saturado de color.

A partir del análisis gráfico de este modelo saturado se eliminan los coeficientes considerados no significativos. Los coeficientes significativos son aquellos que se sitúan a la derecha de la recta de significación y se alejan de ella (Fig. 9-3).

b) Color. Estudio del modelo obtenido con los coeficientes significativos

Se estudia el modelo con los coeficientes declarados significativos en el análisis gráfico anterior (Ec. 9-6) y se determinan los coeficientes y su significación. En la Tabla 9-13 se muestran los términos del modelo, se observa que todos ellos son significativos (Probabilidad < 0,05).

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{color-L}} = & b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + \\
 & b_{123}X_1X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 9-6}$$

Tabla 9-13. Coeficiente del modelo (Ec. 9-6) estimado para el color en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	15,8	0,45	35,4	0,00
b ₁	10,8	0,45	24,2	0,00
b ₂	14,7	0,45	32,9	0,00
b ₃	6,9	0,45	15,5	0,00
b ₁₂	10,7	0,45	23,9	0,00
b ₁₃	5,4	0,45	12,2	0,00
b ₂₃	6,8	0,45	15,3	0,00
b ₁₂₃	5,3	0,45	11,9	0,00

c) Color. Estudio de la variancia

Para poder continuar con el estudio de las posibles curvaturas del modelo, se debe verificar si la variancia es constante en el campo experimental estudiado. A partir de la comparación del cuadrado medio residual (CMR) y la variancia de los tres puntos centrales (S_c^2) se realiza la prueba de homocedasticidad, obteniendo que p value > 0,05, con lo que el modelo es homocedástico, es decir, la variancia es constante (Tabla 9-14).

Tabla 9-14. Análisis de variancia del modelo para el color en la etapa L.

n	16	SCR	0,26
p	8	CMR	3,19
r	3	S_c^2	1,00
v _R	8	F _{calc}	0,31
v _c	2	p value	0,52

d) Color. ¿Influyen los términos cuadráticos?

Para realizar el estudio de las posibles curvaturas, en el modelo obtenido en el estudio del diseño factorial 2⁴ anterior se incluyen los 8 coeficientes ya declarados significativos y el coeficiente representante de los términos cuadráticos, de modo que se obtiene el modelo de la Ec. 9-7. Se incluyen en la matriz de diseño las experiencias centrales L 9, L 10 y L 11 (Tabla 9-15), diseño 2⁴ con tres respuestas centrales, y se analizan las posibles curvaturas. Según el análisis estadístico (Tabla 9-16) el término representativo cuadrático tiene un coeficiente de -3,2 y resulta significativo (Probabilidad = 0,01). A partir de las experiencias centrales no se puede determinar qué factor influye de forma cuadrática en la respuesta, por lo que se deben añadir experiencias adicionales en el estudio estadístico.

Tabla 9-15. Color de las experiencias centrales después de aplicar la etapa L.

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Ref.	Color
0	0	0	0	L 9	20
0	0	0	0	L 10	19
0	0	0	0	L 11	18

$$Y_{\text{color-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{11}X_1X_1$$

Ec. 9-7

Tabla 9-16. Coeficientes del modelo (Ec. 9-7) estimado para el color en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	19,0	0,96	19,8	0,00
b ₁	10,8	0,41	26,1	0,00
b ₂	14,7	0,41	35,4	0,00
b ₃	6,9	0,41	16,7	0,00
b ₁₂	10,7	0,41	25,8	0,00
b ₁₃	5,4	0,41	13,1	0,00
b ₂₃	6,8	0,41	16,4	0,00
b ₁₂₃	5,3	0,41	12,8	0,00
b ₁₁	-3,2	1,04	-3,1	0,01

e) Color. ¿Qué factores tienen un efecto cuadrático?

Para determinar cual de los factores tiene un efecto cuadrático en la respuesta se añaden las experiencias L16, L17, L18, LF, LH y LI para desconfundir los términos cuadráticos (Tabla 9-17). Se analiza el modelo Ec. 9-8 que se calcula a partir del diseño factorial 2⁴ con tres experiencias centrales y seis correspondientes a la estrella.

$$Y_{\text{color-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{11}X_1X_1 + b_{22}X_2X_2 + b_{33}X_3X_3$$

Ec. 9-8

Tabla 9-17. Color de las experiencias de la estrella después de aplicar la etapa L.

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Ref.	Color
0	-1	0	0	L 16	3
0	0	-1	0	L 17	11
0	0	0	1	L 18	23
0	0	0	0	L F	28
0	0	1	0	L H	30
0	0	0	-1	L I	24

f) Color. Obtención del modelo definitivo

El modelo definitivo se ha obtenido a partir de 25 respuestas y corresponde a la ecuación Ec. 9-9 con un índice de determinación (R²) de 0,99 y una probabilidad asociada a F_{calc} es de 277. Se presentan en la Tabla 9-18 los coeficientes del modelo y su significación.

$$Y_{\text{color-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{11}X_1X_1 \quad \text{Ec. 9-9}$$

Tabla 9-18. Coeficientes del modelo (Ec. 9-9) con 25 respuestas de color en la etapa L.

Coeficientes modelo	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	20,4	0,76	26,8	0,00
b ₁	10,9	0,52	20,9	0,00
b ₂	14,8	0,52	28,5	0,00
b ₃	7,2	0,50	14,3	0,00
b ₁₂	10,7	0,54	20,0	0,00
b ₁₃	5,4	0,54	10,2	0,00
b ₂₃	6,8	0,54	12,7	0,00
b ₁₂₃	5,3	0,54	9,9	0,00
b ₁₁	-4,5	0,92	-4,9	0,00

g) Color. Verificación del modelo definitivo

En la Tabla 9-19 se presenta el color estimado y los residuos obtenidos en el modelo. En la Fig. 9-4 se muestran los gráficos de verificación del modelo. La distribución de los residuos en función de las respuestas estimadas no sigue ningún tipo de tendencia, ver Fig. 9-4 (a). En la Fig. 9-4 (b) se observa que las respuestas de color pronosticadas por el modelo y las respuestas experimentales se sitúan en torno a una recta, las diferencias entre ambas respuestas se encuentran entre -3 y 4 kgPtCo·t⁻¹.

En el Gráfico Probabilístico Normal los valores de $Z:N(0,1)$ en función de los residuos se ajustan a una recta (Fig. 9-4 c). Teniendo en cuenta estos resultados, el modelo se considera estadísticamente correcto.

Tabla 9-19. Color estimado, residuos y valor de Z de la ley Normal para cada una de las experiencias del modelo de color en la etapa L.

Ref.	Color estimado	Residuos	Z:N(0,1)
LD	1	-3	-2,05
L 16	1	-3	-1,55
L 7	6	-2	-1,28
L 11	28	-2	-1,08
L 17	1	-2	-0,92
L 10	2	-1	-0,77
LC	12	-1	-0,64
L 3	77	-1	-0,52
L 6	1	-1	-0,41
L 4	1	-1	-0,31
L 9	6	0	-0,20
L 14	28	0	-0,10
LA	1	0	0,00
L 2	2	0	0,10
L 1	12	0	0,20
LE	77	0	0,31
L 12	20	0	0,41
L 5	20	1	0,52
LB	20	1	0,64
LF	6	1	0,77
L 13	13	2	0,92
L 8	20	2	1,08
LH	27	2	1,28
L 18	28	3	1,55
LI	20	4	2,05
LD	1	-3	-2,05

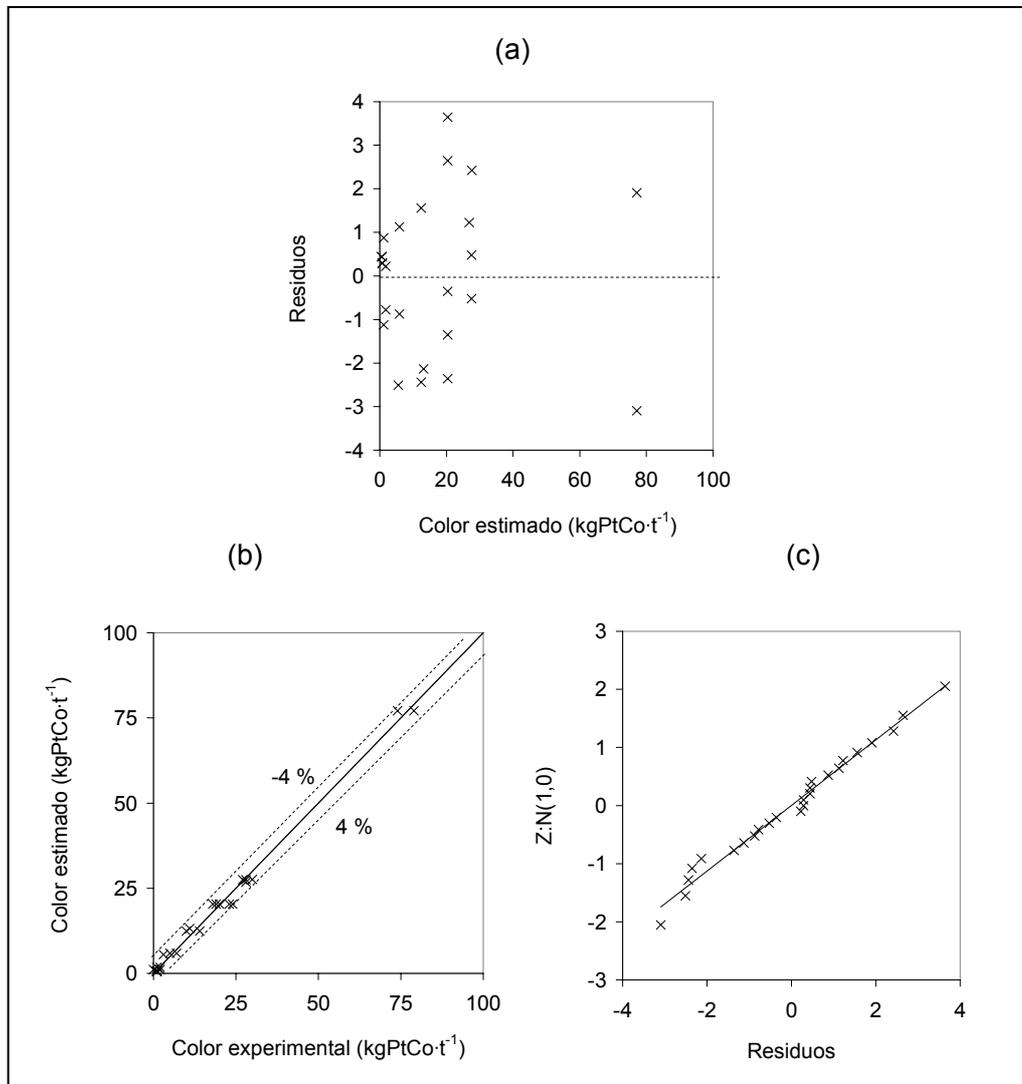


Fig. 9-4. Gráficos probabilísticos para el modelo de color en la etapa L. Residuos frente a color estimado (a), color estimado frente a color experimental (b), residuos frente al valor de Z de la Ley Normal (c).

9.3.1.3 Análisis estadístico de la actividad enzimática residual

a) Actividad enzimática residual. Estudio del diseño factorial 2⁴

Se estudia el diseño factorial 2⁴ a partir de las experiencias L 1a L 8, L 12 a L 14 y L A a L E (Tabla 9-20). Se realiza el gráfico probabilístico del modelo saturado (Ec. 9-10, Tabla 9-21 y Fig. 9-5).

Tabla 9-20. Actividad enzimática residual después de aplicar la etapa L.

x_1	x_2	x_3	x_4	Ref.	Actividad
-1	-1	-1	-1	L 1	0
1	-1	-1	-1	L A	12,3
-1	1	-1	-1	L B	0
1	1	-1	-1	L 4	6,4
-1	-1	1	-1	L C	0
1	-1	1	-1	L 6	12,4
-1	1	1	-1	L 7	0
1	1	1	-1	L D	2,5
-1	-1	-1	1	L E	0
1	-1	-1	1	L 2	11,8
-1	1	-1	1	L 3	0
1	1	-1	1	L 12	4,9
-1	-1	1	1	L 5	0
1	-1	1	1	L 14	13,2
-1	1	1	1	L 13	0
1	1	1	1	L 8	2,2

Tabla 9-21. Coeficientes estimados del modelo saturado de actividad enzimática residual en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes	Sz
b_{234}	0,0	0,00
b_{1234}	0,0	0,04
b_4	0,0	0,13
b_{14}	0,1	0,21
b_{24}	0,1	0,30
b_{124}	0,1	0,39
b_{34}	0,1	0,48
b_{134}	0,2	0,57
b_3	0,2	0,67
b_{13}	0,3	0,78
b_{23}	0,3	0,90
b_{123}	0,5	1,04
b_2	0,5	1,19
b_{12}	2,1	1,38
b_1	2,1	1,64
b_0	4,1	2,13

$$Y_{\text{actividad residual-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{234}X_2X_3X_4 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{1234}X_1X_2X_3X_4$$

Ec. 9-10

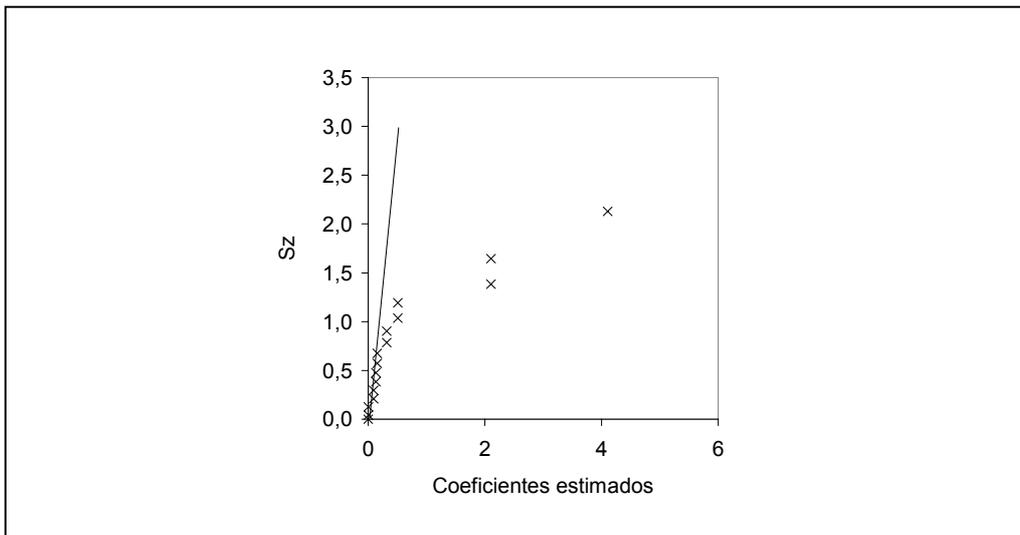


Fig. 9-5. Gráfico seminormal del modelo saturado de actividad enzimática residual.

A partir del análisis gráfico de este modelo saturado se eliminan los coeficientes considerados no significativos. Los coeficientes significativos son aquellos que se sitúan a la derecha de la recta de significación y se alejan de ella (Fig. 9-5).

b) Actividad enzimática residual. Estudio del modelo obtenido con los coeficientes significativos

Se estudia el modelo con los coeficientes declarados significativos en el análisis gráfico anterior (Ec. 9-11) y se determinan los coeficientes y su significación. En la Tabla 9-22 se muestran los términos del modelo y se observa que todos ellos son significativos (Probabilidad < 0,05).

$$Y_{\text{actividad residual-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad \text{Ec. 9-11}$$

Tabla 9-22. Coeficiente del modelo (Ec. 9-11) estimado para la actividad residual en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	4,1	0,1	36,6	3,4·10 ⁻¹⁰
b ₁	4,1	0,1	36,6	3,4·10 ⁻¹⁰
b ₂	-2,1	0,1	-18,8	6,8·10 ⁻⁸
b ₃	-0,3	0,1	-2,8	2,2·10 ⁻²
b ₁₂	-2,1	0,1	-18,8	6,8·10 ⁻⁸
b ₁₃	-0,3	0,1	-2,8	2,2·10 ⁻²
b ₂₃	-0,5	0,1	-4,5	2,0·10 ⁻³
b ₁₂₃	-0,5	0,1	-4,5	2,0·10 ⁻³

c) Actividad enzimática residual. Estudio de la variancia

Para poder continuar con el estudio de las posibles curvaturas del modelo, se debe verificar si la variancia es constante en el campo experimental estudiado. A partir de la comparación del cuadrado medio residual (CMR) y la variancia de los tres puntos centrales (S_c²) se realiza la prueba de homocedasticidad, obteniendo que p value > 0,05, con lo que el modelo es homocedástico, es decir, la variancia es constante (Tabla 9-23).

Tabla 9-23. Análisis de variancia del modelo para la actividad residual en la etapa L.

n	16	SCR	0,03
p	8	CMR	0,20
r	3	S _c ²	0,03
v _R	8	F _{calc}	0,15
v _C	2	p value	0,27

d) Actividad enzimática residual. ¿Influyen los términos cuadráticos?

Para realizar el estudio de las posibles curvaturas, en el modelo obtenido en el estudio del diseño factorial 2⁴ anterior se incluyen los 8 coeficientes ya declarados significativos y el coeficiente representante de los términos cuadráticos, de modo que se obtiene el modelo de la Ec. 9-12. Se incluyen en la matriz de diseño las experiencias centrales L 9, L 10 y L 11 (Tabla 9-24), diseño 2⁴ con tres respuestas centrales, y se analizan las posibles curvaturas. Según el análisis estadístico (Tabla

9-25) el término representativo cuadrático tiene un coeficiente de 1,8 y resulta significativo (Probabilidad = $3,6 \cdot 10^5$). A partir de las experiencias centrales no se puede determinar qué factor influye de forma cuadrática en la respuesta, por lo que se deben añadir experiencias adicionales en el estudio estadístico.

Tabla 9-24. Actividad residual de las experiencias centrales después de aplicar la etapa L.

x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Ref.	Actividad residual
0	0	0	0	L 9	2,4
0	0	0	0	L 10	2,1
0	0	0	0	L 11	2,4

$$Y_{\text{actividad residual-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{11}X_1X_1 \quad \text{Ec. 9-12}$$

Tabla 9-25. Coeficientes del modelo (Ec. 9-12) estimado para la actividad residual en la etapa L.

Coeficientes	Coeficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	2,30	0,24	9,73	0,00
b ₁	4,11	0,10	40,1	0,00
b ₂	-2,11	0,10	-20,6	0,00
b ₃	-0,32	0,10	-3,12	0,01
b ₁₂	-2,11	0,10	-20,6	0,00
b ₁₃	-0,32	0,10	-3,12	0,01
b ₂₃	-0,51	0,10	-4,95	0,00
b ₁₂₃	-0,51	0,10	-4,95	0,00
b ₁₁	1,81	0,26	7,01	0,00

e) Actividad enzimática residual. ¿Qué factores tienen un efecto cuadrático?

Para determinar cual de los factores tiene un efecto cuadrático en la respuesta se añaden las experiencias L16, L17, L18, LF, LH y LI para desconfundir los términos cuadráticos (Tabla 9-26). Se analiza el modelo Ec. 9-13 que se calcula a partir del diseño factorial 2⁴ con tres experiencias centrales y seis correspondientes a la estrella.

$$Y_{\text{actividad residual-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{11}X_1X_1 + b_{22}X_2X_2 + b_{33}X_3X_3 \quad \text{Ec. 9-13}$$

Tabla 9-26. Actividad residual de las experiencias L16 a L18 y LF a LI después de aplicar la etapa L.

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Ref.	Actividad residual
0	-1	0	0	L 16	7,4
0	0	-1	0	L 17	4,3
0	0	0	1	L 18	2,6
0	0	0	0	LF	4,9
0	0	1	0	LH	1,7
0	0	0	-1	LI	2,6

f) Actividad enzimática residual. Obtención del modelo definitivo

El modelo definitivo se ha obtenido a partir de 25 respuestas y corresponde a la ecuación Ec. 9-14 con un índice de determinación (R^2) de 0,98 y una probabilidad asociada a F_{calc} de 140. Se presentan en la Tabla 9-27 los coeficientes del modelo y su significación. El coeficiente cuadrático obtenido en el modelo definitivo es de 1,7 similar al coeficiente del término cuadrático representativo calculado anteriormente (apartado d).

$$Y_{\text{actividad residual-L}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{22}X_2X_2 \quad \text{Ec. 9-14}$$

Tabla 9-27. Coeficientes del modelo (Ec. 9-14) con 25 respuestas de actividad residual en la etapa L.

Coefficientes modelo	Coefficientes estimados	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
b ₀	2,4	0,24	10,1	7,7·10 ⁻⁹
b ₁	4,0	0,17	24,4	3,0·10 ⁻¹⁵
b ₂	-2,2	0,16	-13,7	5,7·10 ⁻¹¹
b ₃	-0,4	0,16	-2,7	1,6·10E ⁻²
b ₁₂	-2,1	0,17	-12,4	2,9·10 ⁻¹⁰
b ₂₃	-0,5	0,17	-3,0	8,0·10 ⁻³
b ₁₂₃	-0,6	0,17	-3,4	2,9·10 ⁻³
b ₂₂	1,7	0,29	5,9	1,4·10 ⁻⁵

g) Actividad enzimática residual. Verificación del modelo definitivo

En la Tabla 9-28 se presenta la actividad enzimática residual estimada y los residuos obtenidos en el modelo. En la Fig. 9-6 se muestran los gráficos de verificación del modelo. La distribución de los residuos en función de las respuestas estimadas no

sigue ningún tipo de tendencia, ver Fig. 9-6 (a). En la Fig. 9-6 (b) se observa que las respuestas de color pronosticadas por el modelo y las respuestas experimentales se sitúan en torno a una recta, las diferencias entre ambas respuestas se encuentran entre $-1,0$ y $1,4 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. En el Gráfico Probabilístico Normal los valores de $Z:N(0,1)$ en función de los residuos se ajustan a una recta (Fig. 9-6 c). Teniendo en cuenta estos resultados, el modelo se considera estadísticamente correcto.

Tabla 9-28. Actividad residual estimada, residuos y valor de Z de la ley Normal para cada una de los experiencias del modelo de actividad residual en la etapa L.

Ref.	Actividad residual estimada	Residuos	Z:N(0,1)
L F	5,9	-1,0	-2,07
L 6	13,1	-0,7	-1,57
L 1	0,7	-0,7	-1,30
L E	0,7	-0,7	-1,10
L 12	5,4	-0,5	-0,94
L B	0,4	-0,4	-0,80
L 3	0,4	-0,4	-0,67
L G	2,0	-0,4	-0,56
L 10	2,4	-0,3	-0,45
L H	2,0	-0,3	-0,34
L 8	2,4	-0,2	-0,24
L 2	11,8	0,0	-0,15
L 9	2,4	0,0	-0,05
L 11	2,4	0,0	0,05
L 14	13,1	0,1	0,15
L D	2,4	0,1	0,24
L 18	2,4	0,2	0,34
L I	2,4	0,2	0,45
L C	-0,3	0,3	0,56
L 5	-0,3	0,3	0,67
L 7	-0,3	0,3	0,80
L 13	-0,3	0,3	0,94
L A	11,8	0,5	1,10
L 4	5,4	1,0	1,30
L 16	6,3	1,1	1,57
L 17	2,9	1,4	2,07

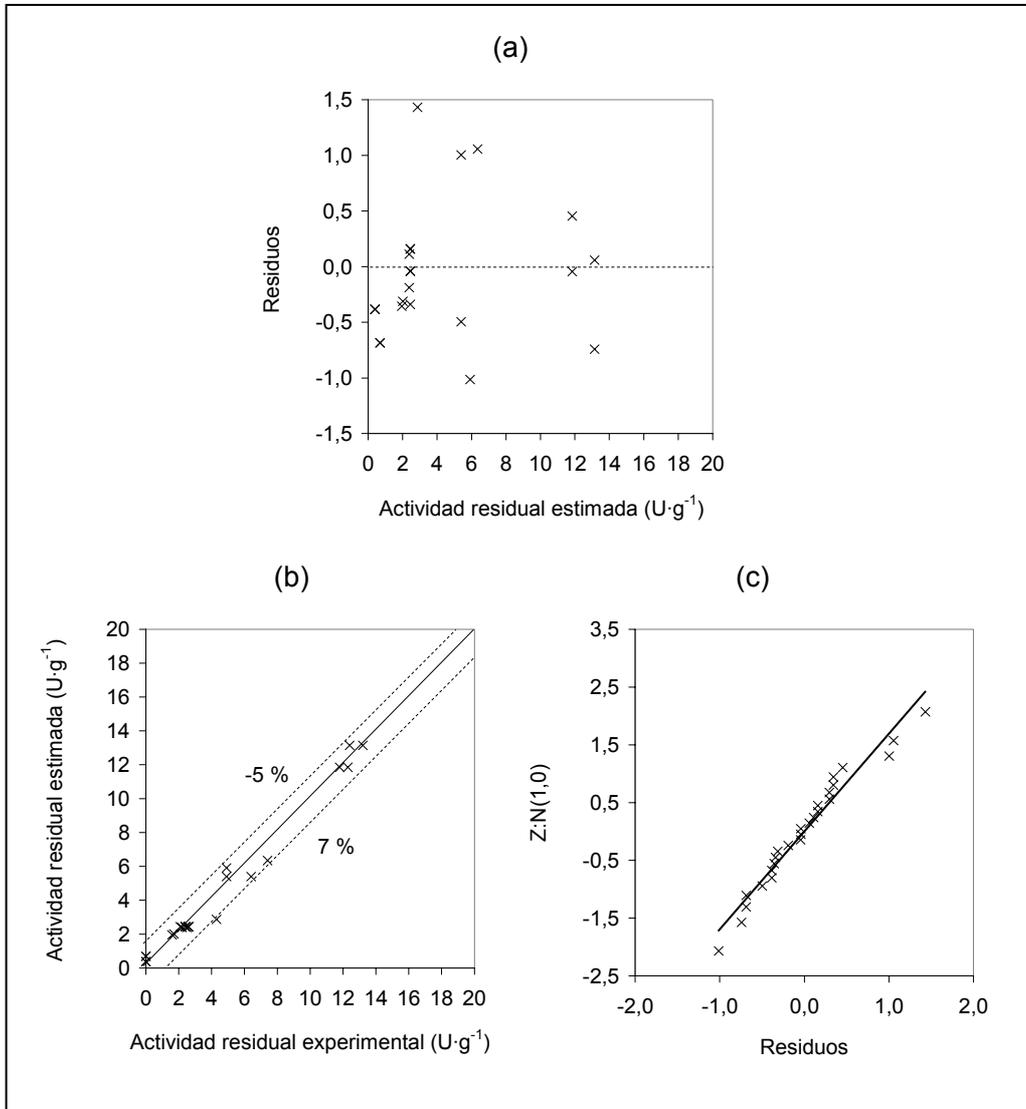


Fig. 9-6. Gráficos probabilísticos para el modelo de actividad residual en la etapa L. Residuos frente a actividad residual estimada (a), actividad residual estimada frente a actividad residual experimental (b), residuos frente al valor de Z de la Ley Normal (c).

9.3.2 EXPERIENCIA CONTROL

En la Tabla 9-29 se describen las propiedades de los efluentes de la experiencia control después de la etapa L. En la experiencia control no se adiciona enzima ni mediador, se realiza a 6,5 h de tiempo de tratamiento y 0,6 MPa de presión de oxígeno, condiciones máximas de tiempo y presión en el plan estadístico. A partir de la experiencia control se pretende determinar el efecto de la temperatura y la presión

de oxígeno cuando se realiza sin la presencia de enzima ni mediador. También se analizan las propiedades de las soluciones de reactivos (enzima lacasa y mediador HBT) a las concentraciones en las que se encuentran estos en la etapa L cuando su dosis es de 20 U·g⁻¹ y 2 %odp a la consistencia del 3 %odp. De esta forma se pretende analizar la contribución individual de cada uno de estos reactivos en las propiedades de los efluentes del bioblanqueo.

Tabla 9-29. Propiedades de los efluentes del control después de la etapa L. Propiedades de la lacasa y el HBT individualmente.

Ref.	DQO (kg·t ⁻¹)	Color (kgPtCo·t ⁻¹)	Toxicidad (equitox·m ⁻³)
control	155	No significativo	No detectable
HBT a 2 %odp	14	No significativo	3
lacasa a 20 U·g ⁻¹	352	No significativo	No detectable

9.3.3 MODELOS MATEMÁTICOS DE DQO Y COLOR DE EFLUENTES EN LA ETAPA L

9.3.3.1 Modelo de DQO en la etapa L

El modelo que relaciona la DQO de los efluentes en la etapa L y las variables de proceso corresponde a la ecuación Ec. 9-15 y predice valores de DQO entre 160 y 477 kg·t⁻¹.

$$Y_{DQO-L} = 318 + 158X_1 \quad \text{Ec. 9-15}$$

Donde $X_1 = (L - 10,5) / 9,5$, L=dosis de lacasa (U·g⁻¹)

Según el modelo, la única variable que influye en la DQO es X_1 dosis lacasa de manera lineal. Las demás variables, X_2 dosis mediador, X_3 tiempo y X_4 presión de oxígeno en el reactor, no tienen ningún tipo de influencia en la respuesta de DQO.

La DQO aumenta al aumentar la dosis de lacasa (Fig. 9-7). Si se realiza la suma de DQO que aporta cada uno de los reactivos por separado cuando se usa en su dosis máxima y el control (Tabla 9-29) la DQO resultante es de 521 kg·t⁻¹. Este valor es del mismo orden que el de las experiencias realizadas con el sistema lacasa mediador a las dosis máximas de reactivos, por lo que se deduce que la alta DQO que presentan los efluentes se debe a la DQO que presenta la preparación de enzima comercial utilizada, en concreto a los aditivos que se utilizan para mantener la actividad enzimática. Se propone el estudio de formulaciones de enzima con menor DQO, ya

que esta alta DQO puede ser un problema en la aplicación industrial del sistema lacasa mediador.

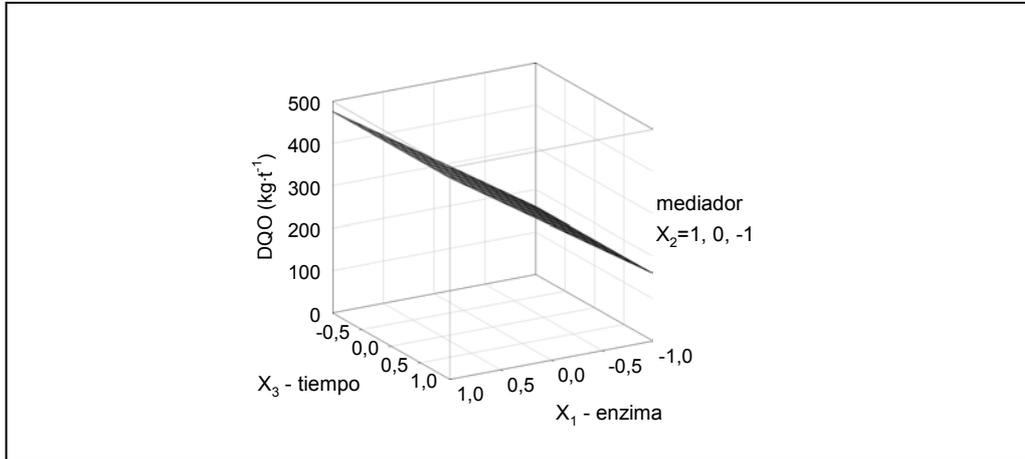


Fig. 9-7. DQO en función de los factores del plan estadístico en la etapa L.

9.3.3.2 Modelo de color en la etapa L

Las respuestas de color en los efluentes después de aplicar la etapa L se encuentran entre 1 y 77 kg·t⁻¹. El modelo que relaciona el color de los efluentes después de aplicar la etapa L y las variables de proceso corresponde a la ecuación Ec. 9-16 y predice valores de color entre 4 y 81 kg·t⁻¹.

$$Y_{\text{color-L}} = 20,4 + 10,9X_1 + 14,8X_2 + 7,2X_3 + 10,7X_1X_2 + 5,4X_1X_3 + 6,8X_2X_3 + 5,3X_1X_2X_3 - 4,5X_1^2 \quad \text{Ec. 9-16}$$

Donde $X_1 = (L - 10,5) / 9,5$, $L = \text{dosis de lacasa (U·g}^{-1})$; $X_2 = (M - 1,05) / 0,95$, $M = \text{dosis de HBT (\%odp)}$; $X_3 = (t - 3,5) / 3$, $t = \text{tiempo de reacción (h)}$.

Análisis del modelo matemático de color

Según el modelo, las variables que influyen en el color son X_1 dosis lacasa, X_2 dosis mediador y X_3 tiempo. La presión de oxígeno en el reactor, X_4 , no tiene ningún tipo de influencia. La variable que tiene una mayor influencia en el margen estudiado es X_2 , dosis de HBT con un coeficiente de $X_2 = 14,8$. Todas las interacciones dobles entre las variables dosis de lacasa, mediador y tiempo tienen influencia en el color. En el modelo el factor dosis de lacasa, X_1^2 , tiene influencia cuadrática en la respuesta. Las interacciones dobles tienden a aumentar el color cuando los factores implicados se

encuentran a niveles bajos o altos, mientras que los términos cuadráticos tienden a disminuirlo.

Análisis gráfico del modelo de color

En la Fig. 9-8 se pueden observar las superficies de respuesta del modelo de color en función de las variables del proceso. El color mínimo obtenido en el plan es $4 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$ y corresponde a las variables $X_1=-1$, $X_2=-1$ y $X_3=-1$, o sea, dosis de lacasa de $0,5 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, dosis de HBT de $0,1 \text{ \%odp}$ y un tiempo de $0,5 \text{ h}$. Se observa que este valor de color mínimo se obtiene a la dosis de lacasa, HBT y tiempo mínimos estudiados en el plan. El color máximo obtenido en el plan es de $81 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$ y corresponde a las variables $X_1=1$, $X_2=1$ y $X_3=1$, o sea, dosis de lacasa de $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, dosis de HBT de 2 \%odp y un tiempo de $6,5 \text{ h}$. Se observa que este valor de color máximo se obtiene a la dosis de lacasa, HBT y tiempo máximos estudiados en el plan.

En general, un aumento en los factores individuales provoca un aumento del color. En cuanto a la dosis de lacasa, el modelo predice una dosis límite a partir de la cual un aumento de ésta no supone un aumento adicional del color (Fig. 9-8 a y b).

Cuando las dosis de reactivos (dosis de lacasa o mediador) están en su nivel bajo, aunque las demás variables se encuentren en su nivel alto, el color de los efluentes es muy bajo, menor a $16 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$ (Fig. 9-8 a y c). Por lo que el color de los efluentes del tratamiento no se debe al color inicial de los reactivos del tratamiento sino que se desarrolla durante el tratamiento con el sistema lacasa mediador, se disuelven o se forman compuestos en la fase líquida que presentan color. En cambio, cuando ambas dosis son altas ($X_1=1$, $X_2=1$) ya se observa formación de color cuando el tiempo está en el nivel bajo ($X_3=-1$), en la primera media hora el color es de $31 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$. Se observa que para cada una de las dosis de HBT (Fig. 9-8 a) y de lacasa (Fig. 9-8 c) las líneas de tiempo no son paralelas. El aumento en las dosis de reactivos influye tanto en el color que se produce en los primeros 30 min de tratamiento, como en el color a un tiempo de $6,5 \text{ h}$. Además, este efecto debido al aumento de dosis es superior a medida que aumenta el tiempo.

El color que se forma en el sistema lacasa mediador podría deberse a que aumenta el contenido en lignina degradada en los efluentes, pero también, a que cambia el tipo de lignina disuelta o a la formación de otros productos de degradación, tanto del mediador HBT como de la enzima durante el tratamiento. El HBT se convierte parcialmente a BT (benzotriazol) en el sistema lacasa mediador (Bourbonnais et al. 1997; Potthast et al. 2001; Sealey and Ragauskas 1998), por lo que este compuesto podría ser el responsable del aumento de color rojo en los efluentes a tiempos largos de tratamiento.

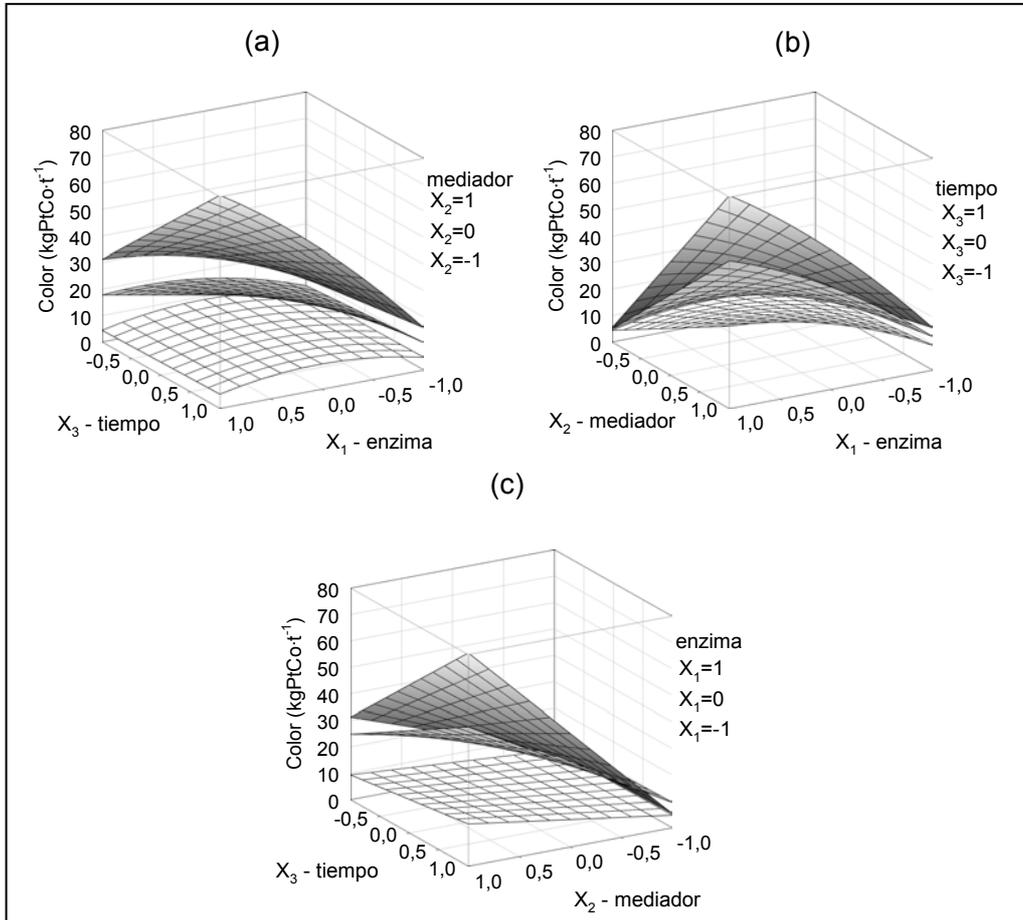


Fig. 9-8. Color en función de los factores del plan estadístico en la etapa L.

9.3.3.3 Modelo de actividad enzimática residual en la etapa L

Análisis de las respuestas de actividad enzimática residual

En la Tabla 9-30 se presentan las respuestas de actividad residual de las experiencias medidas después de la etapa L y sus respectivas condiciones del tratamiento con el sistema lacasa mediador (L). La actividad enzimática residual respecto a la pasta y la pérdida de actividad se ha calculado a partir de las ecuaciones Ec. 9-17, Ec. 9-18 y Ec. 9-19. Las respuestas de las experiencias realizadas varían entre 0 y 18 U·g⁻¹.

$$\text{actividad residual (U}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\text{actividad residual (UL}^{-1})}{1000 \cdot \text{consistencia (\%)}} \quad \text{Ec. 9-17}$$

$$\text{pérdida de actividad (U}\cdot\text{g}^{-1}) = \text{dosis lacasa inicial} - \text{actividad residual} \quad \text{Ec. 9-18}$$

$$\text{pérdida de actividad relativa (\%)} = \frac{\text{pérdida de actividad}}{\text{dosis lacasa inicial}} \quad \text{Ec. 9-19}$$

Tabla 9-30. Actividad residual y pérdida de actividad después de aplicar la etapa L.

x_1	x_2	x_3	x_4	Ref.	Dosis lacasa inicial (U·g ⁻¹)	Actividad residual (U·g ⁻¹)	Pérdida de actividad (U·g ⁻¹)	Pérdida de actividad relativa (%)
1	-1	-1	1	L 2	10	11,8	8	41
1	1	-1	-1	L 4	20	8,1 ± 0,1	12	60
1	-1	1	-1	L 6	20	12,4 ± 0,8	8	38
1	1	1	1	L 8	20	2,2 ± 0,0	18	89
0	0	0	0	L 9	10	2,4 ± 0,1	8	76
0	0	0	0	L 10	10	2,1 ± 0,1	8	79
0	0	0	0	L 11	10	2,4 ± 0,1	8	76
1	1	-1	1	L 12	20	2,8 ± 0,0	17	86
-1	1	1	1	L 13	0,5	0,6	-	-
1	-1	1	1	L 14	20	13,2 ± 0,8	7	34
0	-1	0	0	L 16	10	7,4 ± 0,4	3	26
0	0	-1	0	L 17	10	4,3 ± 0,5	6	57
0	0	0	1	L 18	10	2,6 ± 0,0	7	74
1	-1	-1	-1	L A	20	12,3 ± 0,4	8	39
1	1	1	-1	L D	20	2,5 ± 0,1	18	88
-1	-1	-1	1	L E	0,5	0,9 ± 0,0	-	-
1	0	0	0	L F	20	4,9 ± 0,0	15	76
0	1	0	0	L G	10	1,6 ± 0,2	8	84
0	0	1	0	L H	10	1,7 ± 0,0	8	83
0	0	0	-1	L I	10	2,6 ± 0,0	7	74

Sólo se ha determinado la actividad residual de dos de las experiencias con la dosis inicial baja de lacasa de 0,5 U·g⁻¹ (L13 y LE), que ha resultado ser de 0,6 y 0,9 U·g⁻¹, respectivamente. Aunque se podría pensar que, en este caso, la actividad se mantiene o aumenta ligeramente después del tratamiento, estas diferencias son muy bajas y la actividad medida es del mismo orden que el límite de detección del método

utilizado en la medida de actividad enzimática. Por ello, para la realización del modelo matemático se asume que la actividad residual de las experiencias con dosis baja de enzima de $0,5 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ (L1, L13, L5, L7, LB, LC y LE) es de $0 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$.

Análisis del modelo matemático de actividad enzimática residual

El modelo que relaciona la actividad residual de la pasta después de aplicar la etapa L y las variables de proceso corresponde a la ecuación Ec. 9-20 y predice valores de actividad residual entre $13,1$ y $-1,9 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Aunque matemáticamente se obtienen valores negativos de actividad, se asume que estos valores corresponden a $0 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ de actividad enzimática residual.

$$Y_{\text{actividad residual-L}} = 2,4 + 4,0X_1 - 2,2X_2 - 0,4X_3 - 2,1X_1X_2 - 0,5X_2X_3 - 0,6X_1X_2X_3 + 1,7X_2^2 \quad \text{Ec. 9-20}$$

Donde $X_1=(L-10,5)/9,5$, L =dosis de lacasa ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$); $X_2=(M-1,05)/0,95$, M =dosis de HBT (%odp); $X_3=(t-3,5)/3$, t =tiempo de reacción (h).

Según el modelo, las variables que influyen en la actividad residual son X_1 dosis lacasa, X_2 dosis mediador y X_3 tiempo. La presión de oxígeno en el reactor, X_4 , no tiene ningún tipo de influencia. La variable que tiene una mayor influencia en el margen estudiado es X_1 , dosis de lacasa con un coeficiente de $X_1=4,0$. En el modelo el factor dosis de mediador, X_2^2 , tiene influencia cuadrática en la respuesta.

Análisis gráfico del modelo de actividad enzimática residual

En la Fig. 9-9 (a, b y c) se presentan las respuestas de actividad residual en función de las variables del plan. No se consideran las respuestas correspondientes a las dosis bajas de lacasa en el estudio de la actividad, ya que se aproximan al límite de detección del método de medida de actividad.

La actividad residual máxima es de $13 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ y corresponde a las variables $X_1=1$, $X_2=-1$, o sea, dosis de lacasa de $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, dosis de HBT de $0,1 \text{ %odp}$. La actividad residual mínima obtenida en el plan a las dosis de lacasa de $X_1=1$ y $X_1=0$, es de 2 y $1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Por lo que en el tratamiento lacasa mediador la enzima lacasa puede perder prácticamente toda su actividad, dependiendo de las dosis de reactivos. La actividad residual depende básicamente de la dosis de lacasa y de la dosis de mediador. La variable tiempo tiene poca influencia en la respuesta, la actividad residual disminuye al aumentar el tiempo de tratamiento, aunque este efecto sólo es significativo cuando la dosis de mediador es alta (Fig. 9-9 a). Al estudiar la pérdida de actividad, como diferencia entre la actividad inicial y la actividad residual (Fig. 9-9 d),

se observa que para una dosis de mediador determinada, la pérdida de actividad en valor absoluto es superior en las experiencias en las que la dosis de enzima es de $X_1=1$ o $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ que en las que la dosis es de $X_1=0$ o $10 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, aunque la actividad relativa es independiente de la dosis inicial de lacasa (Fig. 9-9 e y Tabla 9-31).

Tabla 9-31. Actividad residual prevista por el modelo según las variables de proceso.

X_1	X_2	X_3	Dosis lacasa ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	Dosis HBT (%odp)	Tiempo (h)	Actividad residual ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	Pérdida de actividad ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	Pérdida de actividad relativa (%)
1	-1	1	20	0,1	6,5	13	7	35
1	0	1	20	1	6,5	6	14	70
1	1	1	20	2	6,5	2	18	90
0	-1	1	10	0,1	6,5	6	4	40
0	0	1	10	1	6,5	2	8	80
0	1	1	10	2	6,5	1	9	90

A la dosis de HBT mínima de 0,1 %odp y un tiempo de 0,5 h, la actividad ya disminuye considerablemente. La actividad residual es de $13 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ cuando la dosis inicial es de $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ y de $6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ cuando es de $10 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. A una dosis fija de lacasa, un aumento en la dosis de mediador produce una disminución de la actividad residual. A la dosis máxima de HBT de 2 %odp la actividad residual está por debajo de $3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Esta disminución relacionada con el aumento de la dosis de mediador ya se produce de forma importante al aumentar la dosis de HBT de 0,1 a 1 %odp. A dosis más elevadas de mediador la actividad residual es bastante baja por lo que un aumento en la dosis no produce cambios tan importantes en la actividad residual (Tabla 9-31 y Fig. 9-9 a).

La actividad enzimática residual depende básicamente de la dosis de lacasa y de la dosis de mediador, la variable tiempo tiene poca influencia en la respuesta, de manera, que en los primeros 30 min es cuando se produce la pérdida de actividad en el sistema. La actividad residual relativa depende básicamente de la dosis de mediador. Aunque a dosis de mediador bajas ya se produce una pérdida de actividad del 40 %; a una dosis de mediador del 2 %odp la actividad residual disminuye hasta un 90 %. Los radicales de HBT formados durante el tratamiento inactivan a las lacasas por la oxidación de los aminoácidos aromáticos de la superficie proteica (Amann 1997). En la bibliografía se ha descrito que la presencia de pasta en el sistema lacasa mediador reduce la inactivación de enzima (Fillat et al. 2007;Ibarra et al. 2006;Li et al. 1999) debido a que los radicales formados reaccionan con la pasta ralentizando la inactivación. En este caso, se puede asociar la pérdida de actividad enzimática al aumentar la dosis de mediador a una mayor formación de radicales de oxidación al inicio del proceso que reaccionarían con la pasta pero que también aumentarían la inactivación de la enzima lacasa.

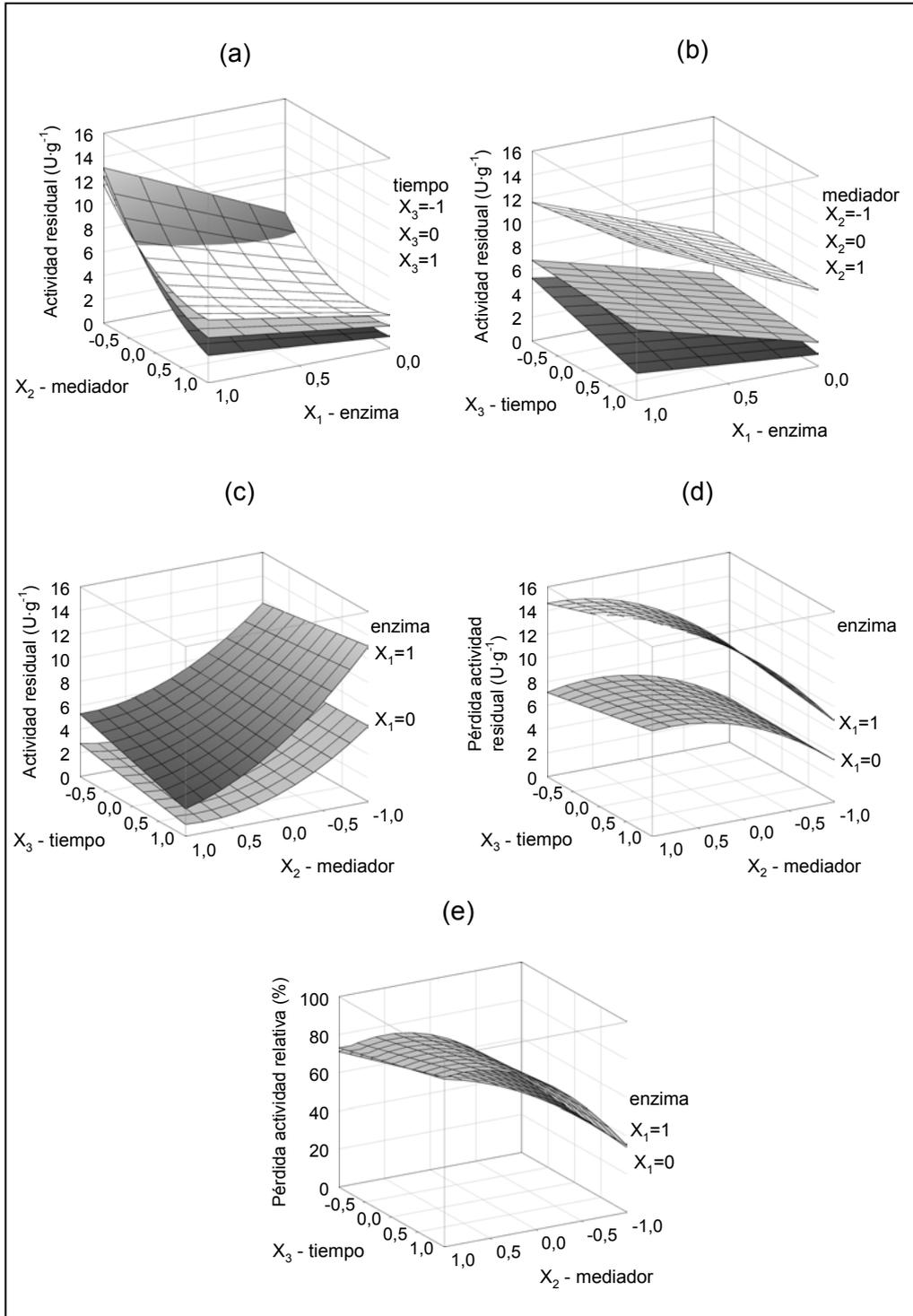


Fig. 9-9. Actividad residual en función de los factores del plan estadístico en la etapa L.

9.3.4 ANÁLISIS DE TOXICIDAD

Los resultados de toxicidad de los efluentes de la etapa L se muestran en la Tabla 9-32. Las respuestas de toxicidad varían entre no detectable y 11 equitox·m⁻³. Las experiencias L4 y LD realizadas a las dosis altas de enzima y mediador (20 U·g⁻¹ y 2 %odp) son las que presentan una mayor toxicidad.

Según la Ley de Aguas (Real Decreto Legislativo 1/2001), los límites cuantitativos y cualitativos que se imponen en la composición del efluente vertido corresponden a la administración hidráulica competente, salvo en los casos de vertidos efectuados en cualquier punto de la red de alcantarillado o de colectores gestionados por las administraciones autonómicas o locales, en los que la autorización corresponde al órgano autonómico o local competente. En Cataluña, el Decreto 130/2003 que aprueba el reglamento de los servicios públicos de saneamiento fija el límite de vertido de materias inhibidoras (MI) en 25 equitox·m⁻³.

Los valores de toxicidad obtenidos en este estudio se encuentran por debajo de este límite de toxicidad. Aunque los valores se encuentren por debajo de los límites que fija la administración, en la Fig. 9-10 se puede observar como la toxicidad varía en función de las condiciones del tratamiento.

La presencia de color y/o turbidez puede causar interferencias en la medida de toxicidad llevando a resultados erróneos, normalmente haciendo que las muestras sean más tóxicas de lo que realmente son. Por lo que, tal como describe el manual del Microtox, se ha corregido el valor de toxicidad a partir de medidas de absorbancia de las muestras. En las muestras más coloreadas, la corrección de color produce una disminución de la toxicidad respecto a las muestras sin corregir en torno a un 20 %.

El tratamiento control (tratamiento de la pasta con el tampón sin la presencia de enzima ni mediador) no presenta toxicidad, como tampoco la presenta el tratamiento L1, cuando las dosis de reactivos y el tiempo son bajos. Una solución de mediador HBT de concentración 620 mg·L⁻¹, que corresponde a la concentración en la que se encuentra el HBT en aquellos tratamientos que se realizan con una dosis de mediador del 2 %odp y a la consistencia de trabajo del 3 %odp, sin presencia de pasta, es de 3 equitox·m⁻³. Si se adiciona a esta solución una cantidad de lacasa, que corresponde a la que contiene el tratamiento realizado a la dosis de lacasa de 20 U·g⁻¹, y seguidamente se mide la actividad residual, se obtiene el mismo resultado anterior, por lo que se deduce que la enzima no presenta toxicidad (Tabla 9-32).

Durante los tratamientos con el sistema lacasa mediador en presencia de pasta, etapa L, la toxicidad de los efluentes es superior a la toxicidad inicial que presenta el mediador HBT. En la Fig. 9-10 se puede observar como al aumentar la dosis de

lacasa y/o la de mediador aumenta la toxicidad de los efluentes. Por lo que se deduce que la toxicidad de los efluentes de la etapa L no sólo se atribuye a la presencia del mediador HBT, sino que se forman subproductos de degradación o de mediador oxidado, como el benzotriazol, en el sistema lacasa mediador que presentan una mayor toxicidad que el mediador HBT en su forma inicial.

Tabla 9-32. Toxicidad del mediador HBT y de los efluentes de la etapa L.

	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Ref.	Toxicidad (UT - equitox·m ³)	Toxicidad (equitox·t ⁻¹)
Reactivos	-	1	-	-	HBT	3	1,1·10 ⁻⁴
	1	1	-	-	HBT + lacasa	3	1,1·10 ⁻⁴
Etapas L	-	-	-	-	control	No detectable	No detectable
	-1	-1	-1	-1	L 1	No detectable	No detectable
	-1	1	1	-1	L 7	6	1,7·10 ⁻⁴
	0	0	0	0	L 10	8	1,8·10 ⁻⁴
	0	0	1	0	L H	7	2,2·10 ⁻⁴
	1	0	0	0	L F	9	2,5·10 ⁻⁴
	0	1	0	0	L G	8	2,7·10 ⁻⁴
	1	1	1	-1	L D	12	3,1·10 ⁻⁴
	1	1	-1	-1	L 4	12	3,6·10 ⁻⁴

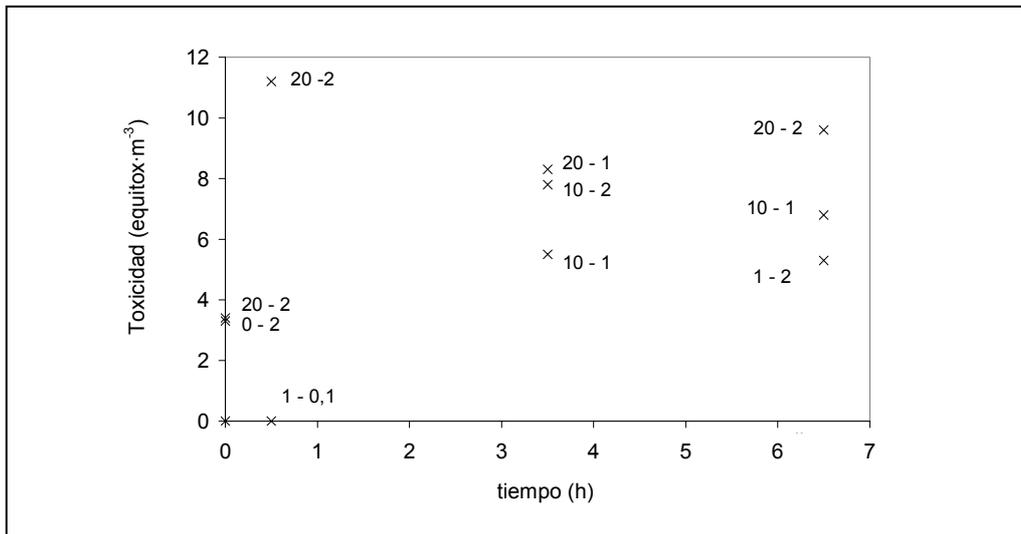


Fig. 9-10. Toxicidad etapa L, en función del tiempo de tratamiento para distintas dosis de lacasa y mediador. En la figura la primera referencia se refiere a dosis de lacasa en U·g⁻¹ y la segunda, a la dosis de HBT en %odp.

9.3.5 ESPECTRO UV/VIS DE ABSORBANCIA

En la Fig. 9-11 y Fig. 9-12 se muestran los espectros de los efluentes de la etapa de tratamiento enzimático con el sistema lacasa mediador a partir de diluciones de los efluentes de 1:20.

En la Fig. 9-11 se observa que el control, sin la presencia de enzima ni mediador, presenta señal de absorbancia a longitudes de onda por debajo de los 245 nm, seguramente debida al tampón tartrato sódico utilizado en el tratamiento. Una solución de mediador HBT de concentración $620 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que corresponde a la concentración en la que se encuentra el HBT en aquellos tratamientos que se realizan con una dosis de mediador del 2 %odp y a la consistencia de trabajo del 3 %odp, sin presencia de pasta, presenta una curva de absorbancia con un pico máximo a 305 nm y otro a 280 nm. Una solución de lacasa, que corresponde a la que contiene el tratamiento realizado a la dosis de lacasa de $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, no presenta señal de absorbancia significativa. Las distintas señales que aparecen entre 290 y 200 nm podrían corresponder tanto al mediador HBT, a lignina disuelta y a productos de degradación y de oxidación del HBT. Debido a que aparecen señales en el espectro que se solapan entre ellas y que corresponden a diferentes productos, en los efluentes del sistema lacasa mediador no se puede determinar la cantidad de lignina disuelta directamente a partir de medidas de absorbancia, tal como describe la norma Tappi 222 om-02.

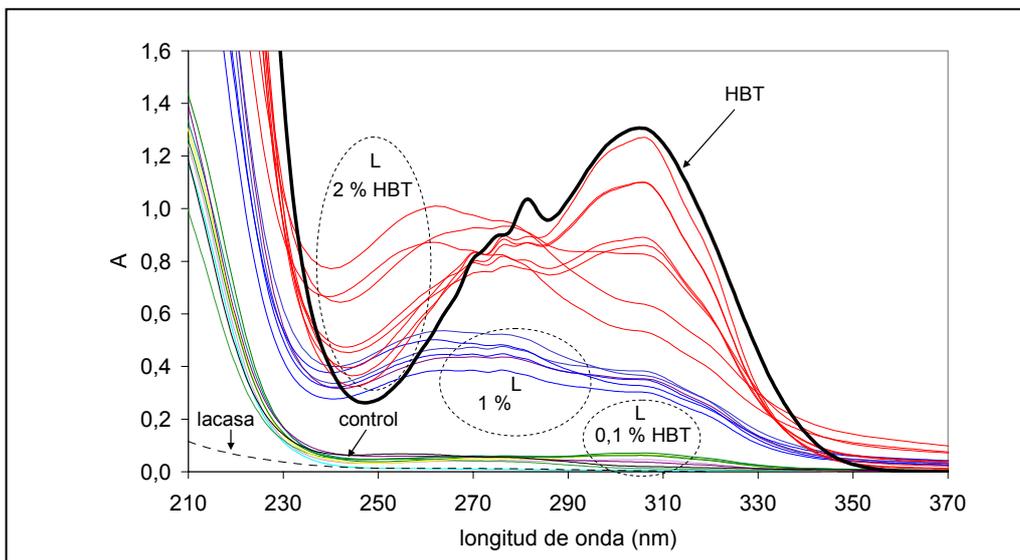


Fig. 9-11. Espectros de los efluentes de la etapa L.

En la Fig. 9-12 (a), se observa como la señal control presenta la misma curva espectral que los tratamientos realizados a dosis bajas de mediador (0,1 %odp), independientemente de la dosis de lacasa y el tiempo de tratamiento. En la Fig. 9-12

(b), se observa como cuando la dosis de mediador es del 1 %odp aparecen distintas señales de absorbancia que presentan tres picos. Los picos a 305 nm y a 280 nm se pueden asociar con la presencia del mediador, ya que una solución de HBT presenta estos mismos picos. Las señales que aparecen entre 240 y 300 nm se pueden relacionar a lignina disuelta y a productos de degradación del sistema, ya que se observa como la señal es menor en el tratamiento realizado a una menor dosis de lacasa y tiempo. En los tratamientos realizados a una dosis de HBT del 2 %odp (Fig. 9-12 c) se observa que las señales de absorbancia son superiores en todo el espectro a las obtenidas en las experiencias con menores dosis de HBT. Las señales de 305 y 280 nm siempre son menores que las que presenta la solución de mediador HBT. Se han relacionado estas dos señales de absorbancia con el mediador, de manera que se podría decir que en el tratamiento sistema lacasa mediador disminuye la concentración de HBT.

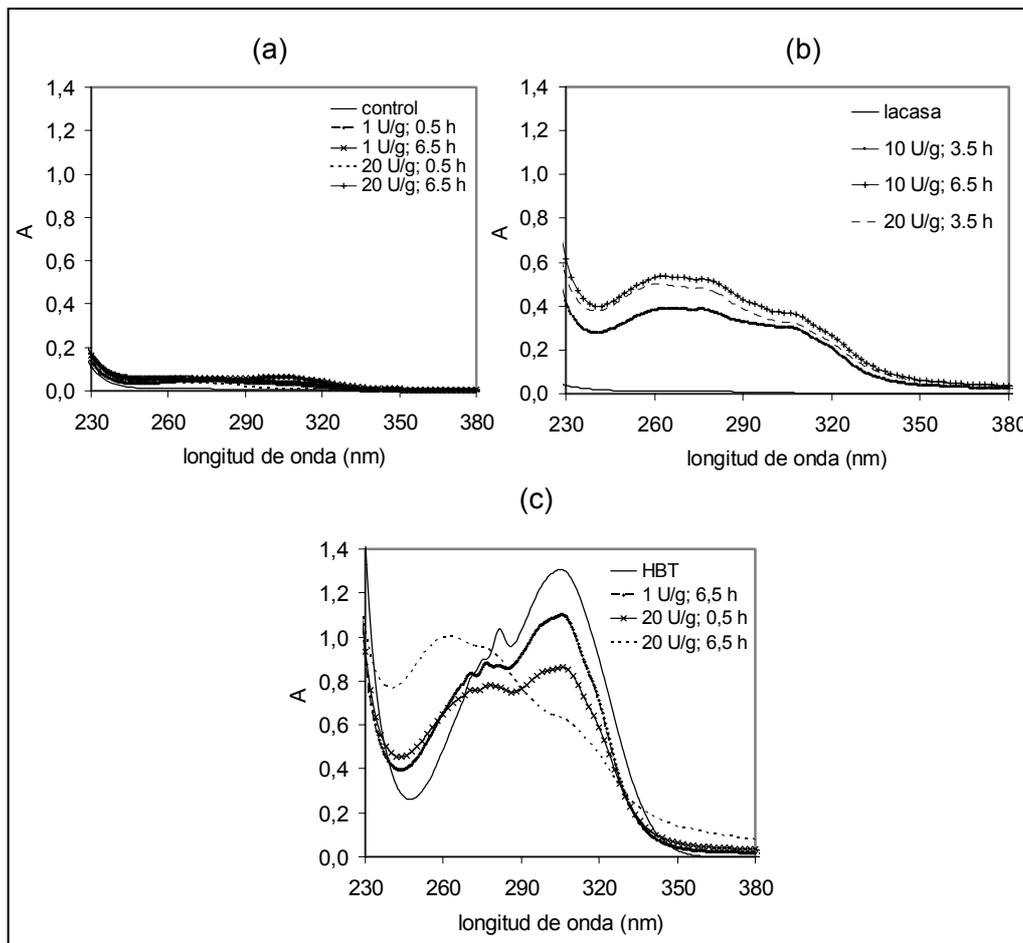


Fig. 9-12. Curvas espectrales de absorbancia. Dosis de HBT del 0,1 %odp (a), del 1 %odp (b) y del 2 %odp (c).

La señal a 305 nm es más elevada en el tratamiento a baja dosis de lacasa y tiempo. Para un mismo tiempo de tratamiento, si la dosis de lacasa es alta ($20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$), estas señales disminuyen, por lo que un aumento de dosis de lacasa produce una disminución de la concentración de HBT, debido posiblemente a una mayor oxidación del mediador por parte de la enzima. En cambio, las señales entre 240 y 290 nm son más elevadas en el tratamiento con dosis alta de enzima, estas señales podrían evidenciar una mayor concentración de lignina y productos de degradación en el sistema a dosis alta de enzima.

Cuando la dosis de lacasa es de $20 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, la señal a 305 nm es superior a tiempo corto, por lo que un aumento del tiempo de tratamiento supondría una disminución de la concentración de HBT en el sistema. Las señales entre 240 y 290 nm son más elevadas en el tratamiento a tiempo largo, por lo que un aumento del tiempo de tratamiento supone una mayor concentración de lignina y productos de degradación en el sistema.

9.3.6 PROPIEDADES DE LOS EFLUENTES EN LA ETAPA E

El efecto principal de la extracción alcalina en los procesos de blanqueo industrial es la disolución de la lignina, que tiene lugar por la ionización de los grupos ácidos formados en la lignina durante las etapas previas (Correia et al. 2004;García et al. 1984). El sistema lacasa mediador introduce grupos carbonilo y carboxilo en la estructura de la lignina. Esta lignina modificada se puede disolver en una etapa de extracción alcalina (etapa E) posterior (Call and Mücke 1997;Chakar and Ragauskas 2000a;Freudenreich et al. 1998;Poppius-Levlin et al. 1999).

9.3.6.1 DQO y color etapa E

Las respuestas de cada experiencia medidas después de la etapa E (DQO y color) y sus respectivas condiciones del tratamiento con el sistema lacasa mediador (L) se presentan en las tablas Tabla 9-33 y Tabla 9-34. Las respuestas de las experiencias realizadas varían entre 38 y $48 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$, 22 y $40 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$ de DQO y color, respectivamente.

La DQO no aumenta al aumentar los factores del nivel bajo a alto, aunque las experiencias LE 8 y LE D, en las que las dosis de reactivos y el tiempo son altos, presenta una DQO algo superior. La propiedad de color sigue una ligera tendencia a aumentar al incrementarse las variables de proceso. En ambos casos, las diferencias entre las respuestas no se consideran lo suficientemente importantes como para realizar el modelo matemático.

Tabla 9-33. Propiedades de los efluentes del control después de la etapa E.

Ref.	DQO (kg·t ⁻¹)	Color (kgPtCo·t ⁻¹)
Control E	38	22

Tabla 9-34. DQO y color después de aplicar la etapa E en la secuencia LE

dosis	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Ref.	DQO (kg·t ⁻¹)	Color (kgPtCo·t ⁻¹)
bajas	-1	-1	-1	-1	LE 1	38	28
	-1	-1	-1	1	LE E	39	13
medias	0	0	0	0	LE 9	40	32
	0	0	0	0	LE 10	38	30
medias y altas	1	0	0	0	LE F	38	31
	0	1	0	0	LE G	39	35
altas	1	1	1	-1	LE D	48	45
	1	1	1	1	LE 8	43	40

9.3.6.2 Espectros UV/VIS de la etapa E en la secuencia LE

En la Fig. 9-13 se muestran los espectros de los efluentes de la etapa de extracción alcalina, etapa E, a partir de diluciones de los efluentes de 1:10. Se observa que la curva espectral del control, sin enzima ni mediador, presenta la misma forma que el resto de curvas espectrales de los tratamientos con el sistema lacasa mediador, por lo que el aumento de las señales de absorbancia, en este caso, se podría relacionar directamente con el aumento de la lignina disuelta en el sistema. La absorbancia del tratamiento a dosis bajas y tiempo corto, no difiere significativamente del tratamiento control, por lo que en el tratamiento realizado en estas condiciones no aumenta la cantidad de lignina disuelta, el tratamiento es poco efectivo, tal como se ha comentado en el capítulo 6 en el estudio de las propiedades de las pastas en la secuencia LE. Las señales de absorbancia más elevadas se presentan en el tratamiento realizado a dosis altas de reactivos y tiempo largo. Para un mismo tiempo de tratamiento de 3,5 h, a medida que se disminuyen una o ambas dosis de reactivos disminuye la señal de absorbancia, o sea, la cantidad de lignina disuelta en los efluentes.

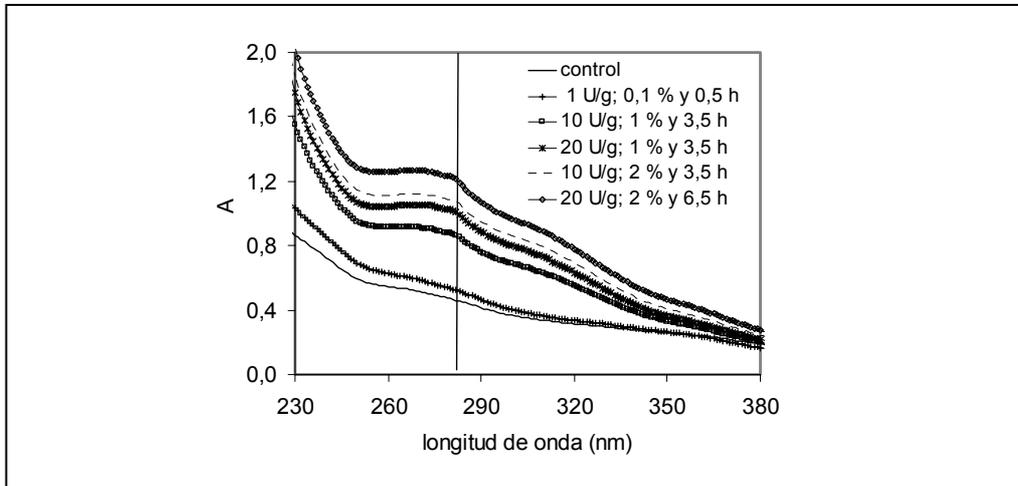


Fig. 9-13. Espectro UV/VIS de los efluentes de la etapa E a partir de diluciones 1:10.

9.3.7 PROPIEDADES ETAPA P

La etapa de peróxido de hidrógeno tiene un doble efecto sobre la pasta. Por un lado de disolución de la lignina, debido a que se realiza a pH alcalino, y que tiene lugar por la ionización de los grupos ácidos formados en la lignina durante las etapas previas (García et al. 1984). Por otro lado, el peróxido de hidrógeno es un agente oxidante de blanqueo y puede oxidar la lignina residual que queda en la pasta, y de este modo producir un aumento de blancura.

9.3.7.1 DQO y color etapa P

Las respuestas de cada experiencia medidas después de la etapa P (DQO y color) y sus respectivas condiciones del tratamiento con el sistema lacasa mediador (L) se presentan en la Tabla 9-35. Las respuestas de las experiencias realizadas varían entre $51 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$ y $70 \text{ kg}\cdot\text{t}^{-1}$ y 31 a $41 \text{ kgPtCo}\cdot\text{t}^{-1}$ de DQO y color, respectivamente. Se observa que no hay diferencias significativas de DQO entre los distintos tratamientos cuando la etapa L se realiza a dosis altas o bajas de reactivos.

La etapa P tiene un doble efecto sobre la pasta de disolución de lignina debido al pH alcalino del proceso, por la ionización de los grupos ácidos formados en la lignina durante las etapas previas (Dence and Reeve 1996) y por el proceso de oxidación del agente oxidante peróxido de hidrógeno. Estos dos efectos se pueden estudiar por separado al comparar la secuencia LE y la LP, ya que la etapa E, se realiza en las mismas condiciones que la etapa P pero sin la adición de peróxido de hidrógeno.

Tabla 9-35. DQO y color después de aplicar la etapa P en la secuencia LP.

dosis	x ₁	x ₂	x ₃	Ref.	DQO (kg·t ⁻¹)	Color (kgPtCo·t ⁻¹)
bajas	-1	-1	-1	LP 1	52	33
medias	0	0	0	LP 9	58	-
	0	0	0	LP 10	51	31
altas	1	1	1	LP D	70	41
	1	1	1	LP 8	56	-

En la etapa E los resultados de DQO son entre 13 y 22 kg·t⁻¹ menores a los obtenidos en la etapa P. Esto se puede deber a la presencia de otros reactivos usados en esta etapa, pero principalmente a una mayor cantidad de lignina disuelta en los efluentes de la etapa P. Los resultados de color en la etapa E, en cambio, son similares a los de la etapa P. Este hecho se relaciona con el efecto blanqueante del peróxido de hidrógeno, que es capaz de oxidar los grupos cromóforos de la lignina de la pasta, como también de la lignina disuelta en los efluentes.

9.4 CONCLUSIONES

Las respuestas de cada experiencia medidas después de la etapa L varían entre 129 y 491 kg·t⁻¹, 0 y 79 kg·t⁻¹ y entre 0 y 11 equitox·m⁻³ de DQO, color y toxicidad, respectivamente. Se han obtenido modelos matemáticos que predicen las propiedades de DQO, color y actividad enzimática residual en función de los factores del proceso.

La alta DQO de los tratamientos enzimáticos se debe a la utilización de la lacasa comercial, en concreto a los aditivos que contiene para evitar pérdidas de actividad enzimática durante el transporte, almacenamiento o durante el bioblanqueo. Por lo que en las formulaciones de estas enzimas se debería tener en cuenta la DQO que aportan estos componentes y que puede ser un problema en una futura aplicación industrial. El color rojo que se forma en los efluentes del sistema lacasa mediador, sobre todo a tiempos largos de tratamiento, se relaciona con la formación de productos de oxidación del mediador HBT.

Las experiencias realizadas a las dosis altas de enzima y mediador (20 U·g⁻¹ y 2 %odp) son las que presentan una mayor toxicidad, aunque los valores máximos medidos se encuentran por debajo de los límites que fija la ley de vertidos del área metropolitana de Barcelona. Un aumento en la consistencia de los tratamientos podría aumentar los valores de toxicidad de los efluentes a valores próximos a los que fija la legislación. Aunque también se debe tener en cuenta que estos efluentes se podrían

reutilizar en otras fases del proceso, diluirse con las aguas de proceso o enviar a la caldera de recuperación. La toxicidad de los efluentes de la etapa L no sólo se atribuye a la presencia del mediador HBT, sino a que se forman subproductos de degradación que presentan una mayor toxicidad que el mediador HBT en su forma inicial.

La actividad enzimática residual depende básicamente de la dosis de lacasa y de la dosis de mediador, la variable tiempo tiene poca influencia en la respuesta, de manera, que en los primeros 30 min es cuando se produce la pérdida de actividad en el sistema. La actividad residual relativa depende básicamente de la dosis de mediador. Aunque a dosis de mediador bajas ya se produce una pérdida de actividad del 40 %; a una dosis de mediador del 2 %odp la actividad residual disminuye hasta un 90 %. Según la bibliografía, los radicales de HBT formados durante el tratamiento inactivan a las lacasas por la oxidación de los aminoácidos aromáticos de la superficie proteica, aunque la presencia de pasta en el sistema lacasa mediador reduce la inactivación de enzima debido a que los radicales formados reaccionan con la pasta ralentizando la inactivación. En este caso, se puede asociar la pérdida de actividad enzimática al aumentar la dosis de mediador a una mayor formación de radicales de oxidación al inicio del proceso que reaccionarían con la pasta pero que también aumentarían la inactivación de la enzima lacasa.

La optimización de las dosis y el tiempo de tratamiento en el bioblanqueo es necesaria para obtener unas buenas propiedades de la pasta a un menor coste, pero también se debe tener en cuenta la influencia de las variables en las propiedades de los efluentes ya que una sobre dosificación puede dificultar la posible reutilización de estos efluentes de blanqueo.

9.5 BIBLIOGRAFÍA

Amann,M. (1997) The Lignozym(R) process coming closer to the mill. *I SWPC - 9Th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry - Oral Presentations F41-F45.*

Amann,M., Candussio,A., Müller,R. and Frey,V. (2000) In situ generation of mediator - a new concept for laccase-catalyzed delignification of kraft pulp. *2000 TAPPI Pulping Process and Product Quality Conference.*

Bajpai,P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 15, 147-157.

Bajpai,P. and Bajpai,P.K. (1998) *Biotechnology in the pulp and paper industry.* Leatherhead, Sussex, UK: Pira International.

Barascud,M.C., Jacquart,J.C., Nivelon,S. and Pichon,M. (1995) Objectif zero rejet. *Revue ATIP* 49, 88-92.

Bourbonnais,R., Paice,M.G., Freiermuth,B., Bodie,E. and Borneman,S. (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4627-4632.

Call,H.P. and Mücke,I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (LignozymR-process). *Journal of Biotechnology* 53, 163-202.

Camarero,S., García,O., Vidal,T., Colom,J., del Río,J.C. and Gutiérrez,A. (2002) Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccase-mediator systems. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* 21, 213-221.

Camarero,S., García,O., Vidal,T., Colom,J., del Río,J.C., Gutiérrez,A., Gras,J.M., Monje,R., Martínez,M.J. and Martínez,A.T. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 113-120.

Camarero,S., Ibarra,D., Martínez,M.J., Romero,J., Gutiérrez,A. and del Río,J.C. (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 2171.

Cañas,A., Alcalde,M., Plou,F., Martínez,M.J., Martínez,A.T. and Camarero,S. (2007) Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science and Technology* 41, 2964-2971.

Cates,D.H., Eggert,C., Ynag,J.L. and Eriksson,K.-E.L. (1995) Comparison of effluents from TCF and ECF bleaching of kraft pulps. *Tappi Journal* 78, 93-98.

Chakar,F.S. and Ragauskas,A. (2000a) The kismet of residual lignins during LMS delignification of high-kappa kraft pulps. *Holzforchung* 54, 647-653.

Chakar,F.S. and Ragauskas,A.J. (2000b) The effects of oxidative alkaline extraction stages after laccase-HBT and laccase-NHAA treatments - an NMR study of residual lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 20, 169-184.

Colom,J., García,O., Camarero,S., Fillat,U., Martínez,A.T., Roncero,M.B., Torres,A.L., Martínez,M.J., Gras,J.M. and Vidal,T. (2005) Application of enzymes in the bleaching processes of high quality pulps. *COST E-23 Action on: Biotechnology for Pulp and Paper Industry.2005 Conference for Biotechnology for Pulp and Paper Manufacture: From Tailor-Made Biocatalysts to Mill Application* pp. 49-50.

Correia,E., Treves,B.J. and Snook,R. (2004) Water toxicity monitoring using *Vibrio fischeri*: a method free of interferences from colour and turbidity. *Journal of Environmental Monitoring* 6, 97-102.

d'Acunzo, F. and Galli, C. (2003) First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry* 270, 3634-3640.

da Silva, M.R., de Brito, A.C.H. and Colodette, J.L. (1997) A seqüencia de branqueamento ideal para um processo em circuito fechado. *O Papel* 3, 35-45.

Dence, C. and Reeve, D. (1996) *Pulp bleaching. Principles and practice*. Atlanta: Tappi Press.

Fillat, A., Colom, J. and Vidal, T. (2007) Exploring enzyme stability during delignification of flax pulp by laccase and natural mediators. *10th International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Integrating biology with processes*. pp. 86.

Freudenreich, J., Amann, M., Fritz-Langhals, E. and Stohrer, J. (1998) Understanding the lignozym-process. *International Pulp Bleaching Conference* pp. 71-76.

García, J.A., Vidal, T. and Colom, J.F. (1984) Blanqueo de pastas en la industria papelera. ed. Publicaciones de la Universidad Politécnica de Cataluña Terrassa.

García, O. (2003) Utilización de fibras de lino en la fabricación de papel. Nuevas secuencias de blanqueo y aplicación de sistemas enzimáticos. Terrassa, España: Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Textil e Papelera, Universidad Politécnica de Cataluña.

García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Monje, R. and Vidal, T. (2003) Optimization of a Laccase-Mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513-519.

Geng, X., Li, K. and Xu, F. (2004) Investigation of hydroxamic acids as laccase-mediators for pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 493-496.

Ibarra, D., Romero, J., Martínez, M.J., Martínez, J. and Camarero, S. (2006) Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme Microbial Technology* 39, 1319-1327.

Johannes, C. and Majcherczyk, A. (2000) Natural mediator in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 524-528.

Johansson, N.G. and Clark, F.M. (1995) Developing technologies open door to future closure of bleach plant. *Pulp and Paper* 69, 71-75.

Kenealy, W.R. and Jeffries, T.W. (2003) Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments. In *Wood deterioration and preservation: Advances in our changing world* ed. Goodell, B., Nicholas, D.D. and Schultz, T.P. pp. 210-239. American Chemical Society.

- Li,K., Xu,F. and Eriksson,K.-E. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2654-2660.
- Nelson,P., Chin,C., Viikari,L. and Tenkanen,M. (1998) The use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt kraft pulps. *Appita Journal* 51, 451-455.
- Paice,M.G., Bourbonnais,R., Reid,I.D., Archibald,F.S. and Jurasek,L. (1995) Oxidative bleaching enzymes: a review. *Journal of Pulp and Paper Science* 21, 280-284.
- Poppius-Levlin,K., Wang,W., Tamminen,T., Hortling,B., Viikari,L. and Niku-Paavola,M.L. (1999) Effects of laccase/HBT treatment on pulp and lignin structures. *Journal of Pulp and Paper Science* 25, 90-94.
- Potthast,A., Rosenau,T. and Fischer,K. (2001) Oxidation of benzyl alcohols by the laccase-mediator system (LMS) - A comprehensive kinetic description. *Holzforschung* 55, 47-56.
- Rocheffort,D., Leech,D. and Bourbonnais,R. (2004) Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. *Green Chemistry* 6, 14-24.
- Sealey,J. and Ragauskas,A.J. (1998) Investigation of laccase/N-hydroxybenzotriazole delignification of Kraft pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18, 403-416.
- Wong,K.K.Y., Anderson,R. and Kibblewhite,P. (1999) Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 125-131.
- Xu,F., Kulys,J.J., Duke,K., Li,K., Krikstopaitis,K., deussen,H.-J.W., Abbate,E., Galinyte,V. and Scheneider,P. (2000) Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66, -2052.