

Tesista: Diego Morales Urrea

Título al que aspira: Doctor en Ciencia de Materiales, UNMdP

Tema: "Desarrollo de biocatalizadores para el tratamiento de efluentes líquidos industriales"

Director de tesis: Dr. Edgardo Contreras

Co-directora: Dra. Patricia Haure

Lugar de Trabajo: Facultad de Ingeniería, UNMdP

Fecha de Defensa: 27 de abril de 2020

Jurados:

Dra. Noemí Zarizky (CIDCA, CONICET-UNLP)

Dra. Analía Fernández Giménez (CONICET)

Dra. Norma Marcovich (CDS, INTEMA, CONICET-UNMdP)

Resumen

Los efluentes líquidos industriales contienen cantidades diversas de compuestos fenólicos y de colorantes azo. En general, estos compuestos son potencialmente tóxicos y difíciles de degradar bajo condiciones naturales. Por tanto, su descarga a cuerpos receptores sin un tratamiento adecuado implica un impacto negativo sobre el ambiente y la salud en general. Recientemente, la catálisis enzimática es una alternativa ecoamigable para obtener altas tasas de remoción de compuestos xenobióticos en aguas residuales bajo condiciones predecibles en comparación con los tratamientos biológicos y químicos.

El diseño de biocatalizadores debe considerar especialmente la estabilidad y la factibilidad de recuperación de la enzima. Por consiguiente, la inmovilización de enzimas se ha convertido en una importante estrategia para el desarrollo de bioprocesos económicamente viables. Sin embargo, para escalar los procesos y desarrollar sistemas controlados, es importante conocer primero las características estequiométricas y cinéticas de las reacciones enzimáticas en fase homogénea, ya que las enzimas suelen ser sensibles a condiciones externas o la presencia de inhibidores, que pueden ser, incluso, sus mismos sustratos.

La presente Tesis Doctoral tuvo como objetivo general desarrollar biocatalizadores basados en la inmovilización de una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) para el tratamiento de efluentes líquidos industriales con peróxido de hidrógeno.

En el Capítulo 3 se estudió el comportamiento catalítico de la enzima en fase homogénea en la oxidación del contaminante modelo orange II (OII), poniendo énfasis en las condiciones de reacción y posibilidad de reutilización de la enzima, determinando la cinética de degradación y las condiciones óptimas de la reacción. A partir de los resultados obtenidos se desarrolló una versión modificada del mecanismo Dunford de las peroxidases, que tuvo en

cuenta la inhibición de la enzima por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (P), la descomposición de P en agua y oxígeno, la generación de productos de oxidación (PO) y el efecto del pH sobre la cinética de decoloración del OII.

En el Capítulo 4 se estudió la degradación de los contaminantes modelo orange II, fenol y bisfenol A poniendo énfasis en la modalidad de suministro de peróxido de hidrógeno (Sistemas batch y fed-batch) y monitoreando la reacción mediante mediciones del potencial de oxidación-reducción (ORP) para detectar el punto final de la oxidación de los contaminantes estudiados. Los resultados obtenidos demostraron que el ORP puede ser útil para controlar la adición de peróxido de hidrógeno durante la oxidación de OII, fenol y BPA catalizada por HRP, minimizando el tiempo y los costos del proceso.

Una segunda etapa del trabajo de investigación consistió en el estudio de técnicas de inmovilización de la enzima por adsorción y unión covalente sobre dos tipos de materiales: membranas nanofibrosas de poliuretano y diatomitas. En el Capítulo 5 se desarrollaron biocatalizadores a base de HRP inmovilizada sobre nanofibras de poliuretano. La técnica de Caracciolo y col. (2017) fue adaptada con éxito para maximizar la carga de HRP inmovilizada mediante uniones covalente, funcionalizando y activando el material con hipoclorito de sodio y un activador epoxi a pH 8. Los resultados obtenidos demostraron que la inmovilización de la enzima se efectuaba tanto por adsorción (ME) como por unión covalente (MAE). La evaluación de los biocatalizadores demostraron que la actividad enzimática de ME y MAE fue mayor cuando la inmovilización se realizaba a 20 que a 40 °C. Asimismo, los resultados obtenidos demostraron que los biocatalizadores a base de membranas nanofibrosas de poliuretano fueron utilizados con éxito en dos ciclos de oxidación de OII durante un tiempo comprendido entre 4 y 10 h, dependiendo de las condiciones de inmovilización.

Finalmente, en el Capítulo 6 se desarrollaron biocatalizadores a base de HRP inmovilizada sobre diatomitas mediante adsorción (DE) y por uniones covalentes (DSGE, DHSGE). El material de soporte y los biocatalizadores obtenidos fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX), fluorescencia de rayos X (FRX), espectroscopía infrarroja por transformada de fourier de reflectancia difusa (DRIFT), microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de rayos X (SEM/EDX) y análisis termogravimétrico (TGA). Los resultados obtenidos durante la inmovilización mostraron que DSGE tuvo mayores valores de carga enzimática inmovilizada en comparación con DE. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos durante la remoción de OII con P empleando los biocatalizadores a base de diatomitas. La técnica de inmovilización propuesta definió un protocolo exitoso para soportar enzimas estables al almacenamiento durante al menos un mes. Esto reduciría los costos operativos proyectados a la aplicación industrial de enzimas. Los resultados obtenidos representan un punto de inicio para la futura inmovilización de extractos de distintas enzimas con diversas aplicaciones industriales.

Abstract

As a general rule, industrial wastewater usually contain varying amounts of phenolic compounds and azo dyes. In general, these compounds are potentially toxic and difficult to degrade under natural conditions. For this reason, their discharge to the environment without adequate treatments implies a negative impact on the environment and health. In recent years,

enzymatic catalysis becomes an eco-friendly alternative in comparison with traditional biological and chemical treatments to obtain high removal rates of xenobiotics under predictable conditions.

The design of biocatalysts must especially consider their stability and feasibility of enzyme recovery. Consequently, enzyme immobilization has become an important strategy for the development of economically viable bioprocesses. However, to scale these processes and develop more controlled systems, it is important to know the stoichiometric and kinetic features of the enzymatic reactions in homogeneous phase. Consequently, the objective of this Doctoral Thesis was to develop biocatalysts based on the immobilization of a horseradish peroxidase (HRP) for the treatment of industrial liquid effluents with hydrogen peroxide.

Chapter 3 deals with the study of the catalytic behavior of the enzyme in the homogeneous phase during the oxidation of Orange II (OII), a model contaminant of industrial wastewaters. The study emphasizes the reaction conditions and the possibility of reusing the enzyme, the degradation kinetics, and the experimental conditions to optimize the tested reaction. Based on the obtained results, a modified version of the Dunford mechanism of peroxidases was developed. The model took into account the inhibition of the enzyme by high concentrations of hydrogen peroxide (P), the decomposition of P in water and oxygen, the generation of oxidation products (PO), and the effect of pH on the bleaching kinetics of OII.

In Chapter 4 the degradation of model contaminants Orange II, phenol, and bisphenol A was studied. In this Chapter, the mode of hydrogen peroxide supply (Batch and fed-batch systems) was studied. Also, an ORP based control strategy through measurements of oxidation-reduction potential (ORP) to detect the end point of the oxidation of the tested pollutants was developed. The obtained results demonstrate that ORP measurements can be useful for controlling the addition of hydrogen peroxide during the oxidation of OII, phenol and BPA catalyzed by HRP, minimizing the time and costs of the process.

The second stage of this research consisted in the study of enzyme immobilization techniques by adsorption and covalent bonding on two types of materials: nanofibrous polyurethane membranes and diatomites. In Chapter 5, biocatalysts based on HRP immobilized on polyurethane nanofibers were developed. The technique of Caracciolo et al. (2017) was successfully adapted to maximize the load of immobilized HRP through covalent bonds, functionalizing and activating the material with sodium hypochlorite and using an epoxy activator at pH 8. Obtained results showed that the immobilization of the enzyme was carried out both by adsorption (ME) and by covalent bonding (MAE). The evaluation of the biocatalysts showed that the enzymatic activity of ME and MAE was greater when immobilization was performed at 20 than at 40 °C. Likewise, the results showed that biocatalysts based on nanofibrous polyurethane membranes were successfully used in two cycles of OII oxidation for a time between 4 and 10 h, depending on the immobilization conditions.

Finally, Chapter 6 deals with the development of biocatalysts based on HRP immobilized on diatomites by adsorption (DE) and by covalent bonds (DSGE, DHSGE). The support material (diatomite) and the obtained biocatalysts (DE, DSGE, DHSGE) were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRX), X-ray fluorescence (FRX), infrared diffuse reflector fourier transform spectroscopy (DRIFT), electron microscopy scanning and X-ray scattering analysis (SEM / EDX) and thermogravimetric analysis (TGA). The results obtained during immobilization showed that DSGE had higher values of enzyme load compared to DE. These results were consistent with those obtained during the removal of OII with P using diatomite-based biocatalysts. The

proposed immobilization technique defined a successful protocol to support stable enzymes in storage for at least one month. This would reduce the projected operational costs to the industrial application of enzymes. Results obtained in the present work represent a starting point for the future immobilization of extracts of different enzymes with industrial applications.