



PAQUI BLÁNQUEZ CANO, MONTSERRAT SARRÀ ADROGUER i TERESA VICENT HUGUET professores titulars del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEM:

Que l'enginyera **Núria Casas Collet** ha realitzat sota la nostra direcció el treball que, amb el títol "ESTUDI DEL PROCÉS DE DEGRADACIÓ DE COLORANTS TÈXTILS AMB EL FONG *Trametes versicolor*", es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a:

Bellaterra, Juliol 2012

Dra. PAQUI BLÁNQUEZ CANO

Dra. MONTSERRAT SARRA ADROGUER

Dra. TERESA VICENT HUGUET

*Agraeixo i dedico aquest treball a totes les persones  
que han estat, són i seran al meu costat al llarg  
del camí.*

*En especial, a les meves directores, als meus pares,  
a la meva germana, i sobretot a tu, Ricard.*

# Índex

---

<b>Resum</b> .....	I-II
<b>Abstact</b> .....	III-IV
<b>Presentació</b> .....	V-VI

## Capítol 1

<b>Introducció</b> .....	1
<b>1.1 La indústria tèxtil i el procés de tenyit</b> .....	2
<b>1.2 Problemàtica ambiental dels efluent industrial tèxtils lligada als colorants</b> .....	2
1.2.1 Panorama actual a Catalunya .....	3
1.2.2 El trasllat del problema a països emergents .....	4
<b>1.3 Els colorants</b> .....	7
1.3.1 Colorants i pigments .....	9
1.3.2 Color i constitució dels colorants .....	9
1.3.3 Classificació dels colorants .....	10
1.3.3.1 Classificació química .....	10
1.3.3.2 Classificació dels colorants segons la seva aplicació .....	17
<b>1.4 Tractaments d'aigües residuals amb colorants</b> .....	17
1.4.1 Tractaments fisicoquímics .....	18
1.4.1.1 Mètodes de transformació del component del color .....	18
1.4.1.2 Mètodes d'eliminació del component del color .....	21
<b>1.4.2 Tractaments biològics</b> .....	22
<b>1.4.3 Tractaments combinats</b> .....	24
<b>1.5 Aplicació dels fongs ligninolítics a la degradació de colorants</b> .....	24
<b>1.5.1 Nexa entre l'estructura dels colorants i l'estructura de la lignina</b> .....	25
<b>1.5.2 Sistema enzimàtic dels fongs de podridura blanca</b> .....	26
1.5.2.1 Lacasa .....	26
1.5.2.2 Peroxidases extracel·lulars .....	27
1.5.2.3 Sistema citocrom P450 .....	29
<b>1.5.3 Degradació de colorants amb fongs</b> .....	29
<b>1.5.4 Mecanismes de degradació de colorants amb enzims ligninolítics</b> .....	30
<b>1.6 El fong <i>Trametes versicolor</i> i la seva morfologia</b> .....	32

1.7 Utilització del fong ligninolític <i>Trametes versicolor</i> en processos de decoloració ..	34
1.8 Bibliografia.....	42

## Capítol 2

Objectius .....	55
-----------------	----

## Capítol 3

<b>Materials i mètodes generals .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Microorganisme.....</b>	<b>58</b>
3.2 Medis de cultiu.....	58
3.2.1 Medi de creixement .....	58
3.2.2 Medi de tractament.....	58
3.2.2.1 Procés en discontinu sota condicions de creixement.....	58
3.2.2.2 Procés en discontinu sota condicions de manteniment .....	59
3.2.2.3 Discontinus seqüencials .....	59
3.2.2.4 Procés en continu .....	60
<b>3.3 Colorants .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4 Enzim .....</b>	<b>66</b>
<b>3.5 Obtenció de la biomassa en forma de pèl·lets .....</b>	<b>66</b>
3.5.1 Obtenció de miceli.....	66
3.5.2 Obtenció de pèl·lets .....	66
<b>3.6 Tractaments .....</b>	<b>66</b>
3.6.1 Metodologia experimental .....	66
3.6.1 En Erlenmeyers.....	67
3.6.2 En reactor .....	68
3.6.2.1 Característiques del reactor fluiditzat per polsos d'aire.....	68
<b>3.7 Mètodes analítics.....</b>	<b>70</b>
3.7.1 Pes sec.....	70
3.7.2 Determinació de l'activitat enzimàtica .....	70
3.7.3 Concentració de glucosa.....	70
3.7.4 Color .....	71
3.7.5 Toxicitat .....	71
3.7.6 Determinació de l'estructura química dels colorants per RMN.....	72
3.7.7 Determinació de proteases .....	72
<b>3.8 Desenvolupament del model matemàtic .....</b>	<b>72</b>
<b>3.9 Bibliografia.....</b>	<b>73</b>

## **Capítol 4**

Degradation of Orange G by laccase: fungal versus enzymatic process ..... 74

## **Capítol 5**

The potential of *Trametes versicolor* and laccase enzyme for the efficient decolorisation and detoxification of different types of recalcitrant dyes ..... 83

## **Capítol 6**

Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase ..... 108

## **Capítol 7**

Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers ..... 116

## **Capítol 8**

Mathematical model for dye degradation and laccase production by *Trametes versicolor* in fluidized bioreactor ..... 125

## **Capítol 9**

**Conclusions generals** ..... 155

## **Annex I**

Mechanism of textile metal dye biotransmormation by *Trametes versicolor* ..... 157

# Resum

---

La contaminació d'aigües residuals per colorants procedents de la indústria tèxtil i del cuir és un problema ambiental greu. No tan sols la seva toxicitat és un perill per a la salut humana i animal, sinó que també són compostos amb un gran impacte visual. Al llarg del temps, la indústria tèxtil s'ha anat traslladant dels països més desenvolupats, amb costos de mà d'obra més alts i límits per als abocaments al medi cada cop més restrictius, als països en vies de desenvolupament, on actualment suposa un autèntic problema ambiental.

Degut a que els tractaments amb llots actius convencionals no són capaços d'eliminar aquests tipus de contaminants, en els darrers anys s'han desenvolupat tractaments biològics específics que han anat adquirint més rellevància. Actualment, la biodegradació de colorants per fongs ligninolítics o de podridura blanca és una via oberta, gràcies a la capacitat que han demostrat aquests microorganismes en la degradació d'una gran varietat de compostos recalcitrants com són els colorants.

Aquest treball de Tesi s'ha desenvolupat dins el grup de recerca de biodegradació de contaminants industrials i valorització de residus (BioremUAB). En concret s'ha centrat en l'estudi de la degradació de colorants tèxtils pel fong ligninolític *Trametes versicolor*.

S'ha estudiat la biodegradació del colorant azoic Orange G pel fong *Trametes versicolor* i al mateix temps el paper que hi té en aquesta l'enzim lacasa. Els alts rendiments en l'eliminació de color obtinguts, tant amb el fong com amb l'enzim purificat, han demostrat que la lacasa és un dels principals responsables de la decoloració. Tanmateix, els espectres d'absorbància i de ressonància magnètica nuclear han evidenciat que en el tractament amb fong s'obtenen millors resultats al no detectar-se subproductes que sí que es troben al final de la degradació enzimàtica.

El mateix estudi s'ha dut a terme amb 14 colorants més, englobant gran part dels tipus d'estructures de colorants existents. En el tractament amb fong, no tan sols s'obtenen millors rendiments de decoloració per a la majoria de colorants si es compara amb el procés enzimàtic, sinó que disminueix la toxicitat del medi al final del tractament. Només amb els colorants altament tòxics, en el tractament amb el fong s'arriba a valors de decoloració inferiors al 50%, rendiments que augmenten al disminuir la concentració inicial de colorant. Aquests resultats conjuntament amb els elevats rendiments de decoloració obtinguts en el

tractament en reactor fluïditzat, simulant un possible efluent tèxtil, avalen la utilització del fong *Trametes versicolor* com a solució potencial al tractament d'efluents contaminats amb aquests compostos.

L'anàlisi en línia per ressonància magnètica nuclear de la degradació enzimàtica de 5 colorants trifenilmetans, ha permès conèixer que l'enzim lacasa oxida les seves estructures de la mateixa forma, donant lloc a subproductes estables i amb estructures similars que són degradades pel fong.

S'ha estudiat la influència sobre la decoloració i producció enzimàtica de diferents paràmetres (concentració inicial de colorant, subministrament de nutrients, modes d'operació...) que afecten al procés i al fong, en el tractament en bioreactor del colorant tèxtil Gris Lanaset G. Els resultats indiquen que un mode d'operació en etapes discontinues repetides permet una millor adaptabilitat i eficàcia del fong si es compara amb altres com l'operació en continu.

Finalment, tots els coneixements adquirits i els resultats obtinguts s'han aplicat en el desenvolupament, calibració i validació d'un model matemàtic capaç de descriure el comportament del fong en la decoloració i la producció enzimàtica; no tant sols per als colorants sinó en general per a contaminants que puguin ser degradats pel fong seguint el mateix mecanisme.



# Abstract

---

Contamination of wastewater dyes from the textile and leather industry is an important environmental problem. Not only, for its toxicity and danger to human and animal health but also for significant visual impact of its compounds. Along the time, textile industry has been moving from developed countries, where labour costs are higher and the limits discharge have become more stringent, to developing countries, where it has become an important environmental problem at present.

As conventional activated sludge treatments are unable to eliminate these contaminants, in recent years biological processes have become more relevant. Nowadays, the dye biodegradation by white rot fungi has been an open way through its capacity for the degradation of a wide range of recalcitrant compounds such as dyes.

The PhD work presented has been developed in the research group: “Bioremediación de contaminantes y valorización de residuos (BioremUAB)” This study has been focused on the study of dyes degradation by *Trametes versicolor*.

The decolourisation of azo dye Orange G has been studied by the fungus *Trametes versicolor* as well as the role of the laccase enzyme in this process. The important role of enzyme inside dye decolourisation has been demonstrated with high colour removal yields obtained with the fungus, but also with the enzyme. Even so, the absorbance spectrums and the nuclear magnetic resonances results show how the fungus biodegradation enables to obtain better results. By-products that are detected at the end of enzymatic process are not found at the end of fungus process.

Fourteen dyes have been studied in the same way as azo dye. These 15 dyes represent most of the existing dyes structures. In fungus treatment not only better decolourisation yields were achieved, if they are compared to enzymatic process results, but also the culture toxicity decreases at the end of treatment. Only in case of highly toxic dyes, fungus test had decolourisation values lower than 50%. In any case, these yields can be improved by decreasing initial concentration of dye. These results together with the high decolourisation obtained in the treatment in fluidised reactor, simulating a possible textile effluent, validate the use of fungus as a solution to treat dye contaminated effluents.

On-line magnetic resonance spectra analysis of five triphenylmethane dyes has shown that laccase enzyme oxidizes the structures of these dyes in the same way, giving stable by-products with similar structures that are degraded by fungus.

The influence on Gris Lansaset G textile dye decolourization and enzyme production in fluidized reactor by different parameters (initial dye concentration, supply of nutrients, operating modes...) has been studied. The results indicate that the mode "sequential batch" had the best adaptability and effectiveness in relation to other operation mode as continuous operation.

Finally, all the knowledge and results obtained have been used to develop, calibrate and validate a mathematical model which describes the dye degradation and enzyme production in dye decolourisation. Beyond this, the model can also be adapted to any contaminant biodegradation which follows the same degradation mechanism of the fungus.

# Presentació

---

EL treball de Tesi que es presenta recull els resultats més importants dins l'estudi del procés de biodegradació de colorants amb el fong ligninolític *Trametes versicolor* sota condicions de producció de l'enzim lacasa.

Aquest estudi parteix de l'experiència adquirida dins el grup de recerca de biodegradació de contaminants industrials i valorització de residus (BioremUAB) en la que s'ha estudiat el tractament del colorant Gris Lanaset G amb el fong *Trametes versicolor*. El conjunt de coneixements aconseguits han permès: seleccionar el fong *Trametes versicolor* evitant el creixement del fong sobre sondes i parets del bioreactor, establir les condicions nutricionals del fong per a la producció de l'enzim lacasa (considerat com a possible catalitzador en la degradació dels colorants) i utilitzar el bioreactor fluïditzat per polsos d'aire per evitar la compactació del llit i afavorir la transferència de matèria.

Aquest treball s'estructura en nou capítols i un annex. En el primer capítol es descriu què són els colorants, la problemàtica que suposa el seu ús en la indústria per al medi ambient i els tractaments estudiats per a la seva eliminació, entre els quals es troba el tractament amb fongs ligninolítics.

En el segon capítol es fixen els objectius generals de la recerca. Els materials i mètodes experimentals utilitzats en la investigació es resumeixen en el tercer capítol.

En els capítols 4, 5, 6, 7 i 8 es recullen els resultats obtinguts i la seva discussió en format d'article. S'inicia el treball amb l'estudi de la degradació del colorant monoazo Orange G tant pel fong *Trametes versicolor* com per l'enzim lacasa (capítol 4). S'estudia la degradabilitat, i la disminució de la toxicitat en el medi el tractament de 14 colorants més (capítol 5), englobant pràcticament la totalitat de les famílies de colorants existents en base a la seva tipologia estructural. Els resultats permeten proposar una estratègia d'operació en funció de les característiques del colorant que permetrà generalitzar l'aplicabilitat del procés.

En l'estudi de mecanismes de degradació la majoria de treballs s'han centrat en la decoloració dels colorants azoics, i pràcticament no n'existeixen per altres famílies com la dels colorants arilcarbeni, extensament utilitzada en camps que van des de la indústria tèxtil a la medicina. En el capítol 6 s'analitza el tractament de 5 colorants trifenilmetans amb fong i enzim, i s'utilitzen espectres de ressonància magnètica nuclear en la detecció de productes finals en ambdós tractaments per tal de descriure el mecanisme enzimàtic de degradació.

Per conèixer si el tractament amb fong podria ser un procés més competitiu front a altres, era important aprofundir en el coneixement del procés de biodegradació per tal d'optimitzar tant la decoloració com la producció enzimàtica. En el capítol 7 s'estudia la disminució i/o eliminació de nutrients en el sistema, així com l'efecte que els mateixos colorants suposen en la producció de l'enzim lacasa, i alhora es treballa sota diferents formes d'operació (discontinu, discontinus repetits...).

Conèixer els aspectes anteriorment comentats del tractament de colorants amb el fong *Trametes versicolor* ha permès desenvolupar un model matemàtic capaç de descriure la decoloració i la producció enzimàtica en les diferents formes d'operació. El desenvolupament del model, la seva calibració i la seva validació es recullen en el capítol 8.

Les conclusions globals a les que s'ha arribat en aquest treball de recerca es troben resumides en el capítol 9.

Finalment l'annex I, adjuntat en aquest treball com a material complementari, mostra els resultats amb els quals es descriu el mecanisme de degradació del colorant Gris Lanaset G amb el fong *Trametes versicolor*. Tot i que aquests resultats van ser obtinguts prèviament a l'inici de la tesi doctoral aporten informació important en la comprensió d'aquesta.

# Capítol 1

## Introducció

---

### **1.1 La indústria tèxtil i el procés de tenyit**

El sector de la indústria tèxtil (es parlarà de la indústria tèxtil com el sector que engloba la indústria tèxtil, la de la confecció, i la del cuir) consisteix en diferents processos de producció i processament de matèries per a la posterior transformació en teixit, calçat i articles industrials. L'impacte ambiental més important de la indústria tèxtil es deriva dels anomenats processos humits on es destaca l'etapa de tenyit. En aquesta etapa es dona color als teixits i s'utilitzen grans volums d'aigua i energia. En els processos de tenyit es poden arribar a utilitzar fins a 170 L d'aigua, 1,1kW d'energia elèctrica i 16 MJ d'energia tèrmica per cada kilogram de producte acabat (web: IPPC, 2003). Utilitzant diferents tècniques i equipaments, els processos de tenyit es poden realitzar en discontinu o en continu. En la tinció en discontinu, una determinada quantitat de teixit es col·loca en una màquina de tenyir i es porta a l'equilibri amb una solució que conté colorant; el colorant es fixa a la fibra utilitzant calor i/o productes químics i finalment es renta el teixit per eliminar el colorant no fixat i els productes químics. En els processos de tenyit en continu, els teixits o les fibres s'alimenten contínuament a un bany on s'hi aplica colorant, productes de fixació i calor en proporció a la fibra entrant. Les aigües residuals tèxtils doncs, contenen mesclres complexes de productes com són metalls, sals, àcids/bases i colorants.

## 1.2 Problemàtica ambiental dels efluents industrials tèxtils lligada als colorants

Es coneixen més de 100.000 colorants comercialment disponibles al mercat i al voltant de 10.000 s'obtenen a escala industrial donant lloc a més de  $7 \cdot 10^5$  tones anuals de producció (Robinson et al., 2001; web: Sophied, 2006). Es calcula que dues terceres parts de tots els colorants existents s'utilitzen en el mercat tèxtil (Asad et al., 2007). Aproximadament entre el 10 i el 15% dels colorants utilitzats es perden a l'efluent durant el procés de tenyit (Vaidya i Datye, 1982; Conneely et al., 2001; web: Sophied, 2006), tot i que els percentatges es poden reduir en un 2% com en el cas dels colorants bàsics, o incrementar-se fins al 50% com passa amb els colorants reactius (Pandey et al., 2007).

Malgrat la presència a baixa concentració d'aquests compostos químics, el seu resultat és un gran efecte visual (Nigam et al., 2000). Els colorants tèxtils es caracteritzen per tenir un gran poder de tinció i una gran persistència a l'ambient. Són dissenyats per ser altament estables davant la llum, la temperatura, als agents oxidants i en front als atacs dels microorganismes. Les molècules responsables del color tenen estructures químiques complexes i en molts casos contenen un o varis anells aromàtics. Són difícilment degradables i normalment no són eliminats de l'aigua per tractaments convencionals de depuració d'efluents amb llots actius.

El potencial contaminant d'alguns colorants tèxtils, a part del color, és degut a la seva possible toxicitat i carcinogènesi (Brown i De Vito, 1993) ja que molts d'ells provenen de carcinògens coneguts com la benzidina i altres compostos aromàtics. Ara bé, encara que la majoria de colorants no són pròpiament tòxics per als microorganismes, una forta coloració del medi receptor pot arribar a suprimir els processos fotosintètics (Mansilla et al., 2003). Per altra part, l'efecte dels colorants ve potenciat en el procés de tenyit per productes com agents oxidants, agents reductors, agents dispersius, emulsionants... que ajuden a incrementar l'efecte sobre els paràmetres de qualitat de l'aigua com la Demanda Bioquímica d'Oxigen (DBO), la Demanda Química d'Oxigen (DQO), el Carboni Orgànic Total (COT), i els sòlids totals (Correira et al., 1994).

Si es té en compte que cada tipus de colorant té unes característiques pròpies i l'existència d'una gran varietat estructural de colorants, amb el fet que la indústria tèxtil es caracteritza per utilitzar diferents colorants durant períodes curts de temps, en una mateixa factoria es poden generar efluents complexes i extremadament variables en composició, de manera que es fa difícil trobar un sol tractament per a aquest tipus d'aigües residuals.

La presència d'aquest tipus de contaminació ha de ser controlada i la legislació cada vegada s'està tornant més estricta en els països desenvolupats. En la UE s'apliquen les directives 91/271/CEE, 98/15/CE i 2002/61/CE (modificació de la directiva 76/769/CEE) que obliguen a eliminar el color de les aigües residuals abans d'abocar-les, i fins i tot prohibeix la comercialització i l'ús de determinats colorants, sobretot colorants azo que puguin alliberar amines aromàtiques.

El creixement de la sensibilitat social cap al medi ambient esdevinguda en els últims anys, ha tingut una important influència sobre la indústria (entre elles la tèxtil), que ha de complir cada vegada amb mesures més estrictes, no només per satisfer la legislació, sinó la percepció pública.

### **1.2.1 Panorama actual a Catalunya**

Es calcula que al voltant d'un 35% de l'activitat tèxtil a l'estat Espanyol es concentra a Catalunya. En el 2010 la indústria tèxtil va suposar a Catalunya un volum de negoci al voltant dels cinc mil milions d'euros (web: IDESCAT, 2010). A l'actualitat, les petites i mitjanes empreses (PIME) es poden considerar majoritàries, ja que disposen d'una major flexibilitat per respondre a les evolucions del fenomen de la moda. Segons les dades de l'Agència Catalana de l'Aigua (web: Termes, 2009) l'evolució dels consums de l'aigua a la indústria no és homogènia. Així com al sector tèxtil ha disminuït, no ha estat igual als sectors químic, paperer i adober en què s'ha mantingut gairebé estable. El sector tèxtil ha sofert un canvi profund, durant els darrers anys s'ha reduït el nombre d'empreses del sector i ha disminuït la dimensió mitjana de les plantilles de les empreses supervivents, és a dir, ha baixat el nombre d'empreses grans i ha augmentat el de mitjanes i petites. Diversos factors han contribuït a aquesta reducció de les dimensions de les empreses: la deslocalització, l'avanç tecnològic (que ha permès un important grau de productivitat amb la corresponent reducció de les plantilles) i la tendència de les empreses a reduir la seva estructura contractant serveis externs. A l'actualitat, les grans partides tèxtils són importades de països com la Xina i la Índia a l'inici de cada temporada, en cas que hi hagués una punta de producció per un determinat producte de temporada, aquest passaria a ser fabricat localment. Tot i aquesta davallada, les 1.750 empreses dedicades al sector tèxtil i a la moda a Catalunya representen el 1,49% del PIB Català donant feina a 103.915 treballadors (web: IDESCAT, 2009; web: Europapress, 2011).

En general, a Catalunya s'utilitzen dues opcions a l'hora de tractar aigües industrials. Una primera opció consisteix en tractar les aigües a la planta depuradora de la indústria per eliminar contaminants específics i després abocar a la xarxa de sanejament. Aquesta alternativa és indicada per efluents generats en grans cabals i amb contaminants com

nutrients, salinitat, color. El Decret 130/2003 (DOGC 3894, 2003) estableix que el color és un paràmetre contaminant difícilment tractable a les EDAR's i que la concentració de color límit d'admissió sigui inapreciable en una dilució 1/30. La segona opció s'aplica davant residus difícils de tractar o efluents molt concentrats i generats en baixes quantitats. En aquest cas els residus són enviats a plantes de tractament de residus industrials centralitzades.

A Catalunya, moltes de les empreses del sector tèxtil es troben situades a prop de nuclis urbans. En funció de la gestió de les seves aigües residuals es classifiquen en dos grups: El primer comprèn les indústries que poden realitzar l'abocament al clavegueram, donant lloc a la depuració conjunta de les aigües residuals industrials i urbanes. El segon grup, comprèn les indústries que estan obligades a fer un tractament de depuració per arribar als límits de qualitat fixats per l'Administració competent del medi receptor. D'acord amb l'informe "Programa de sanejament d'aigües residuals industrials, 2003" (web: PSARI, 2003), a Catalunya l'any 2001 s'hi feien 5.374 abocaments corresponents a activitats industrials, dels quals 3.606 estaven connectats a clavegueram i 1.768 abocaven directament al medi físic (llera i mar). Els abocaments del sector tèxtil s'ubicaven a nivell de tot Catalunya (a sistema i llera) però en especial a la conca de la Tordera.

Segons les declaracions d'ús i contaminació (que només fan a l'ACA les grans empreses acollides al cànon de l'aigua amb tarifa individualitzada), en el 2005 el consum industrial manufacturer a Catalunya va ser d'uns 200 Hm<sup>3</sup>, dels quals el 9% pertanyia a la indústria tèxtil, arribant a un 13% si s'inclou la indústria del cuir i el calçat (web: 2026.cat, 2009, web: ACA, 2007).

Degut a la regulació dels abocaments, a Catalunya les empreses estan obligades a realitzar la declaració de residus. El Catàleg de Residus de Catalunya classifica i especifica els tractaments idonis per als residus generats, i potencia la minimització i el reciclatge abans d'arribar a la disposició final. D'acord amb les dades de les declaracions de residus entre l'any 2002-2006 la indústria tèxtil va baixar la generació de residus a causa de la disminució en la seva activitat de les 198.909 Tn/any al 2002 a les 140.350 Tn/any en el 2006. (web: 2026.cat, 2009). L'any 2009 es van declarar 78.462 tones de residus provinents de la indústria tèxtil. (web: IDESCAT, 2009).

### **1.2.2 El trasllat del problema a països emergents**

En les últimes dècades, la indústria tèxtil s'ha anat desplaçant a països com la Xina o la Índia, on la pressió legislativa i els costos de mà d'obra són menors respecte als existents en països més desenvolupats com els pertanyents a la Unió Europea. En països com la Xina o la Índia



doncs, la contaminació de l'aigua s'ha convertit en un dels majors desafiaments ambientals dins la seva lluita per estar entre els principals països industrialitzats del món.

La indústria tèxtil a Xina és un gran negoci, l'any 2010 representava el 7,6% del volum comercial total del país. Xina però, té un dels pitjors nivells de contaminació de l'aigua del món, fins al 70% dels rius, llacs i pantans es troben afectats per la contaminació, un 20% de la qual és orgànica i prové de vessaments industrials (web: Greenpeace, 2011).

Amb la finalitat de mantenir preus baixos, moltes indústries, entre elles les tèxtils, construeixen canonades que vessen els residus industrials ja sigui sota terra o directament en aigües superficials (imatges 1.1, 1.2 i 1.3). Fins i tot, en llocs de la Xina se sol fer broma sobre que per saber quin és el color de moda de la temporada únicament cal mirar els rius (Imatge 1.4).



**Imatge 1.1.** Canonades d'aigües residuals industrials sortint per les platges del mar Groc (28 d'Abril 2008).

(web: Eugene Smith, 2009)

**Imatge 1.2.** Vessament d'aigües industrials amb metalls a menys de 1000 metres aigües avall de la captació d'aigua per la ciutat de Danyang (10 de juny 2009).

(web: Eugene Smith, 2009)



**Imatge 1.3.** Moltes de les més de 100 fàbriques de a la ciutat de Jiangsu descarreguen les aigües altament contaminades directament al mar. Altres indústries les emmagatzemen en piscines, on finalment són igualment vessades al mar amb les mareas altes de cada mes (2 juny 2008). (web: Eugene Smith, 2009)



**Imatge 1.4.** En la província de Anhui Cihu (Districte Químic) es va construir una canonada subterrània per descarregar aigües residuals en el riu Yangtze. El color del riu canvia de negre a vermell, gris fosc, groc...segons els vessaments (18 juny 2009).

(web: Eugene Smith, 2009)

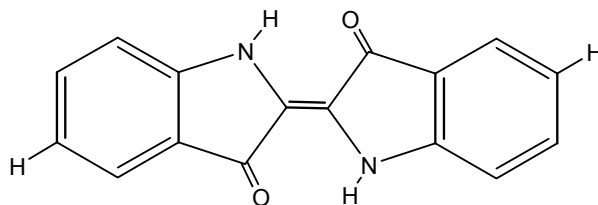


Un clar exemple del problema que suposa la contaminació tèxtil a la Xina el trobem a les ciutats de Xitang i Gurao. La primera produeix més del 40% dels pantalons texans que s'exporten als EEUU, UE i Rússia, 260 milions de parells de texans a l'any o més del 60% de la producció total de Xina. En Gurao s'hi produeixen 200 milions de sostenidors. Les dues ciutats són símbol de l'èxit de les exportacions i per tant de model econòmic, però al mateix temps de la degradació del medi ambient. La ONG Greenpeace va dur a terme proves de laboratori independents que van revelar alts continguts de metalls pesats en aigües i sediments de Xitang i Gurao (web: Greenpeace, 2010; web: Airdye, 2011). Així per exemple, una mostra de sediment de Xitang contenia Cadmi en concentracions fins a 128 vegades superiors a les permeses per les normes ambientals nacionals. Tot i l'existència a Xina de directrius i polítiques ambientals per frenar la contaminació de les agències locals, rutinàriament se les ignora degut als incentius pel desenvolupament econòmic. El govern Xinès va encarregar a investigadors de tot el món solucions pragmàtiques i polítiques que treballessin amb el mercat. Els investigadors van concloure que Xina es beneficiaria d'una "Política Verda" fomentant el cultiu sostenible de cotó i establint un "impost verd" a productes tèxtils per pagar el tractament de les aigües residuals i el reciclatge; aquesta mesura no va ser recolzada per la indústria. L'any 2011 Greenpeace va realitzar la campanya informativa "Draps bruts" on basant-se en investigacions científiques, analitzava el problema de la contaminació tòxica de l'aigua a la Xina, causada pels vessaments de substàncies químiques perilloses per part de la indústria tèxtil. L'informe va treure a la llum, no tant sols els greus problemes de contaminació que suposaven els abocaments d'efluents tèxtils dels complexos industrials als rius Yangsé i Perla; sinó que també va revelar que aquests complexos tèxtils eren proveïdors de grans companyies com H&M, Adidas, Puma, Nike, Calvin Klein, Lacoste, Converse, etc. Fruit d'aquest informe va arrencar la campanya "Detox", promoguda per Greenpeace i que té com a objectiu que les principals marques es comprometin a eliminar progressivament totes les substàncies químiques perilloses dels vessaments i a llarg termini de la mateixa cadena productiva (web: Greenpeace, 2011).

Un altre clar exemple del trasllat del problema de contaminació tèxtil a països emergents és la Índia. La indústria tèxtil a la Índia ocupa el segon lloc (després de l'agricultura) en llocs de treball, dóna ocupació a 35 milions de persones i representa el 10% de les exportacions del país (web: Airdye, 2011). Deixant de banda el canvi climàtic, la creixent demanda d'aigua dolça conjuntament amb la falta de tractament per a les aigües residuals domèstiques, agrícoles i industrials ha portat a alts nivells de contaminació les aigües de llacs, rius i aqüífers del país. Tot i que actualment ja es detecta una clara mancança d'aigua, són poques les indústries que estan adquirint consciència del problema. Es calcula que només un 30% de les empreses tenen una política de consum prudent en el malbaratament d'aigua i només un 22% tenen polítiques de gestió d'aigües residuals. A la ciutat de Tiruppur, al sud del país, les activitats industrials lligades a la producció de gènere de punt han experimentat un ràpid creixement en les últimes dècades; més de 2 milions de persones hi treballen directament, i suposa un 56% del total de les exportacions de gènere de punt de la Índia (web: Nelliya, 2010). Es calcula que actualment a Tiruppur s'utilitzen 85 milions de litres d'aigua al dia en processos de blanqueig i de tenyit, abocant alhora uns 83 milions d'efluents que transporten un volum considerable de productes químics (colorants) utilitzats en els processos humits. Degut a aquests vessaments constants, s'ha contaminat una àrea entre 146 i 218 kilòmetres quadrats. L'agricultura, el subministrament d'aigua potable, la pesca aigües avall en el riu Noyyal i les piscifactories han estat afectats per aquesta la contaminació.

### 1.3 Els colorants

El color és present en tot el què ens envolta i ha fascinat als humans ja des de temps prehistòrics on s'hi van començar a utilitzar pigments d'origen natural, provinents de plantes, arbres, mol·luscs i insectes... s'utilitzaven per pintar les cases, la pell i la roba. Un bon exemple de colorant natural utilitzat al llarg dels segles és l'indigo que prové de la planta *Indigofera tinctoria* (Índia). A la figura 1.1 es pot veure un exemple d'estructura d'un colorant indigoid.



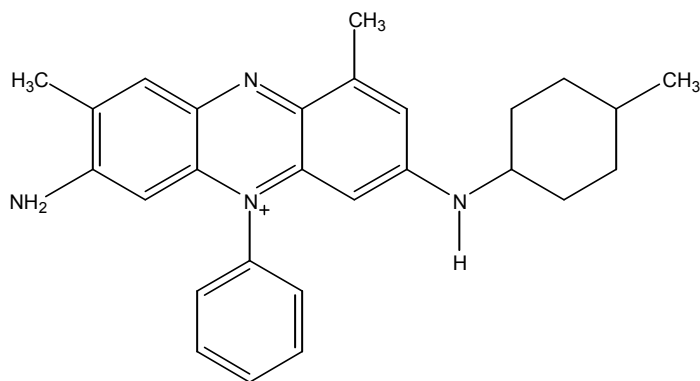
**Figura 1.1.** Exemple de colorant natural. Estructura del colorant Tyrian Purple.

Es creu que fou ja a l'Egipte antic quan es van desenvolupar els primers colorants sintètics com l'Egyptian Blue (mescla de silicats, coure i calci) d'origen inorgànic.

Els colorants sintètics tèxtils però, són tots de naturalesa orgànica i el seu origen és molt més recent ja que no es van començar a utilitzar fins a meitats del segle XIX. Fins aleshores encara

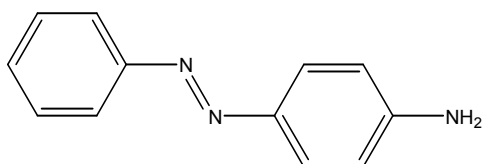
s'utilitzaven colorants naturals, tot i que s'havia anat millorant el procés de fixació del colorant al teixit.

Es creu que el primer colorant sintètic va ser l'àcid pícric, preparat per primera vegada a l'any 1771. L'inici de la indústria del colorant sintètic però, s'atribueix a William Henry Perkin, que va descobrir al 1856 el colorant sintètic Aniline Purple (actualment anomenat Mauveine). A la figura 1.2 es mostra la seva estructura.



**Figura 1.2.** Estructura del colorant Mauveine.

Posteriorment a aquest, un dels descobriments més importants en aquest camp el portà a terme Peters Griens, qui desenvolupà la química dels colorants azo, el grup més important per la seva gran utilització, un exemple dels quals es mostra a la figura 1.3.



**Figura 1.3.** Exemple colorant monoazo, estructura del colorant Aniline Yellow.

Des d'aleshores la indústria dels colorants ha anat a l'alça i encara avui, a principis del segle XXI, s'investiga la producció de nous tipus de colorants i pigments per aplicacions tèxtils, pelleteres, en pintures, plàstics, etc.

Actualment, a més, el camp dels colorants s'ha obert cap a noves aplicacions, amb els anomenats "colorants funcionals" que es caracteritzen per complir amb altres funcions a part de donar color. Es tracta per exemple dels colorants aplicats a camps com l'electrònica

(làsers, pantalles de cristall líquid...), l'electrofotografia i en medicina (fluorimetries, teràpies fotodinàmiques contra el càncer...) (Christie, 2001).

### 1.3.1 Colorants i pigments

El terme colorant s'utilitza freqüentment per referir-se a dos tipus de compostos: colorants i pigments. Els dos s'utilitzen en la coloració de materials i fins i tot arriben a ser substàncies semblants químicament, però es necessari distingir les diferències en les seves propietats i especialment en la seva utilització. Colorants i pigments es diferencien principalment en la seva solubilitat: si els colorants són solubles, els pigments són insolubles. La utilització tradicional dels colorants és en la indústria tèxtil, on normalment es requereix que siguin solubles en medi aquós i en les noves aplicacions com en l'electrònica, on es requereix que siguin solubles en dissolvents orgànics. Per al contrari els pigments són completament insolubles en el medi de coloració i les seves principals aplicacions es troben en pintures, plàstics, coloració de materials com el ciment, materials ceràmics, vidre, etc. Una distinció més acurada entre aquests dos materials seria que, mentre els colorants es dissenyen perquè siguin lligats fortament a molècules polimèriques per a dur a terme la coloració en el procés; els pigments no són atrets pel medi sinó entre ells, per a formar una estructura en forma de xarxa cristal·lina i així resistir qualsevol dissolució (Christie, 2001).

En els següents apartats on es descriuen les principals característiques i les classificacions existents per a colorants i pigments, es parlarà de ambdós grups referint-s'hi amb el terme "colorants".

### 1.3.2 Color i constitució dels colorants

Un dels mètodes més simples, però que actualment encara s'utilitza per explicar l'origen del color fou proposat per Witt al 1876. La seva teoria postula l'existència de dos grups principals (cromòfor i auxocrom) com a responsables de l'aparició del color.

Segons aquesta teoria, el primer grup anomenat **cromòfor** es defineix com el grup d'àtoms responsable del color. En segon lloc es troba el grup **auxocrom** com a potenciador del color. Posteriorment s'ha vist que per explicar la presència de color és necessari que el grup cromòfor estigui dins una estructura conjugada (alternant enllaços senzills amb dobles). Aquesta terminologia és encara avui utilitzada per tal de donar una simple explicació del color, tot i que suggeriments inicials de Witt com que els grups auxocroms són tant essencials com els grups cromòfors per a garantir les propietats dels colorants, han resultat ser poc vàlids, ja que aquest element essencial és l'existència de conjugació dins la molècula. Els grups cromòfors més importants són: en primer lloc l' azo (**-N=N-**) seguit pel grup carbonil (**-C=O**),

metilè (-CH=) i nitro (-NO<sub>2</sub>). Com a grups auxocroms principals trobem el grup hidròxid (-OH), sulfat (-HSO<sub>3</sub>), àcid (-COOH) i amino (-NR<sub>2</sub>). Algunes teories també associen el grup auxocrom amb l'estat d'ionització de la molècula, així grups com el COOH i HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> donen caràcter àcid a la molècula mentre que el grup amino dóna a la molècula un estat d'ionització positiu, per tant caràcter bàsic (web: Stainsfile).

Existeixen altres teories sobre la base del color, les dues més importants són: "València d'enllaç" que explica les propietats dels colorants en base als lligams que mantenen les diferents molècules que componen la seva estructura; i "Teoria de l'acostament de l'orbital molecular al color i la constitució", on s'hi relaciona el color amb l'energia d'excitació dels orbitals moleculars. Aquesta última és una de les més utilitzades sobretot pel que fa a prediccions en la síntesi de nous colorants (Christie,2001).

### 1.3.3 Classificació dels colorants

La referència més utilitzada en la identificació dels colorants és la de l' Índex de Color (*Color Index*) publicat per la *Society of Dyes and Colourists, Bradford, England*. L'Índex de Color és l'obra de referència més important i completa en el camp dels colorants. Atorga a cada colorant o pigment, ja sigui natural o sintètic, dues referències: la primera en base a la seva denominació industrial i la segona segons la seva estructura química. Conèixer aquest índex numèric permet obtenir informació molt útil per cada colorant sobre les seves propietats i els mètodes d'aplicació.

Els colorants poden ser classificats en dues formes principals, en funció de la seva estructura química o segons la seva d'aplicació. Existeix una tercera forma de classificació, però només important a nivell teòric i que es fonamenta en el mecanisme d'excitació electrònica (Christie, 2001).

#### 1.3.3.1 Classificació química

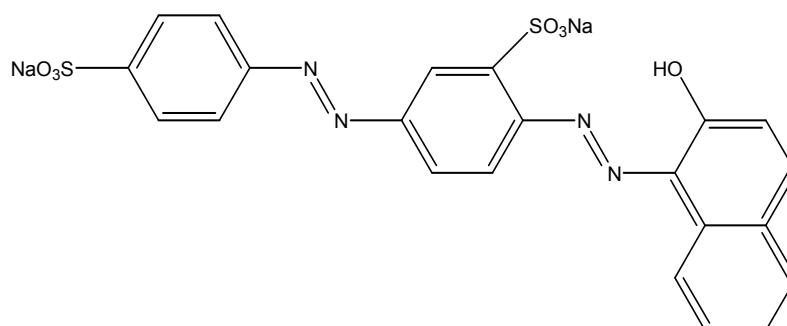
La classificació química, la més important per als colorants, es basa en les característiques estructurals comunes dels colorants, i és la classificació que s'ha utilitzat en aquest treball com a referència. Segons aquesta, les classes de colorants i pigments per ordre d'importància decreixent són: **Azoic**, **Carbonil** (incloent-hi els antraquinònics), **Ftalocianina**, **Ió Arilcarbeni**, **Quinoneimine**, **Sulfur**, **Poliens Dioxacines** i **Nitro**. Cal dir que existeixen altres grups de colorants que no han estat mencionats en aquesta classificació química, o bé perquè no han estat prou investigats o ja que no tenen sortida comercial (Christie,2001; web: Stainsfile).

### Colorants Azoics (Azo)

Els colorants azoics (anomenats també "azo") constitueixen la classe més important de colorants orgànics comercials. Inclouen el 60-70% de tot el mercat de colorants utilitzats en les aplicacions tèxtils al tenir la relació cost-efectivitat millor. Són capaços de donar el doble d'intensitat de color que molts altres colorants i alhora són fabricats a un cost menor. La raó es troba en la seva estructura química; que es pot preparar en grans quantitats segons necessitats d'aplicació i amb pocs requeriments energètics. Els colorants azo són molt importants en colors com els grocs, taronges i vermells.

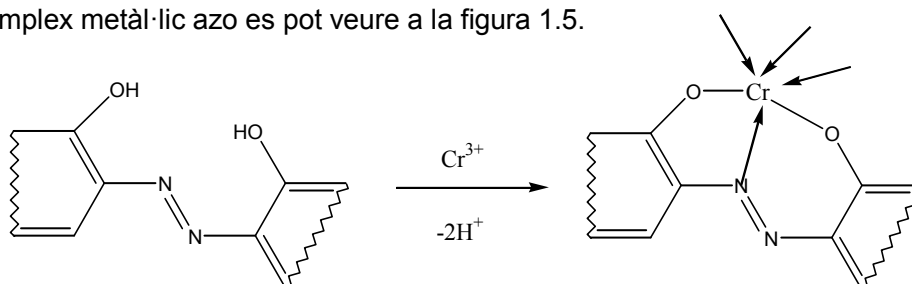
L'estructura comuna per als colorants azo ve determinada per l'enllaç **-N=N-**. Normalment, tot i que no de forma exclusiva, els grups azo van lligats a dos sistemes d'anells aromàtics.

La majoria dels colorants azo contenen un sol enllaç **-N=N-**, i s'anomenen colorants monoazo. A la figura 1.3 es presenta l'estructura del colorant monoazo Aniline Yellow. Tot i que també se'n troben, ja en menys quantitat, amb dos o més enllaços, com l'estructura del colorant diazo Biebrich Scarlet que es mostra en la figura 1.4.



**Figura 1.4.** Exemple colorant diazo, estructura del colorant Biebrich Scarlet.

Un dels subgrups dins la classe azo que té una importància significativa, és la dels colorants complexes metàl·lics azo. S'han combinat colorants azo amb metalls (sobretot metalls de transició) amb la finalitat de millorar la rapidesa del procés de tenyit i la brillantor del producte acabat. És el que s'anomena procés de fixació. Aquests colorants s'utilitzen encara avui, però el seu ús ha quedat restringit bàsicament al tenyit de la llana. Un exemple de la formació d'un colorant complex metàl·lic azo es pot veure a la figura 1.5.



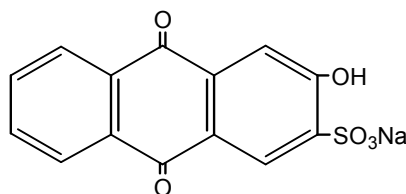
**Figura 1.5.** Formació d'un complex metàl·lic azo entre o,o'-dihidroxi azo i crom(III).

### **Colorants Carbonil**

És el segon grup més important després dels colorants azo, i es caracteritza per la presència del grup carbonil (**-C=O**) com a grup cromòfor. Els colorants carbonil es troben en una gran gamma estructural, i per tant de colors, més amplia que el grup dels colorants azo.

Dins d'aquest grup cal remarcar especialment per les seves aplicacions, el subgrup dels colorants antraquinònics. També, comercialment rellevants es troben altres subgrups com són els indigoids, benzodifuranones, coumarins, naftaliamides...

Els colorants antraquinònics contenen un sistema característic de tres anells de sis àtoms, en el que el grup carbonil es troba en l'anell central i els dos anells exteriors són aromàtics, tal i com s'observa a la figura 1.6.



**Figura 1.6.** Estructura model d'un colorant antraquinònic.

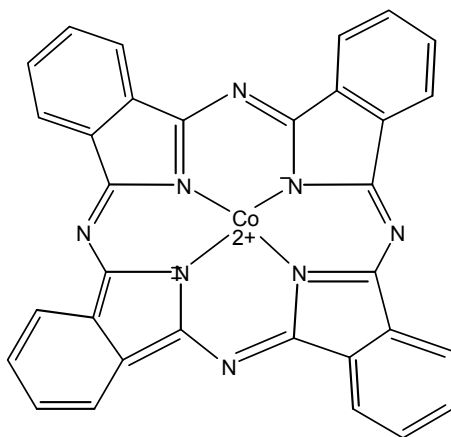
Respecte a les propietats de fermesa i rapidesa en el tenyit, aquests colorants solen ser superiors als colorants azo i s'utilitzen (sobretot els colorants antraquinònics) en aplicacions de tenyit de fibres com el cotó; gràcies a l'habilitat dels grup carbonil per reduir-se de forma reversible en medi soluble. Avui en dia existeixen al voltant d'uns 200 tipus de colorants antraquinònics diferents, i la seva utilització s'ha basat fins ara en l'aplicació de colors verds, blaus i violetes. Tot i això la producció dels colorants carbonil, si la comparem amb la dels azo, és molt menys versàtil i molt més elaborada implicant múltiples etapes intermèdies i la utilització d'intermediaris.

### **Colorants ftalocianines**

Les ftalocianines representen sens dubte el grup cromòfor més important desenvolupat durant el segle XX. Després del seu descobriment la indústria comença a explotar ràpidament les seves propietats úniques pel què fa a colors intensos i elevada brillantor; essent la classe de colorants que ha estat més extensament estudiada.



L'estructura bàsica de les ftalocianines és plana i consisteix en quatre unitats "isoindole" connectades per quatre àtoms de nitrogen. La majoria de les ftalocianines contenen un àtom metàl·lic central, tal com es mostra a la figura 1.7.



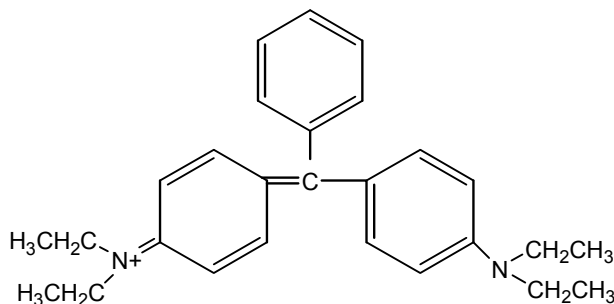
**Figura 1.7.** Estructura del colorant ftalocianina Pigment Blue 75.

Aquesta classe de compostos té molta importància en el camp dels pigments, sobretot pel que fa a aplicacions plàstiques dels colors blau i verd, ja que són estructuralment molt estables, fins i tot a temperatures elevades.

### **Colorants Ió Arilcarbeni**

Són els primers colorants tèxtils que es van desenvolupar ja que *Mauvaise*, el primer colorant orgànic sintetitzat, pertany a aquest grup (veure figura 1.2).

La majoria d'aquests colorants van ser desenvolupats al llarg del segle XIX i XX. Tot i que la seva importància ha anat minvant considerablement, encara avui conserven cert pes dins la indústria tèxtil (s'utilitzen en el tenyit de fibres acríliques). Encara que en el procés de tenyit, donen colors molt vius i extremadament intensos en una àmplia gamma de tons, per a la indústria tèxtil, tècnicament, es troben molt per sota dels colorants azo i carbonil.



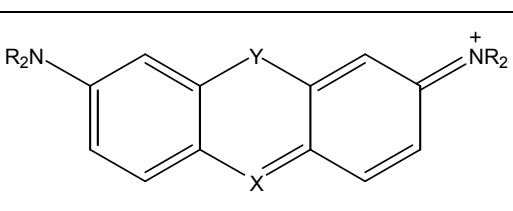
**Figura 1.8.** Estructura del colorant trifenilmetà Malachita Green.

L'estructura bàsica d'aquests colorants es fonamenta en un carboni central rodejat per tres anells aromàtics, aquesta forma els ha donat el nom comú de triarilmetans o trifenilmetans. Un exemple de l'estructura d'aquests colorants es presenta a la figura 1.8.

### Colorants Quinoneimine

Aquests colorants, de relativa poca importància en la indústria tèxtil, es divideixen en diferents subgrups. A la taula 1.1 es mostra un resum de les estructures d'aquests colorants. Existeixen també derivats que s'obtenen enllaçant dos anells aromàtics en la posició orto amb un heteroàtom. A nivell d'ús industrial únicament destaquen els colorants Tiazina.

Taula 1.1. Subgrups colorants Quinoneimine.

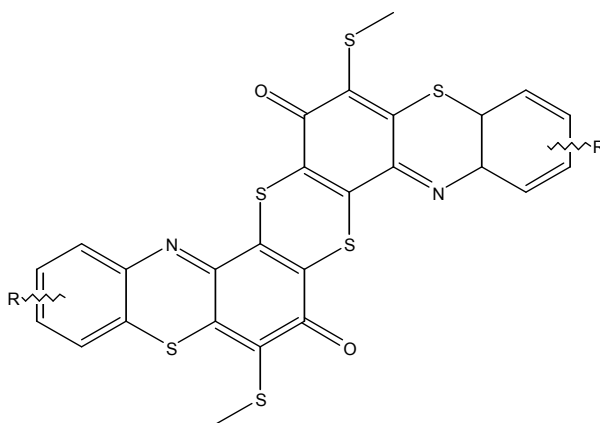
		
X	Y	Tipus
-N=	-O-	Oxazina
-N=	-S-	Tiazina
-N=	-N-	Azina

### Colorants Sulfur

Aquest grup està format per una quantitat petita de colorants. Individualment però, es produeixen en grans quantitats sobretot pel que fa a colors com els negres.

Són mescles d'estructures polimèriques que compten amb un gran nombre de sulfurs en forma de sulfit (-S-), disulfit (-S-S-) i polisulfit (-S<sub>n</sub>-). A la figura 1.9 es mostra l'estructura bàsica que constitueixen els colorants de tipus sulfur.

Són productes tradicionalment poc solubles en aigua i que un cop solubilitzats, tot i produir-se a baix cost, provoquen problemes mediambientals tant greus que la seva utilització ha disminuït de forma molt important en els últims anys.

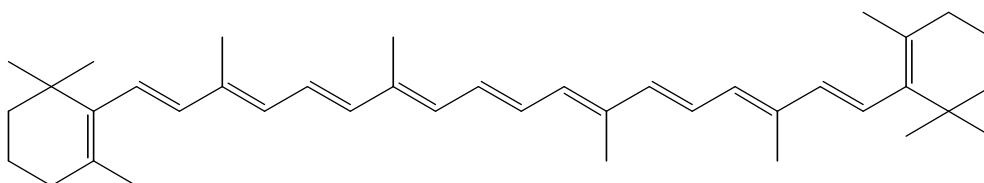


**Figura 1.9.** Estructura model dels colorants sulfur.

### Colorants Polièns i Polimetens

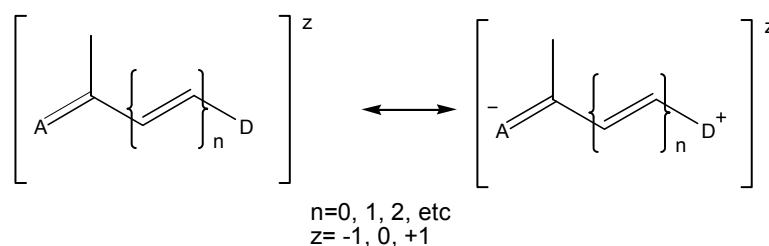
Els colorants polièns i polimetens tenen estructures que compten amb un o més d'un metè (-CH=). Són estructures que contenen una sèrie de dobles enllaços conjugats que donen color a la molècula. Aquestes cadenes solen acabar amb grups alifàtics i alíclics.

El grup del poliè més conegut i utilitzat és el de  $\beta$ -carotens (d'origen natural), tot i que la seva aplicació no es troba a la indústria tèxtil sinó a la bioquímica. La seva estructura típica es mostra a la figura 1.10.



**Figura 1.10.** Estructura típica dels colorants polièns.

Els colorants del grup polimetè es caracteritzen per tenir una àmplia varietat estructural. De forma bàsica però, la seva estructura es resumeix com es mostra a la figura 1.11. On els grups donador (D) i acceptor (A) li donen el caràcter: aniònic, catiònic o neutre.

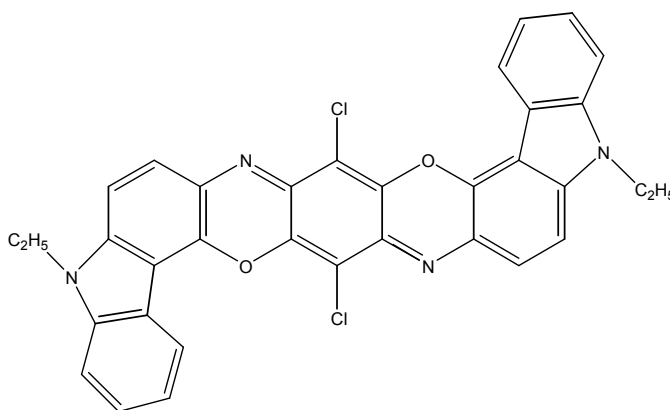


**Figura 1.11.** Estructura típica dels colorants polimetens.

Si bé aquest últim grup és capaç de donar gran intensitat de color; pel que fa a la seva velocitat de tinció és tan pobre que pràcticament no s'utilitzen en la indústria tèxtil (únicament en el tenyit de fibres de polièster); si en canvi en la indústria fotogràfica.

### **Colorants Dioxacines**

Són colorants que es caracteritzen per contenir dos grups oxazines com a grup cromòfor. Tenen una estructura angular, com la que es mostra a la figura 1.12.

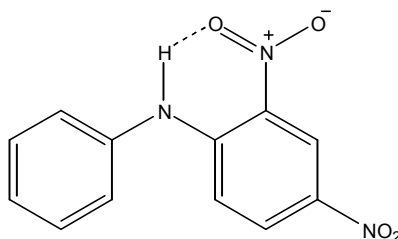


**Figura 1.12.** Estructura del colorant dioxacine Carbazole Violet.

Hi ha relativament pocs colorants d'aquesta classe. Fonamentalment donen colors violetes. Molts d'ells són pigments i tenen una alta resistència a elevades temperatures.

### **Colorants Nitro**

Aquest petit grup de colorants tenen en la seva estructura el grup cromòfor (**NO<sub>2</sub>**), tal i com es mostra en la figura 1.13.



**Figura 1.13.** Estructura model dels colorants nitro.

Tot i que la síntesi d'aquests colorants és relativament simple i fins a cert punt el cost de la seva producció es baixa; la gran majoria d'aquests colorants no s'han arribat a aplicar

comercialment, ja que les seves propietats de tinció són pobres, la seva toxicitat elevada i cal prendre mesures especials durant la seva manipulació a causa de la seva elevada explosivitat.

### 1.3.3.2 Classificació dels colorants segons la seva aplicació

La classificació segons aplicació s'utilitza sobretot quan es parla de pigments i es fonamenta bàsicament en la utilitat que té un colorant per tenyir un determinat tipus de fibra.

Segons aquesta classificació es distingeix entre colorants fixadors utilitzats en el tenyit de fibres proteiques, colorants directes per a fibres de cel·lulosa, colorants dispersos per al polièster... Cada classe té un determinat mecanisme de fixació al teixit. Per exemple, els colorants directes utilitzen forces de Van der Waals per adherir-se al cotó (Christie, 2001).

Segons aquesta classificació, un grup molt important és el grup dels colorants reactius. El desenvolupament dels colorants reactius ha significat una de les innovacions més importants en el sector tèxtil. Són els colorants que es comporten millor durant i després del procés de tenyit, i si fins ara la seva aplicació bàsicament es trobava en el tenyit de fibres de cel·lulosa, ja s'han fet estudis per aplicar-los a fibres sintètiques. La importància dels colorants reactius recau en el fet que aquests colorants no utilitzen diferents forces d'enllaç sinó que són capaços de reaccionar químicament amb els grups reactius de les mateixes fibres. Així per exemple, aquests colorants realitzen un atac nucleofílic a la fibra de cel·lulosa aprofitant els grups -OH que aquesta té. Si bé els colorants reactius es poden preparar amb gairebé qualsevol de les diferents classes químiques, els que tenen més importància són els preparats a partir del grup azo.

## 1.4 Tractaments d'aigües residuals amb colorants

Considerant que la presència de concentracions molt baixes de colorants en els efluentés és molt visible i indesitjable (Nigam et al., 2000), que l'estructura química dels colorants fa que siguin resistents a agents externs com la llum, aigua i agents químics (McKay, 1979) i a la gran diversitat de colorants utilitzats comercialment, encara avui no s'ha desenvolupat un procés universal per al tractament de les aigües residuals tèxtils.

En els següents apartats es mostra un resum dels mètodes d'eliminació de colorants més àmpliament utilitzats.

### 1.4.1 Tractaments fisicoquímics

Els processos fisicoquímics per a l'eliminació del color de l'aigua residual es poden classificar en dues categories principals: els mètodes de transformació del component del color i els mètodes d'eliminació del component del color.

#### 1.4.1.1 Mètodes de transformació del component del color

Aquests tractaments es caracteritzen per la descomposició de l'estructura del colorant i la formació de productes intermedis.

A continuació es fa un breu resum dels processos de transformació de color més utilitzats per a l'eliminació de colorants.

**Processos oxidatius:** Els processos oxidatius es fonamenten en la utilització d'agents oxidants com el peròxid d'hidrogen, el reactiu de Fenton, l'ozó o el permanganat de potassi:

Fenton (Catàlisi Homogènia (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>)): La mescla de peròxid d'hidrogen amb quantitats catalítiques de ferro (II) es coneix com a reactiu de Fenton. Aquesta dissolució presenta una elevada capacitat oxidativa degut a la generació del radical hidroxil (<sup>·</sup>OH) a partir de la següent reacció:



On l'agent oxidant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es descomposa en radicals hidroxils i es caracteritza per ser un poderós oxidant no selectiu capaç de mineralitzar completament la matèria orgànica de naturalesa diversa. El cost del tractament és baix, ja que es basa en un sistema operacional senzill i s'utilitza en efluent resistents a tractaments biològics o efluent tòxic. És un mètode molt efectiu en la decoloració de colorants i pigments, però s'hi generen residus provinents dels colorants i dels mateixos reactius utilitzats (Raghavacharya, 1997; Pérez et al., 2001).

Hipoclorit sodi (NaOCl): Aquest mètode és molt útil en el tractament de colorants azo, on el OCl<sup>-</sup> ataca al grup amino de la molècula iniciant el trencament de l'enllaç N=N. L'utilització de OCl<sup>-</sup> per a l'eliminació de color ha esdevingut poc freqüent degut a la possible producció d'amines aromàtiques i altres compostos tòxics (Robinson et al., 2001).

Ozó (O<sub>3</sub>): L'ozó és un agent molt inestable amb un gran potencial d'oxidació. Alguns estudis han trobat en la utilització d'ozó un camí efectiu per a la decoloració i eliminació de la DQO en

aigües industrials. Altres treballs però, consideren que aquest procés no elimina significativament la DQO al mateix temps que el color (Gupta i Suhas, 2009).

**Processos químics d'oxidació avançada (POA's):** Els POA's han estat proposats en els últims anys com una bona solució a la depuració d'aigües industrials. Els POA's es caracteritzen per combinar més d'un procés oxidatiu al mateix temps. De la mateixa forma que els processos oxidatius, els POA's impliquen la formació d'espècies radicalàries d'elevat poder oxidant fonamentalment el radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ).

Donat que les espècies oxidants radicalàries són poc estables, s'han de generar *in situ* gràcies a l'ús d'activadors, com per exemple catalitzadors de ferro o l'aplicació d'una font de radiació; el principal inconvenient dels POA's és el seu elevat cost per l'ús de reactius ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ...) i/o el seu elevat consum energètic (làmpades per generar radiació UV), que encareixen el procés si es compara amb els tractaments biològics.

Alguns dels processos d'oxidació avançada més estudiats en el tractament d'aigües contaminades amb colorants són:

Foto-fenton o Fotocatàlisi Homogènia ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{UV-vis}$ ) : Actualment, el procés on s'utilitza el reactiu de Fenton, es considerat un dels principals POA's pel tractament d'aigües ja que és un atractiu sistema oxidatiu que no requereix reactius complexos. La combinació del reactiu Fenton amb radiació UV/visible dona lloc al procés de foto-Fenton, responsable de l'increment de la velocitat d'oxidació de la matèria orgànica com a conseqüència de la major velocitat de regeneració del catalitzador  $\text{Fe}^{2+}$ , que permet que es dugui a terme contínuament la reacció de Fenton, i que s'obtingui una major generació de radicals  $\cdot\text{OH}$ . El foto-Fenton es defineix com a fotocatàlisi homogènia ja que és un procés en el qual es produeix una alteració fotoquímica d'alguna espècie com a resultat de l'absorció de radiació per una altra espècie fotosensible, en aquest cas un catalitzador dissolt com el  $\text{Fe}^{2+}$ . La velocitat de decoloració depèn de diversos factors com són: tipologia de radiació, pH i estructura del colorant. (Wu et al., 1999; García-Montaña et al., 2006)

Processos fotoquímics : En els mètodes fotoquímics per la degradació de contaminants dissolts en aigües s'hi proporciona energia als compostos químics en forma de radiació, que és absorbida per les diferents molècules fins arribar a estats d'excitació el temps necessari per experimentar reaccions. L'energia radiant és absorbida formant radicals lliures ( $\text{O}_2\cdot$ ,  $\cdot\text{OH}$ ) i donant lloc a una sèrie de reaccions en cadena. La radiació ultraviolada constitueix un procés d'oxidació avançada per si mateixa, però presenta de forma general una baixa eficàcia en la

degradació de compostos orgànics dissolts si es compara amb els altres processos d'oxidació avançada (Galadi i Julliard, 1996).

Fotocatàlisis heterogènia (Semiconductor/UV-vis/H<sub>2</sub>O): El concepte de fotocatalàlisi heterogènia es basa en l'ús d'un sòlid semiconductor, com per exemple el TiO<sub>2</sub>, que forma una suspensió estable sota irradiació per estimular una reacció en la interfase sòlid/líquid o sòlid/gas (Fernández et al., 2004; Davis et al., 1994; Peralta-Zamora et al., 1999).

Processos d'ozonització (O<sub>3</sub>/UVB, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVB) : Utilitzen ozó com a oxidant. Són processos molt efectius capaços de reduir el color en la seva totalitat. El seu principal inconvenient però, és el temps de vida mitja de l'ozó (al voltant d'uns 20 minuts) i que en ocasions resulta ser un temps massa curt per a la total eliminació del color (Robinson et al., 2001). Per evitar-ho, l'ozó ha de ser utilitzat en continu, cosa que incrementa considerablement el cost d'aquests processos. (Ensar i Bülent, 2007).

**Processos electroquímics d'oxidació avançada (AEOP's)**: El tractament d'aigües residuals per via electroquímica ha estat significativament impulsat durant els darrers deu/quinze anys gràcies al desenvolupament de la tecnologia electroquímica (Martínez-Huitle i Brillas, 2009). Els AEOP's es basen en l'oxidació directa i/o en la indirecta, a través d'espècies actives electrogenerades, de la matèria orgànica arribant a la mineralització total (combustió) o parcial (conversió) dels compostos orgànics. Aquests tipus de tractaments es poden classificar en processos electroquímics clàssics i avançats. Els principals processos electroquímics clàssics són els següents: l'electrodeposició, procés de recuperació de metalls (processos de membrana per gradient de concentració, en base a la diferència de potencial químic entre els dos costats d'una membrana d'intercanvi iònic), processos de membrana per gradient elèctric (és una electrodiàlisi que es fomenta en la diàlisi tradicional, i que permet la desmineralització d'aigües salobres), i l'eliminació i el reciclatge d'àcids i àlcalis; mètodes de separació de fase, com l'electroflotació, l'electrofloculació i l'electrocoagulació, etc.

Aquests processos requereixen poc consum de reactius químics i generen pocs fangs. Són mètodes eficients per a la degradació de contaminants recalcitrants com els colorants (Ogutveren i Kaparal, 1994, Pelegrini et al., 1999); però a cabals relativament elevats s'hi dona una disminució en l'eliminació del colorant i un augment considerable dels costos energètics.



### 1.4.1.2 Mètodes d'eliminació del component del color

En aquests tractaments l'estructura del colorant queda inalterada. Es tracta de mètodes com l'adsorció i els processos de membrana:

**Adsorció en carbó actiu:** L'eliminació de colorant per adsorció en carbó actiu ha estat àmpliament estudiada i utilitzada gràcies a la seva efectivitat en la majoria de colorants. Ara bé, tot i que s'han desenvolupat varies plantes pilot i instal·lacions a escala industrial utilitzant carbó actiu (Crespi i Huertas, 1986); l'adsorció per carbó actiu presenta certes desavantatges com el alts costos associats a la regeneració del carbó actiu, que no és un tractament selectiu i que no resulta efectiu per a tots els colorants (Crisini, 2006).

**Eliminació de color per altres adsorbents:** Actualment existeix un ampli ventall de diferents materials com alternativa al carbó actiu (Baccar et al., 2010). S'ha estudiat la utilització de subproductes de l'agricultura (pellofa de blat de moro, pell de taronja, pell de plàtan, d'arròs, serradures, escorça...), productes secundaris de la indústria com les cendres, materials naturals com les argiles, el silici, la turba, el chitosan... Encara però, que s'han trobat resultats molt prometedors en la substitució del carbó actiu per productes com les argiles, la turba i chitosan, no existeixen pràcticament estudis on s'apliquin aquests adsorbents a escala industrial. Les raons es troben a la gran varietat de possibles adsorbents, que són compostos que depenen del país d'origen, de la seva demanda en el mercat, etc. (Crisini, 2006).

**Processos de membrana:** Aquests mètodes són aplicables si l'efluent conté baixes concentracions de color. S'inclouen sistemes com la osmosis inversa i la ultrafiltració. Aquests processos porten associats alts costos en equips i en consum energètic; a part factors com el possible enverinament de les membranes i la producció de fangs concentrats en contaminant que afecten també directament als costos de l'explotació (Robinson et al., 2001).

**Coagulació-floculació:** Consisteix en afegir reactius que provoquen l'aglomeració dels colorants en col·loides i una floculació posterior per poder-los separar de l'aigua residual. Un exemple d'aquest reactiu és el curcubituril, un polímer compost d'unitats de formaldehid, capaç d'eliminar selectivament colorants formant complexos insolubles entre el colorant i el polímer mitjançant sulfat de ferro i clorur de ferro (Robinson et al., 2001; Dos Santos et al., 2007).

A la taula 1.2 es resumeixen els avantatges i inconvenients dels mètodes fisicoquímics anteriorment comentats per al tractament de colorants en efluents industrials.

**Taula 1.2.** Avantatges i inconvenients dels mètodes fisicoquímics més utilitzats en l'eliminació de colorants dels efluents industrials tèxtils.

Procés	Avantatges	Inconvenients
<b>Processos oxidatius</b>	S'obtenen bons rendiments de decoloració.	Generació de residus. Costos d'explotació elevats. No sempre tenen un bon rendiment en l'eliminació de la DQO
<b>Processos d'oxidació avançada (POA's)</b>	Producció baixa de residus. Tractament eficient per colorants molt recalcitrants	Instal·lacions d'alt cost en execució i explotació. Possible formació de subproductes
<b>Processos electroquímics d'oxidació avançada (AEOP's)</b>	Poc consum de reactius químics. Tractament eficient per colorants molt recalcitrants.	Instal·lacions d'alt cost en execució i explotació.
<b>Adsorció per carbó actiu</b>	Efectiu per una àmplia varietat de colorants.	Costos d'explotació cars, sobretot per a regeneració del carbó actiu.
<b>Altres adsorbents</b>	Millors econòmicament que el carbó actiu.	Es requereix de més estudis a escala industrial. No és un procés destructiu.
<b>Processos de membrana</b>	Capaç d'eliminar tots els tipus de colorants produint efluents de gran qualitat.	Alts costos en instal·lació i explotació. No és un procés destructiu.
<b>Coagulació-floculació</b>	Processos simples. Instal·lacions d'execució fàcil i econòmica	Alts consums de reactius. Altes produccions de fangs fisicoquímics. No és un procés destructiu.

### 1.4.2 Tractaments biològics

Les aigües residuals tèxtils tenen una DQO molt baixa, per tant per la seva càrrega orgànica són aigües residuals assimilables a urbanes i en alguns casos es mesclen amb els efluents urbans per a tractar-les en les Estacions de depuració d'aigües residuals (EDAR's). En la majoria de les EDAR's el tractament de les aigües residuals és biològic. Aquesta DQO però, encara que sigui baixa, és de naturalesa no biodegradable, tant perquè els colorants tenen una estructura química complexa, com per anar acompanyats d'un elevat contingut en sals i

compostos com tensioactius. A més, concentracions excessives de metalls tòxics, pH's extrems, la presència de substàncies inhibidores, i la poca biodegradabilitat de la majoria de colorants i productes químics utilitzats durant el procés de tenyit, fan que els tractaments biològics convencionals (per llots actius a baixa i mitja carrega) no siguin sempre efectius.

**Tractament per llots actius:** és un dels processos biològics més utilitzats a escala industrial pel tractament d'aigües residuals. Una de les característiques més importants dels colorants comercials és la seva resistència a la biodegradació oxidativa, a l'oxidació induïda per la llum o la química, de manera que la majoria d'aquests colorants no mostren biodegradació significativa per llots actius convencionals encara que es trobin a baixes concentracions (Pierce, 1994). Així doncs, la desaparició del color en l'efluent sovint s'associa principalment a l'adsorció dels colorants als bacteris disminuint la seva activitat. Per alguns tipus de colorants, com els azo, s'ha estudiat la seva degradació sota condicions aeròbiques, i s'ha vist que no acaben de ser metabolitzats (Dos Santos et al., 2007). Altres estudis han demostrat que els grups d'àcid sulfònic que s'utilitzen per a augmentar la solubilitat en aigua dels colorants, inhibeixen la degradació aeròbica del colorant, de forma que el mecanisme d'eliminació primari és l'adsorció aeròbica en fangs actius (Ganesh et al., 1994).

**Tractament anaerobi :** La degradació anaeròbica comprèn un primer pas d'adsorció al fang (Weeter i Hodgson, 1977), i un segon on es produeix una digestió anaeròbia que permet decolorar colorants solubles com els de la classe azo. Aquesta decoloració però implica una reducció de l'enllaç azo i s'ha demostrat que les reduccions dels components azo i nitro generen amines tòxiques (Banat et al., 1996; Kapdan et al., 1999; Pinherio et al., 2004; Dawkar et al., 2009).

**Tractament anaerobi seguit d'aerobi :** La utilització de tractaments combinats anaerobis i aerobis donen bons resultats en l'eliminació de color (fase anaeròbia) i alhora s'eliminen els problemes en la formació d'amines (fase aeròbia) (O'Neill et al., 2000; Mendez, 2002). Un exemple el trobem en el mètode d'operació amb llots actius SBR (Sequential Batch Reactor), que combina fases anaeròbiques i aeròbiques per cicles de temps en el tractament d'efluents amb colorants (Shaw et al., 2002; Pazdzior et al. 2009). Yaşar et al. (2008) van comprovar com les amines aromàtiques formades en la fase anaeròbia (on l'eliminació de color arribava fins a un 89%) es reduïen en el cicle aerobi posterior fins a un 92%. Aquest tipus de tractament s'ha ampliat a altres famílies de colorants com poden ser els colorants reactius (Sanyei et al., 2009).

**Tractament per cultius específics :** Alguns estudis han millorat, en temps i eficàcia, l'eliminació de color en efluents tèxtils tractant-los de forma seqüencial a través de cultius bacteriològics i per fongs de podridura blanca específics (Asad et al., 2007; Novotný et al.,

2011). La utilització de la manipulació genètica en l'obtenció microorganismes recombinants suposa també una porta oberta al tractament d'efluents colorejats amb microorganismes capaços d'aconseguir millors rendiments (Forgacs et al., 2004).

### 1.4.3 Tractaments combinats

S'han publicat treballs en els que es combinen tecnologies físico-químiques amb biològiques. La utilització de més d'una tecnologia al mateix temps pot suposar la solució a problemes, que la utilització d'una sola no és capaç de resoldre. Fan et al. (2009) utilitza la combinació de la microelectròlisi amb filtres aerobis, on la reducció dels derivats antraquinònics en el reactor d'electròlisi facilita la biodegradabilitat en el filtre aerobi i augmenta el rendiment en la decoloració. En l'estudi fet per Sirianuntapiboon i Sansak (2008), s'incrementen els rendiments de decoloració biològica per SBR (Seqüencial Batch Reactor) al combinar-la amb la l'adsorció per carbó actiu per al tractament de colorants directes. Alguns estudis han millorant el rendiment del tractament d'aigües contaminades amb colorants per SBR amb un tractament físicoquímic previ com és el mètode Fenton, combinació amb la que s'incrementa la biodegradabilitat de l'efluent (Tantak i Chaudhari, 2006; Rodrigues et al., 2009). Altres autors com Baban et al. (2010) proposen la utilització de reactors biològics aerobis seguits per una ozonització de tal manera que s'arriba a eliminacions per a la DQO del 93% i del 99% per al color.

## 1.5 Aplicació dels fongs ligninolítics a la degradació de colorants

A l'actualitat l'aplicació de fongs de podridura blanca en processos de bioremediació és més que coneguda. S'ha demostrat que aquest tipus de fongs són capaços de degradar un ventall molt ampli de compostos com són els colorants, els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH's), els compostos aromàtics clorats, pesticides o compostos nitroaromàtics entre altres (Pointing, 2001; Wesenberg et al., 2003; Marco-Urrea et al., 2008; Ali, 2010; Gao et al., 2010). Aquesta capacitat, que en alguns casos suposa a més una reducció de la toxicitat de l'efluent (Font et al., 2003; Ramsay i Nyugen., 2002), recau en el fet que els fongs catalitzen la degradació d'aquests compostos mitjançant un mecanisme enzimàtic que també possibilita la formació de radicals lliures no específics. Cal considerar a més, que els fongs de podridura blanca en la majoria de casos, no requereixen un període de preacondicionament a un contaminant concret. A causa de la inducció del sistema de degradació per la limitació de nutrients, ja sigui per una font limitada de carboni o nitrogen, pot iniciar la degradació sense ser necessari una exposició a nivells elevats de contaminants (Reddy i Mathew, 2001).

### 1.5.1 Nexa entre l'estructura dels colorants i l'estructura de la lignina

Els fongs tenen un paper important en el medi ambient com a descomponedors de la cel·lulosa, l'hemicel·lulosa i la lignina (Kirk i Fenn, 1982). Dins d'aquest regne d'organismes, el grup dels fongs de podridura blanca engloba els més actius envers la degradació de lignina, de la qual poden mineralitzar tots els seus components (Dashtban et al., 2010; Martínez et al., 2005).

La lignina és el segon biopolímer més important en la biosfera després de la cel·lulosa, essent un 35% del pes sec del teixit llenyós. La lignina és un polímer aromàtic que forma una xarxa tridimensional sobre les microfibrilles de cel·lulosa i confereix a la cèl·lula de la planta rigidesa, impermeabilitat a l'aigua i resistència a l'atac microbià. Aquest polímer es sintetitza a partir d'unions a l'atzar entre tres precursors fenilpropanoics diferents: *p*-cumaril, coniferil i alcohol sinapílic. Amb enllaços irregulars generen una estructura heterogènia, tridimensional, hidrofòbica i de pes molecular molt elevat. (Barceló et al., 1990). A la figura 1.14 es mostra una possible estructura de la lignina.

Aproximadament un 80-90% dels grups fenil i hidroxil que hi ha en la lignina participen en la formació d'enllaços intermoleculars, donant-li a la lignina el caràcter predominantment no fenòlic. La complexitat física i les característiques químiques que té la lignina, la fan un polímer inaccessible per als mecanismes hidrolítics de degradació més típics d'altres biopolímers (ex: cel·lulosa). La lignina però, pot ser atactada per microorganismes com els fongs ligninolítics. Aquest atac és donat per un procés extracel·lular, no específic i oxidatiu, mitjançant la producció d'enzims per part del fong.

Si es compara l'estructura de la lignina amb la d'alguns colorants es pot observar que els tipus d'enllaços i anells aromàtics són presents en ambdós casos. Fou aquesta similitud la que va

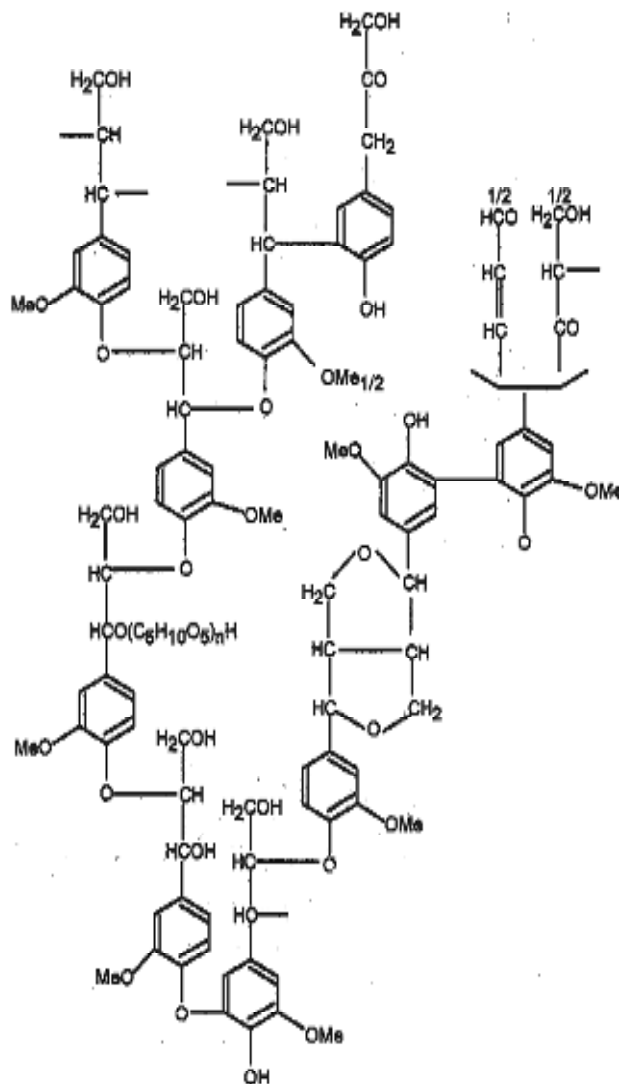


Figura 1.14. Possible estructura de la lignina.

fer plantejar la possibilitat que els colorants poguessin ser substrats susceptibles a ser atacats per aquests enzims (Bumpus i Aust, 1986; Field et al., 1993).

### 1.5.2 Sistema enzimàtic dels fongs de podridura blanca

S'han identificat principalment quatre grups d'enzims relacionats directament amb la degradació de la lignina destacant la lacasa, la lignina peroxidasa (LiP), la manganès peroxidasa (MnP), i la versàtil peroxidasa (VP) (Guillén et al., 1994); així com diferents fongs productors d'aquests enzims: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera*... com els més estudiats.

#### 1.5.2.1 Lacasa

La lacasa (bencenodiol: oxigen oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) pertany al grup de les fenoloxidasas blaves de coure i és l'enzim que es troba més àmpliament distribuït entre els fongs de podridura blanca. Generalment la lacasa s'expressa en forma de diferents isoenzims, ja sigui de forma constitutiva o inductiva (Dittmer et al., 1997).

La lacasa es un dels enzims que van ser dels primers a ser relacionats amb la degradació de la lignina. Aquest enzim presenta una àmplia especificitat de substrat respecte el donador electrònic i catalitza l'oxidació de molts compostos fenòlics i inclús no fenòlics en presència d'alguns intermediaris (Youn et al., 1995; Bourbonnais i Paice., 1990; Srebotnik i Hammel, 2000).

La lacasa conté quatre àtoms de coure (Cu) per molècula, que es classifiquen en diferents tipus (I, II i III) (Thurston, 1994). Els quatre àtoms es troben directament implicats en el cicle catalític de l'enzim, que té lloc mitjançant la reducció d'una molècula d'oxigen per donar dues molècules d'aigua i l'oxidació monoelectrònica i simultània de molts substrats orgànics. La reacció global es pot expressar d'aquesta forma:



El cicle catalític complet de la lacasa es mostra a la figura 1.15. En presència d'oxigen, el donador d'electrons (AH) transfereix un electró al coure I, seguit de la transferència de dos electrons al coure III per l'oxidació de dues molècules més de substrat. Els electrons acumulats es transfereixen a un àtom d'oxigen, que donarà lloc a una molècula d'aigua, a partir de l'espècie  $\text{O}_2^{2-}$ , i a la formació d'un radical hidroxil associat ( $\text{O}^\cdot$ ). A l'última etapa de cicle, s'oxida una altra molècula de substrat i s'acumula un electró en el coure II, que serà transferit al radical hidroxil amb la participació de dos protons del medi, donant lloc a la segona molècula d'aigua i tancant el cicle enzimàtic. Mitjançant aquest mecanisme, la lacasa genera

radicals fenoxi a partir de compostos fenòlics. Aquests radicals són altament reactius i provoquen noves oxidacions, ja siguin espontànies o per via enzimàtica (Thurston, 1994, Shin et al., 1996).

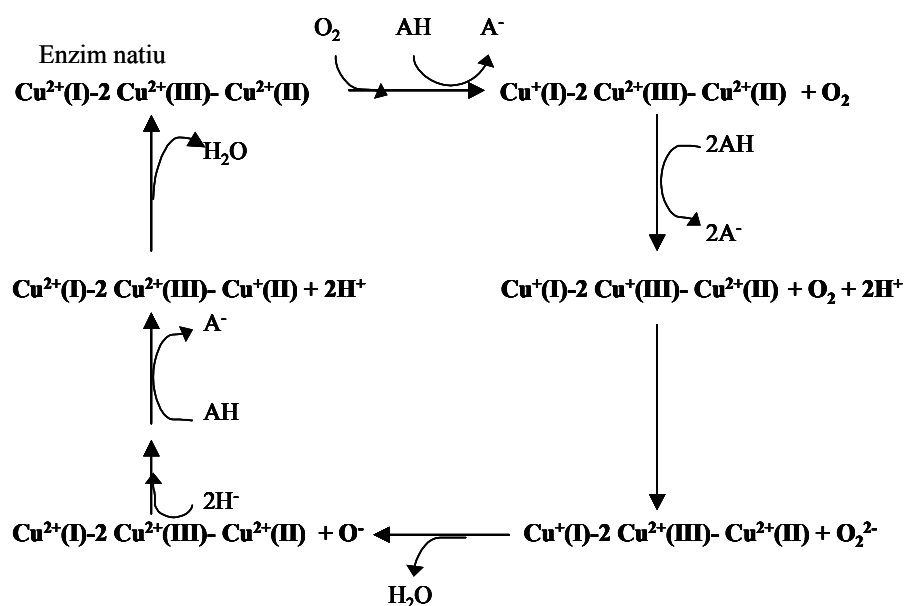


Figura 1.15. Cicle catalític de la lacasa.

### 1.5.2.2 Peroxidases extracel·lulars

La principal diferència entre la lacasa i les peroxidases recau en l'acceptor d'electrons, ja que la lacasa utilitza l' $\text{O}_2$  i les peroxidases el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

La lignina peroxidasa (diarilpropà: peròxid d'hidrogen oxidoreductasa, EC 1.11.1.14) va ser el primer enzim ligninolític descobert en el fong de podridura blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Tien i Kirk, 1983). Aquesta peroxidasa és capaç d'oxidar compostos aromàtics tant fenòlics com no fenòlics. Durant seu cicle catalític (Figura 1.16), el peròxid d'hidrogen oxida amb dos electrons l'enzim a un compost intermedi (LiPI). A continuació, aquest capta un electró del compost aromàtic, ja sigui fenòlic ( $\text{Ar-OH}$ ) o no fenòlic ( $\text{Ar}$ ), amb el que es produeix l'estat d'oxidació monovalent de l'enzim (LiPII) i el radical catió aromàtic ( $\text{Ar}^+$ ) o fenoxil ( $\text{Ar-O}^\bullet$ ) del substrat. Per últim, una oxidació addicional d'una altra molècula de substrat transforma la LiPII en l'estat original de l'enzim. El peròxid d'hidrogen que inicia el cicle és format extracel·lularment pels fongs a partir dels enzims glicoxal oxidasa i superòxid dismutasa (Leonowicz et al., 1999).

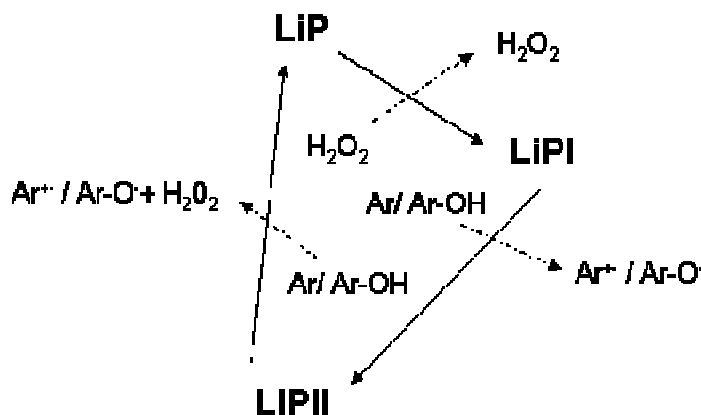


Figura 1.16. Cicle catalític de la lignina peroxidasa.

L'enzim manganès peroxidasa (Mn(II): peròxid d'hidrogen oxidoreductasa, EC 1.11.1.13) va ser descobert posteriorment a la LiP (Kuwahara et al., 1984) però el nombre de fongs en els que s'ha detectat és superior a la LiP (Fakoussa i Frost, 1999).

El seu cicle catalític (Figura 1.17) és similar al de la LiP, però difereix en dos aspectes. D'una banda, el compost intermedi MnPI oxida  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  i aquest darrer compost, estabilitzat amb certs àcids orgànics, actua com a agent oxidant generant radicals lliures. D'altra banda, el compost intermedi MnPII només pot ser reduït al seu estat original per  $Mn^{2+}$  i depèn estrictament d'aquest ió per tancar el cicle.

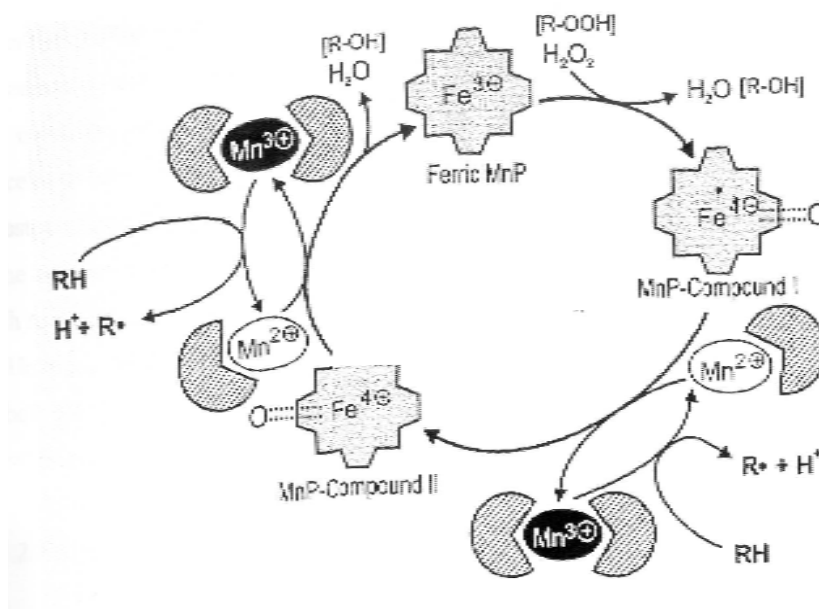


Figura 1.17. Cicle catalític de la manganès peroxidasa (Hofrichter, 2002).

La versàtil peroxidasa (VP, EC 1.11.1.17) pertany a les peroxidases hemo de classe II, grup A.3. Es troba present en els gèneres *Pleurotus*, *Bjerkandera* i comparteix les propietats



catalítiques de MnP i LiP (Martínez et al., 1996; Hofrichter et al., 2010). Tal com succeeix amb MnP, exhibeix una elevada afinitat per  $Mn^{2+}$  i catalitza l'oxidació de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ . La VP oxida dimetoxibenzè, dímers de lignina, fenols, amines, colorants i alcohols aromàtics (Hofrichter et al., 2010). En absència de  $Mn^{2+}$ , VP oxida substrats fenòlics i no-fenòlics de forma similar a com ho fa LiP.

### 1.5.2.3 Sistema citocrom P450

Inicialment, l'habilitat d'un dels primers fongs de podridura blanca, *P. chrysosporium*, utilitzats en tractaments de bioremediació per a degradar contaminants en condicions de limitació de nitrogen, s'atribuïa als enzims ligninolítics extracel·lulars, particularment a LiP i MnP. Tot i això, Yadav i Reddy (1992 i 1993) van comprovar que certs contaminants orgànics, com els àcids 2,4-diclorofenoxiacètic i 2,4,5-triclorofenoxiacètic, podien ser degradats, en medi ric en nitrogen, sense l'expressió dels enzims LiP i MnP. Per tant, es va deduir que altres sistemes enzimàtics, a banda de LiP i MnP, estaven implicats en la degradació d'aquests contaminants. Estudis recents han demostrat que el sistema enzimàtic intracel·lular citocrom P450 exerceix un paper important en la degradació de diferents contaminants orgànics per fongs ligninolítics. Aquesta evidència es basa en la disminució important de la degradació que s'observa en presència de compostos inhibidors del citocrom P450 en el medi de tractament (Doddapaneni i Yadav, 2004). Les principals reaccions catalitzades pels enzims intracel·lulars citocrom P450 són l'epoxidació dels dobles enllaços C=C i la hidroxilació de compostos aromàtics. Subramanian i Yadav (2008) suggereixen que el citocrom P450 exerceix un important paper en la natura en el procés de mineralització dels metabòlits ligninolítics resultants de la despolimerització de la lignina pels enzims peroxidases.

### 1.5.3 Degradació de colorants amb fongs

El fong ligninolític més àmpliament estudiat en referència a la degradació de productes xenobiòtics és *Phanerochaete chrysosporium*. La capacitat de decoloració d'altres fongs però, com *Hirschioporus larincinus*, *Inonotus hispidus*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Ganoderma WR-1*, *Irpex Flavus*... també s'ha estudiat (Banat et al., 1996; Moreira M.T et al., 2000; Eicheleroová et al., 2006, Chander i Arora, 2007, Revankar i Lele, 2007).

S'ha demostrat per exemple que colorants azo, que tenen problemes de degradació en sistemes biològics convencionals, poden ser degradats per *Phanerochaete chrysosporium* (Paszczynski i Crawford, 1995); i que en el mecanisme responsable de la decoloració participen enzims extracel·lulars com la lignina peroxidasa, manganès peroxidasa o lacases (Michel et al., 1990; Wesenberg et al, 2003; Chander i Arora, 2007).

Fins al moment, pocs sistemes amb fong a escala pilot s'han desenvolupat per a la degradació de colorants. En el 2001, la companyia Zytex va patentar un compost amb enzim lacasa comercialitzat sota el nom Zytile capaç de degradar el colorant Índigo segons un mecanisme específic. Durant el període 2004-2008 es desenvolupa el projecte Sophied (web: Sophied, 2006). Dins el 6è programa Marc de la Unió Europea, el projecte Sophied englobava la coordinació dels estudis de 7 universitats, 3 centres de recerca i 16 empreses que amb un pressupost d'uns 9,6 milions d'euros, tenia com a finalitat l'estudi dels processos biotecnològics a aplicar per a les indústries tèxtils; des del tractament dels seus efluent a escala industrial amb enzims, fins al desenvolupament de "bio-colorants" a través de la transformació de colorants utilitzats en la indústria amb enzims ligninolítics (Enaud et al, 2010).

### 1.5.4 Mecanismes de degradació de colorants amb enzims ligninolítics

Pràcticament no hi ha estudis de les rutes de degradació dels colorants amb enzims ligninolítics. Hipotèticament es poden generar una gran varietat de metabòlits intermitjos, i els anàlisis d'aquests productes de degradació solen presentar dificultats al tractar-se sovint de productes similars entre ells i de vides mitjanes curtes (Khindaria et al., 1995, López et al., 2004).

Existeixen dos tipus de treballs publicats pel que fa a possibles rutes de degradació. Una primera referència es troba en el treball de Goszczynski et al. (1994) on es van utilitzar isoenzims de MnP i LiP de *Phanerochaete chrysosporium* per estudiar el mecanisme de degradació de l' àcid 3,5-dimetil-4-hidroxi-azobenzeno-4'-sulfònic i de l' àcid 3-metoxi-4-hidroxi-azobenzeno-4'-sulfonamida. La identificació de diversos metabòlits va permetre el plantejament de diversos mecanismes, amb dues possibles rutes de degradació tal com es mostra a la figura 1.18. La primera suposa una ruptura simètrica de l'enllaç azo generant-se el radical catiònic sobre l'enllaç N=N. Posteriorment, amb un atac nucleofílic de l'aigua, l'enllaç es redueix generant amines com a productes finals. En la segona ruta es produeix una ruptura asimètrica, produint-se com a conseqüència quinones i fenildiacens principalment. Lopez et al. (2004) va arribar a la mateixa conclusió (possible trencament de l'enllaç azo simètricament o asimètricament) en el tractament del colorant monoazo Orange II per l'enzim MnP.

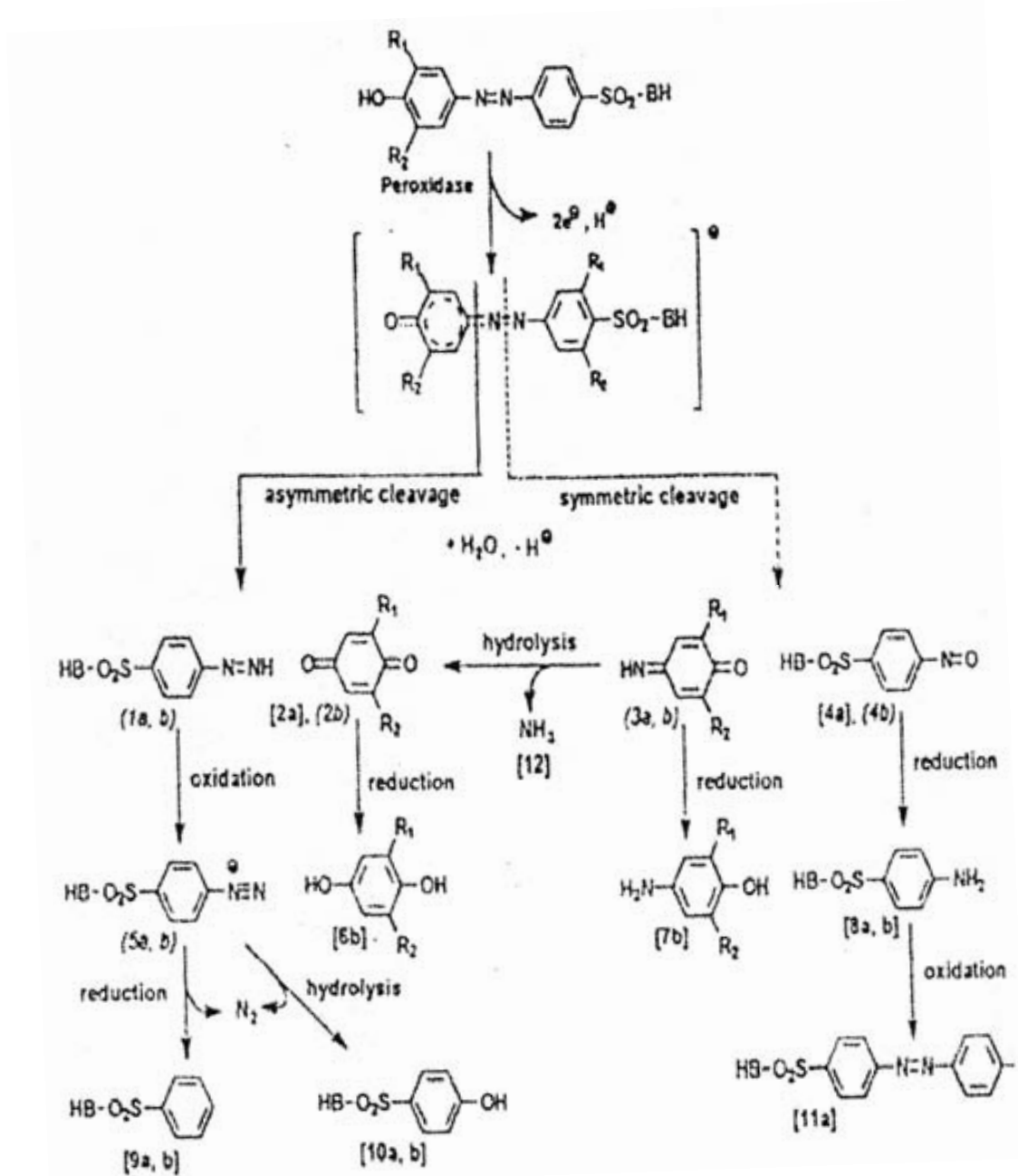


Figura 1.18. Mecanisme postulat per Goszczynski et al. (1994).

Una altra proposta la trobem en els treballs fets per Chivukula i Renganathan (1995) i Spadaro i Renganathan (1994), on es va utilitzar LiP purificada per estudiar la degradació del colorant azo Disperse Yellow 3 i altres compostos. En aquests estudis es van trobar com a productes principals de degradació, quinones i hidroperoxidsfenílics (SPH), postulant mecanismes que impliquen una ruptura asimètrica del colorant (figura 1.19 i 1.20).

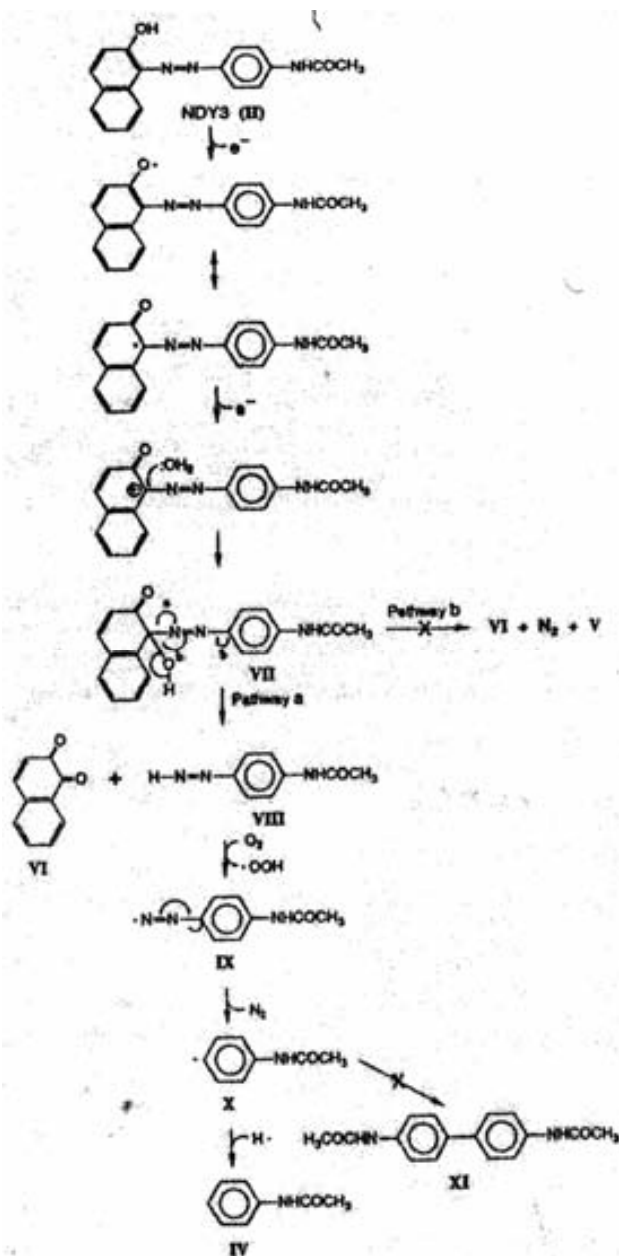


Figura 1.19. Mecanisme postulat per Chivukula i Renganathan (1995).

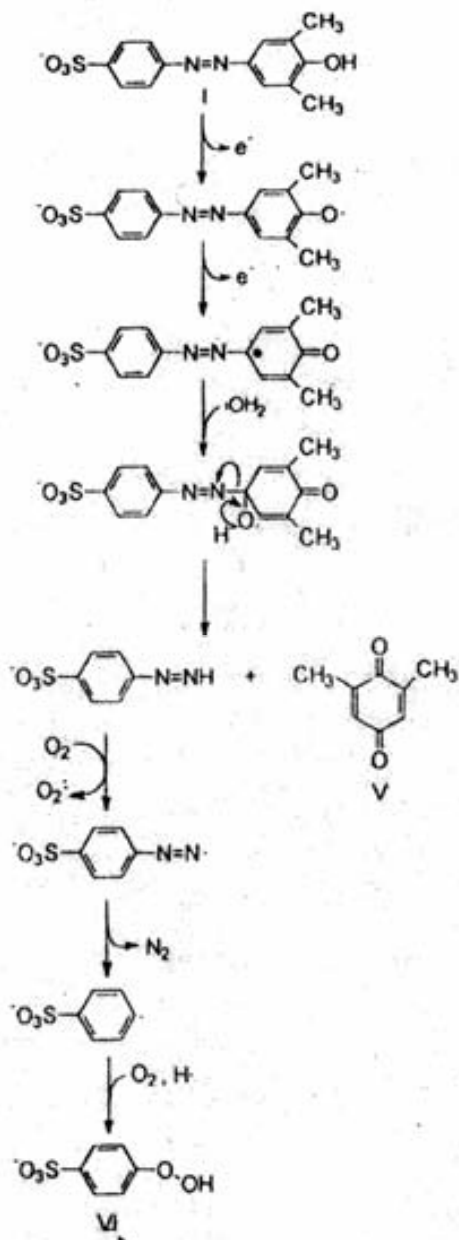


Figura 1.20. Mecanisme postulat per Spadaro i Renganathan (1994).

## 1.6 El fong *Trametes versicolor* i la seva morfologia

*Trametes versicolor* és un fong filamentós de podridura blanca i s'anomena així per l'aparença blanquinosa que adquireix la fusta després de l'atac del fong, ja que és un potent degradador de lignina on l'enzim lacasa hi és de gran importància donat que és constituït pel fong. Aquest fong, per la seva forma, és conegut popularment com a fong de la cua de gall d'indi (*turkey tail*). Els colors de les seves bandes són variables, depenent de la genètica de l'organisme i del medi on es troba (imatges 1.5 i 1.6) Aquest fong es troba distribuït arreu del món i es pot

trobar tot l'any, tot i que amb més facilitat a la tardor i a l'hivern que alliberen les seves espores (no s'ha descrit que ho faci en condicions de laboratori) (Gerhardt et al., 2000).



**Imatge 1.5 i 1.6.** Fong *Trametes versicolor* en el seu estat natural.

La morfologia de creixement dels fongs filamentosos en els cultius submergits varia des del creixement dispers (miceli) a pèl·lets que són agregats molt compactes i de forma esfèrica (imatge 1.7). Generalment, els treballs amb cultius submergits es fan amb en forma de pèl·lets. El tipus de morfologia que s'obté durant el creixement del fong depèn tant de la composició del medi de cultiu com de les condicions de creixement. Així la font de carboni, la relació C/N, el pH i la força iònica del medi, condicionen la morfologia, però també el nivell d'inòcul, l'aeració, el tipus i la velocitat d'agitació són determinants en el procés de creixement. La morfologia del fong condiciona en molts casos l'aplicació industrial. Així per exemple s'ha observat que la producció d'alguns metabòlits secundaris està molt relacionada amb la morfologia de creixement (Smith i Lilly, 1990). Els cultius amb predomini del creixement dispers es caracteritzen per assolir viscositats molt elevades i amb clar comportament no-newtonià del brou de cultiu (Sarrà et al., 1996). Aquest fet influeix de forma significativa els processos de transferència de matèria i energia. Per altra part, els cultius amb una morfologia de pèl·lets no experimenten variacions de viscositat del brou i aquesta es comparable a la de l'aigua. Tanmateix l'estructura de pèl·let implica generalment pel microorganisme unes condicions limitants de nutrients, entre els que cal incloure l'oxigen, a causa dels problemes difusionals. Aquestes limitacions depenen fortament de la mida del pèl·let.



**Imatge 1.7.** Pèl·lets del fong *Trametes versicolor* resuspesos en medi líquid.

Es coneix que aquest fong és capaç de produir els enzims lacasa, LiP i MnP (Wesenberg et al., 2003) però la seva expressió depèn de la composició del medi (Acebes, 2008).

### **1.7 Utilització del fong ligninolític *Trametes versicolor* en processos de decoloració**

Existeix una ampla informació en la bibliografia especialitzada en referència a tractaments de colorants amb fongs i/o enzims ligninolítics amb alts rendiments de decoloració, resulta difícil doncs fer una comparació del resultat degut a la gran diversitat de sistemes descrits, on hi ha diferències importants en les condicions experimentals.

Considerant que el treball de recerca que es presenta s'emmarca en la utilització del fong ligninolític *Trametes versicolor* en condicions de producció de l'enzim lacasa, a la taula 1.3 es presenta un resum de diferents estudis de tractament de colorants amb el fong *Trametes versicolor* i l'enzim lacasa.

Taula 1.3. Resum de diferents estudis de decoloració amb *Trametes versicolor* i enzim lacasa.

Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
<b>Azo</b>						
Amaranth	Aplicació del brou de cultiu amb enzim en la decoloració	7	6 h	Placa	Estudia la decoloració en un rang de 40-60°C. Comparativa decoloració amb la realitzada en medi sòlid.	Theerachat et al., 2012
	Estudi de la decoloració amb fong.	100	3,5 h	Erlenmeyer	Estudia els efectes en la disminució de la toxicitat en el medi.	Ramsay i Nguyen, 2002
		100	1 dia	Erlenmeyer	Estudia els efectes en la disminució de la toxicitat en el medi.	
Tropaeolin O	Estudi de la decoloració amb fong.	100	3 dies	Erlenmeyer	Estudia els efectes en la disminució de la toxicitat en el medi.	Swamy i Ramsay, 1999
Remazol Brilliant Orange 3R		100	3 dies	Erlenmeyer	No estudia els enzims utilitzats pel fong durant el procés.	
Direct Blue 71	Aplicació del brou de cultiu en la decoloració	27	6 h	Placa	Estudia la decoloració en un rang de 40-60°C. Comparativa decoloració amb la realitzada en medi sòlid.	Theerachat et al., 2012
Direct Blue 71	Estudi de la decoloració via reacció enzimàtica	84	3 h	Erlenmeyer	Utilització enzim+DMHAP.	Nyanhongo et al., 2001
Remazol Black B	Estudi de la decoloració amb fong.	100	2 dies	Erlenmeyer	No estudia els enzims utilitzats pel fong durant el procés.	
Congo Red		100	22 h	Erlenmeyer	Estudia els efectes en la disminució de la toxicitat en el medi.	

Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
Congo Red	Estudi adsorció en pèl·lets nadius i modificats	100	1,5 h	Reactor fluiditzat i Reactor per biodiscs	Adsorció del colorant segons isoterma de Langmuir i cinètica d'adsorció per pseudo-segona ordre.	Binupriya et al., 2008
	Estudi de la producció en medi sòlid i decoloració per extracte d'enzim purificat	100	4 h	Erlenmeyer amb medi sòlid	Utilització ABTS i Syringaldazine per a la mesura de constants cinètiques de decoloració	Stoilova et al. 2010
Orange II		100	4 h	Erlenmeyer amb medi sòlid	Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten.	
Reactive Blue 114	Estudi de la decoloració per enzim.	85-92	50 min	Reactor	Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	Cristóvão et al., 2008
Reactive Red 180		92	500 min	Reactor	Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	
Reactive Black 5	Estudi de la decoloració amb enzim lliure i enzim immobilitzat	16-10	20 h	Erlenmeyer/ lit empaquetat	Estudia tant la decoloració com la detoxificació aconseguida amb ambdós enzims	Champagne i Ramsay, 2010
	Aplicació del brou de cultiu en la decoloració	5,2	6 h	Placa	Estudia la decoloració en un rang de 40-60°C. Comparativa decoloració amb la realitzada en medi sòlid.	Theerachat et al., 2012
	Estudi de la decoloració per enzim	88	3 h	Erlenmeyer	Utilització enzim+HOBT.	Nyanhongo et al., 2001



Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
Reactive Black 5	Estudi de la decoloració per enzim	93	10 min	Reactor	Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten.	Cristóvão et al., 2008
	Modelització en la decoloració d'un pseudo-efluent tèxtil	60-80	20-200 min	Reactor	Mescla diferents concentracions de colorants Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten.	Cristóvão et al., 2009
Reactive Yellow 15	Estudi de la decoloració per enzim	100	22 min	Reactor	Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	Cristóvão et al., 2008
	Modelització en la decoloració d'un pseudo-efluent tèxtil	60-80	20-200 min	Reactor	Mescla diferents concentracions de colorants Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	Cristóvão et al., 2009
Reactive Red 239	Estudi de la decoloració per enzim	100	400 min	Reactor	Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	Cristóvão et al., 2008
	Modelització en la decoloració d'un pseudo-efluent tèxtil	60-80	20-200 min	Reactor	Mescla diferents concentracions de colorants Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten.	Cristóvão et al., 2009
Acid Blue 161	Comparació d'adsorció de colorant sobre carbó actiu amb la biosorció sobre fong ligninolític	52-75	48 h	Erlenmeyer	Estudi de l'adsorció en biomassa a diferents condicions de pH, temperatura i utilització de chitosan. Comparació amb carbó actiu.  Descripció de la cinètica l'adsorció per equació de pseudo-primer i pseudo - segon ordre	Aksu et a., 2008.

Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
Acid Red 66	Estudi de la decoloració amb fong	100	8 dies			Sukumar et al., 2009
Direct Blue 15	Estudi de la biodegradació per fong <i>Trametes versicolor</i> immobilitzat	93-98		Reactor de lit fixe	Monitorització de la producció enzimàtica de lacasa i MnP	Pazarlioglu et al., 2010
<b>Ió arilcarbeni</b>						
Phenol Red	Estudi de la producció en medi sòlid i decoloració per extracte d'enzim purificat	100	4 h	Erlenmeyers amb medi sòlid	Utilització ABTS i Syringaldazine per a la mesura de constants cinètiques de decoloració  Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	Stoilova et al., 2010
Acid Violet 17	Estudi de la decoloració per enzim	100	3 h	Erlenmeyer	Utilització enzim+HOBT	Nyanhongo et al., 2001
Basic Red 9	Estudi de la decoloració per enzim	95	3 h	Erlenmeyer	Utilització enzim+MPT	
Acid blue 74	Estudi de la decoloració amb enzim lliure i enzim immobilitzat	34-85	10 h	Erlenmeyer/ lit empaquetat	Estudia tant la decoloració com la detoxificació aconseguida amb ambdós enzims	Champagne i Ramsay, 2010
	Estudi de la decoloració per enzim	100	3 h	Erlenmeyer		Swamy i Ramsay, 1999
<b>Carbonil</b>						
Acid Green 27	Estudi de la decoloració amb fong, amb brou de cultiu i brou de cultiu més inductors	0-100	15 dies/ 25 min	Erlenmeyer	Utilització de inductors com ABTS	Wong i Yu, 1999

Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
Alizarin Red S	Aplicació del brou de cultiu en la decoloració	75	6 h	Placa	Estudia la decoloració en un rang de 40-60°C.  Comparativa decoloració amb la realitzada en medi sòlid.	Theerachat et al., 2012
Remazol brilliant Blue R	Decoloració amb enzim immobilitzat	20-80	45-120	Erlenmeyer	Utilitza diferents suports per immobilitzar l'enzim. Utilitza inductors com HOBT. Complementa la degradació enzimàtica amb el tractament per fotocatalisi heterogènia	Peralta-Zamora et al., 2003
Remazol brilliant Blue R	Aplicació del brou de cultiu en la decoloració	15	6 h	Placa	Estudia la decoloració en un rang de 40-60°C.  Comparativa decoloració amb la realitzada en medi sòlid.	Theerachat et al., 2012
	Estudi de la decoloració amb fong	100	7 dies	Erlenmeyer	No estudia els enzims utilitzats pel fong durant el procés	Nyanhongo et al., 2001
	Estudi de la producció en medi sòlid i decoloració per extracte d'enzim purificat	100	4 h	Erlenmeyers amb medi sòlid	Utilització ABTS i Syringaldazine per a la mesura de constants cinètiques de decoloració  Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten.	Stoilova et al., 2010
Disperse blue 3	Estudi de la decoloració amb enzim lliure i enzim immobilitzat	70-82	10 h	Erlenmeyer/lit empaquetat	Estudia tant la decoloració com la detoxificació aconseguida amb ambdós enzims	Champagne i Ramsay, 2010
Reactive blue 19	Estudi de la decoloració amb enzim lliure i enzim immobilitzat	73-76	8 h	Erlenmeyer/lit empaquetat		

## Capítol 1

Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
Reactive blue 19	Estudi de la decoloració per enzim	100	3 h	Erlenmeyer		Nyanhongo et al., 2001
Acid blue 225	Estudi de la decoloració per enzim	100	3 h	Erlenmeyer		
<b>Ftalocianines</b>						
Reactive Blue 15	Estudi de la decoloració amb fong	100	7 dies	Erlenmeyer	No estudia els enzims utilitzats pel fong durant el procés	Swamy i Ramsay, 1999
<b>Sulfur</b>						
Indigo Carmine	Aplicació del brou de cultiu en la decoloració	10	6 h	Placa	Estudia la decoloració en un rang de 40-60°C.  Comparativa decoloració amb la realitzada en medi sòlid.	Theerachat et al., 2012
Indigo Carmine	Estudi de la producció en medi sòlid i decoloració per extracte d'enzim purificat	100	4 h	Erlenmeyers amb medi sòlid	Utilització ABTS i Syringaldazine per a la mesura de constants cinètiques de decoloració  Descripció de la cinètica enzimàtica per Michaelis-Menten	Stoilova et al., 2010
<b>Mescles</b>						
Gris Lanaset G	Estudi del procés de degradació del colorant amb fong	34-95%	Fins a 32 dies	Reactor 0,5L	Estudia els rendiments obtinguts amb fon i enzim  Estudia la producció enzimàtica en base a l'entrada de colorant al sistema.	Romero et al., 2006

Colorant	Objectiu principal de l'estudi	% (*)	Temps	Escala de decoloració	A considerar en la decoloració	Referència
Gris Lanaset G	Estudi del procés de degradació del colorant amb fong en operació en continu	34-90%	Fins 40 dies	Reactor 1,5L	Analitza el procés en continu amb renovacions parcials de biomassa.	Blánquez et al., 2006
		30-85%	Fins 40 dies	Reactor 1,5L	Estudi des rendiments de decoloració en base al temps de residència hidràulics i l'alimentació de glucosa al sistema.	Blánquez et al., 2007a
	Adaptació del procés de degradació del colorant a condicions industrials.	60-90%	Fins 110 dies	Reactor 10L	Treballa en reactor de 10 L. Procés sota condicions no estèrils i utilització de nutrients industrials. Estudi del comportament del sistema amb aigües reals tèxtils.	Blánquez et al., 2007b

(\*) Percentatges de decoloració al finals dels experiments.

## 1.8 Bibliografia

- Ali H., 2010. Biodegradation of Synthetic Dyes- A Review. *Water Air Soil Pollution*. 213, 251-273.
  
- Acebes J.A., 2008. Biodegradacion de fármacos  $\beta$ -bloqueantes mediante hongos ligninolíticos. Master Tesys. Universitat Autònoma de Barcelona.
  
- Aksu Z., Tatli A.I., Tunç Ö., 2007. A comparative adsorption/biosorption study of Acid .Blue 161: Effect of temperature on equilibrium and kinetic parameters. *Chemical Engineering Journal*. 142, 1, 23-39
  
- Asad S., Amoozegar M.A., Pourbabaee A.A., Sarbolouki M.N., Dastgheib S.M.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology*. 98, 2082-2088.
  
- Baban A.; Yediler A.; Avaz G.; Hostede S.S., 2010. Biological and oxidative treatment of cotton textile dye-bath effluents by fixed and fluidized bed reactors. *Bioresource Technology*. 4,1147-1152.
  
- Baccar R., Blánquez P., Bouzid J., Feki M., Sarrà M., 2010. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies on adsorption of commercial dye by activated carbon derived from olive-waste cakes. *Chemical Engineering Journal*. 165, 457-464.
  
- Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., 1996. Microbiol decolorization of textile-dye-containing effluents, a review. *Bioresource Technology*. 58, 217-227.
  
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B., Sànchez R., 1990. *Fisiologia vegetal*. Ed. Pirámide, 5a. Edició. Madrid
  
- Binupriya A.R., Sathishkumar M., Swaminathan K., Kuz C.S., Yun S.E., 2008. Comparative studies on removal of Congo Red by native and modified mycelial pellets of *Tramets versicolor* in various reactor modes. *Bioresource Technology*. 99, 1080-1088.
  
- Blánquez P., Sarrà M., Vicent M.T., 2006. Study of the cellular retention time and the aptrial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process. *Water Research*. 40, 1650-1656.

- Blázquez P., Caminal G, Sarrà M., Vicent T., 2007a. The effect of HRT on the decolourisation of the Grey Lanaset G textile dye by *Trametes versicolor*. Chemical Engineering Journal. 126, 163-169.
  
- Blázquez P., Sarrà M., Vicent T., 2007b. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. Process Biochemistry. 43, 1-7.
  
- Bourbonnais R., Paice M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates, an expened role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267,99-102.
  
- Brown M.A., De Vito S.C., 1993. Prediction azo dye toxicity. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 23, 234-249.
  
- Bumpus J.A., Aust S.D., 1996. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, involvement of the lignin degraing system. BioEssays. 6, 166-170.
- Champagne P.P., Ramsay J.A., 2010. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. Bioresource Technology. 101, 2230-2235.
  
- Chander M., Arora D.S. ,2007. Evaluation of some White-rot fungi for their potencial to decolourise industrial dyes. Dyes and Pigments. 72, 195-198.
  
- Chivukula M., Renganathan V., 1995. Phenolic azo dye oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. Applied Environmental Microbiology. 61, 4374-4377.
  
- Christie R.M., 2001. Colour Chemistry. Ed. RSC Paperbacaks. 1a edició. Cambridge CB4 0WF, UK.
  
- Crisini G., 2006. Non-conventional low-cost absorbents for dye removal: a review. Bioresource Technology. 97, 1061-1085.
  
- Conneely A., Smyth W.F., McMullan G., 2001. Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. Analytica Chimica Acta. 451, 259-270.
  
- Correira V.M., Stephenson T., Judd J., 1994. Characterisation of textile wastewaters. Environmental Technology. 15, 917-929.

- Crespi M., Huertas J.A., 1986. Industria textil ¿Depuración biológica o fisicoquímica? Tecnología del agua. 30, 51-63.
  
- Cristóvão R.O., Tavares A.P.M., Ribeiro A.S., Loureiro J.M., Boaventura R.A.R., Macebo, E.A., 2008. Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. Bioresource Technology. 99, 4768-4774
  
- Cristóvão R.O., Tavares A.P., Ferreira L.A. Loureiro J.M., Boaventura R.A.R, Macebo, E.A., 2009. Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase. Bioresource Technology. 100, 1094-1099
  
- Dashtban M., Scharaft H., Syed T.A., Qin W., 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 1, 36-50.
  
- Davis R.J., Gainer J.L., O'Neal G., Wu I-W., 1994. Photocatalytic decolorization of wastewater dyes. Water Environmental Research. 66,50-53.
  
- Dawkar V.V., Jadhaw U.U, Ghodake G.S., & Govindwar S.P., 2009. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by Bacillus. Biodegradation. 20, 777-787.
  
- Dittmer J.K., Patel N.J., Dhawale S.W., Dhawale S.S., 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. FEMS Microbiology Letters. 149,65-70.
  
- Doddapaneni H., Yadav J.S., 2004. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biothechnology. 65, 559-565.
  
- Dos Santos A.B., Cervantes F.J., Van Lier J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewater: Prespectives for anaerobic biotechnology. Bioresource Technology. 98, 2369-2385.
  
- Eichlerová I., Homolka L., Nerud F., 2006. Synthetic dye decolorization capacity of White rot fungus *Dichomitus squalens*. Bioresource Technology. 16, 2153-2159.
  
- Enaud E., Trovaslet M., Bruyneel F., Billottet L., Karaaslan R., Sener M.E., Coppens P., Casas A., Jaeger I.J., Hafner C., Onderwater R.C.A., Corbisier A-M., Marchand-Brynaert M.,



Vanhulle S., 2010. A novel azoanthraquinone dye made through innovative enzymatic process. *Dyes and Pigments*. 3, 99-108.

■ Ensar O., Bülent K., 2007. Comparison among O<sub>3</sub>, adsorption, O<sub>3</sub>/HCO<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/PAC processes for the removal of Bomapex Red CR-L dye from aqueous solution. *Dyes and pigments*. 74, 329-334.

■ Fakoussa R.M., Frost P.J., 1999. In vivo-decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52, 60-65.

■ Fan L.; Ni J., Wu Y., Zhang Y., 2009. Treatment of bromoamine acid wastewater using combined process of micro-electrolysis and biological aerobic filter. *Journal of Hazardous Materials*. 162, 1204-1210.

■ Fernández J., Kiwi J., Baeza J., Freer J., Lizama C., Mansilla H.D., 2004. Orange II photocatalysis on immobilised TiO<sub>2</sub>: Effect of the pH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Applied Catalysis B: Environmental*. 48, 205-211.

■ Field J.A., de Jong E., Feijoo G., de Bont J.A.M., 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH*. 11, 44-49.

■ Font X., Caminal G., Gabarrell X., Romero S., Vicent M.T., 2003. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *Chemical Technology and Biotechnology*. 78, 548-554.

■ Forgacs E., Cserhádi T., Oros G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewater: a review. *Environment International*. 30, 953-971.

■ García-Montaña J., Ruíz N., Muñoz I., Domènech X., García-Hortal J.A., Torrades F., Peral J., 2006. Environmental assessment of different photo-Fenton approaches for commercial reactive dye removal. *Journal of Hazardous Materials*. 138, 218-225.

■ Ganesh R., Boardman G.G., Michelsen D., 1994. Fate of azo dyes in sludges. *Water Research*. 28, 1367- 1376.

■ Galadi A., Julliard M., 1996. Photosensitized Oxidative Degradation of Pesticides. *Chemosphere*. 33, 1-15.

- Gao D.W., Du L.N., Yang J.L., Wu W.M., Liang H., 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30, 70-77.
- Gerhardt E., Vila J., Llimona X., 2000. *Bolets dels Països Catalans. Manual d'identificació*. Ed. Omega.
- Goszczynski S., Paszczynski A., Pasti-Grigsby M.B., Crawford R.L., Crawford D.L., 1994. New pathways for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Journal of Bacteriology* 176,1339-1347.
- Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J., Evans C.S., 1994. Hydrogen peroxide producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41, 465-470.
- Gupta V.K., Suhas, 2009. Application of low-cost adsorbents for dye removal- A review. *Journal of Environmental Management*. 90, 2313-1342.
- Hofrichter M., 2002. Review, lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 454-466.
- Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M.J., Liers C., Lundell T., 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87, 871-897.
- Kapdan I.K., Kargi F., McMullan G., Marchant R., 1999. Biological decolorization of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in packed column reactor. *Environmental Technology*. 21, 231-236.
- Khindaria A., Grover T.A., Aust S.D., 1995. Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Science and Technology*. 29, 719-725.
- Kirk T.K., Fenn P., 1982. Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes. In *decomposer basidiomycetes, their biology and ecology*. A, Frankland, J.C., Hedger, J.N., Swift, M.J. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 67-90.
- Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H., 1984. Separation and characterization of 2 extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169, 247-250.

- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho N.S., Hofrichter M., Rogalski J., 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27, 175-185.
  
- Lopez C, Valade A-G., Combourieu B., Mielgo I., Bouchon B., Lema J.M., 2004. Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and electrospray. *Analytical Biochemistry*. 335, 135-149.
  
- Mansilla H.D., Lizama C., Gutarra A., Rodríguez., 2003. Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. Capítulo 13. Editorial, M.A.Bleza, Mar del Plata, Argentina.
  
- Marco-Urrea E., Parella T., Gabarrell X., Caminal G., Vicent T., Reddy C.A., 2008. Mechanisms of trichloroethylene mineralization by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70, 404-410.
  
- Martínez A.T., Speranza M., Ruíz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martínez M.J., Gutierrez A., del Rio, J.C., 2005. Biodegradation of lignocellulosics, microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8, 195-204.
  
- Martínez M.J., Ruíz-Dueñas F.J., Guillèn F., Martínez A.T., 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*. 237, 424-332.
  
- Martínez-Huitle, C.A, Brillas E.2009. Decontamination of wastewater containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. *Applied Catalysis B: Environmental*. 87, 105-145.
  
- McKay G.,1979.Waste colour removal from textile effluents. *American Dyestuff Reporter*. Rep.68: 29-36.
  
- Mendez D., 2002. Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales. Tesis Doctoral. Universitat de Santiago de Compostela.
  
- Michel F.C., Grulke E.A., Reddy C.A., 1990. Development of a stirred tank reactor system for the production of lignin peroxidase (ligninases) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial Microbiology*. 5, 103-112.

- Moreira M.T., Mielgo I., Feijoo G., Lema J.M., 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of syntetic dyes. *Biotechnology Letters*. 22, 1499-1503.
  
- Nyanhongo G.S., Gomes J., Gübitz G.M., Zvauya R., Read J., Steiner W., 2001. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*. 36, 1449-1456.
  
- Nigam P., Amour G., Banat I.M., Singh D., Marchant R., 2000. Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology* 72, 219-226.
  
- Novotný C., Svobodová K., Benada O., Kofroňová O., Heissenberger A., Fuchs W. ,2011. Potential of combined fungal and bacteial treatment for color removal in textile wastewater. *Bioresource Technology* 102, 879-888.
  
- O'Neill C., Lopez A., Esteves S., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Wilcox S., 2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53, 249-254.
  
- Ogutveren U.B., Kaparal S., 1994. Colour removal from textile effluents by electrochemical destruction. *Journal of Environmental Science and Health A*.29, 1-16.
  
- Pandey A., Singh P., Iyengar L., 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 59, 73-84.
  
- Paszczynsky A., Crawford R.L., 1995. Potencial for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress*. 11, 368-379.
  
- Pazarlioglu N.K., Akkaya A., Akdogan H.A., Gundor B., 2010. Biodegradation of Direct Blue 15 by free and immobilized *Trametes versicolor*. *Water Environmental Research*. 82, 579-585.
  
- Pazdzior K., Klepacz-Smólka A., Ledakowicz S., Sojka-Ledkowicz J., Mrozinka Z., Zylla R., 2009.. Integration of nanofiltration and biological degradation of textile wastewater containing azo dye. *Chemosfere*. 75, 250-255.
  
- Pelegrini R., Peralto-Zamora P., de Andrade A.R., Reyes J., Duran N., 1999. Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Applied Catalysis B: Environmental*.22, 83-90.

- Peralta-Zamora P., Kunz A., Gomez de Morales S., Pelegrini R., de Capos Moleiro P., Reyes J., Duran N., 1999. Degradation of reactive dyes. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. *Chemosphere* 38, 835-852.
  
- Peralta-Zamora P., Pereira C., Tiburtius E., Gomez de Morales S., Rosa M., Minussi R., Duran N., 2003. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis, Environmental* 42, 131-134.
  
- Pérez M., Torrades F., Domènech X., Peral J., 2001. Fenton and photo-Fenton oxidation of textile effluents. *Water Research*. 36, 2703-2710.
  
- Pierce J., 1994. Colour textile effluents-the origins of the problem. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 110, 131-134.
  
- Pinheiro H.M., Touraud E., Thomas O., 2004. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*. 61, 121-39.
  
- Pointing, S.B, 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 20-33.
  
- Raghavacharya C., 1997. Colour removal from industrial effluents –a comparative review of available technologies. *Chemical. Engineering. World* 32, 53-54.
  
- Ramsay J.A., Nguyen T., 2002. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. *Biotechnology Letters*. 24, 1757-1761.
  
- Reddy C.A., Mathew Z., 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. A, Gadd, G.M.(Ed). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press. Cambridge, UK., 52-78.
  
- Revankar M.S., Lele S.S, 2007. Synthetic dye decolorization by White rot fungus, *Ganoderma sp. WR-1*. *Bioresource Technology*. 98, 775-780.
  
- Robinson T., McMullan G., Marcant R., Nigam P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent, a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77, 247-255.

- Rodrigues C.S., Madeira L.M., Bonaventura R.A., 2009. Treatment of textile effluent by chemical (Fenton's Reagent) and biological (sequencing batch reactor) oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1551-1559.
  
- Romero S, Blázquez P, Caminal G, Font X, Sarrà M, Gabarrell X, Vicent T., 2006. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*. 31, 42-47.
  
- Sanyei Y., Ismail N., Tow T.T.; Morad N., 2009. Biological treatment of reative dye (Cibacron yellow FN\_2R) by sequencing batch reactor performance. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* . 3, 4071-4077
  
- Sarrà M.; Ison A.; Lilly M.D., 1996. The relationships between biomass concentration, determined by a capacitance-based probe, rheology and morphology of *Saccharopolyspora erythraea* cultures. *Journal of Biotechnology*.. 51, 157- 165.
  
- Shaw C.B., Carliell C.M., Wheatley A.D., 2002. Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. *Water Research*.36, 1993-2001.
  
- Shin W., Sundaran U.M., Cole J.L., Zhang M.H., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I., 1996. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide level intermediate in the multicopper oxidases. Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction of water. *Journal of the American Chemical Society*. 118, 3302-3315.
  
- Sirianuntapiboon S., Sansak J., 2008. Treatability stuedies with ganular activated carbon (GAC) and sequencing batch reactor (SBR) system for textile wastewater containing direct dyes. *Journal of Hazardous Materials* 159, 404-411.
  
- Smith J.J., Lilly M.D., 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 1011-1023.
  
- Spadaro J.T., Renganathan V., 1994. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: Mechanism of disperse yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312.1, 301-317.
  
- Srebotnik E., Hammel K., 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hidroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology*. 81, 179-188.

- Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V., 2010. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advanced in Bioscience and Biotechnology*. 1, 208-215.
  
- Subramanian V., Ydav J.S., 2008. Regulation and heterologous expression of P450 enzyme system components of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbiology and Technology*. 43, 205-213.
  
- Sukumar M., Sivasamy A., Swaminathan G., 2009. In situ biodecolorization kinetics of Acid Red 66 in aqueous solutions by *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 167, 660-663.
  
- Swamy J., Ramsay A., 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzym and Microbial Technololy*. 24, 130-137.
  
- Tantak N.P., Chaudhari S., 2006. Degradation of azo dyes by sequential Fenton's oxidation and aerobic biological treatment. *Journal of Hazardous Materials*. 25, 698-705.
  
- Theerachat M., Moret S., Guieysse D., Remaud-Simeon M., Chulalaksananukul W., 2012. Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM 11269. *African Journal of Biotechnology*. 11, 1964-1969.
  
- Tien M., Kirk T.K., 1983. Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* 221, 661-662.
  
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal lacasses. *Microbiology-UK*. 140, 19-26.
  
- Vaidya A.A., Datye K.V., 1982. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. *Colourage*. 14, 3-10.
  
- Weeter D.W., Hodgson A.G., 1977. Alternatives for biological waste treatment of dye wastewater. *American Dyestuff Reporter*. 66,32-61.
  
- Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S.N., 2003. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial effluents. *Biotechnology Advances*. 22, 161-187.
  
- Wong Y., Yu Y., 1999. Laccase-catalyzed decolorization of sythethic dyes. *Water Research*. 33, 3512-3520.

- Wu K., Xie Y., Zhao J., Hidaka H., 1999. Photo-Fenton degradation of dye under visible light irradiation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 144, 77-84.
- Yadav J.S., Reddy C.A, 1992. Noninvolvement of lignin peroxidases and manganese peroxidases in 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology letters*. 14, 1089-1092.
- Yadav J.S., Reddy C.A, 1993. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and mixures of 2,4-D and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 59, 2904-2908.
- Yaşar S., Cirik K., Çınar Ö., 2008. The effect of cyclic anaerobic-aerobic conditions on biodegradation of azo dyes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35, 449-457.
- Youn H.D., Han Y.C., Kang S.O., 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 132, 183-188.

### Recursos Web

- 2026.cat, 2009. Estratègia per al Desenvolupament Sostenible de Catalunya. Informe del sector de la indústria. Document base per al debat de l'Estratègia al desenvolupament sostenible de Catalunya a càrrec BioQuad. Juny del 2009
- ACA, 2007. L'estalvi de l'aigua a Catalunya. Taula tècnica d'estalvi d'aigua del Segon Conveni AGA-FNCA. Abril  
2007[http://acaweb.gencat.cat/aca/documents/ca/planificacio/recursos\\_demandes/estalvi\\_aigua\\_a\\_catalunya.pdf](http://acaweb.gencat.cat/aca/documents/ca/planificacio/recursos_demandes/estalvi_aigua_a_catalunya.pdf)
- Airdye, 2011. <http://blog.airdye.com/goodforbusiness/2011/12/05/india-struggles-with-textile-water-pollution/>
- Eugene Smith, 2009. October 14, 2009, the 30<sup>th</sup> annual awards ceremony of the W. Eugene Smith Memorial Fund took place at the Asia Society in New York City. <http://www.chinahush.com/2009/10/21/amazing-pictures-pollution-in-china/>
- Europapress, 2011. <http://www.europapress.cat/politica/noticia-mas-confia-ressorgiment-industria-textil-catalunya-20111028114923.html>
- Greenpeace, 2010. <http://www.greenpeace.org/eastasia/press/releases/toxics/2010/textile-industrial-pollution/>



■ Greenpeace, 2011.

<http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/contaminacion/WaterScandelReport11-ESok.pdf>

■ IDESCAT, 2009. Institut Estadístic de Catalunya. Anuari estadístic de Catalunya. Residus Industrials. Per sectors d'activitat. <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=239>

■ IDESCAT, 2010. Institut Estadístic de Catalunya. Indicacions d'estructura econòmica. Volum de negoci en la indústria. Per agrupacions d'activitat. <http://www.idescat.cat/economia/inec?tc=3&id=5208&lang=es>

■ IPPC, 2003. European Comisión. Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC). Reference Document on Best Available Techniques for the Textiles Industry. July 2003. [http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/txt\\_bref\\_0703.pdf](http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/txt_bref_0703.pdf)

■ Nelliya, 2010. Socio-economic, environmental and clean technology aspects of textile industries in Tiruppur, south India. Madras School of Economics, Chennai-600 025. India. <http://www.sasnet.lu.se/EASASpapers/12PrakashNelliya.pdf>

■ PSARI, 2003: Programa de sanejament d'aigües industrials, 2003. [http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/planificacio/psari/psari2003\\_090703.pdf](http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/planificacio/psari/psari2003_090703.pdf)

■ Stainsfile. <http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>

■ Sophied, 2006. [www.sophied.net/press-and-publication/brochures/sophied\\_presentation\\_FR.pdf](http://www.sophied.net/press-and-publication/brochures/sophied_presentation_FR.pdf)

■ Termes, 2009. Anàlisi de la tendència del consum d'aigua a Catalunya i marges d'estalvi. Universitat de Barcelona.

## **Legislació**

■ Directiva 91/271/CEE del Consell, de 21 de maig del 1991, relativa al tractament d'aigües residuals urbanes. Aquesta Directiva ha estat transposada a la normativa espanyola pel Real Decret Llei 11/1995 i el Real Decret Llei 509/1996.

■ Directiva 98/15/CE de la Comissió, de 27 de febrer de 1998, per la que es modifica la Directiva 91/271/CEE del Consell, en relació amb determinats requisits establerts en el seu annex I.

## Capítol 1

---

- Directiva 2002/61/CE del Parlament Europeu i del Consell, de 19 de juliol del 2002, per el que es modifica per dinovena vegada la directiva 76/769/CEE del consell, que limita la comercialització i l'ús de determinades substàncies i preparats perillosos (colorants azoics).
- Decret 130/2003, de 13 de maig, pel qual s'aprova el Reglament dels serveis públics de sanejament DOGC núm. 3894, 29.05.2003.

# Capítol 2

## Objectius

---

L'objectiu principal d'aquest treball de tesi és aprofundir en el coneixement de la degradació de colorants tèxtils amb el fong *Trametes versicolor* sota condicions de producció de l'enzim lacasa. Per assolir-lo, diversos objectius específics es van establir:

- Determinar la capacitat que té el fong per degradar colorants que pertanyen a diferents famílies segons la classificació química i avaluar el rendiment de decoloració en funció de la concentració de colorant. Aquests resultats han de permetre treure conclusions sobre l'aplicabilitat del procés per tractaments d'aigües residuals de la indústria tèxtil que es caracteritzen per la seva variabilitat en composició.
- Estudiar com actua el fong en la degradació de colorants, quin paper hi juga l'enzim lacasa produït per *Trametes versicolor* i si és aquest enzim el màxim responsable de la decoloració.
- Identificar els subproductes de degradació que s'obtenen en els tractaments amb fong i amb enzim d'alguna família de colorants, per conèixer el mecanisme de biodegradació i comparar-los deduint els seus avantatges i inconvenients.
- Analitzar l'efecte d'algunes variables operacionals (concentració de colorant, concentració de biomassa, concentració de nutrients...) que condicionen la decoloració, i sobretot la producció enzimàtica en la biodegradació de colorants. Optimitzar el procés de decoloració ja

des de la seva posada en marxa amb la reducció i/o eliminació de l'aport de nutrients i aplicar aquestes condicions a diferents formes d'operació (discontinu, discontinus repetits, continus sense etapa d'adaptació ...).

- Modelitzar matemàticament el procés de degradació del colorant Gris Lanaset G (colorant comercial format per la mescla de colorants metàl·lics complexos) en reactor fluïditzat sota condicions de no creixement del fong, i establir les etapes claus en la decoloració i producció enzimàtica.

# Capítol 3

## **Materials i mètodes generals**

---

En aquest capítol de Materials i Mètodes es vol donar una visió general i detallada de totes les eines i tècniques utilitzades en el treball experimental de la present Tesi Doctoral:

- S'especifica la soca de fong emprada.
  
- Es descriu el medi emprat per al manteniment de la soca *Trametes versicolor*, per al creixement del fong i els utilitzats durant el procés de tractament de diferents colorants.
  
- Es caracteritzen els diferents colorants utilitzats en els experiments així com es descriuen les diferents formes d'operació (discontinu, continu, discontinu seqüencial) en els tractaments de decoloració.
  
- Es descriuen tots els mètodes analítics per a la quantificació dels paràmetres com la concentració de color, la producció enzimàtica, etc.
  
- Finalment es presenta la metodologia emprada per al desenvolupament del model matemàtic proposat que descriu la producció enzimàtica i el procés de decoloració pel fong.

## 3.1 Microorganisme

El microorganisme que s'ha utilitzat és el fong *Trametes versicolor* (ATCC#42530).

El fong es conserva a 25°C en plaques de Petri en medi agar (15g/L) amb extracte de malta (20 g/L) i es ressembla mensualment.

Al finals del seu ús les plaques són esterilitzades a l'autoclau abans d'abocar-les.

## 3.2 Medis de cultiu

### 3.2.1 Medi de creixement

La composició del medi de creixement per a la formació de miceli i pèl·lets és de 20 g/L d'extracte de malta. La solució s'ajusta a pH 4,5 (amb HCl 1 M o NaOH 1 M) i s'esterilitza a l'autoclau.

### 3.2.2 Medi de tractament

#### 3.2.2.1 Procés en discontinu sota condicions de creixement

El medi per al tractament en el reactor fluïditzat sota condicions que permeten el creixement del fong es presenta a la taula 3.1.

Taula 3.1: Composició del medi del reactor

Component medi	Concentració
glucosa (g/L)	8
micronutrients (mL/L)	1
macronutrients (mL/L)	10
2,2-Dimetriilsuccínic (g/L)	1,168
Clorur amoni (g/L)	1,9
Colorant (g/L)	0,15

Un cop preparat el medi, se l'ajusta a pH 4,5 (amb HCl 1 M o NaOH 1 M) i s'esterilitza a l'autoclau.

Taula 3.2: Composició de solucions de macronutrients i micronutrients

Micronutrients	Concentració (g/L)	Macronutrients	Concentració (g/L)
Àcid nitril-tri-acètic	1,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,0	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,5	CaCl <sub>2</sub>	1
NaCl	1,0		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1		
CoSO <sub>4</sub>	0,1		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01		
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,01		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01		
NaMoO <sub>4</sub>	0,01		

### 3.2.2.2 Procés en discontinu sota condicions de manteniment

El medi per al tractament en el reactor fluiditzat en condicions únicament de manteniment sense creixement microbià es presenta a la taula 3.3. Les diferències respecte el medi amb creixement són la manca de nitrogen i la reducció de la quantitat de glucosa inicial.

Taula 3.3: Composició del medi del reactor en condicions de manteniment

Component medi	Concentració
glucosa (g/g (pes sec) )	0,26
micronutrients (mL/L)	1
macronutrients (mL/L)	10
2,2-Dimetilsuccínic (g/L)	1,168
Colorant (g/L)	0,15

### 3.2.2.3 Discontinus seqüencials

En el procés que es duen a terme discontinu seqüencial (o repetits) s'utilitza el mateix medi que per al procés en discontinu sota condicions de manteniment (Taula 3.3).

**3.2.2.4 Procés en continu**

La composició del medi utilitzat per als experiments en continu es correspon al medi per al procés en discontinu sota condicions de manteniment, amb la diferència que es dosificava aquestes concentracions al llarg del dia (Taula 3.4).

**Taula 3.4:** Composició del medi per al tractament en continu

<b>Component medi</b>	<b>Concentració</b>
glucosa (g/g (pes sec)· dia <sup>-1</sup> )	0,26
micronutrients (mL/ L·dia <sup>-1</sup> )	1
macronutrients (mL/ L·dia <sup>-1</sup> )	10
2,2-Dimetilsuccínic (g/ L·dia <sup>-1</sup> )	1,168
Colorant (g/ L·dia <sup>-1</sup> )	0,15



### 3.3 Colorants

Els colorants emprats en aquest treball i les seves característiques es recullen a la Taula 3.5.

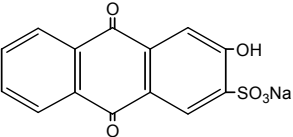
Taula 3.5 Resum de propietats dels colorants utilitzats

Nom (Índex Color (I.C))	Nom comú	I.C Número	Classificació	Màxima longitud d'ona (nm)	Fórmula empírica	Estructura colorant	Casa comercial	Ionització
<b>Acid Black 58</b>	Lanasyn Grey	12230	Complex metàl·lic azoc	591	$C_{40}H_{34}CrN_6O_{12}S_2$		ALDRICH (S-467014)	Àcid
<b>Acid Geen 16</b>	Acid green 16	44025	Trifenilmetà	640	$C_{31}H_{33}N_2NaO_6S_2$		ALDRICH (S-468770)	Àcid

Nom (Índex Color (I.C))	Nom comú	I.C Número	Classificació	Màxima longitud d'ona (nm)	Fórmula empírica	Estructura colorant	Casa comercial	Ionització
<b>Acid Orange 10</b>	Orange G	16230	Azo	478	$C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$		SIGMA (O-3756)	Àcid
<b>Acid Red 103</b>	Azocarmine B	50090	Quinoneimine	516	$C_{28}H_{19}N_3O_9S_3Na_2$		FLUKA (11599)	Àcid
<b>Acid Violet 19</b>	Acid Fuchsin	42685	Trifenilmetà	545	$C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$		SIGMA (F-8129)	Àcid

Nom (Índex Color (I.C))	Nom comú	I.C Número	Classificació	Màxima longitud d'ona (nm)	Fórmula empírica	Estructura colorant	Casa comercial	Ionització
<b>Acid Yellow 1</b>	Naphtol Yellow S	10316	Nitro	399	$C_{10}H_6N_2Na_2O_8S$		FLUKA (498747)	Àcid
<b>Amino Black 10</b>	Amino Black 10	20470	Diazo	621	$C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$		ALDRICH (A-8181)	Àcid
<b>Basic Blue 9</b>	Methylene Blue	52015	Tiazina	612	$C_{16}H_{18}ClN_3S$		SIGMA (MB-1)	Bàsic

Nom (Índex Color (I.C))	Nom comú	I.C Número	Classificació	Màxima longitud d'ona (nm)	Fórmula empírica	Estructura colorant	Casa comercial	Ionització
<b>Basic Green 1</b>	Brilliant Green 1	42040	Trifenilmetà	624	$C_{27}H_{34}N_2O_4S$		SIGMA (B-6756)	Bàsic
<b>Basic Red 9</b>	Basic Fuchsin	42010	Trifenilmetà	539	$C_{20}H_{19}N_3$		ALDRICH (861081)	Bàsic
<b>Methyl Green</b>	Brilliant Green 20	42590	Trifenilmetà	632	$C_{27}H_{35}BrCl_3N_3Zn$		MERCK (115944)	Bàsic

Nom (Índex Color (I.C))	Nom comú	I.C Número	Classificació	Màxima longitud d'ona (nm)	Fórmula empírica	Estructura colorant	Casa comercial	Ionització
<b>Mordant Red 3</b>	Alizarin Red S	58005	Antraquinònic	428	$C_{14}H_7O_7SNa$		SIGMA (A-5533)	Àcid
<b>Lanaset Burdeos B</b>	Burdeos Lanaset B	-	Organometàlic (mescla)	855	-	Patentat	CIBA	Àcid
<b>Lanaset Grey G</b>	Gris Lanaset G	-	Organometàlic (mescla)	590	-	Patentat	CIBA	Àcid
<b>Lanaset Pardo B</b>	Pardo Lanaset B	-	Organometàlic (mescla)	370	-	Patentat	CIBA	Àcid

## 3.4 Enzim

L'enzim purificat Lacasa del fong *Trametes versicolor* és de la casa comercial Fluka (referència 53739). Amb una activitat de 34 U/mg, aquest enzim es troba liofilitzat i es conserva a -20 °C.

## 3.5 Obtenció de la biomassa en forma de pèl·lets

Per a la producció de pèl·lets és necessària l'execució de dos passos: obtenció del miceli i creixement del fong en forma de pèl·lets.

### 3.5.1 Obtenció de miceli

S'esterilitza un Erlenmeyer de 500 mL amb 150 mL de medi de creixement. A partir de la zona de creixement del fong en plaques, amb la part superior d'una pipeta Pasteur estèril, es fan cilindres de 0,6 mm de diàmetre. Cada Erlenmeyer s'inocula amb 4 cilindres i se'l manté en agitació orbital a 135 rpm durant 5 dies i a 25 °C.

Un cop format el miceli, se li separa el medi, i se li afegix solució NaCl 0.8% en pes, prèviament esterilitzada a 121°C durant 30 min, en relació 1:1 (v/v). Es tritura amb l'homogeneïtzador d'Ystral GmgH model X/10/20 i es guarda a 4°C.

### 3.5.2 Obtenció de pèl·lets

Erlenmeyers de 1000 mL s'omplen amb 250 mL de medi de creixement i s'esterilitzen. S'inoculen amb 1ml de suspensió de miceli i es mantenen a 25°C i agitació orbital de 135 rpm durant 5 dies.

Els pèl·lets formats es separen del medi per filtració en condicions estèrils, es suspenen amb una solució de NaCl 0.8% en pes, prèviament esterilitzada a 121°C durant 30 min, en relació 1:1 (v/v). i es guarden a 4°C. (Font et al., 2003).

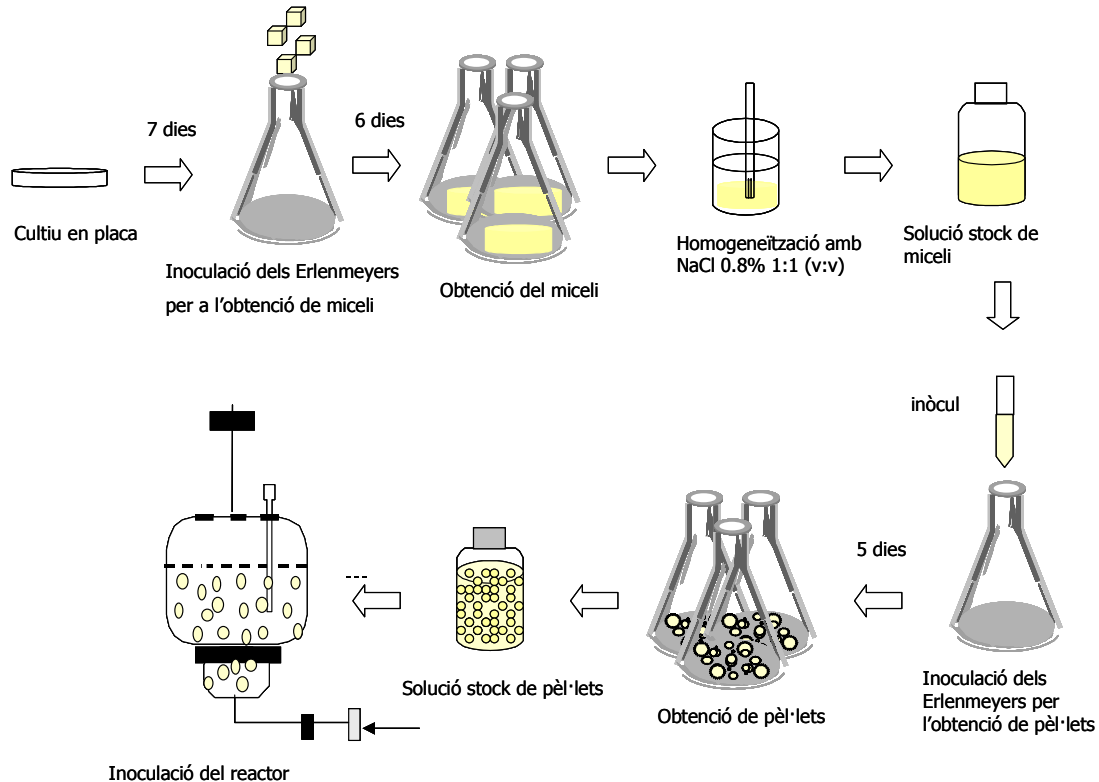
A la figura 3.1 es presenta de forma esquemàtica la metodologia d'obtenció de pèl·lets per ser utilitzats finalment en el tractament de colorants en bioreactor.

## 3.6 Tractaments

### 3.6.1 Metodologia experimental general

En tots els experiments (tant en Erlenmeyers com en reactor) es segueix la mateixa metodologia de posada en marxa del procés:

- 1.Preparació del medi de tractament.
- 2.Esterilització tèrmica de l'Erlenmeyer/reactor amb el medi de tractament.
- 3.Inoculació amb fong *Trametes versicolor* en forma de pèl·lets o adició d'enzim comercial/brou de cultiu.



**Figura 3.1.** Esquema de la metodologia seguida des del cultiu en placa fins a la inoculació del bioreactor (Blánquez, 2005)

### 3.6.1 En Erlenmeyers

Per els experiments *in vivo* s'utilitzen Erlenmeyers de 500 mL de volum amb 250 mL de medi de tractament sota condicions de creixement. Un cop estèrils s'inoculen amb 64 g/L de pèl·lets (pes humit), que equival a 1,7 g/L de pes sec. Aquests Erlenmeyers es mantenen a 25°C i a agitació orbital de 135 rpm fins acabar l'experiment. Per a poder discernir entre la biodegradació del colorant i la decoloració per adsorció es duen a terme controls paral·lels amb Erlenmeyers en les mateixes condicions i iguals en concentració de color i biomassa però on la biomassa resta inactivada per l'addició d'azida sòdica al 0,1%.

Per experiments *in vitro* es filtra 100 mL de brou de cultiu obtingut en els experiments en reactor (veure apartat 3.6.2) amb una activitat enzimàtica compresa entre 1000 i 3000 U/L, i se l'addiciona a Erlenmeyers de 500 mL de volum. S'hi afegeix 0,15 g/L de colorant a tractar.

Posteriorment es mantenen els Erlenmeyers a 25°C i agitació orbital de 135 rpm fins a acabar l'experiment.

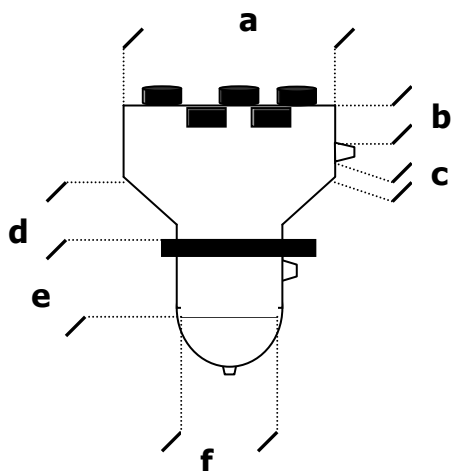
Per experiments *in vitro* amb enzim comercial s'utilitzen Erlenmeyers de 500 mL de volum amb 100 mL d'aigua tamponada a pH de 4,5. S'hi addiciona 1000-3000±100 U/L d'enzim i 0,15 g/L del colorant a tractar. Posteriorment es mantenen els Erlenmeyers a 25°C i a agitació orbital de 135 rpm fins acabar l'experiment.

## 3.6.2 En reactor

### 3.6.2.1 Característiques del reactor fluïditzat per polsos d'aire

El bioreactor situat en una càmera isotèrmica a 25°C, és un reactor fluïditzat per polsos d'aire de volum total 2 L i volum útil de 1,5 L. A la figura 3.2 es presenta el seu esquema i a la taula 3.6 les seves dimensions.

**Taula 3.6** Dimensions del bioreactor fluïditzat per polsos d'aire

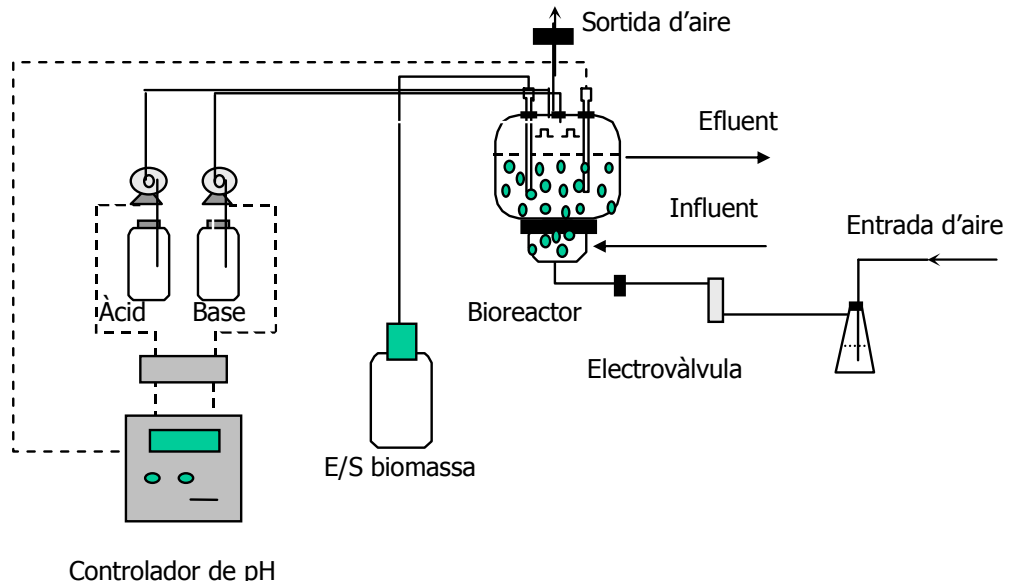


Mida	Dimensions (cm)
a	14
b	2
c	5,5
d	2
e	11,5
f	7,5

**Figura 3.2** Esquema del bioreactor fluïditzat per polsos d'aire (Blánquez, 2005).

Per la part inferior s'introdueix l'aire, i gràcies a la placa porosa l'aire es distribueix de forma homogènia en cada pols, mantenint alhora la biomassa en suspensió. En la figura 3.3 es representa les característiques del muntatge.





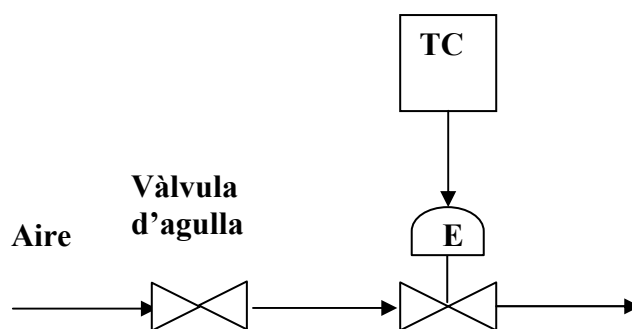
**Figura 3.3:** Esquema del muntatge experimental del bioreactor fluiditzat (Blánquez, 2005)

El reactor està equipat amb un control de pH que afegeix base (NaOH 1M) o àcid (HCl 1M) mantenint el pH a 4,5 amb una tolerància de  $\pm 0,1$ .



**Imatge 3.1:** Imatge del bioreactor

Al reactor s'introdueix un flux d'aire de 30 L/h. El flux polsant es genera mitjançant la transmissió pneumàtica d'una pertorbació en forma de pols de gas (aire) al medi de cultiu del bioreactor (Feijoo et al., 1994). El dispositiu utilitzat per generar la pulsació es presenta en la figura 3.4, on el cabal d'aire d'entrada al reactor és regulat per una vàlvula d'agulla, i el control de les pulsacions es fa utilitzant un temporitzador cíclic (TC), sobre el que es pot fixar el temps d'obertura i el temps de tancament de l'electrovàlvula (E) (Font, 1997; Romero, 2000).



**Figura 3.4:** Sistema generador de polsos. TC: temporitzador cíclic, E: electrovàlvula.

La freqüència de pulsació es defineix com la inversa de la suma dels temps d'obertura i tancament de l'electrovàlvula:  $F = 1/(t_0 + t_t)$ , on  $F$  és la freqüència,  $t_0$  és el temps d'obertura i  $t_t$  és el temps de tancament. En el treball que es presenta el temps d'obertura és d'un segon i el de tancament de cinc segons.

## 3.7 Mètodes analítics

### 3.7.1 Pes sec

Un cop pesada la mostra de biomassa es deixa a l'estufa de 105°C fins assolir pes constant. Es deixa refredar a l'assecador i es torna a pesar a la balança.

### 3.7.2 Determinació de l'activitat enzimàtica

L'activitat lacasa s'analitza utilitzant una versió modificada del mètode per a la determinació del manganès peroxidasa (Kaal et al., 1993).on el 2,6-dimetoxifenol (DMP) és oxidat per la lacasa, en absència d'aigua oxigenada. 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. La cubeta de reacció conté : 600 µL de mostra més 200 µL de malonat sòdic 250 mM a pH 4.5 i 50 µL de DMP 20 mM. Durant dos minuts es mesura la variació de l'absorbància a temperatura de 30°C utilitzant un espectrofotòmetre VarianCary3. Una unitat d'activitat (U) es defineix com un µmol de DMP oxidat per minut (µmol DMP/min).

### 3.7.3 Concentració de glucosa

La glucosa es mesura amb un analitzador enzimàtic de glucosa i lactat model YSI 2000 de Yellow Springs Instruments and Co. El rang de treball d'aquest analitzador es troba entre 0 i 20 g/L de glucosa, amb una precisió de  $\pm 2\%$  (0.04 g/L).

L'anàlisi es basa en la reacció enzimàtica d'oxidació de la glucosa a peròxid per mitjà de la glucosa oxidada immobilitzada a la membrana i la posterior reducció del peròxid a l'ànode de

platí. Les mostres a analitzar són filtrades prèviament a través d'un filtre de 0.45 µm d'acetat de cel·lulosa. Les mostres que són difícils de filtrar es centrifuguen durant 10 minuts a 6000 rpm amb una centrífuga Heraeus Sepatech, model Megafuge 1.0.

### 3.7.4 Color

Prèviament a la mesura de l'absorbància, i en cas que existeixi terbolesa es centrifuga la mostra a 6000 rpm durant uns 10 minuts amb una centrífuga Heraeus Sepatech, model Megafuge 1.0.

La mesura del color es realitza mesurant a la longitud d'ona de màxima absorció trobada prèviament per a cada colorant mitjançant escombrats. Els escombrats es duen a terme dins l'espectre del visible (de 350 a 650 nm) en l'espectrofotòmetre UV/Visible VarianCary3 a temperatura de 20°C.

Es fan servir cubetes de vidre òptic d'un ml de volum i les mostres es dilueixen amb aigua destil·lada per tal que tinguin absorbàncies inferiors a 0.8 i així garantir el rang de linealitat entre la concentració i l'absorbància.

S'ha comprovat experimentalment l'estabilitat de cada colorant en més de 200 h davant la llum i l'oxigen. En cap cas s'ha donat valors de degradabilitat més grans del 2%.

### 3.7.5 Toxicitat

El valor de la toxicitat es mesura amb l'aparell Microtox Systems de Microbis Corporation. Aquest assaig es basa en la pèrdua d'intensitat lluminosa emesa per un bacteri bioluminiscent (*Photobacterium phosphoreum*) provocada per l'efecte inhibidor de la mostra. El valor de toxicitat que s'obté, la EC<sub>50</sub>, correspon a la concentració efectiva de la mostra analitzada que causa un 50% de disminució en la lluminositat sota unes condicions determinades de temps i temperatura. Com més elevat és el valor de EC<sub>50</sub> menys tòxica és la mostra. Les mesures s'han realitzat amb un temps d'assaig de 5 minuts i a temperatura de 15°C al pH 7.

Les unitats de toxicitats s'expressen en TU on  $TU (\%) = 100 / EC_{50}$ . Quan el valor de la mostra és superior al 25% (en *Photobacterium phosphoreum*) es considera tòxica.

Els reactius utilitzats en l'anàlisi de toxicitat són:

- *Photobacterium phosphoreum* liofilitzat, es conserva a -20°C i es resuspèn en el moment de fer l'assaig (Microtox Acute Reagent Ref. AZF686010A)
- Solució reconstituent (Microtox Diluyente Ref. AZF686004)
- Solució osmòtica MOAS (NaCl 22% en pes)
- Solució diluent (NaCl 2% en pes)

Degut a què les aigües utilitzades són colorades s'aplica un protocol de correcció de color, on es té en compte aquest paràmetre a l'hora de mesurar la toxicitat (Microtox Manual, 1992).

### **3.7.6 Determinació de l'estructura química dels colorants per RMN**

Els experiments de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) es van realitzar en el Servei de RMN de la UAB en un espectròmetre AVANCE500 de la casa BRUKER. Els espectres de protó es van fer a una freqüència bàsica de 500.13 MHz, utilitzant un temps de reciclatge de 1 segon amb una amplada espectral de 12 ppm i es van recollir 16k punts en el domini del temps. Les dades es van processar amb una transformada de Fourier i un 'zero-filling' de fins a 32k, sense cap modificació extra. El nombre d'acumulacions variava en funció de la concentració de la mostra.

Les mostres miscibles en fase aquosa s'han preparat utilitzant aigua deuterada a concentració entre (1-2 mg mostra/mL). Les mostres no miscibles en fase aquosa s'han preparat utilitzant dissolvents orgànic. En el nostre cas s'ha utilitzat metanol pur (proporcionat pel mateix servei de RMN) a concentracions entre (1-2 mg mostra/mL).

En l'anàlisi de mostres de forma continuada dins el mateix aparell (en línea), es preparen dues mostres per separat: una primera de 5 mL d'aigua deuterada tamponada a pH=4.5 i el colorant a tractar. Una segona de 5 mL d'aigua deuterada amb enzim. En la preparació de les mostres s'ha de tenir en compte que la RMN necessita una concentració mínima de sòlid per a fer l'anàlisi de 0,6 g/L. Al servei de RMN es mesclen els dos medis abans d'introduir la mostra a l'aparell de RMN.

### **3.7.7 Determinació de proteases**

La possible producció de proteases per part del fong es va analitzar per kits de fluorescència (Fluorescent Protease Kit) de QuantiCleave™ i seguint les instruccions de la casa comercial.

## **3.8 Desenvolupament del model matemàtic**

Es va utilitzar el programa MATLAB 2007 (Mathematical Laboratory) per simular el comportament del fong en la decoloració i producció enzimàtica a través d'equacions diferencials. Els paràmetres cinètics es van avaluar per la funció ODE15S (Solve stiff differential equations and DAEs, variable order method) qui resol les equacions diferencials a través de la rutina Runge Kutta, i avalua el millor ajust del model (i per tant el valor òptim del paràmetres cinètics) per a cada experiment en base a la suma de les diferències al quadrat entre valors experimentals i valors teòrics.

### 3.9 Bibliografia

- Blánquez P., 2005. Desenvolupament d'un process a escala pilot per al tractament del colorant Gris Lanaset G amb *Trametes versicolor*. PhD. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona
  
- Feijoo G., Dorosetz C., Lema J.M., 1994. Production of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in packed bed bioreactors with recycling. *Biotechnology Techniques*.5,363-368.
  
- Font X., 1997. Tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Monitoratge del procés. PhD. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona
  
- Font X., Caminal G., Gabarrel X., Romero S., Vicent M.T., 2003. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 78, 548-554.
  
- Kaal E.E.J., de Jong ED., Field J.A., 1993. Stimulation of Ligninolytic Peroxidase Activity by Nitrogen Nutrients in the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Applied Environmental Microbiology*. 59, 4031-4036.
  
- Microtox Manual, a Toxicity Testing Handbook. 1992.
  
- Romero S., 2000. Tractament amb fongs d'aigües residuals colorades. PhD. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.

# Capítol 4

## Degradation of Orange G by laccase: fungal versus enzymatic process

---

Aquest capítol conté els resultats publicats:

**Revista:** Environmental Technology, 2007 Volum 28, pàgines 1103-1110.

**Autors:** Núria Casas, Paqui Blánquez, Xavier Gabarrell, Teresa Vicent, Gloria Caminal i Montserrat Sarrà.

## DEGRADATION OF ORANGE G BY LACCASE: FUNGAL VERSUS ENZYMATIC PROCESS

N. CASAS<sup>1</sup>, P. BLÁNQUEZ<sup>1</sup>, X. GABARRELL<sup>1</sup>, T. VICENT, G. CAMINAL<sup>2</sup> AND M. SARRÀ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departament d'Enginyeria Química, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Unitat de Biotecnologia Aplicada associada al IIQAB (CSIC-UAB), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

(Received 20 September 2006; Accepted 11 May 2007)

### ABSTRACT

Biodegradation of the Orange G azo dye by pellets of *Trametes versicolor* in a fluidized bioreactor operating under conditions of laccase production was studied. The percentage of decolorization obtained was 97% in batch mode and both the biomass and the broth, were colorless. *In vitro* degradations carried out with purified commercial laccase from *Trametes versicolor* demonstrated that laccase is able to degrade the dye. In spite of the high level of decolorization reached in both processes, an important difference between the fungal and enzymatic treatments was detected. At the end of the experiments carried out *in vitro*, a final residual color appears (different to the initial one). Consequently, measuring the yield of decolorization as a percentage of absorbance  $\lambda_{max}$  variation is not the best indicator of the treated wastewater quality, but the analysis of the visible color spectrum makes it possible to detect changes in color. The results demonstrate that better results are obtained with fungal Orange G biodegradation because a further breakdown of the enzymatic products is achieved with the fungus.

Keywords: Textile dye, bioreactor, decolorization, *Trametes versicolor*

### INTRODUCTION

Discharge of dyes in the textile industry represents an important environmental problem for which a universal, economic and environmentally friendly solution has not been developed. It is known that at least 10% of the dyes are lost into wastewater during the dyeing process [1]. Dyes vary in chemical composition, but they share a common feature: high stability to external agents such as chemical compounds, light or microbial attack. Consequently, dyes are usually considered xenobiotics and recalcitrant aerobically. Therefore, dye removal and/or degradation from wastewater by a conventional aerobic process is difficult even at low concentrations [2].

Textile wastewater is normally treated by physical and chemical methods, but there are certain drawbacks such as the creation of sludge, high cost, emission of toxic pollutants, and production of recalcitrant substances. Moreover, not all dyes currently used can be eliminated with such processes [3-5].

Azo dyes constitute, by far, the most important chemical class of commercial organic colorant and account for around 60-70% of the dyes used in traditional textile applications [6]. As their common structural feature, azo dyes contain one or more azo bonds (-N=N-) usually associated with one or more aromatic systems, which may also contain sulfonic acid groups. Another important feature of the

structure of azo dyes is the presence of a hydroxyl group conjugated with (i.e. ortho or para to) the azo group. Some studies indicate that these dyes are toxic or carcinogenic [7]. Therefore, effluents which contain these kinds of compounds must be treated before being released into the aquatic or terrestrial environments.

Various alternatives have been investigated to transform, degrade or mineralize azo dyes by biological processes. For example, decolorization of azo dyes was achieved by anaerobic reduction of azo bonds to form corresponding amines [8]. Several authors have demonstrated that a combined anaerobic and aerobic microbial treatment enhances the bacterial degradation of textile dyes, because the intermediate aromatic amines are further mineralized under aerobic conditions [9,10]. Recently Pearce et al. [11] published an interesting review about the removal of colour from textile wastewater by bacteria.

On the other hand, decolorization by white rot fungi is achieved by the aid of the extracellular ligninolytic enzymatic system, which produces enzymes such as lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase. These enzymes are involved in the decolorization of a wide variety of substrates, including dyes, due to their non-specificity [12-16]. Other studies have reported the use of purified ligninolytic enzymes in dye decolorization [17-19]. Moreover, few studies compare the difference between microbial and

enzymatic degradation [20]. In addition, there are few examples where the level of degradation obtained with the fungus is higher than the enzymatic degradation [21]. In order to increase the yield of the enzymatic decolorization, low molecular mediators such as hydroxybenzotriazole or violuric acid can be used [18,22]. But this practice is not viable in the development of an industrial process, given that these compounds are expensive, carcinogenic and may leave residual color.

In this study, the decolorization of the azo dye Orange G by *T. versicolor* and the role of the enzyme laccase are examined. There is evidence that the dye decolorization measured at the maximum dye absorbance is not the best indicator because it does not consider the possible changes in colour. For this reason the difference in the all visible spectrum of final effluents obtained from the fungus and the enzymatic treatment are evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Dye

The azo dye Orange G (C.I 16230) was purchased from Sigma-Aldrich.

### Strain

*Trametes versicolor* was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC # 42530). The fungus was maintained on 2% malt agar slants at 25°C until use. Subcultures were routinely made.

### Synthetic Dye Wastewater

The solution contained per litre: 8 g glucose, 1.9 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 11 ml of a supplemented medium [23], 1.168 g of 2, 2-dimethylsuccinate buffer and 0.15 g of Orange G. The pH was adjusted to pH 4.5 with NaOH 0.5 M. It was sterilised at 120°C for 30 min.

### Bioreactor and Operating Conditions

A glass fluidized bioreactor, with a working volume of 1500 ml, was equipped with a pH controller in order to maintain it at 4.5. A 9.3 l  $\text{h}^{-1}$  air flow was introduced at the bottom of the reactor by pulses [24]. Temperature was maintained at 25°C. The bioreactor was inoculated with an amount of pellets equivalent to 3.7 g  $\text{l}^{-1}$  dry weight (DW). The fungal pellets were obtained as described previously [21].

### Enzymatic Production

The bioreactor was filled with the same solution used as synthetic wastewater (pH 4.5) but free of dye and it was operated at the same conditions. When the laccase activity was approximately 2500 AU  $\text{l}^{-1}$ , the reactor broth was

centrifuged at 10000 x g at 4°C for 10 min. The supernatant was filtered through 0.22 mm filter.

### In Vitro Dye Biodegradation

Two types of experiments were carried out using the filter broth culture or commercial purified laccase of *T. versicolor* from Fluka. In both 15 mg of Orange G were added to 100 ml of the laccase solution (pH adjusted to 4.5). Both enzymatic biodegradations were carried out in Erlenmeyer flasks which were placed in an orbital shaker at 25°C. The dye concentration and the enzyme activity were measured for 24 h.

### Colour Determination

Spectrophotometric measurements were carried out at the visible maximum absorbance, 478nm using UV/Visible Cary of Varian at 20°C.

### Glucose Determination

Glucose concentrations were measured with YSI 2000 enzymatic analyser from Yellow Springs Instruments and Co.

### Laccase Activity

Enzymatic activity was measured using a modified version of the method for the determination of MnP [25]. The reaction mixture used consisted of 200  $\mu\text{l}$  of 250 mM sodium malonate at pH 4.5; 50  $\mu\text{l}$  of 20 mM 2,6-Dimetoxiphenol (DMP) and 600  $\mu\text{l}$  of sample. DMP is oxidized by laccase even in the absence of a cofactor. Changes in the absorbance at 468 nm were monitored for 2 min on a Varian Cary 3 UV/Vis spectrophotometer at 30°C. One activity unit (AU) was defined as the number of micromoles of DMP oxidized per min. The DMP extinction coefficient is 10,000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### Manganese Peroxidase Activity

Enzymatic activity was measured by the oxidation of DMP at 468 nm [24].

### Toxicity Determination

Toxicity was measured using a Microtox System (Microbics Co.) [26]. The effective concentration  $\text{EC}_{50}$ , based on *Photobacterium phosphoreum* test, was measured after 5 min.

### NMR Spectroscopy

In order to carry out on line NMR spectroscopy during the enzymatic biodegradation, both solutions of dye and enzyme were prepared using deuterium water. Several on line proton NMR spectra were obtained on a Bruker Advance 500 (500.13 MHz) Spectrometer during the decolorization.



## RESULTS AND DISCUSSION

### Degradation by *Trametes versicolor*

The fluidized bed bioreactor was filled with the synthetic dye wastewater, which contained  $150 \text{ mg l}^{-1}$  of the azodye Orange G. It was inoculated with pellets of *T. versicolor*. Figure 1 shows the evolution of glucose concentration, extracellular enzyme activity and percentage of dye decolorization. After a brief period of biomass adaptation, a linear consumption of glucose was observed ( $0.46 \text{ g/(g DW day)}^{-1}$ ) until the glucose was exhausted after 120 h. This linear consumption is evidences for the use of glucose mainly to maintain the initial biomass. Moreover, the extracellular laccase was accumulated in the broth reaching about  $3500 \text{ AU l}^{-1}$  at the end of the experiment and no MnP activity was detected. In contrast, the decrease in dye concentration was very rapid; more than 97% of decolorization was achieved in only 20 h when extracellular activity was only  $32 \text{ AU l}^{-1}$ . In spite of the low level of extracellular laccase, it is suspected that the enzyme is involved in the process of decolorization.

The change in the appearance of the broth and biomass during the dye treatment was clearly evident. While initially the culture media and pellets were intensely colored due to Orange G, after 24 h both phases had already lost color to

quite a large extent. The percentage of decolorization achieved was 99.7% at the end of the process when both biomass and broth reactor had become almost colorless.

### *In Vitro* Laccase Degradation

In order to study the degradation of Orange G by laccase *in vitro*, two types of experiments were carried out. In the first, a solution of commercial purified laccase from *T. versicolor* with  $30 \text{ AU l}^{-1}$  was used to degrade the dye solution. The percentage of decolorization reached was very low (20%) in 24 h. In contrast when the concentration of enzyme was increased to obtain  $3010 \text{ AU l}^{-1}$ , the yield of decolorization was 91% in 6 h. No laccase inactivation was detected in both experiments. In the second type of experiment, the dye was treated with the filtered broth containing laccase equivalent to  $2500 \text{ AU l}^{-1}$ . The percentage of decolorization achieved in 24 h was 86.6%. In this case the activity loss was 40%. Figure 2 shows decolorization evolution.

Comparing the fungal degradation at 24 h, when the extracellular enzyme activity was  $32 \text{ AU l}^{-1}$ , with *in vitro* degradation with  $32 \text{ AU l}^{-1}$ , a great difference in the decolorization yield is observed. These results could suggest that the enzyme laccase is not involved in the degradation process.

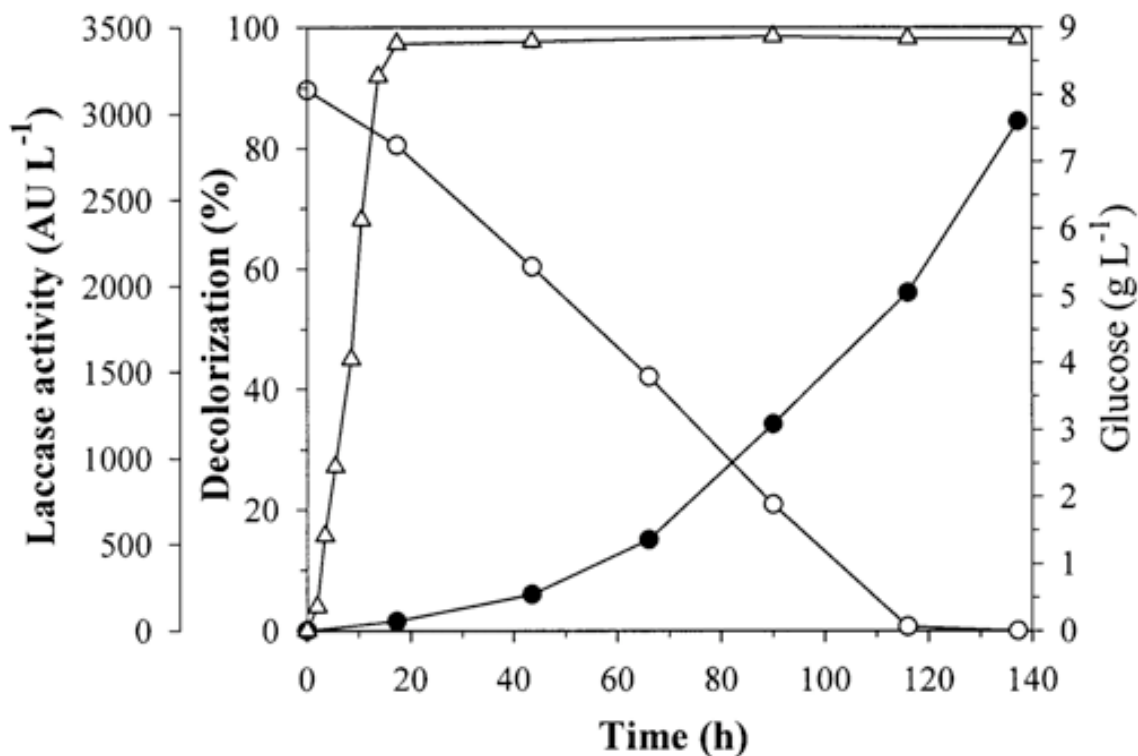


Figure 1. Evolution of laccase activity (●), glucose concentration (○) and percentage of decolorization (Δ) during the Orange G biodegradation by *T. versicolor*.

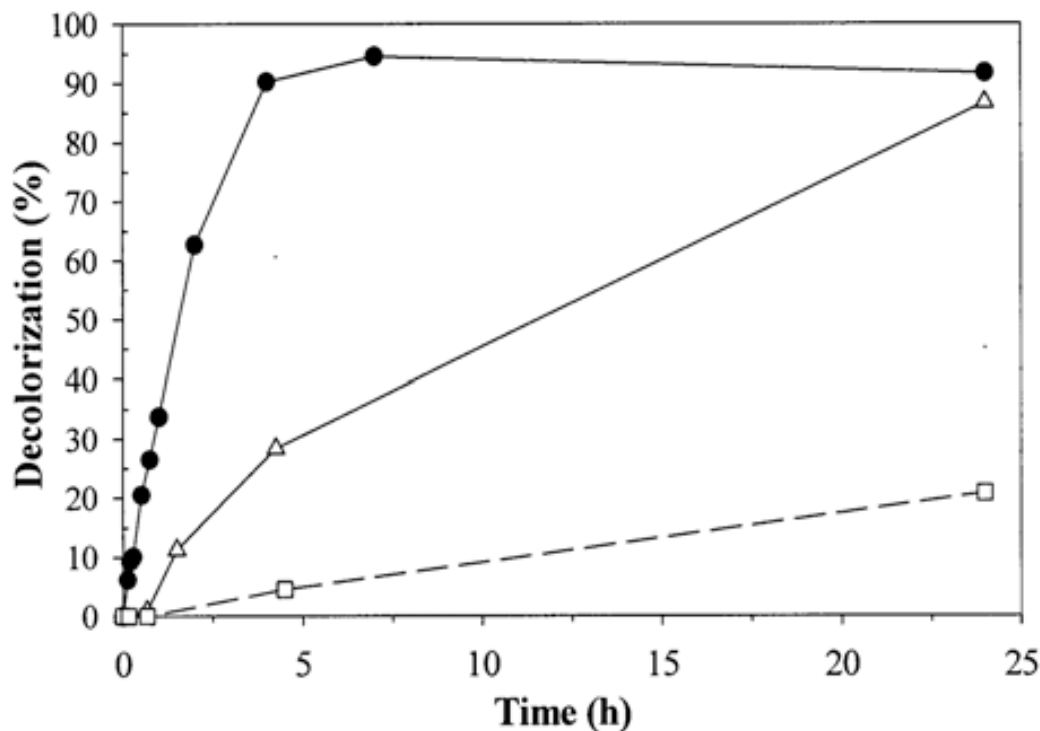


Figure 2. Enzymatic decolorization of Orange G carried out with broth culture ( $AU_0 = 2500$ ) ( $\Delta$ ) and purified enzyme solutions: ( $AU_0 = 3000$ ) ( $\bullet$ ) and ( $AU_0 = 30$ ) ( $\square$ ).

On the other hand when the dye is treated with culture broth free of cell with a laccase activity of  $2500 \text{ AU l}^{-1}$ , the degradation yield is similar to that obtained with fungus in 24 h. But other enzymes present in the broth and not measured could be responsible for the degradation. So finally the results provided with  $3000 \text{ AU l}^{-1}$  of purified enzyme evidence that laccase is able to degrade the dye Orange G. The different rates observed between the broth and the commercial enzyme can be attributed to the difference in the initial enzyme activity and the difference in the laccase stability. These results make it possible to draw the conclusion that laccase is, in fact, responsible for the Orange G decolorization and, as previous work [21] demonstrated, the dye degradation mechanism starts with a very rapid adsorption phase of the dye on the microorganism followed by its degradation inside fungi, where the intracellular activity is detected earlier than the extracellular activity. So the low extracellular enzyme detected has a very low contribution in the fungus degradation but the intracellular laccase could be the key in this process.

Decolorization is calculated by measuring absorbance reduction at the wavelength of maximum absorbance (478nm for the Orange G). In spite of the high level of decolorization obtained at the end of all the experiments, a residual color (different to the initial) was observed in the experiments

carried out *in vitro*. Therefore, the evolution of the absorbance spectrum through the experiment was measured. Data of absorbance at wavelengths between 350 and 650nm throughout the time of the Orange G degradation experiment with commercial enzyme are shown in Figure 3. As can be seen, the dye spectrums outline changes during the experiment. Initially, a rapid absorbance decrease at the characteristic maximum absorbance peak is observed, but the absorbance at lower wavelengths then increases substantially. These changes in the spectrum shape indicate a structural modification due to enzymatic activity.

Several authors have proposed cationic radical pathways for peroxidase oxidation of sulfonated azo dyes [27,28]. They suggested azo dyes could be asymmetrically split to a quinone product and diazene derivatives which hydrolysis and loss of nitrogen gas gave aromatic sulphonate. These unstable intermediates underwent further redox, oxidation, and hydrolytic transformation. The identification of degradation products is difficult because several products are obtained and some of them had shown instability due to a further breakdown [29]. The intermediate products of the *in vitro* degradation were examined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, as shown in Figure 4. Spectrum A illustrates the proton NMR signal of the initial dye solution and spectra B and C represent the signals after 15 h and 9 d, respectively.

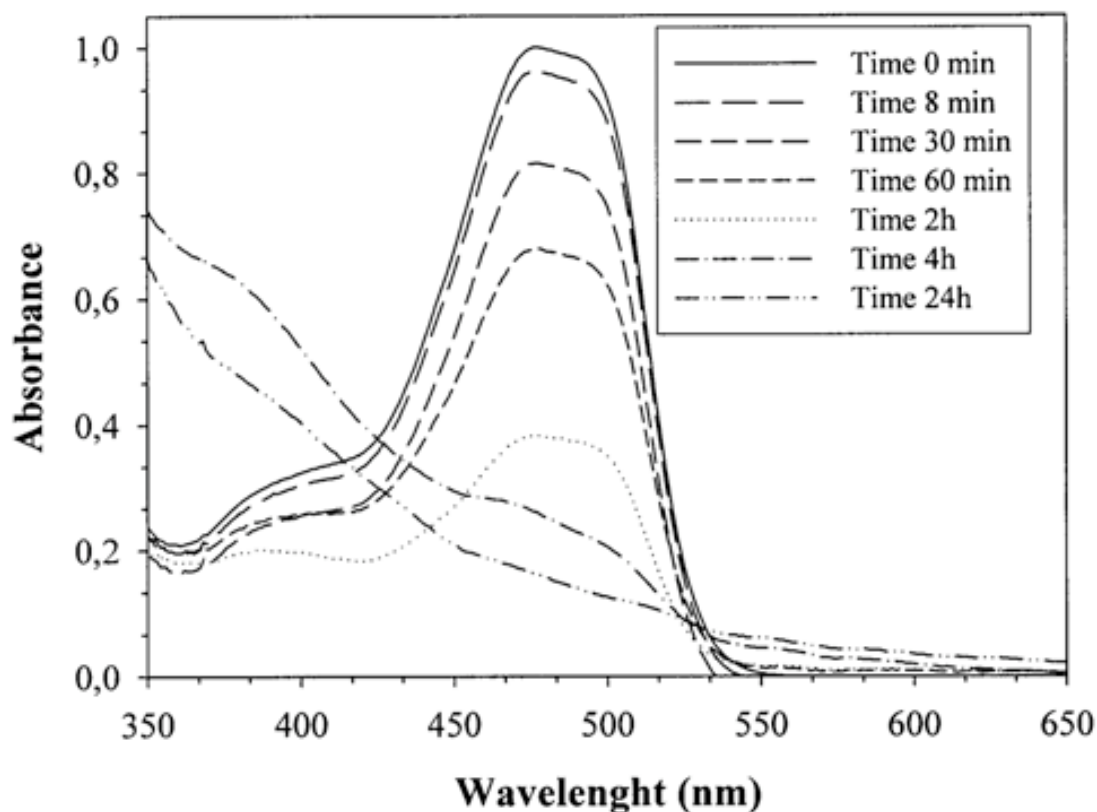


Figure 3. Absorbance spectrum evolution of Orange G treated with purified enzyme ( $AU_0 = 3000$ ).

Throughout the experiment, the initial dye signals of the aromatic protons (6-9 ppm) decreased in a continuous form and any intermediate product was obtained in significant abundance. At 15 h, an important decrease in these  $^1H$  NMR signals can be appreciated and at the end of the experiment the disappearance of the aromatic proton signal is clearly relevant. The appearance of multiple signals can be observed after amplifying the signals of the aromatic protons in spectrum C and some of them could be attributed to the presence of naphthoquinonedisulfonic acid and phenol. But none of these are of any evident importance, so the lack of predominant reaction products may indicate that the decolorization process can involve reactive radicals, which can oxidize most of the intermediate reaction products. Recently Zille et al. [30] showed that laccase is able to polymerize the reaction products obtained during long-term batch decolorization processes with azo dyes. Although the polymerized products concentration was low it would provide residual color to the treated effluents.

#### Differences between in Vivo and in Vitro Orange G Degradation

In spite of the similar final percentages of decolorization of the dye Orange G obtained with the fungus and with high levels of purified enzyme, an important difference is detected.

The final solution obtained after the *in vitro* treatment shows a residual color quite different to the initial dye, this aspect being seen in spectral changes observed in both processes. Figure 5 shows the visible spectrum of the initial synthetic dye wastewater and of the two final solutions; these are from the treatment with fungus and from *in vitro* treatment. The first shows an absolutely flat spectrum with very low absorbance at all wavelengths. In contrast, after the *in vitro* treatment a new absorption band appears at wavelengths lower than 420nm.

Finally, the toxicity test was carried out by measuring the  $EC_{50}$ , which considers a solution as toxic when its value is lower than 3%. The initial synthetic dye wastewater has an  $EC_{50}$  of  $18\% \pm 9\%$  and neither of the reaction products obtained with the two treatments are toxic, because the parameter  $EC_{50}$  is equal to or even higher than that of the initial dye solution, which means that the final solution is never more toxic than the initial solution.

#### CONCLUSIONS

The azo dye Orange G was successfully degraded in an air-pulsed bioreactor filled with pellets of the fungus *T. versicolor*. Although the main decolorization is initially a consequence of the adsorption process, both the biomass and culture broth become colorless at a later phase. Similar

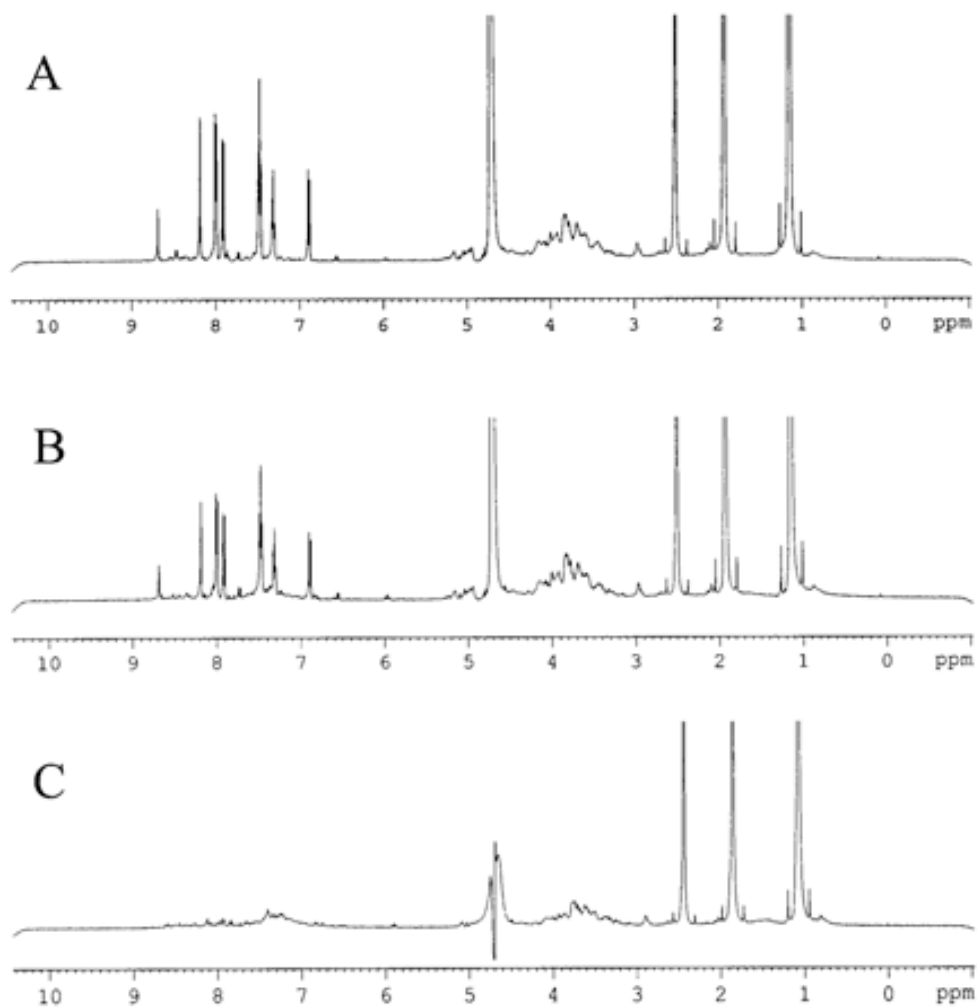


Figure 4.  $^1\text{H}$  NMR spectra changes during an in vitro laccase degradation of the dye Orange G: (A) 0h; (B) 15h; (C) 6d.

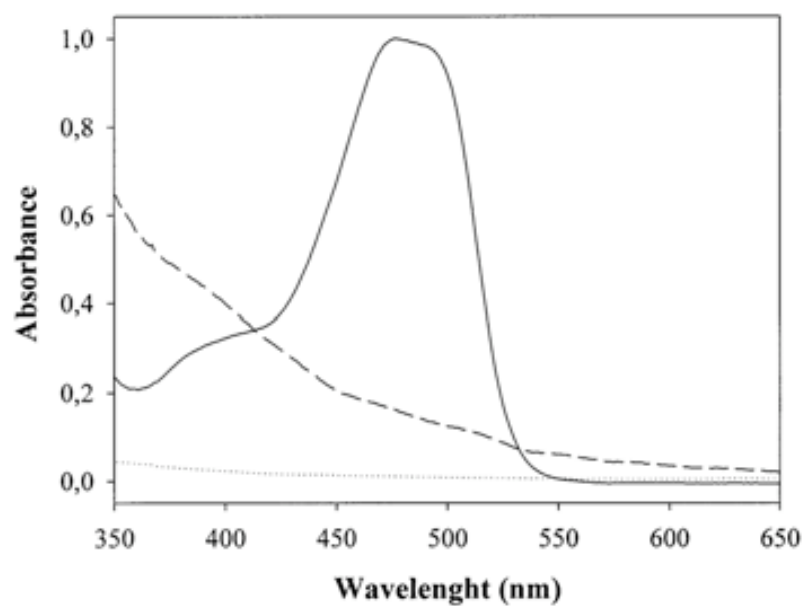


Figure 5. Absorbance spectrum of: the initial dye solution (continuous line), final bioreactor broth (100h) (dotted line) and final in vitro solution (24h) (broken line).

percentages of decolorization, measured at the maximum absorbance wavelength of the dye, were obtained with fungus degradation and enzymatic degradation, which provide evidence for the role of the enzyme laccase in the degradation process, since no other ligninolytic enzymes (MnP) had been detected. However, the visible spectrum of the final enzymatic and microbial treated effluents shows significant differences in the residual color. The fungus treatment underwent further decolorization, as no residual color appears at any wavelength after the process. Consequently the fungus biodegradation makes it possible to obtain better results because of the further breakdown of the products of the enzymatic reaction. As a result, the final products are colorless, non-toxic and the mineralization may possibly be obtained.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología project PPQ2000-0645-C02-01, the Ministerio de Educación y Ciencia project CTQ2004-01459 and the AGBAR Foundation (Spain). The authors wish to thank the financial support of DURSI 2005SGR 00698 Generalitat de Catalunya. The Department of Chemical Engineering of the Universitat Autònoma de Barcelona is the Unit of Biochemical Engineering of the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) de Catalunya. N.C. acknowledges DURSI for a predoctoral grant. We are grateful to Dr. Teodor Parella for his help in getting the MNR spectra.

#### REFERENCES

1. Brown D., Hitz H.R. and Schafer L., The assessment of the possible inhibitory effect of dye stuffs on aerobic waste-water bacteria with screening test. *Chemosphere*, **10**, 245-261 (1981).
2. Pierce J., Colour in textile effluents-the origins of the problem. *J. Soc. Dyers Colourists*, **110**, 131-134 (1994).
3. Spadaro J.T., Lorne I. and Renganathan V., Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 1389-1393 (1994).
4. Lin S.H. and Peng F.C., Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. *Water Res.*, **30**, 5 87-92 (1996).
5. Lambert S.D., Graham N.J.D., Sollar C.J. and Fowler G.D., Evaluation of inorganic adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides. *Water Sci. Technol.*, **36**, (2), 173-80 (1997).
6. Christie R.M., Colour Chemistry. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge (UK) (2001).
7. Chagas E.P. and Durrant L.R., Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorajaju*. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **29**, 473-477 (2001).
8. Zimmermann T., Kulla H.G. and Leisinger T., Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Eur. J Biochem.*, **129**, 197-203 (1982).
9. Haug W., Schmidt A., Nortemann B., Hempel D.C., Stolz A. and Knackmuss H.J., Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate degrading bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3144-3149 (1991)
10. O'Neill C., Lopez A., Esteves S., Hawkes F.R., Hawkes D.L. and Wilcox S., Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **53**, 249-254 (2000).
11. Pearce C.I., Lloyd J.R. and Guthrie J.T., The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigment*, **58**, 179-196 (2003).
12. Heinfling A., Martínez M.J., Martínez A.T., Bergbauer M. and Szewzyk U., Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2788-2793 (1998).
13. Swamy J. and Ramsay J.A., The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **24**, 130-137 (1994).
14. Moreira M.T., Mielgo I., Feijoo G. and Lema J.M., Evaluation of different fungi strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1499-1503 (2000).
15. McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N. Robinson T., Nigam P., Banat I.M., Marchant R. and Smyth W.F., Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 81-87 (2001).
16. Blázquez P., Caminal G., Sarrà M, Vicent M.T. and Gabarrell X., Olive oil mill waste waters decolorization and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Biotechnol. Progr.*, **18**, 660-662 (2002).
17. Soares G.M.B, Costa-Ferreira M. and de Amorim M.T.P, Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation, *Biores Technol.*, **79**, 171-177 (2001).
18. Nyanhongo G.S., Gomes J., Gübitz G.M., Zvaunya R., Read J. and Steiner W., Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res.*, **36**,1449-65 (2002).

19. Peralta-Zamora P., Pereira C.M., Tiburtius E.R.L., Moraes S.G., Rosa M.A., Minussi R.C and Duran N., Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Appl. Catal., B: Environ.*, **42**,131-144 (2003).
20. Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra KH., Cavaco-Paulo A. and Gübitz G.M., Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3357-3362 (2000).
21. Blázquez P., Casas N., Font X., Gabarrell X., Sarrà M., Caminal G. and Vicent T., Mechanism of textile metal dye biotransformation by *T. versicolor*. *Water Res.*, **38**, 2166-2172 (2004).
22. Soares G.M.B., Amorim M.T.P., Oliveira-Campos A.M., Hrdina R. and Costa-Ferreira M., Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **30**, 607-612 (2002).
23. Kirk T.K., Schultz E., Connors W.J., Lorenz L.F. and Zeikus J.G., Influence of culture parameters on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, **117**, 227-285 (1978).
24. Sanromán M.A., Chamy R., Núñez M.J. and Lema J.M., Enzymatic hydrolysis of starch in a fixed-bed pulsed-flow reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28/29**, 527-538 (1991).
25. Paszczynski A., Crawford R.L. and Huynh V.B., Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification methods. *Enzymol.*, **161**, 264-270 (1988).
26. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed.: American Public Health Association. Washington DC (1995).
27. Goszczynski S., Paszczynski A., Pasti-Grigsby M., Crawford R. and Crawford D., New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.*, **176**, 1339-1347 (1994).
28. Chivukula M., Spadaro J.T. and Renganathan V., Lignin peroxidase-catalysed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochem.*, **34**, 7765-7772 (1995).
29. Zhao X., Lu Y. and Hardin I., Determination of biodegradation from sulfonated dyes by *Pleurotus ostreatus* using capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 69-72 (2005).
30. Zille A., Górnacka B., Rehorek A. and Cavaco-Paulo A., Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6711-6718 (2005).

# Capítol 5

**The potential of *Trametes versicolor* and laccase enzyme for the efficient decolorization and detoxification of different type of recalcitrant dyes.**

---

Aquest capítol conté els resultats enviats per a publicació:

**Revista:** International Biodeterioration and Biodegradation. Març 2012.

**Autors:** Núria Casas, Paqui Blánquez, Glòria Caminal, Teresa Vicent, i Montserrat Sarrà.

1 **The potential of *Trametes versicolor* and laccase enzyme for the efficient**  
2 **decolorization and detoxification of different types of recalcitrant dyes**

3  
4 Núria Casas<sup>1</sup>, Paqui Blánquez<sup>1\*</sup>, Glòria Caminal<sup>2</sup>, Teresa Vicent<sup>1</sup>, Montserrat Sarra<sup>1</sup>

5 <sup>1</sup>Departament d'Enginyeria Química, <sup>2</sup>Unitat Associada de Biocatàlisi Aplicada, IQAC-  
6 CSIC. Escola d'Enginyeria. Universitat Autònoma de Barcelona 08193 Bellaterra,  
7 Spain.

8  
9  
10 \* Corresponding author.

11 E-mail address: [Paqui.Blanquez@uab.cat](mailto:Paqui.Blanquez@uab.cat)

12 Tel 34 93 581 1879; Fax 34 93 581 2013

13 E-mail address of the co-authors:

14 [ncasas@deisa.es](mailto:ncasas@deisa.es)

15 [Teresa.Vicent@uab.cat](mailto:Teresa.Vicent@uab.cat)

16 [Montserrat.Sarra@uab.cat](mailto:Montserrat.Sarra@uab.cat)

17 [Gloria.Caminal@uab.cat](mailto:Gloria.Caminal@uab.cat)

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25



## 26 **Abstract**

27 The potential use of *Trametes versicolor* to treat textile wastewater in an engineered  
28 process was studied, and the degradation of 15 commercial dyes using purified  
29 commercial laccase (in vitro) and using *T. versicolor* (in vivo) was performed.  
30 Generally, better results were obtained with fungal biodegradation, with simultaneously  
31 reduced toxicity. Approximately half (46%) of the dyes were decolorized by over 90%  
32 in 24 hours, 67% of the dyes were decolorized by over 64% and only 26% of the dyes  
33 were decolorized by less than 50%. Methylene Blue and Basic Fuchsin, which showed  
34 high toxicities, were minimally degraded by the fungus, favoring cellular lysis, and  
35 therefore changes in pellet morphology. When the initial dye concentrations were  
36 reduced from 178 mg l<sup>-1</sup> to 27 mg l<sup>-1</sup>, decolorization after 100 hours of treatment  
37 increased from 32% to 91%. To simulate textile industry conditions, repeated batch  
38 reactor experiments with different dyes were carried out. In the first decolorization  
39 cycle, Lanaset Grey G was decolorized by 94.6%, in the second cycle, Orange G was  
40 97.4% decolorized, Alizarin red S was decolorized by 87.4% in the third cycle, and in  
41 the fourth cycle, Acid Fuchsin was decolorized by 98.5%. A final cycle with Lanaset  
42 Grey G was carried out, and 77.6% decolorization was achieved.

43

## 44 **1. Introduction**

45

46 Synthetic dyes are used mainly in the textile, dyeing and printing industries, and part of  
47 the dyes used are discharged in industrial wastewater effluents (O'Neil et al., 1999;  
48 Pierce, 1994; Robinson et al., 2001). Most reactive dyes entering activated sludge  
49 sewage treatment plants pass through unchanged and are released into natural water

50 streams due to their complex polyaromatic structures and synthetic and recalcitrant  
51 natures.

52 Dyes vary in chemical composition but share a common feature: they are highly  
53 resistant to external agents such as chemical compounds, light or microbes. Dye  
54 chemical structures are characterized by their chromophoric groups, such as azo,  
55 anthraquinone, triarylmethane, and others, and by color index (C.I.). Textile wastewater  
56 is normally treated by physical and chemical methods, but drawbacks such as the  
57 creation of sludge, high cost, the emission of toxic pollutants and the production of  
58 recalcitrant substances make these processes imperfect from an environmental point of  
59 view. Moreover, not all dyes currently in use can be eliminated using these processes  
60 (Spadaro et al., 1994; Lambert et al., 1997). The removal of color from wastewater by  
61 conventional methods is difficult, even though color is present at low concentrations.  
62 Different physical, chemical and biological treatments or combinations thereof are  
63 currently being studied (Lin and Peng, 1996; Robinson et al., 2001; Kim et al., 2005;  
64 Lin et al., 2006; García-Montaña et al., 2006; Lodha and Chaudhari, 2007).

65 Alternative processes based on biotechnological principles are the subjects of increasing  
66 interest (Kandelbauer et al., 2004; Jadhav et al., 2008; Tauber et al., 2008; Tony et al.,  
67 2009; Papadia et al., 2011; Mishra et al., 2011). It has been widely shown that white rot  
68 fungi (WRF) have the ability to oxidize a large number of organic contaminants  
69 (Pointing, 2001; Blázquez et al., 2004; Auriol et al., 2008; Marco-Urrea et al., 2009)  
70 due to their powerful enzymatic systems. These are characterized by low specificities  
71 due to their oxidation mechanisms, which are based on the generation of free radicals  
72 and the presence of extracellular enzymes such as laccases and peroxidases. Laccases or  
73 laccase-like activity has been demonstrated in higher plants, in some insects and in a  
74 few bacteria; however, the best known laccases are of fungal origin, especially those

75 belonging to the WRF. The basidiomycete *Trametes versicolor* is one of the most  
76 studied WRF.

77 Other studies have reported the use of purified ligninolytic enzymes in dye  
78 decolorization (Soares et al., 2002, Nyanhongo et al., 2002, Couto, 2007; Telke et al.,  
79 2010). The use of these enzymes allows for easy operation and in some cases, fast  
80 degradation. To increase decolorization with these enzymes, low-molecular-weight  
81 mediators such as hydroxybenzotriazole or violuric acid are used (Soares et al., 2001;  
82 Nyanhongo et al., 2002). Moreover, few studies have examined the differences between  
83 microbial and enzymatic degradation, and few reports have studied reductions in  
84 toxicity (Manal et al., 2005). Abadulla et al. 2000 studied the great potential of these  
85 enzymes for environmental pollution control through microbial and enzymatic  
86 degradation and suggested that extracellular laccase seems to be largely responsible for  
87 the degradation of azo, anthraquinonic and indigo dyes, but they did not find a  
88 correlation between decolorization and detoxification. Casas et al., 2009 demonstrated  
89 that *T. versicolor* was able to further degrade metabolites by the action of its laccase  
90 during the biodegradation of triphenylmethane dyes.

91 The aim of this paper is to study the potential of *T. versicolor* to treat textile wastewater  
92 when a suitable engineering strategy is used, taking into account not only decolorization  
93 but also detoxification.

94

## 95 **2. Materials and Methods**

96

### 97 **2.1 Chemicals**

98

99 Table 1 shows the main characteristics of the dyes used in this study. Purified laccase  
 100 from *T. versicolor* was obtained from Fluka (ref. 53739) (Barcelona, Spain). All other  
 101 chemicals were reagent grade.

102

103 **Table 1.** Characteristics of the dyes used in this study.

104

Dye	C.I.	Type	$\lambda$ max (nm)	Molecular formula	Company	Ioniza tion
Acid Fuchsin	42685	Triarylmetane	545	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	SIGMA (F-8129)	Acid
Acid green 16	44025	Triphenylmetane	640	C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	ALDRICH (S-468770)	Acid
Alizarin Red S	58005	Antraquinonic	428	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> SNa	SIGMA (A-5533)	Acid
Amino Black 10	20470	Diazo	621	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	ALDRICH (A-8181)	Acid
Azocarmine B	50090	Quinone-imine	516	C <sub>28</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	FLUKA (11599)	Acid
Basic Fuchsin	42510	Triarylmetane	539	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	ALDRICH (861081)	Alkali
Brilliant Green 1	42040	Triaryletane	624	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	SIGMA (B-6756)	Alkali
Brilliant Green 20	42590	Triphenylmetane	632	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> BrCl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> Zn	MERCK (115944)	Alkali
Lanaset Burdeos B	-	Organometalic mixture	855	-	CIBA	Acid
Lanaset Grey G	-	Organometalic mixture	590	-	CIBA	Acid
Lanaset Pardo B	-	Organometalic mixture	370	-	CIBA	Acid
Lanasyn Grey	12230	Azo metal complex	591	C <sub>40</sub> H <sub>34</sub> CrN <sub>6</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	ALDRICH (S-467014)	Acid
Methylene Blue	52015	Tiazine	612	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> S	SIGMA (MB-1)	Alkali
Naphtol Yellow S	10316	Nitro	399	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> SNa <sub>2</sub>	FLUKA (498747)	Acid
Orange G	16230	Azo	478	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> Na <sub>2</sub>	SIGMA (O-3756)	Acid

105

106

107 2.2 Microorganism

108

109 *T. versicolor* was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC#  
110 42530). The fungus was maintained on 2% malt agar slants at 25 °C until use.  
111 Subcultures were routinely made. Fungal pellets were obtained as described previously  
112 (Blázquez et al., 2004).

113

114 2.3 Laboratory-scale fungal biodegradation

115

116 *2.3.1 Equipment and operating conditions*

117 A glass air-pulsed bioreactor (Blázquez et al., 2007) operated in batch mode with a  
118 working volume of 1500 mL was equipped with a pH controller to maintain a pH of 4.5.  
119 The solution in the bioreactor was inoculated with an amount of pellets equivalent to 2.8  
120 g dry weight l<sup>-1</sup>. Air flow at 9.3 l h<sup>-1</sup> was introduced by pulses, maintaining the biomass  
121 in suspension. The temperature was maintained at 25°C.

122

123 *2.3.2 Culture medium*

124 The culture medium contained 8 g l<sup>-1</sup> glucose, 1.9 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 1.168 g l<sup>-1</sup> 2,2-dimethyl  
125 succinate buffer and 0.15 g l<sup>-1</sup> of dye. In addition, 11 ml of supplemented medium (Kirk  
126 et al., 1978) were added per liter. The medium was sterilized at 120 °C for 30 min after  
127 adjusting the pH to 4.5 with 0.5 M NaOH.

128

129 2.4 Enzymatic biodegradation

130

131 Commercial purified laccase from *Trametes versicolor* was added to 100 ml of 0.15 g l<sup>-1</sup>  
132 dye solution buffered with 1.64 mM 2,2-dimethyl succinate at pH 4.5 in a 500 ml  
133 Erlenmeyer flask. The initial activity was measured at approximately 1210 U l<sup>-1</sup>. Flasks  
134 were placed in an orbital shaker (135 rpm, r = 25 mm) at 25 °C. In each experiment, the  
135 dye concentration and the enzyme activity were measured.

136

137 2.5 Analytical methods

138

139 2.5.1 Color and glucose determination

140 Spectrophotometric measurements were carried out at the visible maximum absorbances  
141 of each dye (summarized in Table 1) using a Varian UV/Visible Cary  
142 spectrophotometer at 20 °C. Glucose concentrations were measured with a YSI 2000  
143 enzymatic analyzer from the Yellow Springs Instrument Co.

144

145 2.5.2 Laccase assay

146 Laccase activities were measured using a modified version of the method for the  
147 determination of manganese peroxidase (Kaal et al., 1993), which employs 2,6-  
148 dimethoxyphenol (DMP) as the substrate (extinction coefficient: 24 800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>  
149 (Wariishi et al., 1992)). The results were expressed as activity units (U) per milliliter.  
150 One U was defined as the number of micromoles of DMP oxidized per min.

151

152

153

### 154 2.5.3 Toxicity assay

155 Toxicity was measured using a Microtox System (Microbics Co.) (APHA, 1995) The  
156 effective concentration (EC<sub>50</sub>), based on the *Photobacterium phosphoreum* test, was  
157 measured after 5 min. Toxicity units (TU) were defined as  $TU (\%) = 100/EC_{50}$ .  
158 According to the EC Regulation, a solution is considered toxic if the TU is higher than  
159 25% measured on *P. phosphoreum*.

160

## 161 3. Results and discussion

162

### 163 3.1 Enzymatic biodegradation

164

165 To study the degradation of the selected dyes by purified commercial laccase, *in vitro*  
166 experiments were carried out in Erlenmeyer flasks at the laboratory scale. Table 2  
167 summarizes the results of these experiments. Different dyes exhibited significantly  
168 different behaviors. Some of the dyes, such as Orange G, Brilliant Green 1, Brilliant  
169 Green 20, Alizarin Red S, Amino Black 10 and Azocarmine B, were easily degraded by  
170 the commercial enzyme, with decolorization percentages between 84 and 93%. Acid  
171 Green 16 and the organometallic mixture dyes Lanaset Burdeos B and Lanaset Pardo B  
172 were more resistant to enzymatic attack, being degraded by 60, 67 and 60%,  
173 respectively, whereas the aryl dyes Acid Fuchsin, Methylene Blue and Basic Fuchsin,  
174 and the organometallic complex dyes Lanasyn Grey and Lanaset Grey G were  
175 minimally degraded by the commercial laccase, with decolorization yields between 28  
176 and 49%. No decolorization of the nitro dye Naphthol Yellow S was observed in the *in*  
177 *vitro* experiments.

178 Laccase activities were measured at the ends of the experiments. For some of the dyes  
179 with low degrees of degradation, such as Acid Fuchsin, Lanaset Grey G and Naphthol  
180 Yellow S, almost no enzyme deactivation was detected (data not shown). In the  
181 Azocarmine B, Brilliant Green 1 and Brilliant Green 20 experiments, where the dyes  
182 were degraded to a high degree, drastic laccase deactivations (90%) were observed after  
183 24 h. The reactions were very fast for these dyes, with the enzymatic attack taking place  
184 before deactivation.

185

186 **Table 2.** Experimental results of decolorization by commercial laccase at an initial  
187 concentration of  $1210 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$  after 24 h.

188

Dye	% decolorization	Dye	% decolorization
Acid Fuchsin	28	Lanaset Burdeos B	67
Acid Green 16	60	Lanaset Grey G	35
Alizarin Red S	84	Lanaset Pardo B	60
Amino Black 10	93	Lanasyn Grey	49
Azocarmine B	84	Methylene Blue	37
Basic Fuchsin	18	Naphtol Yellow S	0
Brilliant Green 1	90	Orange G	87
Brilliant Green 20	90		

189

190

### 191 *3.2 Fungal biodegradation by Trametes versicolor in the lab-scale bioreactor*

192

193 The ligninolytic fungal biodegradation of dyes is related to two processes: the  
194 production of extracellular enzymes that catalyze the dye degradation and the  
195 adsorption of the dye onto the biomass followed by its transfer into cells, where  
196 degradation aided by intracellular enzymes occurs (Blázquez et al., 2004). Table 3



197 shows the results of the biodegradation experiments for the different dyes by *Trametes*  
198 *versicolor*.

199 For most of the dyes (Orange G, Acid Fuchsin, Brilliant Green 1, Alizarin Red S,  
200 Lanasyn Grey, Lanaset Grey G, Amino Black 10, Azocarmine B, Acid Green 16,  
201 Lanaset Burdeos B and Lanaset Pardo B), fast decolorization occurred during the first  
202 24 hours, and the culture media and biomass were almost fully decolorized at the ends  
203 of the experiments. The changes in the appearances of the broths and the biomass  
204 during the treatment of these dyes was clearly evident; although the culture media and  
205 pellets were initially intensely colored, both phases lost their color to a large extent after  
206 24 hours and became colorless by the end of the process (Image 1).

207

208



209  
210

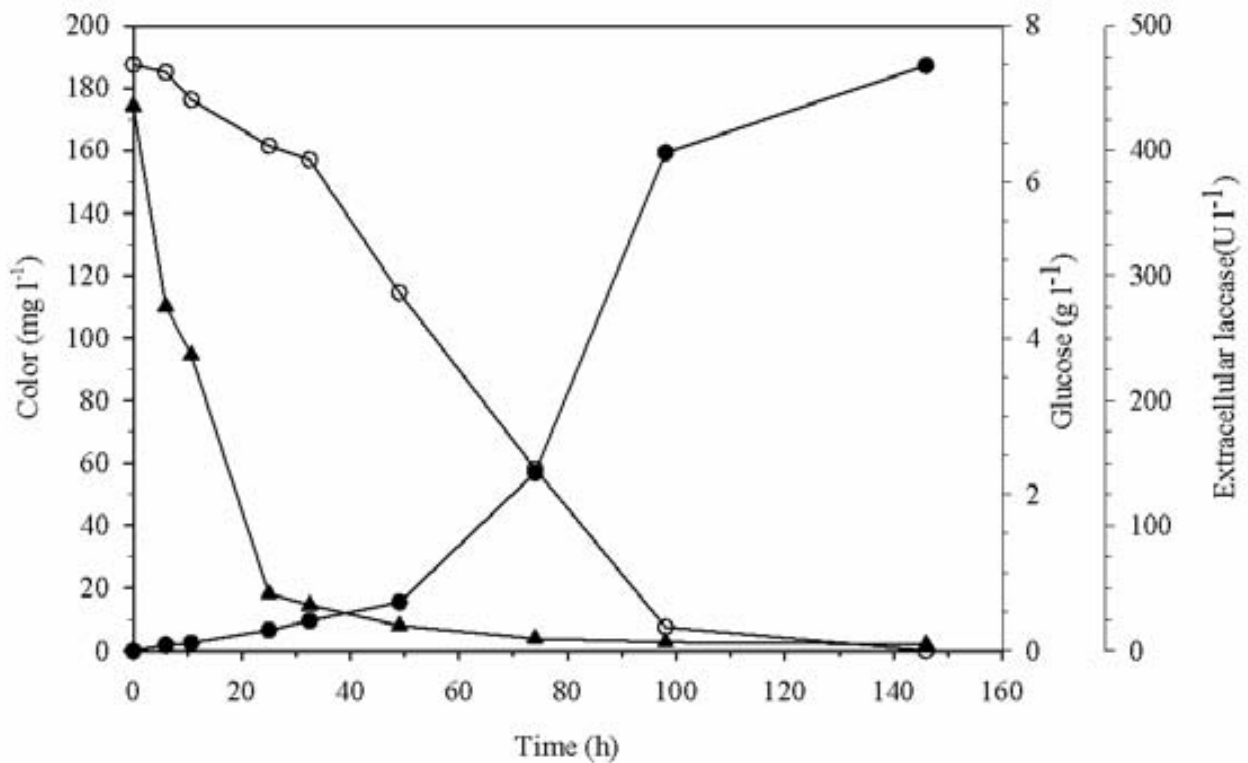
211 **Image 1.** Progress of the biomass color during the treatment of Azocarmine B dye: A:  
212 time 2 hours, B: time 24 hours, C: time 146 hours.

213

214

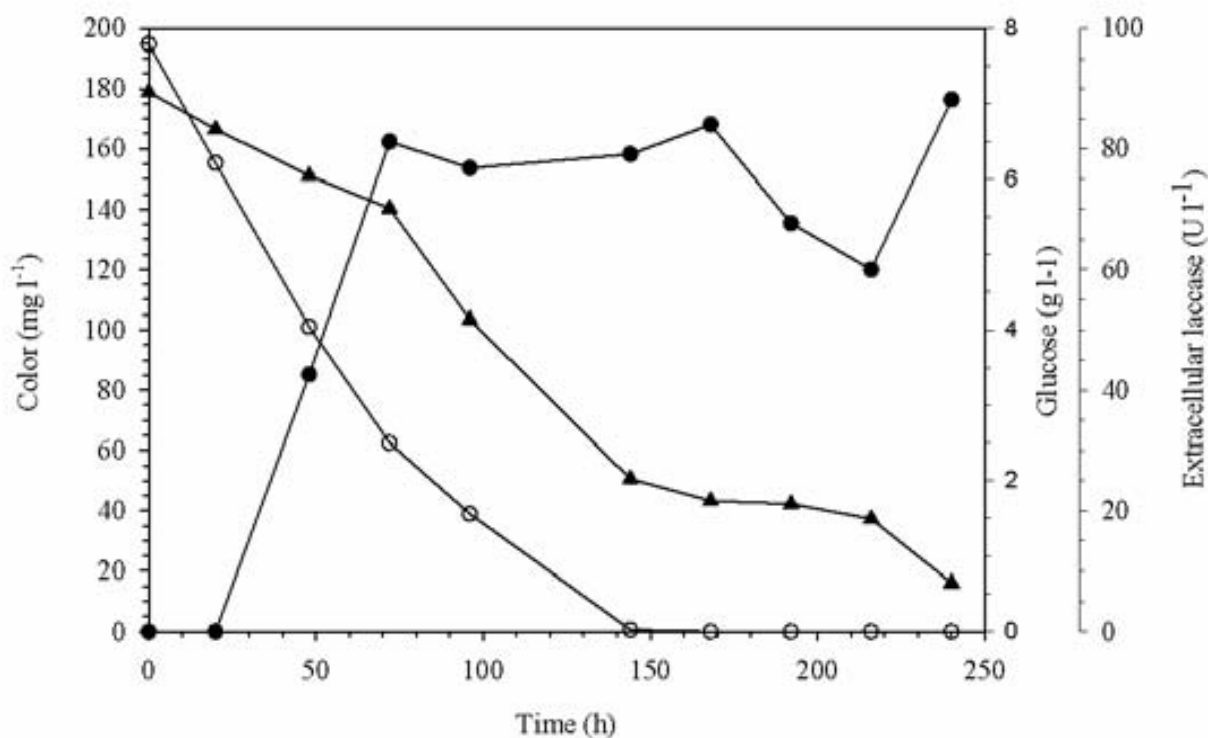
215 Figure 1 shows the glucose concentration, extracellular enzyme activity and  
216 decolorization percentage over time for Azocarmine B dye as an example of the  
217 behaviors of these parameters for the dyes that were easily degraded by the fungus. A  
218 glucose consumption of  $0.54 \text{ g g dry cell weight}^{-1} \text{ d}^{-1}$  was observed until the glucose  
219 was exhausted after 100 hours. Although the highest laccase extracellular enzyme was  
220 observed at the end of the experiment ( $468 \text{ U l}^{-1}$ ), the decrease in dye concentration

221 occurred largely within the first 24 hours, when extracellular laccase activity was very  
222 low. Therefore, no direct relationship between laccase activity and the decolorization  
223 rate exists, as has been demonstrated previously (Blázquez et al., 2007; Casas et al.,  
224 2007).



225  
226 **Figure 1.** Time course of glucose concentration (○), extracellular enzyme activity (●)  
227 and decolorization percentage (▲) for Azocarmine B dye.

228  
229 The nitro dye Naphthol Yellow S was degraded by the fungus but much more slowly  
230 than the dyes previously mentioned. The results of degradation experiments with this  
231 dye are shown in Figure 2. The glucose consumption rate was lower (0.36 g g DCW<sup>-1</sup>  
232 d<sup>-1</sup>) and extracellular laccase production was much lower than for other dyes, although  
233 laccase production was maintained at approximately 80 U l<sup>-1</sup> from 72 hours until the  
234 end of the experiment (240 h).



235

236

237 **Figure 2.** Time course of glucose concentration (○), extracellular enzyme activity (●)  
 238 and decolorization percentage (▲) for Naphtol Yellow S dye.

239

240 Methylene Blue and Basic Fuchsin were minimally degraded by the fungus. In the  
 241 treatment of the thiazole dye Methylene Blue with *Trametes versicolor*, only 14%  
 242 decolorization was achieved after 24 hours, and only 28% decolorization was achieved  
 243 at the end of the experiment. The maximum enzyme activity, 114 U l<sup>-1</sup>, was reached  
 244 after 24 hours, with extracellular enzyme activity quickly decreasing to 40 U l<sup>-1</sup> by the  
 245 end of the experiment. The biomass at the end of the experiment was completely dyed  
 246 and had lost the pellet morphology, indicating that only adsorption took place and that  
 247 no biodegradation processes occurred. Similar results were obtained with the  
 248 tryphenylmethane dye Basic Fuchsin. Brilliant Green 20 was 78% decolorized, but the

249 biomass at the end of the experiment was completely dyed, while no loss of pellet  
 250 morphology was observed. Further measurements of the decolorization of Brilliant  
 251 Green 20 in live and dead pellets indicated the inactivation of the fungal activity,  
 252 showing the occurrence of adsorption phenomena rather than the biodegradation  
 253 process. To gain further insight, toxicity analyses of the dye solutions before and after  
 254 biological treatment were carried out. Toxicity values are shown in Table 3. Biological  
 255 treatment reduced the initial toxicities in all cases except for Lanasyn Grey. Methylene  
 256 Blue and Basic Fuchsin showed high toxicities. Toxicity seemed to occur through  
 257 cellular lysis, resulting in a change in pellet morphology.

258

259 **Table 3.** Decolorization and detoxification of the dyes by fungal treatment

Dye	% decolourization (24 h)	% decolorization (100 h)	Initial toxicity (TU)	Final toxicity (TU)
Acid Fuchsin	98	>99	6,9	3,6
Acid Green 16	90	>99	1,3	0,6
Alizarin Red S	92	94	4,4	1,3
Amino Black 10	96	>99	11,3	2,1
Azocarmine B	90	>99	8,1	1,6
Basic Fuchsin	12	40	303,0	58,8
Brilliant Green 1	55	93	81,0	75,9
Brilliant Green 20	76	78	45,5	11,9
Lanaset Burdeos B	83	88	3,4	2,2
Lanaset Grey G	92	98	7,5	3,8
Lanaset Pardo B	64	81	2,9	4,2
Lanasyn Grey	72	87	9,0	13,8
Methylene Blue	14	28	33,3	31,3
Naphtol Yellow S	8	50 92 (240 h)	6,9	1,4
Orange G	97	>99	5,6	4,7

260

261

262 To decrease the toxicity of the fungus, several biodegradation and adsorption  
 263 experiments were carried out at lower dye concentrations. Methylene Blue and Basic  
 264 Fuchsin exhibited similar results (data not shown). When dye concentrations decreased,  
 265 adsorption decolorization percentages decreased slightly (data not shown). The most  
 266 remarkable effect was observed in fungal treatment (Table 4). When the initial dye  
 267 concentrations decreased, decolorization yields increased after 100 hours of treatment.  
 268 High decolorization and detoxification were achieved simultaneously with fungal  
 269 treatment. The use of *Trametes versicolor* under laccase production conditions was  
 270 demonstrated as a suitable process for the treatment of different kinds of dyes.

271

272 **Table 4.** Experimental results for Methylene Blue decolorization process by *Trametes*  
 273 *versicolor* at 100 h.

274

Initial Concentration (mg·L <sup>-1</sup> )	Glucose Consumption (g)	Decolorization (%)	Final Activity (U·L <sup>-1</sup> )
178.08	5.3	32.16	34.3
101.33	5.8	20	36.2
48.55	5.7	19.55	64.5
26.78	6.6	90.95	92.7

275

276

277

278 *3.3 Comparison between enzymatic and fungal treatments*

279

280 In some cases, the total decolorization using commercial laccase was very low. For  
 281 example, the decolorization achieved with Acid Fuchsin and Azocarmine B was less  
 282 than 50%, while fungal treatment resulted in 100% decolorization. Acid Yellow S, a  
 283 nitro dye, was decolorized by 90% by fungi, but the commercial enzyme was not able to  
 284 decolorize this dye.

285 The difference between fungal and laccase degradations of Acid Fuchsin may be due to  
286 the activities of different enzymes or fungal metabolites that can act as mediators. For  
287 example, if a common laccase mediator such as 1-hydroxybenzotriazole ( $10^{-3}$  M) is  
288 added to the laccase solution, complete degradation occurs in only 120 min. However,  
289 the addition of such mediators is not desirable due to their possible mutagenic and toxic  
290 properties (Canas et al., 2011). Moreover, the use of the mediator raises the price of the  
291 treatment and adds extra compounds to the effluent.

292 One of the advantages of using whole cells is that the availability of cells is only limited  
293 by the number of organisms that can be cultured, whereas enzymes are limited by the  
294 amount that is commercially available. At the same time, biomass is inexpensive, the  
295 cost of fermentation is usually low, and the purification costs associated with the  
296 purchase of enzymes are avoided with the use of biomass. Processes can be more  
297 complicated if they must be designed for cell growth, and growth requirements in a  
298 large scale process can be difficult to satisfy. In this case, however, growth does not  
299 occur inside the reactor, but rather the medium is inoculated with previously grown  
300 pellets.

301 The range of substrates degraded by laccase can be expanded with the use of co-factors  
302 or mediators, which can be synthetic or natural (Camarero et al., 2005, Kunamneni et  
303 al., 2008, Grassi et al., 2011). In a universal process, the use of whole biomass does not  
304 require exogenous co-factors for re-dox reactions because the cells recycle existing co-  
305 factors. Additionally, for re-dox reactions, it is not necessary to provide complimentary  
306 reactions to recycle the co-factors that are converted. Other drawbacks of the use of  
307 purified enzymes are their deactivation over time and the comparably lower range of  
308 treatable dyes compared with the use of fungus, even with the addition of mediators.

309 An advantage of enzyme processes over biomass-based processes is that a vessel may  
310 contain cells and spent growth medium in addition to products and residual substrates,  
311 and the formation of unwanted by-products is more likely because other enzymes are  
312 present in addition to the desired enzyme in the “catalyst.” However, this was not a  
313 problem in the process presented here because the biodecolorization and detoxification  
314 of the initial culture was demonstrated using whole *Trametes versicolor*.

315 One final advantage of the enzyme process is that it is possible that enzymes are not  
316 excreted, and cell lysis prior to conversion is necessary. However, Blázquez et al.  
317 (2004) demonstrated that substrates are transported across the wall of the cell, and  
318 laccase is excreted during the process.

319

#### 320 *3.4 Repeated batch reactor experiments with different dyes*

321

322 Once the applicability of the fungal process with *T. versicolor* for the decolorization and  
323 detoxification of textile dyes was demonstrated, experiments were performed to  
324 simulate textile industry conditions, with different dyeing processes used and different  
325 wastewaters generated using different dyes.

326 The bioreactor was operated in repeated batch mode. First, the bioreactor was filled  
327 with one of the dye solutions; once the dye was decolorized, the bioreactor was emptied  
328 and filled with a new dye solution. The dyes used in this experiment were Lanaset Grey  
329 G (organometallic), Orange G (azo), Alizarin Red S (anthraquinonic) and Acid Fuchsin  
330 (triarylmethane).

331

332

333

334 **Table 5.** Characteristics of the different decolorization cycles in repeated batch mode  
 335 operation.  
 336

	Decolorization Cycles				
	Lanaset Grey G	Orange G	Alizarin Red S	Acid Fuchsin	Lanaset Grey G
<b>Cycle number</b>	1	2	3	4	5
<b>Cycle length (h)</b>	22.83	23	23.08	22.25	7
<b>Initial concentration (mg·L<sup>-1</sup>)</b>	155.6	150.9	142.5	137.0	73.2
<b>mg dye/g dry weight</b>	70.1	68.0	64.2	61.7	33.0
<b>Decolorization</b>	94.6	97.4	87.4	98.52	77.6
<b>Laccase max. (U·L<sup>-1</sup>)</b>	46.4	130.7	45.7	47.8	28.6
<b>Dye removal rate (mg dye·(L·h)<sup>-1</sup>)</b>	6.50	6.39	5.39	6.07	8.11

337

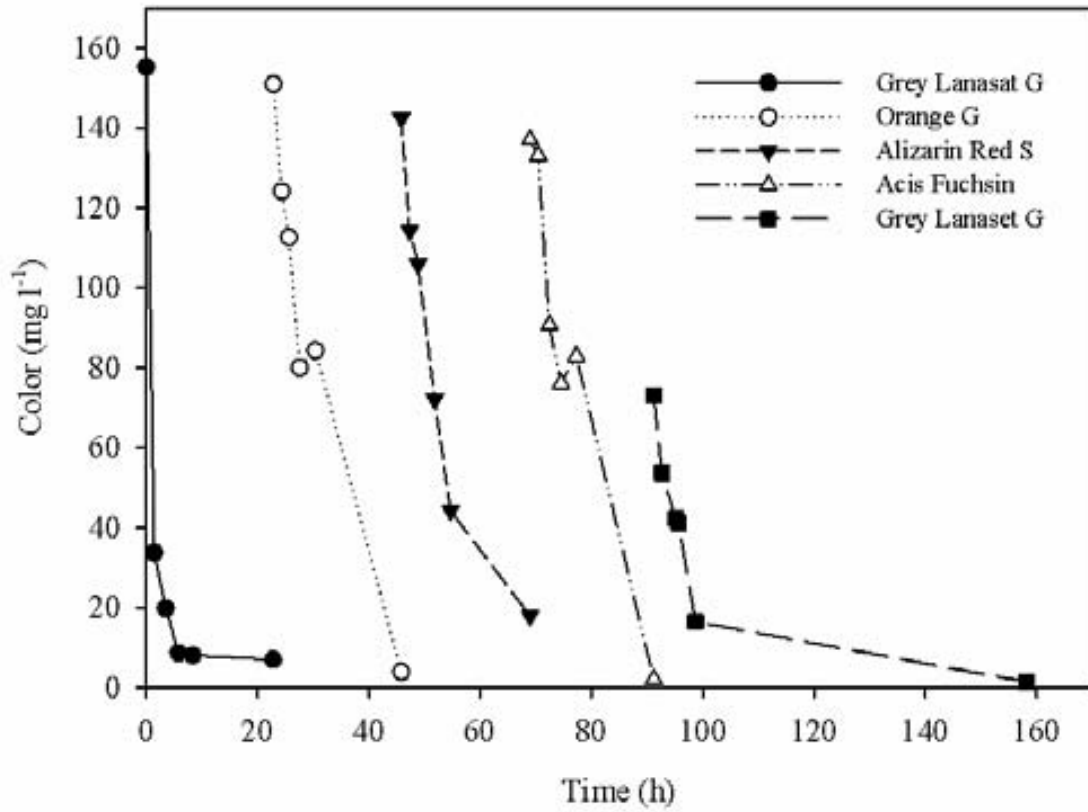
338

339 Table 5 summarizes the characteristics of the different decolorization cycles, and Figure  
 340 3 shows the dye concentrations and laccase production over time. Good decolorization  
 341 was achieved for each of the four dyes. In the first decolorization cycle, Lanaset Grey G  
 342 was decolorized by 94.6%. In the second cycle, with Orange G, 97.4% decolorization  
 343 was achieved, and laccase activity was three times higher than in the first batch due to  
 344 the previous stimulation of the ligninolytic enzymatic system. In the third cycle,  
 345 Alizarin Red S, an anthraquinonic dye, was treated, and a decolorization of 87.4% was  
 346 achieved. In the fourth cycle, Acid Fuchsin was decolorized by 98.5%. In the third and  
 347 fourth cycles, laccase activity was maintained between 45 and 50 U l<sup>-1</sup>. Finally, a short  
 348 cycle with Lanaset Grey G was carried out, and 77.6% decolorization was achieved.  
 349 For all of the dyes, decolorizations similar to those obtained in simple batch mode were  
 350 achieved. The repeated batch mode experiment shows that it is possible to decolorize



351 different dyes at high yields in a short time period. After five cycles, no loss of  
352 decolorization capacity was observed.

353



354

355 **Figure 3.** Time course of dye concentration during the different decolorization cycles in  
356 repeated batch mode operation.

357

358

359

360

361

362

363

364 **4. Conclusions**

365

366 The fungus *Trametes versicolor* was shown to be usable in the biodecolorization of all  
367 of the types of dyes used in this work, with its use clearly suggesting a detoxification of  
368 the initial culture. However, when commercial laccase was used, the *in vitro* process  
369 exhibited lower efficiency and lower detoxification, and the enzyme did not fully  
370 decolorize all of the dyes tested. The repeated batch mode experiment showed that it is  
371 possible to decolorize different dyes at high yields in a short time period. After five  
372 cycles, no loss of decolorization capacity was observed. The use of the whole fungus is  
373 fully applicable in cases where there is a complex compound to oxidize.

374

375 **Acknowledgements**

376 This work has been financially supported by the Spanish Plan Nacional de I+D+I,  
377 project number CTM2007-60971. The authors are members of the consolidated research  
378 group in Catalonia (2009-SGR-656). The Department of Chemical Engineering of the  
379 Universitat Autònoma de Barcelona is the Biochemical Engineering Unit of the Xarxa  
380 de Referència en Biotecnologia (XRB) de la Generalitat de Catalunya. N.C.  
381 acknowledges DURSI for a predoctoral grant.

382

383

384

385

386

387

388

389 **References**

- 390 Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M., 2000.  
391 Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes*  
392 *hirsuta*. Applied Environmental Microbiology 66, 3357-3362.
- 393 Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., Noguerol, T.N., Piña, B.,  
394 2008. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a  
395 municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from  
396 *Trametes versicolor*. Chemosphere 70, 445-452.
- 397 Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T.,  
398 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*.  
399 Water Research 38, 2166-2172.
- 400 Blánquez, P., Caminal, G., Sarrà, M., Vicent, T., 2007. The efecto of HRT on the  
401 decolourization of the Grey Lanaset G textile dye by *Trametes versicolor*.  
402 Chemical Engineering Journal 126, 163-169.
- 403 Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2005. Lignin-derived  
404 compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of  
405 recalcitrant dyes. Applied and Environmental Microbiology 71(4), 1775-1784.
- 406 Canas, A. Camarero, S., 2011. Laccases and their natural mediators: Biotechnological  
407 tools for sustainable eco-friendly processes. Biotechnology Advances 28(6),  
408 694-705.
- 409 Casas, N., Blánquez, P., Gabarrell, X., Vicent, T., Caminal, G., Sarrà, M., 2007.  
410 Degradation of orange g by laccase: fungal versus enzymatic process.  
411 Environmental Technology 23, 1103-1110.

412 Casas, N., Parella, T., Vicent, T., Caminal, G., Sarrà, M., 2009. Metabolites from the  
413 biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase.  
414 Chemosphere 75, 1344-1349.

415 Couto, S.R., 2007. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes*  
416 *hirsuta*. Journal of Hazardous Materials 148, 768-770.

417 García-Montaña, J., Torrades, F., García-Hortal, J.A., Domènech, X., Peral, J., 2006.  
418 Combining photo-Fenton process with aerobic sequencing batch reactor for  
419 commercial hetero-bireactive dye removal. Applied Catalysis B: Environmental  
420 67, 86-92.

421 Grassi, E., Scodeller, P., Filiel, N., Carballo, R., Levin, L., 2011. Potential of *Trametes*  
422 *trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different  
423 types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. International  
424 Biodeterioration and Biodegradation 65, 635-643.

425 Jadhav, U.U., Dawkar, V.V., Ghodake, G.S., Govindwar, S.P., 2008. Biodegradation of  
426 Direct Red 5B, a textile dye by newly isolated *Comamonas sp.* UVS. Journal of  
427 Hazardous Materials 158, 507-516.

428 Kaal, E.E.J., de Jong, E.D., Field, J.A., 1993. Stimulation of ligninolytic peroxidase  
429 activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain  
430 BOS55. Applied Environmental Microbiology 59, 4031-4036.

431 Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R.V., Erlacher, A., Gübitz, G.M., 2004. Study of  
432 dye decolorization in an immobilized laccase enzyme –reactor using online  
433 spectroscopy. Biotechnology and Bioengineering 87, 552-563.

434 Kim, G.Y., Lee, K.B., Cho, S.H., Shim, J., Moon, S.H., 2005. Electroenzymatic  
435 degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. Journal of  
436 Hazardous Materials B126, 183-188.

437 Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikis, J.G., 1978. Influence of  
438 culture parameters on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*.  
439 Archives of Microbiology 117, 227-285.

440 Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou F.J., Alcalde, M., 2008.  
441 Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated  
442 carriers. Process Biochemistry 43, 169-178.

443 Lambert, S.D., Graham, N.J.D., Sollar, C.J., Fowle, G.D., 1997. Evaluation of inorganic  
444 adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides. Water  
445 Science and Technology 36,173-80.

446 Lin, S.H., Peng, F.C., 1996. Continuous treatment of textile wastewater by combined  
447 coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. Water Research.  
448 30(3), 587-92.

449 Liu, C.C., Hsieh, Y.H., Lai, P.F., Li, C.H., Kao, C.L., 2006. Photodegradation  
450 treatment of azo dye wastewater by UV/TiO<sub>2</sub> process. Dyes Pigments 68, 191-  
451 195.

452 Lodha, B., Chaudhari, S., 2007. Optimization of Fenton-biological treatment scheme for  
453 the treatment of aqueous dye solutions. Journal of Hazardous Materials 148,  
454 459-466.

455 Manal, M.A., El-Naggar, S., El-Aasar, A., Khlood, I.B., 2005. Biorremediation of  
456 crystal violet using air bubble bioreactor packed with *Pseudomonas aeruginosa*.  
457 Water Res.39, 5045–5054.

458 Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot  
459 fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation  
460 products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere 74, 765-772.

461 Mishra, A., Kumar, S., Pandey, A.K., 2011. Laccase Production and simultaneous  
462 decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates  
463 of white rot fungus. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65, 487-  
464 493.

465 Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvauya, R., Read, J., Steiner, W., 2002.  
466 Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of  
467 *Trametes modesta*. *Water Research* 36,1449-65.

468 O'Neil, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M., Delee, W.,  
469 1999. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and  
470 simulation: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74,  
471 1009-1018.

472 Papadia, S., Rovero, G., Fava, F., Di Gioia, D., 2011. Comparison of different pilot  
473 scale bioreactors for the treatment of a real wastewater from the textile industry.  
474 *International Biodeterioration and Biodegradation* 65, 396-403.

475 Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied*  
476 *Microbiology and*  
477 *Biotechnology* 57, 20-33.

478 Pierce, J., 1994. Colour in textile effluents-the origin of the problem. *J. Soc. Dyers*  
479 *Colourists*, 110, 131-134.

480 Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in  
481 textile effluents: a critical review on current treatment technologies with a  
482 proposed alternative, *Bioresource Technology* 77, 247-255.

483 Soares, G., Costa-Ferreira, M., Amorim, M.T., 2001. Decolorization of an  
484 anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresources Technology*  
485 79,171-177.

486 Soares, G., Pessoa, M.B., Amorim, M.T., Oliveira-Campos, A.M., Hedina, R., Costa-  
487 ferreira, M., 2002. Specificity of phenolic disazo dyes in relation to  
488 transformation by laccase. *Enzyme and Microbial technology* 30, 607-612

489 Spadaro, J.T., Lorne, I., Renganathan, V., 1994. Hydroxyl radical mediated degradation  
490 of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environmental Science and*  
491 *Technology* 28,1389-1393.

492 Tauber, M.M., Gübitz, G.M., Rehorek, A., 2008. Degradation of azo dyes by oxidative  
493 processes – Laccase and ultrasound treatment. *Bioresource Technology* 99,  
494 4213-4220.

495 Telke, A.A., Kadam, A.A., Jagatap, S.S., Jadhav, J.P., Govindwar, S.P., 2010.  
496 Biochemical characterization and potential for textile dye degradation of blue  
497 laccase from *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Biotechnology and Bioprocess*  
498 *Engineering* 15, 696-703.

499 Tony, B.D., Goyal, D., Khanna, S., 2009. Decolorization of textile azo dyes by aerobic  
500 bacterial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 462-  
501 469.

502 Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1992. Manganese (II) oxidation by manganese  
503 peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Journal of*  
504 *Biological Chemistry* 267, 23688-23695.

505

# Capítol 6

## Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase

---

Aquest capítol conté els resultats publicats:

**Revista:** Chemosphere. 2009 Volum 75, pàgines 1344-1349.

**Autors:** Núria Casas, Teodor Parella, Teresa Vicent, Glòria Caminal i Montserrat Sarrà.



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase

Núria Casas<sup>a</sup>, Teodor Parella<sup>c</sup>, Teresa Vicent<sup>a</sup>, Glòria Caminal<sup>b</sup>, Montserrat Sarrà<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departament d'Enginyeria Química, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain<sup>b</sup> Unitat de Biotatàlisis aplicada Associada al IQAC (CSIC-UAB), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain<sup>c</sup> Servei RMN, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 November 2008

Received in revised form 9 February 2009

Accepted 11 February 2009

Available online 18 March 2009

#### Keywords:

Ligninolytic fungus

NMR

Product identification

Detoxification

### ABSTRACT

The feasibility of degrading triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* and laccase has been investigated for the following dyes: Acid Fuchsin, Brilliant Green 1, Basic Fuchsin, Methyl Green or Acid Green 16. The toxicity level of triphenylmethane dyes is linked to their basic character, but significant detoxification is obtained when there is biodegradation. Identification of enzymatic degradation products by <sup>1</sup>H NMR made it possible to propose a general rule for the laccase attack on triphenylmethane compounds. The enzyme completely degrades the molecular part of the canonical resonance substructures of dyes, because no *N*-substituted, mono-*N* and di-*N,N* substituted *p*-amine aromatic residues seem to be wholly degraded. No enzymatic degradation is observed in the cases of either the non-substituted or trisubstituted-*N,N,N* *p*-amine aromatic residues. On the other hand, for all the dyes tested, no aromatic residues are detected after fungal treatment; this means that *T. versicolor* is more capable of performing further degradation than is laccase. The results of this study demonstrated that compounds with a triphenylmethane structure can be degraded by *T. versicolor* even if they are highly toxic. The enzyme laccase plays an important role in the attack on the structure and a general rule for predicting which products would be obtained after the enzymatic treatment is suggested.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Triphenylmethane dyes are used in many industrial dyeing processes, for example for paper, leather, plastics, varnishes, fat, waxes and extensively in the textile industry for nylon, wool, silk and cotton (Azmi et al., 1998; Hessel et al., 2007). Some triphenylmethane dyes are also used as medical and biological stains. In effluents, these coloured chemicals pose aesthetic and environmental problems because they absorb light and interfere with aquatic biological processes in the environment. Also most of them are toxic molecules and difficult to degrade biologically in conventional wastewater treatment plants. In treatment by activated sludge, the dyes are adsorbed on the biomass more than they are effectively degraded and the inhibition of microbial growth by certain toxic dyes has been reported. Consequently, industrial wastewater containing dyes is generally treated by physicochemical methods (Gosetti et al., 2004), but biological methods have many advantages, such as the possibility of degradation of dye molecules and production of less sludge.

There are a few reports on biodegradation of triphenylmethane dyes. Some authors have reported degradation by aerobic bacteria

or consortium (Sani and Banerjee, 1999; Sharma et al., 2004; Manal et al., 2005; Alhassani et al., 2007; Baxi and Shah, 2007); by yeast (Jadhav and Govindwar, 2006); by microalgae (Daneshvar et al., 2007) and by anaerobic bacteria (Rai et al., 2007).

White-rot fungi are capable of degrading a wide variety of pollutants including textile dyes. Bumpus and Brock (1988) reported the involvement of the lignin-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium* in decolourizing triphenylmethane dyes using both fungus and purified culture broth containing extracellular enzymes. Subsequently, Yesilada (1995) reported decolourization of Crystal Violet by different fungi, including *P. chrysosporium* and *Trametes versicolor*. More recently, the degradation has been reported of triphenylmethane dyes by different white-rot fungi (Novotny et al., 2001, 2004; Tekere et al., 2001; Liu et al., 2004; Zille et al., 2005; Eichlerova et al., 2006; Chander and Arora, 2007).

Several factors can influence biodegradation by fungi, such as the fungal growth conditions and the chemical structure of the compounds. Dyes with *ortho*- and *para*-substituted mono- and polyphenol groups or aromatic amines in their chemical structure are decolourized easier and faster than dyes with non-substituted aromatic structure (Thurston, 1994; Yarovolov et al., 1994).

In general, most of the reports on the biotreatment of dyes deal mainly with decolourization, but few report on the reduction in toxicity (Manal et al., 2005) or on the biodegradation products or

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2789; fax: +34 93 581 2013.

E-mail address: [Montserrat.Sarra@uab.es](mailto:Montserrat.Sarra@uab.es) (M. Sarrà).

intermediates of degradation. The biodegradation pathway or degradation product identifications have been mainly studied for azo dyes (Lopez et al., 2004; Nachiyar and Rajakumar, 2004; Zhao and Hardin, 2007). Due to the high toxicity of most triphenylmethane dyes, it is essential to understand the fungal degradation mechanism in order to identify the degradation products. When the product is known, it is possible to study its toxicity. This can help to select a fungal or enzymatic biotreatment process.

The aim of this paper is to present the fundamental aspects involved in the enzymatic and fungal biodegradation of triphenylmethane dyes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All the dyes – Acid Fuchsin, Brilliant Green 1, Methyl Green, Basic Fuchsin and Acid Green 16 – were purchased from Sigma–Aldrich, St. Louis, MO and used without further purification. Table 1 shows their chemical structure and main characteristics.

Purified laccase from *T. versicolor* was obtained from Fluka.

### 2.2. Microorganism

*T. versicolor* was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC# 42530). The fungus was maintained on 2% malt agar slants at 25 °C until use. Subcultures were routinely made. The fungal pellets were obtained as described earlier (Blánquez et al., 2004).

### 2.3. Fungal biodegradation

The culture medium contained (in g L<sup>-1</sup>): 8 glucose, 1.9 NH<sub>4</sub>Cl, 1.168 (2,2-dimethyl succinate) buffer and 0.15 of dye. In addition 11 mL of supplemented medium (Kirk et al., 1978) was added per litre. The medium was sterilised at 120 °C for 30 min after adjusting its pH 4.5 with 0.5 M NaOH or HCl 0.5 M. Degradation studies with *T. versicolor* were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks with 250 mL of sterile medium and inoculated with 16 g of pellets equivalent to 1.7 g L<sup>-1</sup> dry weight. The flasks were incubated by orbital shaking (135 rpm, r = 25 mm) at 25 °C. Each experiment included uninoculated and azide-inactivated controls (0.1% (w/v)). Azide-inactivated controls consisted of cultures that were pre-grown on the same days as the degradation experiment under identical conditions to those of the experimental cultures. Percent decolourization at a specified interval was calculated by comparing concentration in the uninoculated control with those in the experimental flasks.

### 2.4. Enzymatic biodegradation

Commercial purified laccase was added to 100 mL of dye solution (150 mg L<sup>-1</sup>) buffered with 1.64 mM 2,2-dimethyl succinate at pH 4.5 and contained in a 500 mL Erlenmeyer flasks. The measured initial activity was about 1225 AU L<sup>-1</sup>. Flasks were placed in an orbital shaker at 25 °C.

### 2.5. Analytical methods

#### 2.5.1. Colour and glucose determination

Spectrophotometric measurements were carried out at the visible maximum absorbance of each dye (summarized in Table 1), using a Varian UV/Visible Cary spectrophotometer at 20 °C. The glucose concentration was measured with a YSI 2000 enzymatic analyser from Yellow Springs Instruments and Co.

**Table 1**  
Characteristics of the dyes used.

Name, colour index (C.I.)	Chemical structure	$\lambda_{\max}$ (nm)
C.I. Acid Violet 19 (Acid Fuchsin) C.I. 42685		545
C.I. Basic Green 1 (Brilliant Green 1) C.I. 42040		624
C.I. Basic Red 9 (Basic Fuchsin, "pararosaniline chloride") C.I. 42500		544
C.I. Methyl Green (Brilliant Green 20) C.I. 42590		632
C.I. Acid Green 16 C.I. 44025		640

### 2.5.2. Laccase assay

Laccase activity was measured using the first step of the method for determination of manganese peroxidase (Wariishi et al., 1992), where 2,6-dimethoxyphenol (DMP) is oxidized by laccase, even in the absence of a cofactor. One activity unit (AU) was defined as the number of micromoles of DMP oxidized per min. The DMP extinction coefficient was  $24\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

### 2.5.3. Toxicity assay

Toxicity was measured using a Microtox System (Microbics Co.) (APHA, 1995). The effective concentration ( $EC_{50}$ ), based on the *Photobacterium phosphoreum* test, was measured after 5 min. Toxicity units (TU) were defined as  $TU (\%) = 100/EC_{50}$ .

### 2.5.4. NMR spectroscopy and mass analysis

High-resolution NMR spectra were obtained at 298 K in a Bruker AVANCE 500.13 MHz spectrometer equipped with a triple resonance inverse TXI probe from dye and enzyme samples dissolved in deuterated water. Kinetic NMR studies were performed recording 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra during enzymatic degradation of a  $5000\text{ mg L}^{-1}$  dye solution and periodically adding fresh enzyme. Unambiguous characterization of degradation compounds was performed using two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC correlation experiments.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Fungal biodegradation

Lignolytic fungal biodegradation of dyes can be linked to two processes: production of extracellular enzymes which catalyse the dye degradation and/or adsorption of the dye into the biomass and subsequent degradation inside the cells aided by intracellular enzymes (Blázquez et al., 2004). The results obtained for the different triphenylmethane dye biodegradation by *T. versicolor* are presented in Table 2. This table requires much explanation if it is to be understood. According to the EC Regulation, a solution is considered toxic if the TU is higher than 25% measured on *P. phosphoreum*. As a consequence, the two acid dyes assayed are clearly not toxic ( $TU < 25\%$ ), both according to the toxicity test and for *T. versicolor* because the glucose uptake at 48 h is similar to that measured in culture without dye ( $2.04\text{ g L}^{-1}$ ) and laccase production is higher than  $80\text{ AU L}^{-1}$ . Although the high decolourization level of liquid phase was similar to that obtained by adsorption, the fact that the biomass was colourless, leads to the conclusion that with the active fungi the decolourization is the result of a degradation process. In addition, the degradation products are not toxic as Table 2 shows.

The other dyes are basic and toxic. Although the toxicity assay shows high values for the basic dyes, the fungus can be partially active under those conditions except in the case of Basic Fuchsin.

**Table 3**

Results obtained after 48 h of biodegradation for different concentrations of the two more toxic dyes.

Dye	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Adsorption <sup>a</sup> (%)	Decolourization (%)
Brilliant Green 1	25	62	90
	75	55	79
	105	55	76
Basic Fuchsin	50	78	97
	100	76	95
	140	79	77

<sup>a</sup> Inactivated pellets by sodium azide (0.1% (w/v)).

It can be seen that the glucose consumption is inversely proportional to the toxicity level. The results justify, in the past, the use of some dyes belonging to this family in veterinary medicine, such as Gentian violet to inhibit fungal propagation (Au et al., 1978). On the other hand, the laccase production could not be determined because the final colour level interfered with the laccase test. So the decolourization could seem mainly an adsorption process because the final active biomass was still coloured.

For the two more toxic dyes (Basic Fuchsin and Brilliant Green 1) dilutions of the dye solutions were assayed. Therefore, on reducing toxicity, *T. versicolor* remains active and able to degrade both dyes. The results obtained are presented in Table 3. As the dye concentration decreases the difference between the decolourization and adsorption process increases. This means that the degradation is more evident even for the most toxic dye assayed after 48 h of fungal treatment of a solution with  $50\text{ mg L}^{-1}$  of Basic Fuchsin.

### 3.2. Enzymatic biodegradation

Treatment with purified commercial laccase was carried out for all dyes. Fig. 1 shows the percentage of decolourization obtained and the laccase activity measured over 48 h. Analysing these results, significant differences were obtained, depending on the dye. Acid Fuchsin showed clearly different behaviour, because only 28% degradation was achieved and almost no enzyme deactivation was detected. On the other hand, for the remaining dyes a drastic deactivation of laccase was observed after 24 h (see Fig. 1B). In spite of this, full degradation is measured for Brilliant Green 1 and Methyl Green, because it is very fast and the enzymatic attack takes place before deactivation. But for Acid Green 16 and Basic Fuchsin the degradation rate is slower than mentioned above, as the enzyme deactivation does not allow full degradation. Nevertheless, if fresh enzyme is added it is possible to achieve complete decolourization (data not shown). During experiments with basic dye degradation, a slightly dark precipitate was observed after 24 h of biodegradation, which was more evident after a centrifugation step. IR spectra of the solid product did not show any signal

**Table 2**

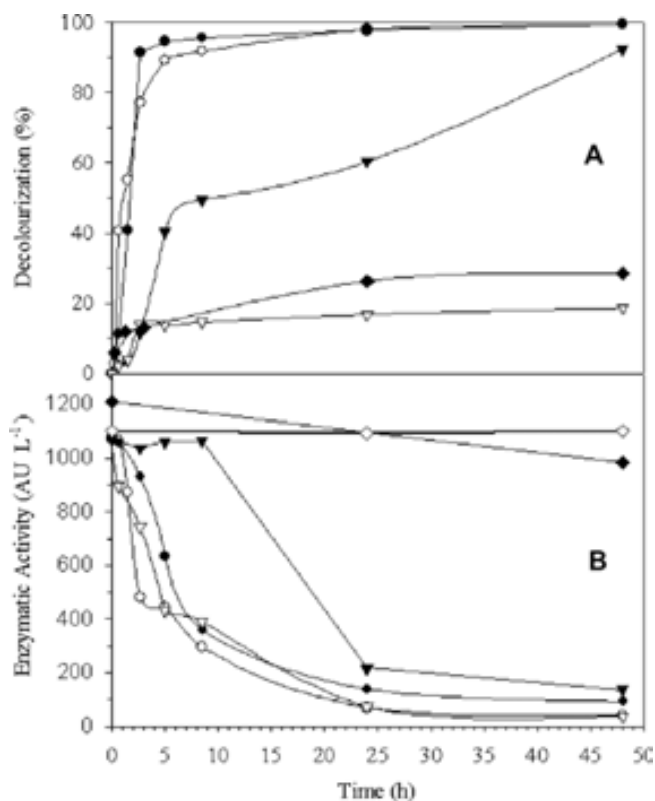
Main results obtained after 48 h of biodegradation treatment for  $0.15\text{ g L}^{-1}$  of dye concentration.

Dye	Adsorption <sup>a</sup> (%)	Decolourization		Glucose uptake ( $\text{g L}^{-1}$ )	Toxicity (TU)	
		Liq. phase (%)	Biomass		Initial	Final
Acid Green 16	98	99	+++	1.9	$1.3 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.1$
Acid Fuchsin	99	99	+++	2	$6.9 \pm 0.6$	$3.6 \pm 0.3$
Methyl Green	76	78	+	1.5	$45.0 \pm 1.2$	$11.9 \pm 1.7$
Brilliant Green 1	90	92	-	1	$81.3 \pm 3.2$	$75.8 \pm 11.5$
Basic Fuchsin	78	79	-	0	$303 \pm 46$	$57.8 \pm 13.4$

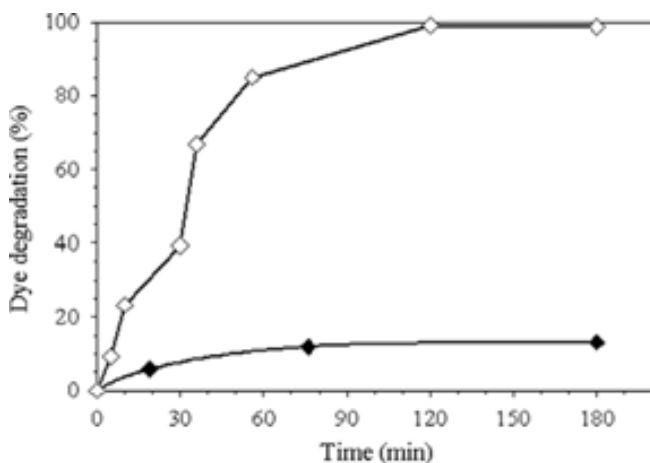
TU =  $100/EC_{50}$  (%).

Final biomass aspect: +++ means completely colorless; + partially coloured, - fully coloured.

<sup>a</sup> Inactivated pellets by sodium azide (0.1% (w/v)).



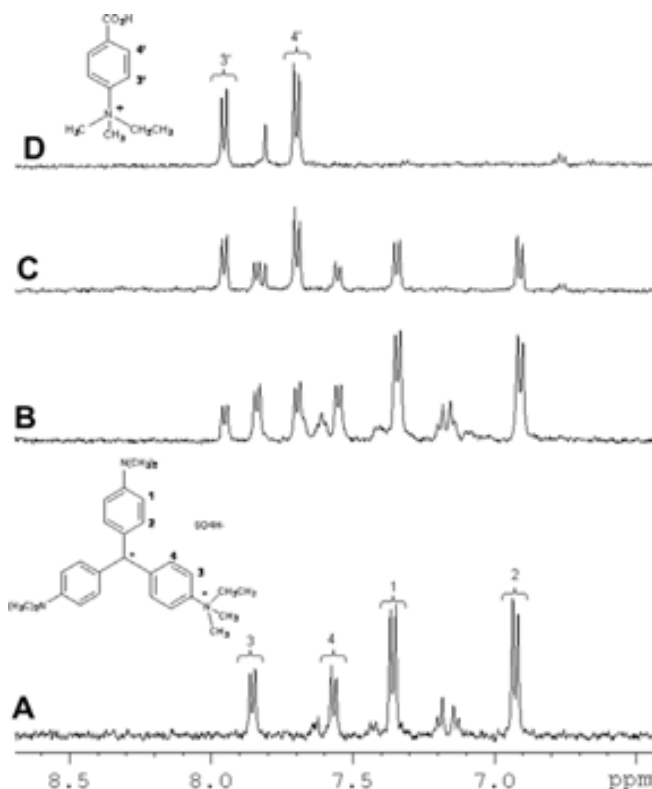
**Fig. 1.** Time evolution of the decolourization percentage (A) and remaining laccase activity (B) during *in vitro* dye degradation: (○) Brilliant Green 1, (●) Methyl Green, (▼) Acid Green 16, (▽) Basic Fuchsin, (◆) Acid Fuchsin and (◇) without dye.



**Fig. 2.** Time evolution obtained during an Acid Fuchsin enzymatic biodegradation: (◆) without mediator and (◇) with HOBT mediator.

corresponding to the dye or a possible polymerization product (data not shown). In addition, no change is observed in laccase activity without dye (see Fig. 1B).

The main explanation for the difference between fungal and laccase degradation of Acid Fuchsin could be the activity of different enzymes or fungal metabolites which could act as mediators. For example, if a common laccase mediator such as 1-hydroxybenzotriazole ( $10^{-3}$  M), is added to the laccase solution, as Fig. 2 shows, fast complete degradation is observed in only 120 min. But the addition of such mediators is not suitable for a process development due to their mutagenic properties.



**Fig. 3.** Time-dependent evolution of the resonances appearing in the aromatic region of the Methyl Green enzymatic biodegradation: (A) initial, (B) 10 h (C) 24 h and (D) 10 d.

### 3.3. Product identification after *in vitro* treatment

Comparison of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of the initial dye solutions and the degraded solutions after enzymatic treatment can help us to understand the biodegradation process.  $^1\text{H}$  NMR spectra were periodically collected online in order to detect and characterize possible intermediates and final compounds. This analysis was performed mainly by analysing the decrease in the NMR signals belonging to the original triphenylmethane dyes and the appearance of new resonances in the aromatic region. This study was carried out for all the triphenylmethane dyes which can be completely degraded by laccase. Consequently, Acid Fuchsin is not included in this part of the study because only 30% degradation is obtained.

As an example, the time-dependent evolution of the resonances appearing in the aromatic region of the Methyl Green dye degradation process is shown in Fig. 3. Signals belonging to the initial dye compound decrease until complete disappearance whereas those belonging to a single main degradation product (*p*-*N,N,N*-(dimethyl,ethyl)aminobenzoic acid) appear. No signals corresponding to the tentative *p*-*N,N*-dimethylaminobenzoic acid as an intermediate compound were observed and, we can therefore affirm that this moiety is completely degraded.

Fig. 4 shows the aromatic region corresponding to the dye Brilliant Green 1 and its degradation product, where benzoic acid and diethylamine (not shown) were identified as the degradation products. The benzoic acid showed high stability even when fresh enzyme was added and after incubation for a long time. In the absence of 2,2'-dimethyl succinic acid, commonly used as buffer, *p*-*N,N*-diethylaminobenzoic acid and acetaldehyde were also detected as intermediate adducts.

In the case of the dye Basic Fuchsin, progressive disappearance of their resonances in the aromatic region until complete

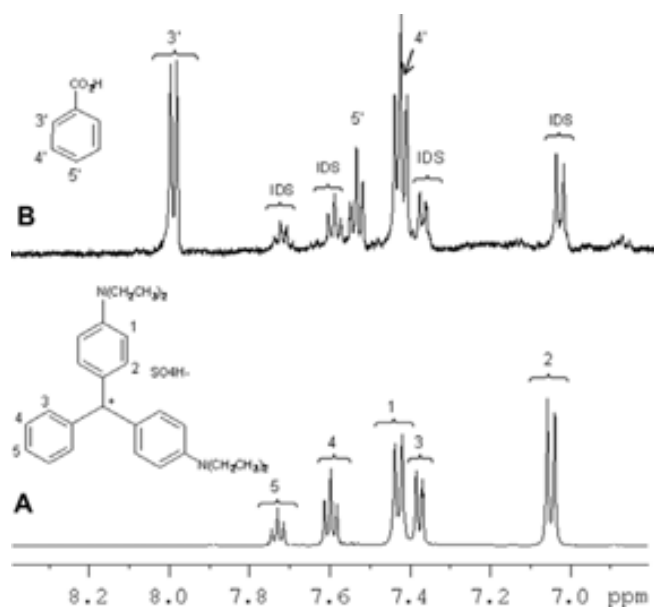


Fig. 4. Aromatic region of the <sup>1</sup>H NMR spectra for Brilliant Green 1: (A) initial dye solution and (B) *in vitro* treated solution.

degradation was observed without the appearance of new signals. This means that the tentative intermediate *p*-aminobenzoic acid was never detected and no degraded aromatic product was obtained.

Finally, when the study was carried out on Acid Green 16, complete degradation of the dye afforded 5,7-disulfo-2-naphtoic acid which corresponds to the acid derivative of the non resonant molecular part of the dye structure, in addition to residual amounts of *N,N*-diethyl-*p*-aminobenzoic acid due to partial degradation.

In summary, the laccase acts by oxidising the methyl carbon of the dye structure, giving stable products depending on the *p*-substituted phenyl part. It can be concluded that biodegradation of triphenylmethane dyes by the enzyme laccase leads to complete degradation of the molecular part of the canonical resonance structures. Thus, no degradation is observed in the case of the non-substituted and trisubstituted-*N,N,N* *p*-amine aromatic subunits whereas NH<sub>2</sub><sup>-</sup>, mono-*N* and di-*N,N* substituted *p*-amine aromatic residues seem to be completely degraded.

On the other hand, product identification on *in vivo* treated dye detected a non-aromatic structure that provides evidence of fungus carrying out further degradation than the enzyme. It was verified that when one of the identified products, such as benzoic acid (40 mg L<sup>-1</sup>), was added to the fungal culture, it was completely eliminated after one day of treatment.

#### 4. Conclusions

It has been demonstrated that compounds with a triphenylmethane structure can be degraded by *T. versicolor* even if they are highly toxic. The enzyme laccase plays an important role in the attack on the structure. Identification of the degradation products made it possible to propose a general rule for predicting product formation after the enzymatic treatment. This is very important because once the expected product is known, it is then possible to study its toxicity and make decisions about the suitability of enzymatic treatment as an alternative to the fungal process, as it has been demonstrated that *T. versicolor* was able to further degrade metabolites produced by the action of its laccase.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Spanish National R&D+I Plan, under Project Numbers CTQ2006-01080 and CTM2007-60971. The authors wish to thank the Generalitat de Catalunya for its support (DURSI 2005SGR 00220). The Department of Chemical Engineering of the Universitat Autònoma de Barcelona is the Biochemical Engineering Unit of the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) de la Generalitat de Catalunya. Núria Casas acknowledges DURSI for providing a pre-doctoral grant.

#### References

- Alhassani, H.A., Rauf, M.A., Ashraf, S.S., 2007. Efficient microbial degradation of Toluidine Blue dye by *Brevibacillus* sp. *Dyes Pigments* 75, 395–400.
- APHA, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Publishers Health Association, Washington DC, USA.
- Au, W., Parhak, S., Collie, C.J., Hsu, T.C., 1978. Cytogenetic toxicity of gentian violet and crystal violet on mammalian cells in vitro. *Mutat. Res.* 58, 269–276.
- Azmi, W., Sani, R.K., Banerjee, U.C., 1998. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22, 185–191.
- Baxi, N.N., Shah, A.K., 2007. The use of solid waste of a nylon-6 plant as a nutrient for bacterial decolourisation of dyes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1321–1326.
- Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* 38, 2166–2172.
- Bumpus, J.A., Brock, B.J., 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1143–1150.
- Chander, M., Arora, D.S., 2007. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes Pigments* 72, 192–198.
- Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A.R., Pourhassan, M., 2007. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresour. Technol.* 98, 1176–1182.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F., 2006. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochem.* 39, 855–859.
- Gosetti, F., Gianotti, V., Angioi, S., Polati, S., Marengo, E., Gennaro, M.C., 2004. Oxidative degradation of food dye E133 Brilliant Blue FCF: Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry identification of the degradation pathway. *J. Chromatogr. A* 1054, 379–387.
- Hessel, A., Allegre, C., Maisseu, M., Charbit, F., Moulin, P., 2007. Guidelines and legislation for dye house effluents. *J. Environ. Manage.* 83, 171–180.
- Jadhav, J.P., Govindwar, S.P., 2006. Biotransformation of Malachite Green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast* 23, 315–323.
- Kirk, T.K., Schulz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikus, J.G., 1978. Influence of cultural parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117, 277–284.
- Liu, W., Chao, Y., Yang, X., Bao, H., Qian, Sh., 2004. Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 127–132.
- Lopez, C., Valade, A.G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B., Lema, J.M., 2004. Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ 1H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 335, 135–149.
- Manal, M.A., El-Naggar, S., El-Aasar, A., Khlood, I.B., 2005. Biorremediation of crystal violet using Hubble bioreactor packed with *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Res.* 39, 5045–5054.
- Nachiyar, C.V., Rajakumar, G.S., 2004. Mechanism of Navitan Fast Blue S5R degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemosphere* 57, 165–169.
- Novotný, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V., Molitoris, H.P., 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* 89, 113–122.
- Novotný, C., Svobodová, K., Kasinath, A., Erbanová, P., 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *Int. Biodeter. Biodegr.* 54, 215–223.
- Rai, H.S., Singh, S., Cheema, P.P.S., Bansal, T.K., Banerjee, U.C., 2007. Decolorization of triphenylmethane dye-bath effluent in an integrated two-stage anaerobic reactor. *J. Environ. Manage.* 83, 290–297.
- Sani, R.K., Banerjee, U.C., 1999. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme Microbiol. Technol.* 24, 433–437.
- Sharma, D.K., Saini, H.S., Singh, M., Chimni, S.S., Chadha, B.S., 2004. Biotreatment of simulated textile dye effluent containing Malachite Green by an up-flow immobilized cell bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 431–434.
- Tekere, M., Mswaka, A.Y., Zvauya, R., Read, J.S., 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28, 420–426.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol. UK* 140, 19–26.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267, 23688–23695.

- Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko, V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D., 1994. Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49, 257–280.
- Yesilada, O., 1995. Decolorization of crystal violet by fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 601–602.
- Zhao, X., Hardin, I.R., 2007. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes Pigments* 73, 322–325.
- Zille, A., Górnacka, B., Rehorek, A., Cavaco-Paulo, A., 2005. Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6711–6718.

# Capítol 7

## **Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers.**

---

Aquest capítol conté els resultats publicats:

**Revista:** Environmental Technology. Abril 2012

**Autors:** Núria Casas, Paqui Blánquez, Teresa Vicent i Montserrat Sarrà.





## Environmental Technology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.tandfonline.com/loi/tent20>

### Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers

N. Casas<sup>a</sup>, P. Blázquez<sup>a</sup>, T. Vicent<sup>a</sup> & M. Sarrà<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament d'Enginyeria Química, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

Available online: 12 Apr 2012

To cite this article: N. Casas, P. Blázquez, T. Vicent & M. Sarrà (2012): Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers, *Environmental Technology*, DOI:10.1080/09593330.2012.683820

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2012.683820>



## Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers

N. Casas, P. Blázquez\*, T. Vicent and M. Sarrà

Departament d'Enginyeria Química, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

(Received 25 November 2011; final version received 5 April 2012)

Laccase production by pre-growth pellets of *Trametes versicolor* using two types of textile dyes as inducers was studied. By decoupling the enzyme production phase from the growth phase, it is possible to reduce the time and nutrients required for laccase production. At the glucose maintenance level, the effect of the nitrogen source and textile dye was analysed using response surface methodology. Ammonium chloride was used as the inorganic nitrogen source. Two types of dyes were tested: Grey Lanaset G (GLG), a metal complex dye mixture containing nitrogen; and Alizarin Red (AR), an anthraquinonic dye with no nitrogen in its chemical structure. GLG induces laccase production at a higher extent than AR. Despite the limiting conditions required for the production of laccase, enzyme production increases with increasing ammonium chloride. When AR, the N-free dye, was used as an inducer, the optimal supply of N for laccase production was 1.2 mg/(g dry cell weight-d) as ammonium chloride. The reuse of fungal pellets in the repeated-batch mode under maintenance conditions was found to be a good strategy for improving laccase production, as enzyme production increased to up to seven times the production of the first cycle. It was demonstrated that GLG can be used as an inducer and as an N source and, thus, it is possible to decolorize the dye and to induce laccase production at the same time without adding an extra N source.

**Keywords:** pre-growth pellets; sequential batch reactor; inducers; bioreactor; response surface methodology

### 1. Introduction

Laccases (benzenediol: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.10.3.2) are copper-containing oxidoreductases produced by higher plants and microorganisms, mainly fungi. Laccases reduce oxygen directly to water in a four-electron transfer step without the intermediate formation of soluble hydrogen peroxide through one-electron oxidation of a variety of substrates, such as phenolic compounds, which constitute a large group of organic pollutants used in many industrial processes [1,2]. The applicability of laccase has also been expanded to non-phenolic substrates in the presence of small molecular weight redox mediators, which act as electron shuttles [3]. Consequently, the low substrate specificities of these enzymes, in addition to their relatively high stabilities, have led to their diverse applications in many industrial fields, such as pulp and paper manufacturing, textiles and food and in environmental technologies, such as wastewater and soil treatment, for removing a wide range of organic pollutants [4–8]. Other possible applications can be found in agriculture, medicine and nanotechnology, focused on laccase-based biodegradation, biotransformation, biosensor and enzymatic synthesis [9–12].

Nevertheless, the stabilities and catalytic activities of laccases considerably decrease in a wide variety of environmental conditions (pH, inhibitors, etc.), limiting their industrial applications. Therefore, the improvement of both laccase stability and laccase reusability is very important. Enzyme immobilization enables these improvements and is consequently a way to implement continuous enzyme-catalysed processes. Several laccase-immobilized technologies and applications have been reported [13–18].

Moreover, any use of laccase at the industrial scale requires the production of the enzyme at high yields from microbial processes and the optimization of the time-consuming procedures for the separation of the end-products from the enzyme. There are two main approaches related to the production step: the development of suitable media and culture conditions for laccase production by white-rot fungi and the induction of the heterologous expression of laccase genes in a host microorganism. Little research on this second aspect has been reported [19–23]; consequently, the study of laccase production by white-rot fungi growing in different media is the most common strategy [24–32]. In most of the reported studies, laccase production is associated with fungus growth, which requires

---

\*Corresponding author. Email: Paqui.Blanquez@uab.cat

nutrients and time before maximum production is reached. There have been few studies reported on laccase production under limited-growth conditions [25].

This study deals with laccase production by pre-growth pellets of *Trametes versicolor* using two types of textile dyes as inducers. By decoupling the enzyme production phase from the growth phase, it is possible to reduce the time and nutrients required for laccase production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Dyes

Grey Lanaset G (GLG) is a commercial mixture of several metal complex dyes and was kindly provided by Ciba. Alizarin Red (AR; Sigma, C.I. 58005) is an anthraquinonic dye free of nitrogen. Both dyes were used without further purification.

### 2.2. Laccase-producing strain

*Trametes versicolor* was obtained from ATCC # 42530. The fungus was maintained on 2% malt agar slants at 25 °C until use, and subcultures were routinely made. Pellets of *T. versicolor* were obtained as previously described [33].

### 2.3. Media and culture conditions

The basic medium contained 11 ml of supplemented medium [34] per litre. The medium was sterilized at 120 °C for 30 min after adjusting its pH to 4.5 with 0.5 M NaOH or HCl 0.5 M.

### 2.4. Bioreactor and operating conditions

A glass air-pulsed bioreactor with a working volume of 1500 ml [35] was equipped with a pH controller to maintain the pH at 4.5. The temperature was maintained at 25 °C. During the batch-fed process or repeated-batch processes the glucose was continuously fed at the specified rate, and the nitrogen or dye was added in pulses.

### 2.5. Experimental design and response surface methodology

Batch experiments were performed in 500 ml Erlenmeyer flasks with 250 ml of sterile basic medium. Glucose, dye and nitrogen were added at different concentrations depending on the experiment. The flasks were inoculated with an amount of pellets equivalent to 3.7 g dry cell weight/l and incubated in an orbital shaker (135 rpm,  $r = 25$  mm) at 25 °C. The effects of ammonium chloride ( $x_1$ ) and GLG ( $x_2$ ) were statistically studied using a factorial design. The experimental design technique was performed as previously described [36]. The experimental design included 15 factor combinations, which are shown in Table 1. The laccase production after 80 h was statistically modelled as a function of the two factors. A full second-order polynomial model

Table 1. Experimental matrix ( $x_1$  ammonium chloride,  $x_2$  GLG): observed and predicted values of the response.

Run	$x_1$ (mg/l)	$x_2$ (mg/l)	Laccase activity (AU/l)	
			Observed	Predicted
1	0	27	284.6	340.4
2	0	68	742.1	831.7
3	0	86	1068.5	981.1
4	0	104	1052.4	1078.2
5	0	204	843.4	810.0
6	7.5	25	790.7	653.9
7	7.5	63	1013.9	1029.7
8	7.5	80	1186.6	1128.9
9	7.5	104	1186.6	1208.0
10	7.5	177	896.0	952.6
11	15	25	955.3	996.5
12	15	47	1137.5	1180.0
13	15	78	1250.9	1321.1
14	15	122	1396.9	1293.6

was selected to fit each response function ( $Y$ , representing laccase activity) to the values of the factors considered, according to Equation (1):

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

For each sample, the model parameters  $b_i$  were estimated from experimental values using multi regression software (Sigmaplot® 8.0, Systat Software Inc., San Jose, USA).

### 2.6. Analytical methods

#### 2.6.1. Biomass concentration

Biomass was measured by drying at 103 °C to a constant weight.

#### 2.6.2. Colour determination

Spectrophotometric measurements were performed at the visible maximum absorbances, 590 and 428 nm, for GLG and AR S, respectively, using a Varian ultraviolet/visible (UV/Vis) Cary spectrophotometer at 20 °C.

#### 2.6.3. Glucose determination

Glucose was measured using a YSI 2000 enzymatic analyser from Yellow Springs Instruments and Co.

#### 2.6.4. Laccase activity

Laccase activity was measured using the first step of the method for the determination of manganese peroxidase [37]. The reaction mixture used for the determination of the laccase consisted of 200  $\mu$ l of 250 mM sodium malonate at pH 4.5, 50  $\mu$ l of 20 mM 2,6-Dimetoxiphenol (DMP) and up to 600  $\mu$ l of sample, for a total volume of 850  $\mu$ l. DMP is oxidized by laccase even in the absence of

a cofactor. Absorbance changes were measured for 2 min on a Varian Cary 3 UV/Vis spectrophotometer at 468 nm at a temperature of 30 °C. An activity unit (AU) was defined as the number of micromoles of DMP oxidized per minute. The DMP extinction coefficient was  $24,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3. Results and discussion

Most studies on laccase production reported have been focused on growth and enzymatic production, which means a long time must elapse before the nutrient-limiting conditions necessary for obtaining maximum laccase levels are reached. The use of pellets of *T. versicolor* for decolorization processes has been extensively studied by our research group [33,35,38]. When working in batch processes with an air-pulsed bioreactor, the growth-limited medium containing the dye is inoculated with fungal pellets. The maximum extracellular laccase level is detected after 4 days, and almost complete decolorization is accomplished in only one or two days. Blázquez *et al.* [38] found that the maximum intracellular laccase level was detected earlier than the extracellular level. The production of laccase by pellets of *T. versicolor* under growth-limited conditions using textile dyes as inducers was further explored in light of these results. In this manner, wastewater containing N can be used to produce enzymes.

#### 3.1. Effect of glucose

The glucose uptake rate during a continuous decolorization process in the air-pulsed bioreactor was  $0.31 \text{ g}/(\text{g dry cell weight}\cdot\text{d})$  [25]. The effects of changes in the glucose feeding rate were measured by comparing the results obtained during two batch-fed processes, one with glucose fed continuously at the uptake rate and another with glucose fed at a lower feeding rate ( $0.26 \text{ g}/(\text{g dry cell weight}\cdot\text{d})$ ). No difference was observed in the decolorization process, but enzyme production was detected earlier with the lower glucose feed rate and extracellular laccase production was higher. Therefore, the growth-limited conditions seem to stimulate laccase production (Figure 1). These results agree with Tavares *et al.* [39], who observed a clear and significant stimulation of enzyme production under carbon limitation. After these observations were made, further experiments were performed under glucose-limited conditions.

#### 3.2. Effect of nitrogen source

The effects of nitrogen sources on laccase production have been studied by comparing inorganic sources, such as ammonium tartrate or ammonium sulfate, with organic sources, such as malt or yeast extract [40,41]. Generally, high levels of laccase activity are obtained using organic nitrogen sources composed mainly of amino acids. Although most of the studies are performed in growth conditions, laccase production during long-term continuous

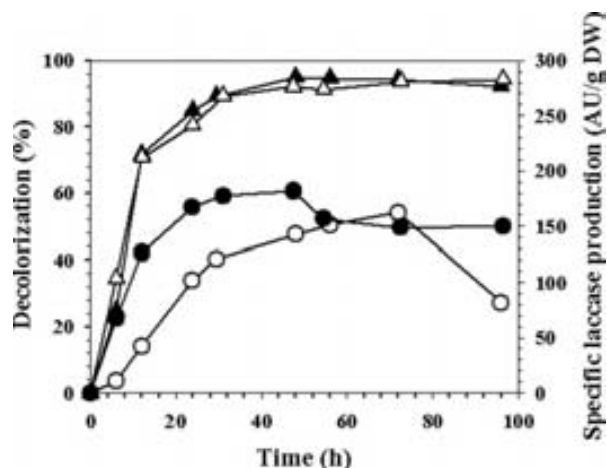


Figure 1. GLG decolorization (triangles) and specific laccase production (circles) at the time of continuous glucose feeding at the uptake rate (empty symbols) and lower than the uptake rate (filled symbols).

decolorization processes and without any nitrogen sources has also been reported [35]. This indicates that the dye GLG may be both a laccase production inducer and a nitrogen source at the same time. To further explore this possibility, a batch-fed experiment with different stages was performed. Throughout the experiment, glucose was continuously fed at a rate of  $0.26 \text{ g}/(\text{g dry cell weight}\cdot\text{d})$ , and the nitrogen source and/or level was changed in each stage. Laccase activities and nitrogen sources are shown in Figure 2. During the first stage (A), no nitrogen source was supplied, so the laccase activity was at the base level. Laccase activity did not increase when a pulse of inorganic nitrogen (equivalent to  $5.8 \text{ mg N/l}$ ) as ammonium chloride was added (Stage B). However, when the GLG dye pulse ( $150 \text{ mg/l}$ ) was added, the laccase activity increased more than seven times after 48 h (Stage C). Laccase activity did not increase when a new inorganic nitrogen pulse was added; in contrast, slight enzyme deactivation was observed (Stage D). Finally, two additional GLG dye pulses ( $0.5$  and  $1.5 \text{ mg N/l}$ ) were added

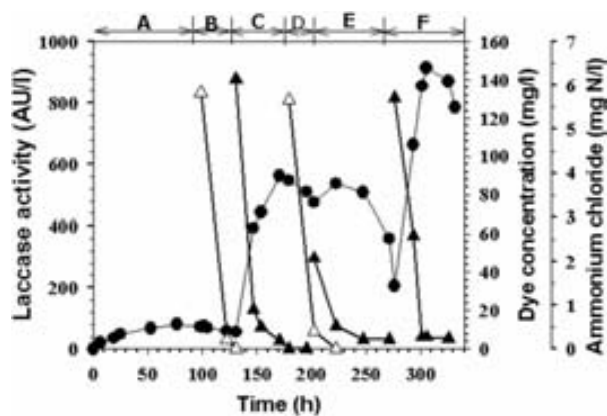


Figure 2. Time course of laccase activity (●), GLG concentration (▲) and ammonium chloride (△) in batch cultivation.

to evaluate the effects on laccase production and enzyme deactivation when full decolorization was achieved (Stages E and F).

These results indicate that the presence of an inducer, such as a textile dye, stimulates laccase production and that laccase production stops when the dye is degraded. It is unclear whether production increases to reduce the toxic effect of the pollutant or to use the dye as a nitrogen source in the absence of any other nitrogen source; in that case, the presence of inorganic nitrogen would not be necessary to produce laccase.

### 3.3. Effect of the mixture nitrogen sources

After assessing the effect of the nature of the nitrogen source laccase production, the interaction of both nitrogen sources was statistically evaluated through experiments investigating two factors: the dye GLG and ammonium chloride. The dye concentration ranged from 20 to 200 mg/l in the experiments. Although the dye may enhance laccase production, Romero *et al.* [33] showed that high dye concentrations may have a toxic effect, decreasing enzyme production. The range of ammonium chloride concentrations was 0–15 mg/l, ensuring that the nitrogen provided was insufficient for significant fungal growth in each experiment. The defined medium used for pellet growth contained 2.1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$  [42].

An experimental design methodology was applied to investigate the response of laccase production at 80 hours under the effects of the two factors. Glucose was added to the medium at the starting time according to the uptake rate, the biomass and the experimental duration. Table 1 shows the actual values for the two factors and the observed and estimated responses. The second-order polynomial model was able to fit the obtained results and to statistically represent the process response. The values of the fitted  $b_i$  coefficients in the coded range ( $-1, +1$ ) and the corresponding correlation coefficients ( $R^2$ ) are presented in Table 2. The correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.966 with a model  $F$ -value of 46.11 ( $P < 0.0001$ ) that indicated the statistical significance of the model. It is possible to conclude that both independent variables can be used to predict the dependent variable when  $p < 0.05$ . The linear effect of the dye ( $b_2$ ) and

Table 2. Estimated coefficient for the fitted second-order polynomial model and statistical parameters measuring the correlation and significance of the model, both calculated with coded values ( $-1, +1$ ) ( $x_1$  ammonium chloride,  $x_2$  GLG).

Coefficient	Value	Std. error	$P$	Analysis of variance	
$b_0$	1215.9	32.9	$<0.0001$	$R^2$	0.966
$b_1^*$	100.0	32.7	0.012	$F$	46.11
$b_{22}^*$	-537.3	58.3	$<0.0001$	$P$	$<0.0001$
$b_{12}^*$	-238.2	50.3	0.0008		

(\*) Parameter significant to predict the response when  $p < 0.05$ .

the quadratic effect of ammonium ( $b_{11}$ ) were negligible in terms of predicting the system response and, thus, they were omitted from the model. The parameters of the model show that the ammonium concentration has a positive linear effect on laccase production, while the dye concentration has a quadratic negative effect; therefore, high ammonium concentrations can exert a major inhibitory effect on enzyme production. Table 2 also shows that the interactions between both factors also have a major negative effect on laccase production. Figure 3 shows the effects of the ammonium chloride and the GLG dye concentration on laccase production. A small lineal and a strong quadratic dependence of production on ammonium chloride and on dye concentration, respectively, are exhibited, meaning that ammonium chloride enhances laccase production when moderate GLG dye levels are present.

### 3.4. Effect of the mixture of inorganic nitrogen and nitrogen-free dye

*T. versicolor* is able to rapidly degrade the anthraquinonic dye AR (data not shown), which has no nitrogen in its elemental composition. Experiments were performed to investigate the effects of ammonium chloride and AR dye on laccase production. The response was measured after 48 hours, because the dye molecule is very simple and easily degraded by the fungus. Glucose was added to the medium according to the uptake rate, biomass concentration and experimental duration. Table 3 shows the experimental matrix with observed and predicted responses. Again, the second-order polynomial model was able to fit the obtained results and to statistically represent the process response. The values of the fitted  $b_i$  coefficients in the coded range

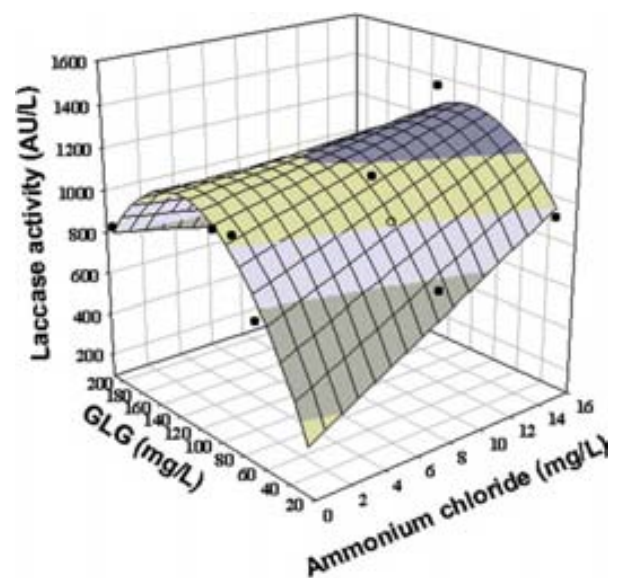


Figure 3. Response surface and experimental plots (●) for laccase production by *T. versicolor* depending on the level of two factors: ammonium chloride and GLG.

Table 3. Experimental matrix ( $x_1$  ammonium chloride,  $x_2$  Alizarin Red): observed and predicted values of the response.

Run	$x_1$ (mg/l)	$x_2$ (mg/l)	Laccase activity (AU/l)	
			Observed	Predicted
1	0	12.51	122.5	134.3
2	0	33.96	138.4	137.2
3	0	69.63	139.3	142.0
4	0	106.22	147.6	146.9
5	0	162.56	167.0	154.5
6	7.5	11.52	234.3	216.8
7	7.5	31.09	240.7	219.5
8	7.5	70.36	202.6	224.7
9	7.5	109.14	243.6	230.0
10	7.5	163.95	207.1	237.3
11	15	11.52	130.7	168.9
12	15	31.1	180.2	171.5
13	15	70.4	190.3	176.8
14	15	109.15	201.5	182.0
15	15	163.95	185.9	189.4

(-1, +1) and the correlation coefficients ( $R^2$ ) are presented in Table 4. The correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.90 with a model  $F$ -value of 13.9 ( $P = 0.0005$ ), indicating statistically good agreement between the experimental data and the model. The effect of the dye ( $b_2$ ) was found to be lineal and slightly relevant. The ammonium concentration causes both a positive lineal and a quadratic negative effect, which became important at high concentrations. The ammonium concentration had a positive lineal effect on laccase production, while the dye concentration had a quadratic negative effect; that is, high concentrations of dye exerted major inhibitory effects on enzyme production. The parameters also revealed that there was no interaction between the two factors. Figure 4 shows the effects of ammonium chloride and the Alizarin dye concentration on laccase production. The small lineal and the strong quadratic dependences on the dye and ammonium chloride concentrations, respectively, are illustrated. These results show that moderate ammonium chloride concentrations enhance laccase production when the dye is present. The optimum ammonium concentration was 8.5 mg/l. Therefore, in growth-limiting conditions when nitrogen-free dye is treated, 1.2 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}/(\text{g dry cell weight}\cdot\text{d})$  should be added to the medium.

Table 4. Estimated coefficient for the fitted second-order polynomial model and statistical parameters measuring the correlation and significance of the model, both calculated with coded values (-1, +1) ( $x_1$  ammonium chloride,  $x_2$  Alizarin Red).

Coefficient	Value	Std. error	$P$	Analysis of variance	
$b_0$	227.1	9.4	<0.0001	$R^2$	0.900
$b_1^*$	17.4	6.6	0.023	$F$	13.90
$b_2$	10.2	7.5	0.200	$P$	0.0005
$b_{11}^*$	-65.3	11.4	0.0001		

(\*) Parameter significant to predict the response when  $p < 0.05$ .

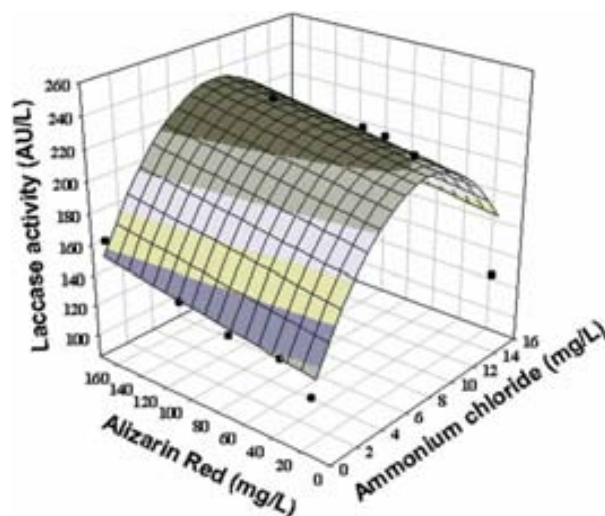


Figure 4. Response surface and experimental plots (●) for laccase production by *T. versicolor* depending on the level of two factors: ammonium chloride and Alizarin Red.

### 3.5. Laccase production during dye decolorization in the repeated-batch mode

The effect of the successive use of the biomass on laccase production during dye treatment in the repeated-batch mode was analysed using the two aforementioned dyes. Glucose was continuously fed at 0.26 g/(g dry cell weight·d). The batch time was approximately 24 hours, and both the dye concentrations and the laccase levels were analysed over that time. Figures 5 and 6 show the results obtained for the dyes GLG and AR, respectively. Although *T. versicolor* was able to decolorize the GLG dye, the amount of dye remaining was slightly higher at the end of each cycle. Even when the initial dye concentration of each cycle was the same, laccase production increased considerably during the first four cycles. The enzyme level achieved after the fourth cycle was seven times more than the level reached in the first cycle. Thus, the dye-inducer effect can be increased and maintained for a certain time until the biomass

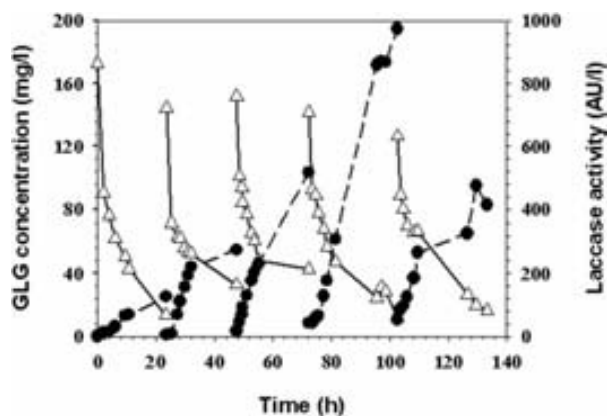


Figure 5. Time course of GLG concentration ( $\Delta$ ) and laccase activity ( $\bullet$ ) in repeated batch cultures.

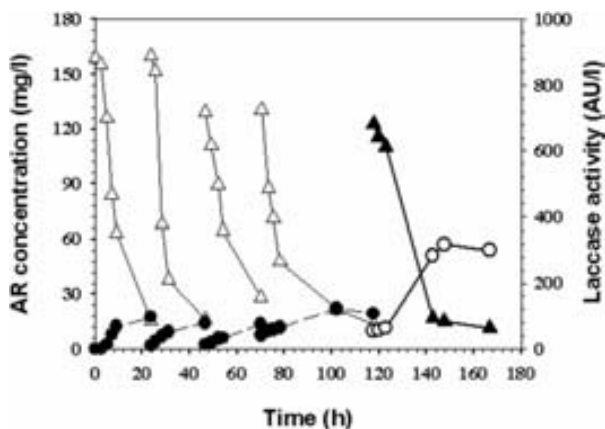


Figure 6. Time course of Alizarin Red concentration ( $\Delta$ ), GLG concentration ( $\blacktriangle$ ) and laccase activity ( $\bullet$ ) in repeated batch cultures.

becomes too stressed and dye removal and enzyme production decrease, which could indicate an inhibitory effect due to intracellular dye accumulation, according to the previously described degradation mechanism [38]. These results are in accordance with the findings reported by Birhanli and Yesilada [25] that laccase production increased during the first six cycles of 24 h-repeated-batch cultures of *T. versicolor* and *Funalia trogii* with a Cu-supplemented medium. However, in that case, the factors between the first and the maximum levels were only 3 and 2 for *T. versicolor* and *Funalia trogii*, respectively. In contrast, Yesilada *et al.* [43] recently reported that the percentage of dye decolorization decreased with each repeated-batch cycle due to the limitation of nutrients.

In the AR degradation in the repeated-batch mode, although low enzymatic levels were detected, *T. versicolor* was capable of decolorizing the dye to a high degree (Figure 6). The low laccase production was due to the lack of supplemented nitrogen source. In the last cycle, when ammonium chloride was added, the level of laccase increased 2.6-fold after 24 hours, showing that pellets can be reused several times and that they are able to produce laccase to a high degree when suitable fungal maintenance conditions are met.

#### 4. Conclusions

The presence of an inducer stimulates laccase production by *T. versicolor* and, thus, an inducer is necessary to achieve high laccase activity levels. Dyes can be used as inducers, but a nitrogen source is required to stimulate laccase production. GLG can be used as an inducer and as a nitrogen source at the same time, increasing laccase production while the decolorization process takes place. The reuse of *Trametes versicolor* biomass in repeated-batch mode for the decolorization of GLG and laccase induction is a good strategy for the first four cycles, after which an intracellular dye accumulation seems to produce an inhibitory effect, reducing dye removal and laccase production.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Spanish Plan Nacional de I+D+I, project number CTM2007-60971. The authors are members of the consolidated research group in Catalonia (2009-SGR-656). The Department of Chemical Engineering of the Universitat Autònoma de Barcelona is the Biochemical Engineering Unit of the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) de la Generalitat de Catalunya. N.C. acknowledges the Department of Universities, Research and Information Society (DURSI) for a predoctoral grant.

#### References

- [1] A.I. Yaropolov, O.V. Skorobogat'ko, S.S. Vartanov, and S.D. Varfolomeyev, *Laccase. Properties, catalytic mechanism and applicability*, Appl. Biochem. Biotechnol. 49 (1994), pp. 257–280.
- [2] C.F. Thurston, *The structure and function of fungal laccases*, Microbiology 39 (1994), pp. 326–330.
- [3] R. Bourbonnais and M.G. Paice, *Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation*, FEBS Lett. 267 (1990), pp. 99–102.
- [4] N. Duran and E. Esposito, *Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review*, Appl. Catal. B. (Environ.) 28 (2000), pp. 83–99.
- [5] S. Kahraman and O. Yesilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi*, Folia Microbiol. 46 (2001), pp. 133–136.
- [6] R.C. Minussi, G.M. Pastore, and N. Duran, *Potential applications of laccase in the food industry*, Trends Food Sci. Technol. 13 (2002), pp. 205–216.
- [7] F. Fang, L. Li, Q. Wang, X. Zhang, H. Peng, W. Fang, Y. Hong, H. Ge, and Y. Xiao, *A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 89 (2011), pp. 1103–1110.
- [8] R. Noreen, M. Asgher, H.N. Bhatti, S. Batool, and M.J. Asad, *Phanerochaete chrysosporium IBL-03 secretes high titers of manganese peroxidase during decolorization of Drimarine Blue K2RL textile dye*, Environ. Technol. 32 (2011), pp. 1239–1246.
- [9] B. Haghghi, L. Gorton, T. Ruzgas, and L.J. Jönsson, *Characterization of graphite electrodes modified with laccase from Trametes versicolor and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis*, Anal. Chim. Acta 487 (2003), pp. 3–14.
- [10] S. Rodríguez-Couto and J.L. Toca-Herrera, *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*, Biotechnol. Adv. 24 (2006), pp. 500–513.
- [11] S. Shleev, P. Persson, G. Shumakovich, Y. Mazhugo, A. Yaropolov, T. Ruzgas, and L. Gorton, *Laccase-based biosensors for monitoring lignin*, Enzyme Microb. Technol. 39 (2006), pp. 835–840.
- [12] D.S. Arora and R.K. Sharma, *Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications*, Appl. Biochem. Biotechnol. 160 (2010), pp. 1760–1788.
- [13] A. Lante, A. Crapisi, A. Krastanov, and P. Spettoli, *Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor*, Process Biochem. 36 (2000), pp. 51–58.
- [14] P. Brandi, A. D'Annibale, C. Galli, P. Gentili, and A.S. Nunes Pontes, *In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: The case of laccase*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 41 (2006), pp. 61–69.
- [15] S. Rodríguez-Couto, J.F. Osmá, V. Saravia, G.M. Gübitz, and J.L. Toca Herrera, *Coating of immobilised laccase for*

- stability enhancement: A novel approach, *Appl. Catal. A: Gen.* 329 (2007), pp. 156–160.
- [16] M.E. Russo, P. Giardina, A. Marzocchella, P. Salatino, and G. Sannia, *Assessment of anthraquinone-dye conversion by free and immobilized crude laccase mixtures*, *Enzyme Microb. Technol.* 42 (2008), pp. 521–530.
- [17] M. Zhao, Y. Wang, Z. Liu, D. Cui, and X. Bian, *Properties of immobilized laccase on mesostructured cellular foam silica and its use in dye decolorization*, *J. Macromolec. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* 48 (2011), pp. 447–453.
- [18] G. Bayramoglu, M. Yilmaz, and M.Y. Arica, *Reversible immobilisation of laccase to poly(4-vinylpyridine) grafted and Cu(II) chelated magnetic beads: Biodegradation of reactive dyes*, *Bioresour. Technol.* 101 (2011), pp. 1451–1457.
- [19] M.J. Bailey, B. Adamitsch, J. Rautio, N. Von Weymarn, and M. Saloheimo, *Use of a growth-associated control algorithm for efficient production of a heterologous laccase in Trichoderma reesei in fed-batch and continuous cultivation*, *Enzyme Microb. Technol.* 41 (2007), pp. 484–491.
- [20] D. Ranieri, M.C. Colao, M. Ruzzi, G. Romagnoli, and M.M. Bianchi, *Optimization of recombinant fungal laccase production with strains of yeast Kluyveromyces lactis from pyruvate decarboxylase promoter*, *FEMS Yeast Res.* 9 (2009), pp. 892–902.
- [21] M. Lopez, O. Loera, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvado, J.A. Gallegos-Lopez, and F.J. Fernandez, *Cell growth and Trametes versicolor laccase production in transformed Pichia pastoris cultured by solid-state or submerged fermentations*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010), pp. 435–440.
- [22] K.S. Wong, Q. Huang, C.H. Au, J. Wang, and H.S. Kwan, *Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of Lentinula edodes laccase expressed from Pichia pastoris*, *Bioresour. Technol.* 104 (2012), pp. 157–164.
- [23] R. Moya, M. Hernández, A.B. García-Martín, A.S. Ball, and M.E. Arias, *Contributions to a better comprehension of red-ox mediated decoloration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by Streptomyces cyaneus CECT 3335*, *Bioresour. Technol.* 101 (2010), pp. 2224–2229.
- [24] D.S. Arora and P.K. Gill, *Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi*, *Bioresour. Technol.* 77 (2001), pp. 89–91.
- [25] E. Birhanli and O. Yesilada, *Increased production of laccase by pellets of Funalia trogii ATCC 200800 and Trametes versicolor ATCC 200801 in repeated-batch mode*, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006), pp. 1286–1293.
- [26] C. Teerapatsakul, R. Parra, C. Bucke, and L. Chitradon, *Improvement of laccase production from Ganoderma sp. KU-Alk4 by medium engineering*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2007), pp. 1519–1527.
- [27] D. Quaratino, M. Ciaffi, E. Federici, and A. D’annibale, *Response surface methodology study of laccase production in Panus tigrinus liquid cultures*, *Biochem. Eng. J.* 39 (2008), pp. 236–245.
- [28] S. Mazumder, S. Bose, A. Bandopadhyay, S. Alam, and M. Mukherjee, *Study of laccase production by Pleurotus ostreatus in a 5 l bioreactor and application of the enzyme to determine the antioxidant concentration of human plasma*, *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (2008), pp. 355–360.
- [29] T. Palvannan and P. Sathishkumar, *Production of laccase from Pleurotus florida NCIM 1243 using Plackett-Burman design and response surface methodology*, *J. Basic Microbiol.* 50 (2010), pp. 325–335.
- [30] P. Sathishkumar, K. Murugesan, and T. Palvannan, *Production of laccase from Pleurotus florida using agro-wastes and efficient decolorization of Reactive blue 198*, *J. Basic Microbiol.* 50 (2010), pp. 360–367.
- [31] S. Rodríguez-Couto, *Production of laccase and decoloration of the textile dye Ramazol Brilliant Blue R in temporary immersion bioreactors*, *J. Hazard. Mat.* 194 (2011), pp. 297–302.
- [32] Y. Yang, F. Ma, H. Yu, F. Fan, X. Wan, X. Zhang, and M. Jiang, *Characterization of a laccase gene from the white-rot fungi Trametes sp. 5930 isolated from Shennongjia Nature Reserve in China and studying on the capability of decolorization of different synthetic dyes*, *Biochem. Eng. J.* 57 (2011), pp. 13–22.
- [33] S. Romero, P. Blázquez, G. Caminal, X. Font, M. Sarrà, X. Gabarrell, and T. Vicent, *Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of Trametes versicolor*, *Biochem. Eng. J.* 31 (2006), pp. 42–47.
- [34] T.K. Kirk, E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz, and J.G. Zeikus, *Influence of culture parameters on lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Microbiol.* 117 (1978), pp. 227–285.
- [35] P. Blázquez, G. Caminal, M. Sarrà, and T. Vicent, *The effect of HRT on the decoloration of the Grey Lanaset G textile dye by Trametes versicolor*, *Chem. Eng. J.* 126 (2007), pp. 163–169.
- [36] S.N. Deming and S.L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*. Data Handling in Science and Technology, 3, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1987.
- [37] H. Wariishi, K. Valli, and M.H. Gold, *Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992), pp. 23688–23695.
- [38] P. Blázquez, N. Casas, X. Font, X. Gabarrell, M. Sarrà, G. Caminal, and T. Vicent, *Mechanism of textile metal dye biotransformation by Trametes versicolor*, *Water Res.* 38 (2004), pp. 2166–2172.
- [39] A.P.M. Tavares, M.A.Z. Coelho, J.A.P. Coutinho, and A.M.B.R. Xavier, *Laccase improvement in submerged cultivation: Induced production and kinetic modelling*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005), pp. 669–676.
- [40] D.S. Arora and P.K. Gill, *Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions*, *Bioresour. Technol.* 73 (2000), pp. 283–285.
- [41] M.S. Revankar and S.S. Lele, *Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1*, *Process Biochem.* 41 (2006), pp. 581–588.
- [42] E. Borràs, P. Blázquez, M. Sarrà, G. Caminal, and T. Vicent, *Trametes versicolor pellets production: Low-cost medium and scale-up*, *Biochem. Eng. J.* 42 (2008), pp. 61–66.
- [43] O. Yesilada, S.C. Yildirim, E. Birhanli, E. Apohan, D. Asma, and F. Kuru, *The evaluation of pre-growth mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2010), pp. 33–39.



# Capítol 8

## Mathematical model for dye degradation and laccase production by *Trametes versicolor* in fluidized reactor

---

Aquest capítol conté els resultats enviats per a publicació:

**Revista:** Bioresource Technology. Maig 2012.

**Autors:** Núria Casas, Paqui Blánquez, Teresa Vicent, i Montserrat Sarrà.

# MATHEMATICAL MODEL FOR DYE DEGRADATION AND LACCASE PRODUCTION BY *TRAMETES VERSICOLOR* IN FLUIDIZED REACTOR

Núria Casas, Paqui Blánquez, Teresa Vicent, Montserrat Sarrà\*

Departament d'Enginyeria Química, Escola d'Enginyeria. Universitat Autònoma de Barcelona 08193 Bellaterra, Spain.

\* Corresponding author. Tel 34 93 581 2789; Fax 34 93 581 2013

E-mail address: Montserrat.Sarra@uab.cat

## Abstract

Models of bioprocesses conducted in bioreactors play a crucial role in the analysis, design, control and development of these bioprocesses. The present work developed a mathematical model for *Trametes versicolor* dye decolorization and enzymatic production in a fluidized bed bioreactor operating in batch, repeated batch and continuous mode. The mathematical model considers all of the steps involved in a dye degradation process, such as the initial dye adsorption on the biomass, intracellular degradation, extracellular degradation, enzyme production and enzyme excretion to the broth. Results obtained from specific experiments at different experimental conditions were used to estimate the kinetic constants. Finally, the whole mathematical model was constructed and validated. The close correlation between the predicted and experimental results supports the reliability of the established model and shows that the model can be used to successfully simulate dye biodegradation and enzyme production in a fluidized bioreactor.

**Keywords:** Ligninolytic fungus, continuous process, grow limiting conditions.

## **Introduction**

More than 10000 chemically different dyes and colorants are being manufactured and used in a variety of industrial activities, such as the production of textiles, tanneries, plastics, pharmaceuticals, paper, food and cosmetics. Synthetic dyes are used mainly in the textile, dyeing and printing industries, and up to 15% of used dyestuff is discharged through industrial effluents (Pierce, 1994; O'Neill et al., 1999; Robinson et al., 2001). The dyes used in the textile industry are designed to resist fading upon exposure to sun, light water, chemicals such as oxidizing agents, and microbial attack. Thus, dye-containing effluents are rarely decolorized by conventional physico-chemical and biological wastewater treatments. Moreover, not all currently used dyes can be eliminated with such processes (Lin and Peng, 1996, Kim et al., 2005; Liu et al., 2006).

Alternative processes based on biotechnological principles are attracting increasing scholarly interest (Tauber et al., 2008; Papadia et al., 2011; Mishra et al., 2011). The ability of white rot fungi (WRF) to oxidate a large number of organic contaminants has been widely proven. Through the aid of their powerful enzymatic system, which is partly based on the generation of free radicals and the presence of extracellular enzymes (e.g., laccases and peroxidases), WRF have been used successfully to treat hazardous and recalcitrant contaminants, such as phenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, paper, and textile dyes (Pointing, 2001; Blázquez et al., 2004; Marco-Urrea et al., 2009)

Models of bioprocesses are specialized tools aimed at mathematically describing the metabolic processes of microorganisms contained in bioreactors. In particular, the dye degradation caused by fungi involves several processes, such as dye adsorption on

the biomass, intracellular degradation, extracellular dye degradation, enzyme production and enzyme excretion to the broth (Blázquez et al., 2004). Some studies have described kinetic models according to different decolorization systems. Most of them are based on a Michaelis-Menten equation. For example, Crisóvão et al. (2008, 2009) describe and simulate the dye decolorization caused by commercial laccase in a batch reactor. Michniewicz et al. (2007) estimated the kinetic parameters when azo and anthraquinone dyes were treated with purified laccase and the crude enzyme from the white-rot fungus *Cerrea unicolor*. In contrast, dyes adsorption processes have been studied and characterized by pseudo-first- or pseudo-second-order equations (Ho et al., 1999; Bayramoğlu et al., 2006, 2007; Aksu et al., 2007). Enzymatic production has also been studied in liquid medium (Tavares et al., 2005; Thiruchelvam et al., 2007). Nevertheless, most of the models proposed in enzymatic production consider a growth stage followed by a maintenance stage and consider the growth as a main step. Few studies have examined enzyme production and its applicability in dye decolorization (Baldrian and Šnajdr, 2006; Birhanli et al., 2006). None of them have tried to describe mathematically the whole dye degradation process.

Although there is increasing interest in the utility of these fungal cultures and the enzymes that they produce, researchers have yet to mathematically model enzymatic reactors comprising flow distribution, transport phenomena, decolorization and enzyme production without cellular growth, which would enable process description and optimization.

The objective of this work is to propose a simple structured model that describes the biodegradation of a commercial mixture of metal complex dyes, such as Grey Lanaset G, by *Trametes versicolor* under growth-limiting conditions in a fluidized bioreactor under different operating modes. Mathematical modeling can help to predict

the behavior of microorganisms and allows the variation of substrate and microorganism concentration with the operation time to be predicted. As a consequence, a mathematical model of a bioprocess is essential for controlling and optimizing this process.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Dye*

Grey Lanaset G (GLG), a commercial mixture of several metal complex dyes, was kindly provided by Ciba. It was used without any further purification.

### *2.2 Strain*

*Trametes versicolor* was obtained from ATCC # 42530. The fungus was maintained on 2% malt agar slants at 25°C until use. Subcultures were routinely made. Pellets of *T. versicolor* were obtained as previously described (Blázquez et al., 2004).

### *2.3 Media and culture conditions*

The basic medium contained per litre: 11 mL of supplemented medium (Kirk et al., 1978) and 0.15 g Grey Lanaset G. The medium was sterilised at 120 °C for 30 min after adjusting its pH to 4.5 with 0.5 M NaOH or HCl 0.5 M.

### *2.4 Bioreactor and operating conditions*

A glass fluidized bioreactor with a working volume of 1500 mL was equipped with a pH controller to maintain a pH of 4.5. Fluidized conditions were maintained by air pulses, as described previously (Blázquez et al., 2004). Temperature was maintained at 25°C.

During the batch process or repeated batch processes, the bioreactor was filled with a basic medium, and the glucose was continuously fed under maintenance conditions ( $0.26 \text{ g glucose g biomass}^{-1} \text{ d}^{-1}$  from a high concentrated solution).

### *2.5. Enzymatic biodegradation*

Commercial purified laccase was added to 100 mL of dye solution ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ) buffered with 1.64 mM of 2,2-dimethyl succinate at pH 4.5 in a 500 mL Erlenmeyer flasks. The measured initial activity was approximately  $100 \text{ U L}^{-1}$  and  $1000 \text{ U L}^{-1}$ . The flasks were placed in an orbital shaker at  $25^\circ\text{C}$ .

### *2.6 Analytical methods*

#### *2.6.1 Biomass concentration*

Biomass concentration was measured as dry weight by vacuum-filtering the cultures through a predried and preweighed Whatman grade GF/C glass-fiber filter (Whatman, Barcelona, Spain). The filters containing the mycelial pellets were dried at  $103^\circ\text{C}$  to achieve a constant weight.

#### *2.6.2 Color determination*

Spectrophotometric measurements were conducted at the visible maximum absorbance (i.e., 590 nm for Grey Lanaset G) by using a Varian UV/Vis Cary (Varian) spectrophotometer at  $20^\circ\text{C}$ .

#### *2.6.3 Glucose determination*

Glucose was measured with an YSI 2000 enzymatic analyzer from Yellow Springs Instruments and Co.

#### *2.6.4 Laccase activity*

Laccase activity was measured using a modified version of the method for determining manganese peroxidase (Kaal et al., 1993). The reaction mixture comprised

200  $\mu\text{L}$  of 250 mM sodium malonate at pH 4.5, 50  $\mu\text{L}$  of 20 mM 2,6-dimethoxyphenol (DMP) and 600  $\mu\text{L}$  of sample. DMP is oxidized by laccase even in the absence of a cofactor. Changes in the absorbance at 468 nm were monitored for 2 min on a Varian Cary 3 UV-vis spectrophotometer at 30°C. One activity unit (U) was defined as the number of micromoles of DMP oxidized per minute. The DMP extinction coefficient was  $24.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wariishi et al., 1992).

#### *2.6.5 Proteolysis activity*

Protease activity in culture supernatant was determined using the QUntiCleave™ Fluorescent Protease Assay Kit (Pierce) in accordance with the manufacturer's instructions.

#### *2.7 Kinetic constants estimation*

To solve the proposed kinetics equations for dye decolorization and enzyme production, this study used the MATLAB2007 program (Mathematical Laboratory). The experimental data and initial parameters values were introduced, and their final parameter values were estimated by the ODE15S function (solve stiff differential equations and DAEs; variable order method). This routine uses a variable step Runge-Kutta Method to solve a set of differential equations. The program minimizes the sum of squared relative residuals between the predicted time courses and the ones obtained experimentally.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Mathematical model

The fungal degradation of textile dyes occurs in several steps. The initial adsorption of the dye onto the biomass is followed by its transfer into the cells. Degradation takes place mainly within the cells, and the resulting products are finally released (Blázquez et al., 2004). In addition, the enzyme excreted to the broth also contributes to the decolorization. Thus, for each step, the kinetic model was chosen based on the best fit to the experimental results or the reports of previous studies.

##### 3.1.1 Enzyme decolorization

Several authors have used the Michaelis-Menten constant associated with the enzymatic level (Eq. (1)) to model the enzymatic decolorization (Radha et al., 2005; Michniewicz et al., 2007; Patel and Suresh, 2006; R.O. Cristóvão et al., 2008, 2009):

$$dC/dt = (v_{\max E} \cdot C / (C + k_{ME})) W_E \quad (1)$$

where  $v_{\max E}$  is the maximum extracellular decolorization rate ( $\text{mg U}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $C$  is the dye concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) in the broth,  $k_{ME}$  is the Michaelis-Menten constant ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and  $W_E$  is the amount of extracellular laccase activity in the broth (U).

The same kinetic model was proposed for the intracellular dye degradation (Eq. (2)):

$$dS/dt = v_{\max I} S / (k_{MI} + S) W_I \quad (2)$$



where  $v_{maxI}$  is the maximum intracellular decolorization rate ( $\text{mg U}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $S$  is the dye concentration in the biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $k_{MI}$  is the Michaelis-Menten intracellular constant ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and  $W_I$  is the amount of extracellular laccase activity in biomass (U).

### 3.1.2 Adsorption step

The irreversible adsorption process of Grey Lanaset G on the *T. versicolor* pellets has been studied by previous researchers (Aretxaga et al., 2001). These tests were conducted on dead biomass. The adsorption equilibrium was reached within 24 h and conformed to a Langmuir isotherm (Eq (3)):

$$(C_0 - C_{eq})V/X = K b C_{eq} / (1 + K C_{eq}) \quad (3)$$

where  $C_0$  and  $C_{eq}$  are the initial and at-equilibrium dye concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ), respectively;  $X$  is the biomass (g); and  $V$  is the volume (L). In addition,  $b$  and  $K$  are Langmuir constants related to adsorption capacity (maximum amount of dye adsorbed per unit of biomass) and energy of sorption, respectively. The constants were determined to be  $b=6.14$  ( $\text{mg dye g wet biomass}^{-1}$ ) and  $K=0.03$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) (Aretxaga et al., 2001), which is equivalent to  $b=144.93$   $\text{mg dye g}^{-1}$  of dry biomass weight. The Langmuir equation (Eq. (2)) was used to calculate the dye concentration at adsorption equilibrium for all experimental conditions. At any time while performing a dye mass balance, the dye mass adsorbed per unit of biomass ( $S$ ) was estimated (Eq. (4)). In this estimation,  $C$  was the broth dye concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ), and the subindex eq indicated a state of equilibrium.

$$S = (C_0 - C) * V / X \quad (4)$$

The Elovich equation, a pseudo-first-order model and a pseudo-second-order model were used to test for kinetics adsorption. The Lagergren pseudo-first-order model (Eq. (5)) gave a good fit to the experimental data (data not shown) (Namasivayan et al., 1996; Ho and McKay, 1999):

$$d[S]/dt = k_1 \cdot ([S_{eq}] - [S]) \quad (5)$$

### 3.1.3 Laccase production

The laccase production is usually associated with both growth and product by the Luedeking and Piret model (Eq. (6)) (Tavares et al. 2005, Thiruchelvam and Ramsay, 2006), where  $\alpha$  is the growth-associated constant ( $U \text{ g}^{-1}$ ) and  $\beta$  the non-growth associated constant ( $U \text{ g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ). The model is as follows:

$$dE_E/dt = \alpha dX/Dt + \beta X \quad (6)$$

where  $X$  is microbial biomass ( $\text{g L}^{-1}$ ) and  $E_E$  is enzyme extracellular concentration ( $U \text{ L}^{-1}$ ).

This assumption is based on the notion that the secreted laccase medium is not proportional to cell concentration. However, studies such as Liu et al. (2003) only relate the production to the growth. In contrast, our experiments were performed under growth-limiting conditions because no nitrogen source was supplied and the glucose was fed at the maintenance uptake rate. Thus, the biomass concentration was constant, and the enzymatic production was induced by Grey Lanaset G. Given the enzymatic production profile obtained from the degradation of the Grey Lanaset G batch (Blázquez et al., 2004), the intracellular laccase production was described with a

hyperbolic kinetic model associated with the dye induction in non-growing conditions (Eq. (7)) (Spiros and Lee, 1993):

$$dE_I/dt = v_{\max EI} S / (S + k_{SEI}) \quad (7)$$

where  $v_{\max EI}$  ( $U \text{ g biomass}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) is the maximum enzymatic production rate,  $k_{SEI}$  ( $U \text{ mg dye}^{-1}$ ) is the constant associated with the production and  $E_I$  ( $U$ ) is the intracellular enzymatic level.

#### 3.1.4 Laccase excretion

The enzyme excretion to the culture broth was described by a pseudo-first-order model (Eq. (8)) that considered the equilibrium between intracellular and extracellular laccase levels:

$$dE_E/dt = k_2 \cdot (E_I \cdot X - E_E \cdot V) / V \quad (8)$$

where  $k_2$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the enzymatic transfer constant.

#### 3.1.5 Laccase deactivation

Although protease activity was scarcely detected, the laccase activity always decreased after the maximum activity level in the batch degradation process was detected. Therefore, an exponential kinetic was proposed to describe the inherent laccase deactivation with the progression of time (Eq. (9)) (Bailey and Ollis, 1994, Santos et al., 2007):

$$dE_E/dt = k_d \cdot \exp((-k_p \cdot t)) \cdot E_E \quad (9)$$

where  $k_d$  ( $h^{-1}$ ) and  $k_p$  ( $h^{-1}$ ) are deactivation constants.

### 3.1.6 Mass balance

For each variable, the general mass balance in the bioreactor or in the cells can be applied (Eq. (10)):

$$\text{Accumulation} = \text{Entrance} - \text{Exit} + \text{Generation} \quad (10)$$

where the entrance and exit refer to the mass associated with the influent and effluent, respectively. These terms are zero in the batch process. The generation includes the kinetics rate for each process (appearance or disappearance), and the variation of the variables along time is derived from the accumulation term.

Combining the kinetics models with the mass balances, the equation set of the mathematical model is obtained (Eq. (11-14)):

$$dC/dt = F_v(C_{in} - C)/V - k_1 \cdot (S_{eq} - S) \cdot X/V - (v_{maxE} C / (C + k_{ME})) \cdot W_E \quad (11)$$

$$dS/dt = k_1 \cdot (S_{eq} - S) - v_{maxI} S / (k_{MI} + S_I) \cdot W_I \quad (12)$$

$$dE_E/dt = -F_v E_E/V + k_2 \cdot (E_I X - E_E V)/V - k_d E_E \exp(-k_p \cdot t) \quad (13)$$

$$dE_I/dt = v_{maxEI} S / (S + k_{SEI}) - k_2 \cdot (E_I X - E_E V)/X \quad (14)$$

where  $F_v$  ( $L h^{-1}$ ) was continuous flow and  $C_{in}$  ( $mg L^{-1}$ ) was inlet dye concentration.

### 3.2. Model calibration

The mathematical model is composed of a set of 4 equations with 10 parameters. To minimize the number of parameters that need to be calibrated, this study performed specific experiments.

### 3.2.1 Adsorption kinetics

Table 1 summarizes the individual kinetics fit of each experimental condition in batch adsorption experiments (Aretxaga et al., 2001). A good correlation coefficient can be observed for most of them. The  $k_1$  values ranged from 0.2 to 0.8. Considering all of the experiments,  $k_1=0.3$  gave the minimum square residual sum (data not shown).

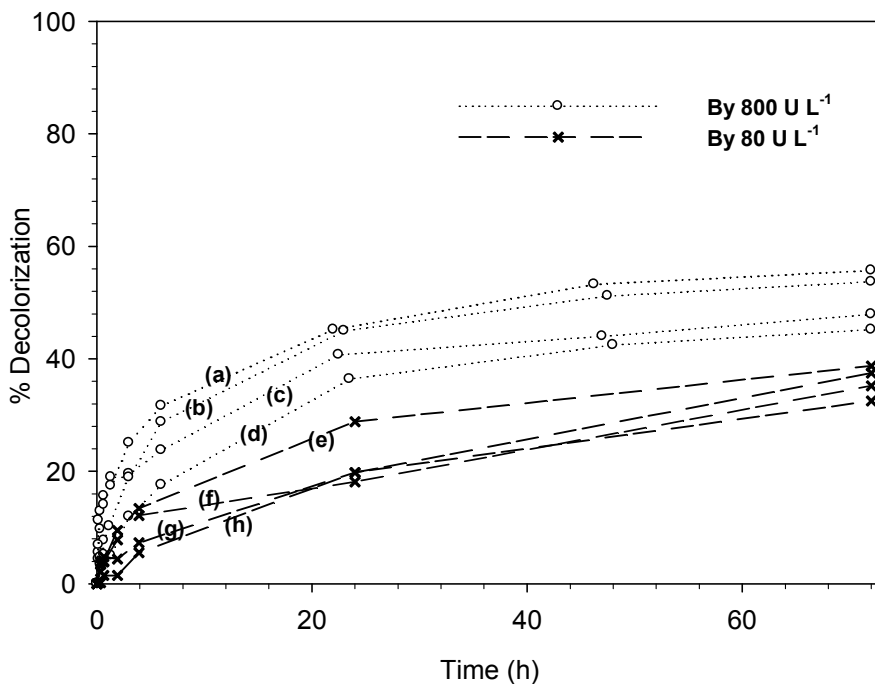
**Table 1.** Adsorption kinetic parameters for pseudo-first order model in inactivated biomass.

$C_0$ (mg L <sup>-1</sup> )	X/V (g L <sup>-1</sup> )	Seq (mg g <sup>-1</sup> )	$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
38	1.7	15.49	0.39	0.964
93	0.9	72.44	0.23	0.985
156	1.6	69.18	0.30	0.985
183	2.0	54.95	0.18	0.992
183	1.6	67.61	0.25	0.997
225	1.4	79.43	0.28	0.996

### 3.2.2 Extracellular enzymatic degradation

Several in vitro degradation experiments were conducted with initial dye concentrations ranging from 20 to 200 mg/l and two laccase levels, 80 and 800 U/l. A significant amount of laccase was not detected at the beginning of the fungal batch

degradation. Blázquez et al. (2004) demonstrated that the degradation mechanism starts with an adsorption phase of the dye on the microorganism and is followed by its degradation inside the fungi, where the intracellular activity is detected earlier than the extracellular activity. Thus, the extracellular enzyme contributes to decolorization after the adsorption and enzyme excretion phases, when the laccase level is higher than 100 U L<sup>-1</sup>. Figure 1 show the results, where an increase in laccase activity did not result in a significant increase in the decolorization yield. In addition, the initial decolorization rates are quite similar across all experiments except for experiments (g) and (h), where the dye concentration and the enzyme level are low. Thus, to simplify the model, this study considered WE as a constant in equation (11).



**Fig. 1.** Decolorization percentage achieved in different enzymatic concentrations and different initial dye concentrations: (a) 20.9 mg L<sup>-1</sup>; (b) 48.0 mg L<sup>-1</sup> ; (c) 99.6 mg L<sup>-1</sup>; (d) 205.1 mg L<sup>-1</sup>; (e) 29.1 mg L<sup>-1</sup> ; (f) 48.5 mg L<sup>-1</sup> ; (g) 98.1 mg L<sup>-1</sup> ; (h) 201.1 mg L<sup>-1</sup>.

The linearization of the Michaelis-Menten equation was used to evaluate the parameter  $v_{ME}$ , as a product of  $v_{maxE}$ ,  $W_E$ , and  $k_{MS}$ . Using (a, b, c, d) experimental data, this study found that  $v_{ME}=16.7$  ( $\text{mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) and  $k_{MS}=639.9$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ). These values are in the same range of those parameters ( $v_{ME} = 4\text{-}24$   $\text{mg L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $k_{MS}=100\text{-}900$   $\text{mg L}^{-1}$  in the enzymatic decolorization obtained from *Phanerochaete chrysosporium*) (Radha et al., 2005).

Several experiments were performed in the fluidized reactor and under different experimental conditions to calibrate and validate the remaining parameters. Table 2 summarizes all experiments performed and the conditions.

**Table 2.** Summary of the experimental conditions and obtained results used for the calibration and validation of the mathematical model. In all experiments the glucose was feed at the consumption rate.

Experiment (Exp)	X/V (g L <sup>-1</sup> )	C <sub>0</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>f</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Duration (h)	E <sub>E0</sub> (U L <sup>-1</sup> )	E <sub>Ef</sub> (U L <sup>-1</sup> )	Fv (L h <sup>-1</sup> )	C <sub>in</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
Batch with pulse of dye								
1	0.8	39.6	3.3	49	0	89.3	-	-
2	0.8	32.7	4.8	95	89.3	75.3	-	-
3	0.8	90.0	12.6	48	75.3	147.4	-	-
4	0.8	91.9	5.14	72	147.4	163.5	-	-
5	0.8	113.2	19.5	72	163.5	237.0	-	-
6	0.8	158.6	20.1	122	237.0	454.8	-	-
7	0.8	142.9	8.4	47	454.8	738.9	-	-
Batch with pulse of dye and NH <sub>4</sub> Cl								
8	1.5	140.1	4.3	40	55.0	546.6		
9	1.5	130.5	6.9	38	662.6	784.5		

Batch								
10	0.7	130.0	11,1	79	0	141.6		
11	1.4	132.6	13.8	79	0	347.5		
12	2.1	140.6	11.1	72	0	741.2		
13	2.1	92.8	9.9	79	0	267.1		
14	2.2	111.2	7.7	96	0	390.7		
Repeated batch								
15	2.0	152.2	14.2	24	0	156.0		
16	2.0	144.3	32.8	24	5.10	283.2		
17	2.0	151.6	17.7	71	16.9	574.8		
18	2.0	141.6	8.8	66	26.9	468.0		
19	2.0	126.5	8.7	95	55.8	354.6		
Continuous mode								
20	0.4	134.5	54.5	108	0	37.8	0.0625	113.2
21	1.2	142.1	60.2	121	0	129.9	0.0625	133.0
22	2.3	142.2	16.5	243	0	74.9	0.0625	153.9
23	1.0	72.5	20.3	400	0	41.9	0.0625	62.7
24	2.3	143.7	47.1	390	0	122.5	0.0625	122.1
25	0.7	73.9	18.6	151	0	20.7	0.0625	73

### 3.2.3 Intracellular degradation

It was not possible to measure the dye concentration adsorbed on the biomass along time because of the irreversible adsorption process of Grey Lanaset G on the *T. versicolor* pellets (Aretxaga et al., 2001). Therefore, to determine the initial intracellular kinetic parameters, this study conducted several batch experiments (2, 3 and 6) that considered the initial concentration as the one at the equilibrium (24 hours) and the final concentration as zero when the pellets were visually colorless. Given the continuous laccase excretion step, the intracellular enzyme level was estimated to be constant. The Michaelis-Menten parameters were  $v_{MI}=v_{maxI} \cdot W_I=0.9$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) and  $k_{MSI}=10.4$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ). These values were used to fit the kinetic model to three other experiments (1, 4, and 7) through the MATLAB application. The parameter optimization generated  $v_{MI}=1.2$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) and  $k_{MSI}=L$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ).



The contribution of those parameters to the global model is relatively low because the limiting step is the adsorption of the dye on the fungal biomass. The same conclusion was reached by Baldrian et al. (2006).

#### *3.2.4 Enzymatic production*

The results from the experiments (1-7) during the first 48 h were used to precalibrate the parameters for the enzymatic production to generate  $v_{\max_{EI}} = 10 - 35$  ( $U\ g^{-1}\ h^{-1}$ ) and  $k_{s_{EI}} = 30 - 180$  ( $mg\ g^{-1}$ ). Thus, the average values were introduced to the MATLAB application as the initial values for the optimization process.

#### *3.2.5 Laccase deactivation*

The results of the experiments with more clear evidence of deactivation (1, 3, 4, 8 and 9) were used to determine the initial deactivation parameters from the linearization. These values were  $k_d = 1.56 \pm 0.92\ h^{-1}$  and  $k_p = -0.02 \pm 0.01\ h^{-1}$ .

In summary, the mathematical model is composed of a set of 4 equations with 10 parameters. Three of them were determined from specific experiments:  $k_1 = 0.3\ (h^{-1})$ ,  $v_{ME} = 16.7\ mg\ L^{-1} \cdot h^{-1}$ , and  $k_{MS} = 639.9\ (mg\ L^{-1})$ .

For the other seven parameters, only the initial values for the calibration were determined. To simplify the dependence of the model on parameters and considering the low weight in the model, this study fixed the values of the intracellular degradation parameters ( $v_{MI} = 1.2\ (mg\ g^{-1} \cdot h^{-1})$  y  $k_{MSI} = 1\ (mg\ g^{-1})$ ). For the other five parameters, only the initial values for the calibration were determined. The results of experiments 11-14 were used to obtain the optimal parameters shown in Table 3.

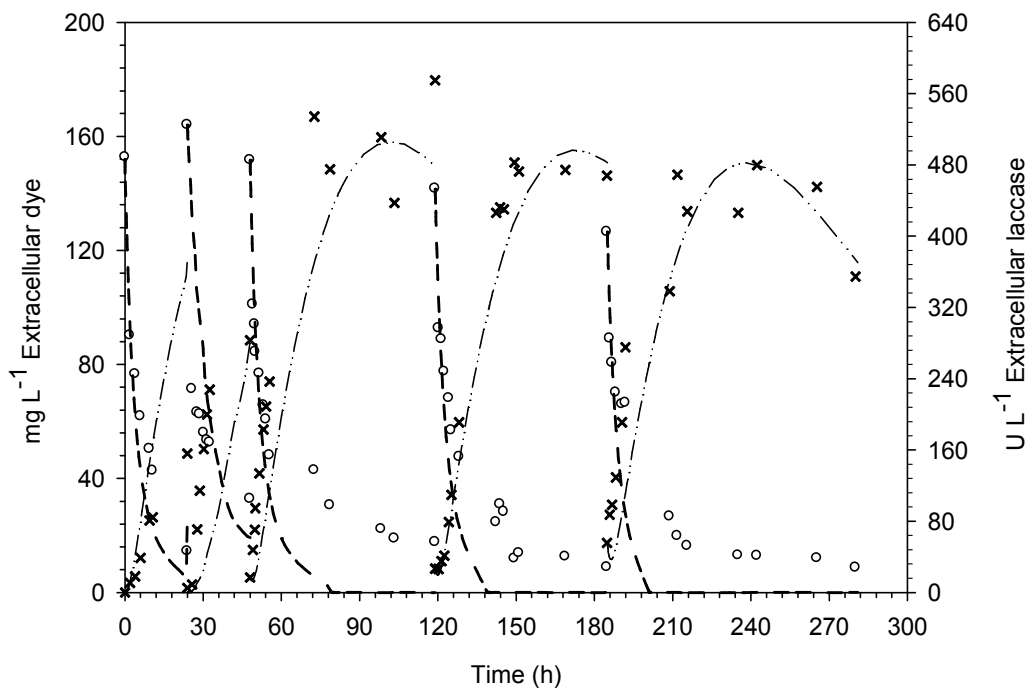
**Table 3.** Laccase production parameters obtained after calibration using batch mode experiments.

Experiment (Exp)	$v_{\max_{EI}}$ ( $U\ g^{-1}\ h^{-1}$ )	$k_{S_{EI}}$ ( $U\ g^{-1}$ )	$k_2$ ( $h^{-1}$ )	$k_d$ ( $h^{-1}$ )	$k_p$ ( $h^{-1}$ )
11	28.74	17.71	0.84	0.050	-0,007
12	41.68	26.10	0.32	0.040	-0,017
13	35.55	27.50	0.26	0.100	-0,005
14	25.94	20.81	0.49	0.030	-0,010
<b>Average</b>	<b>33.48</b>	<b>23.03</b>	<b>0.48</b>	<b>0.055</b>	<b>-0,010</b>
Std	7.37	4.57	0.26	0.030	0,005

### 3.3 Validation of the model

The results of several repeated batch degradations were used to check the validity of the model that described the performance of the system. Figures 2 and 3 show the results obtained from experiments 15-18 and experiments 19-22, respectively, as well as those results predicted by the mathematical model. Despite the complexity of the experimental system, the simple model was able to reproduce both the dye decolorization and the laccase production for sequential batch operation. It is remarkable that the model was calibrated using the results of the batch mode experiments, where fresh biomass was inoculated to the medium containing dye. Only glucose was continuously fed at the uptake rate to guarantee low levels along time. In contrast, the results of the repeated batch or continuous operation experiments were used to validate the model. In the repeated batch operation, the biomass was retained in the reactor along time, while broth was withdrawn and replaced by fresh medium

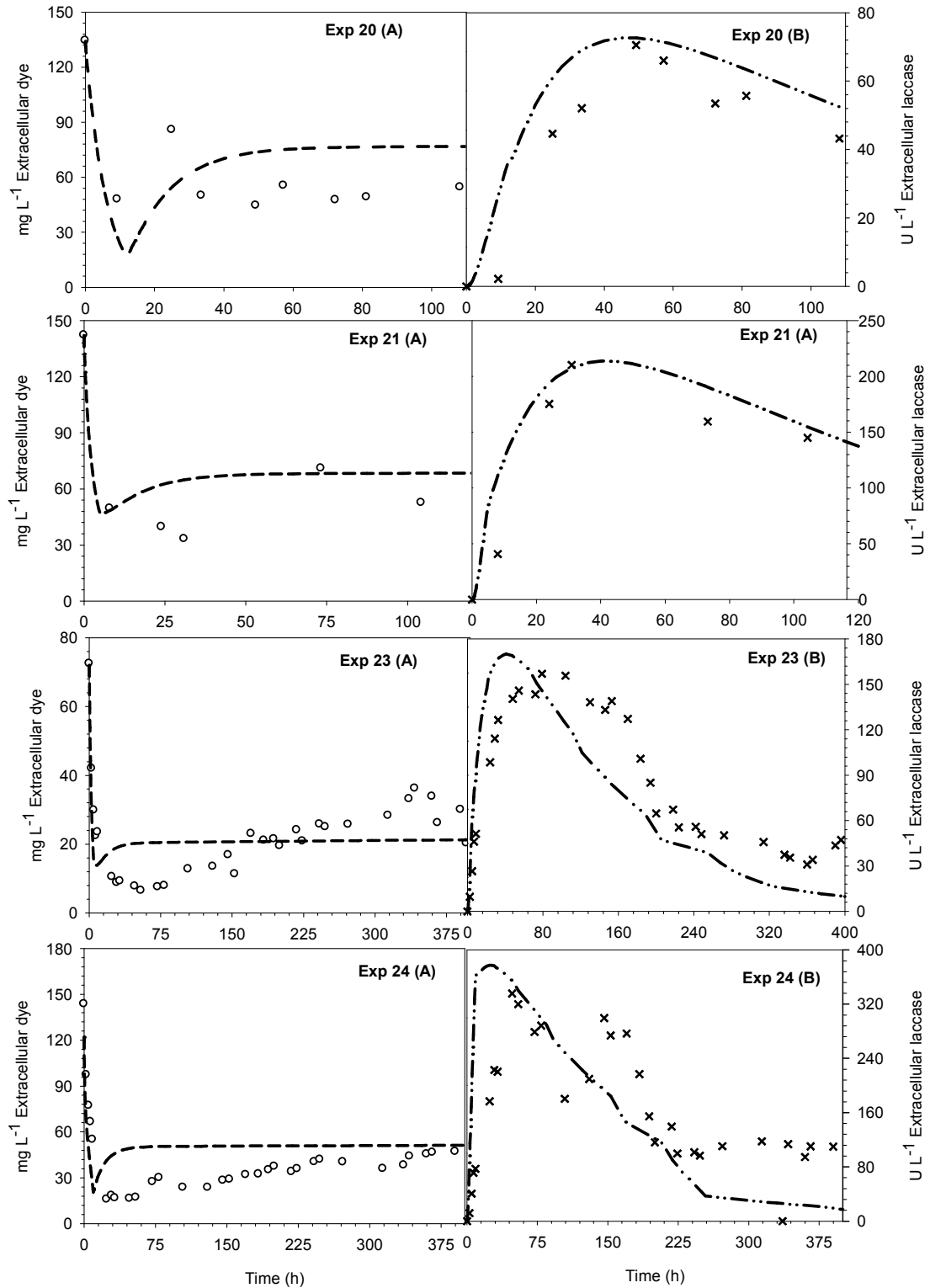
containing dye. Even when the initial dye concentration of each cycle was the same, laccase production increased during the first three cycles; this laccase production improvement effect was described in previous studies (Blázquez et al., 2004; Bihanli and Yesilada, 2006). Nevertheless, the mathematical model was able to predict the system's performance in repeated batch mode. The proposed model is applicable to systems where the growth is limited by the nitrogen source. In other words, the biomass concentration remains constant because glucose is continuously fed at the maintenance uptake rate.



**Fig. 2.** Comparison of experimental (o decolorization dye ( $\text{mg L}^{-1}$ ); x laccase production ( $\text{U L}^{-1}$ )) and simulated (--- decolorization ( $\text{mg L}^{-1}$ ); -.-. laccase production ( $\text{U L}^{-1}$ )) in repeated batch experiments. (15, 16, 17, 18 and 19).

This mathematical model accurately correlates the dye concentration and laccase activity under a wide range of different circumstances. This finding provides robust evidence that the model accurately describes the degradation of the commercial mixture day Grey Lanaset G. The obtained results provide evidence not only for the importance of the adsorption step on the color removal process from the broth but also for the induction of the enzyme production by the dye concentration on the broth.

Finally, the mathematical model can be easily adapted to different systems, such as the degradation of any water soluble organic pollutant, which follow the same mechanism. Obviously, it would require a recalibration of the same parameters. In addition, this model can also describe the behavior of a system where extracellular enzymes do not take part in the biodegradation process (e.g., pollutants where the intracellular enzymatic system cytochrome P450 is involved) (Doddapaneni and Yadav, 2004; Marco-Urrea et al., 2009). Although the system concerns enzymatic degradation, from a global perspective, much depends on the adsorption stage. Therefore, the model can also help to elucidate which operation modes favor adsorption and therefore will be more effective. In summary, the model could also be adapted to the degradation of other pollutants by *T. versicolor* under similar working conditions.



**Fig. 3.** Comparison of experimental (o decolorization dye (A) ( $\text{mg L}^{-1}$ ); x laccase production (B) ( $\text{U L}^{-1}$ )) and simulated (--- decolorization (A) ( $\text{mg L}^{-1}$ ); -.- laccase production (B) ( $\text{U L}^{-1}$ )) in continuous mode experiments. (20,21,23,24).

#### 4. Conclusions

The Grey Lanaset G degradation and the laccase production by the *Trametes versicolor* pellets in a fluidized bed reactor operating with different modes under growth-limited conditions were mathematically described. The model calibration was calculated in an independent set of experiments, and it was validated by the results of experiments in repeated batch and continuous modes. The agreement between the predicted and the experimental results further corroborated the model's ability to describe the dye degradation and enzyme production in all stages of the process. Thus, this study developed a mathematical model that not only describes dye biodegradation but also easily adapts to any contaminant biodegradation that follows the same mechanism.

#### Nomenclature

$b$  = Langmuir constant related to fungal adsorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ )

$C$  = broth dye concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$E_E$  = Extracellular activity concentration ( $\text{U L}^{-1}$ )

$E_I$  = Intracellular activity concentration ( $\text{U g}^{-1}$ )

$F_V$  = Volumetric Flow rate ( $\text{mL h}^{-1}$ )

$k_1$  = kinetic adsorption constant ( $\text{h}^{-1}$ )

$k_2$  = kinetic constant for laccase excretion ( $\text{h}^{-1}$ )

$K$  = Langmuir constant related to energy of sorption ( $\text{L mg}^{-1}$ )

$k_{ME}$  = Michaelis Menten constant for extracellular decolorization ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$k_{MI}$  = Michaelis Menten intracellular decolorization ( $\text{mg g biomass}^{-1}$ )

$k_p$  = exponential deactivation constant ( $\text{h}^{-1}$ )

$k_d$  = deactivation constant ( $\text{h}^{-1}$ )

$k_{SEI}$  = constant associated to the enzyme production ( $\text{U mg dye}^{-1}$ )

$S$  = Dye concentration on the biomass ( $\text{mg g}^{-1}$ )

$t$  = time (h)

$V$  = volume broth (L)

$v_{\text{max}_E}$  = maximum extracellular rate ( $\text{mg U}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$v_{\text{max}_{EI}}$  = maximum enzymatic production rate ( $\text{U g biomass}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

$v_{\text{max}_I}$  = maximum intracellular decolorization rate ( $\text{mg U}^{-1} \cdot \text{g biomass}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

$v_{ME}$  = pseudo-maximum extracellular decolorization rate ( $\text{mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$v_{MI}$  = pseudo-maximum intracellular decolorization rate ( $\text{mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$W_E$  = Amount of extracellular enzyme in broth (U)

$W_I$  = Amount of intracellular enzyme in biomass (U)

$X$  = Amount biomass dry weight (g)

### **Subscripts:**

0 = Value at time zero

eq = value at equilibrium

in = inflow

f = at the end of experiment

### **Acknowledgements**

This work has been financially supported by the Spanish Plan Nacional de I+D+I, project number CTM2007-60971. The authors are members of the consolidated research group in Catalonia (2009-SGR-656). The Department of Chemical Engineering of the Universitat Autònoma de Barcelona is the Biochemical Engineering Unit of the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) de la Generalitat de Catalunya. N.C. acknowledges DURSI for a predoctoral grant.

## 5. References

- Aksu, Z., Tatli A.I, Tunç Ö., 2007. A comparative adsorption/biosorption study of Acid Blue 161: Effect of temperature on equilibrium and kinetic parameters. Chem. Eng. J. 142, 23-39.
- Aretxaga, A., Romero, S., Sarra, M., Vicent, T., 2001. Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. Biotechnol. Prog. 17, 664-668.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., 1994. The kinetics of enzyme-catalysed reactions, in: Biochemical Engineering Fundamentals, second ed. Mc Graw Hill, New York, pp. 86-156.
- Baldrian, P., Šnajdr, J., 2006. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. Enzyme Microb. Tech. 39, 1023-1029.
- Bayramoğlu, G., Çelik, G., Yakup, A.M., 2006. Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. J. Hazard. Mater. B137, 1689-1697.
- Bayramoğlu, G., Yakup, A.M., 2007. Biosorption of benzidine based textile dyes “Direct Blue 1 and Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. J. Hazard. Mater. 143, 135-143.
- Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. Water Res. 38, 2166-2172.



- Birhanli, E., Yesilada, O., 2006. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme Microb. Tech.* 39, 1286-1293.
- Cristóvão, R.O., Tavares, A.P., Ribeiro, A.S., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A.R., Macebo, E.A., 2008. Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresource Technol.* 99, 4768-4774.
- Cristóvão, R.O., Tavares, A.P., Ferreira, L.A., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A., Macebo, E.A., 2009. Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase. *Bioresource Technol.* 100, 1094-1099.
- Doddapaneni H., Yadav J.S., 2004. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Biotechnol.* 65, 559-565.
- Ho, Y.S., McKay, G., 1999. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem.* 34, 451-465.
- Kaal, E.E.J., de Jong, ED., Field, J.A., 1993. Stimulation of Ligninolytic Peroxidase Activity by Nitrogen Nutrients in the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4031-4036.
- Kim, G.Y., Lee, K., B., Cho, S.H., Shim, J., Moon, S.,H., 2005. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *J. Hazard. Mat. B126*, 183-188.

- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikis J.G., 1978. Influence of culture parameters on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117, 227-285.
- Lin, S.H., Peng, F.C., 1996. Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. Water Res. 30, 587-466.
- Liu, J.Z., Weng, L.P., Zhang, Q.L., Xu, H., Ji, L.N., 2003. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biochem. Eng. J. 14, 137-141.
- Liu, C.C., Hsieh, Y.H., Lai, P.F., Li, C.H., Kao, C.L., 2006. Photodegradation treatment of azo dye wastewater by UV/TiO<sub>2</sub> process. Dyes Pigments. 68, 191-195.
- Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere 74, 765-772.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R., Hofichter, M., 2007. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. Dyes Pigments. 77, 295-302.
- Mishra, A., Kumar, S., Pandey, A.K., 2011. Laccase Production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates of white rot fungus. Int Biodeter Biodegr 65, 487-493.
- Namasivayam, C., Muniasamy, N., Gayatri, K., Rani, M., Ranganathan, K., 1996. Removal of dyes from aqueous solutions by cellulosic waste orange peel. Bioresource Technol. 57, 37-43.

- O'Neil, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M., Delee, W., 1999. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 74, 1009-1018.
- Papadia, S., Rovero, G., Fava, F., Di Gioia, D., 2011. Comparison of different pilot scale bioreactors for the treatment of a real wastewater from the textile industry. *Int Biodeter Biodegr.* 65, 396-403.
- Patel, R., Suresh, S., 2006. Decolourization of azo dyes using magnesium-palladium system. *J. Hazard. Mater. B137*, 1729-1741.
- Pierce, J., 1994. Colour in textile effluents-the origin of the problem *J. Soc. Dyers Colourists.* 110, 131-134.
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 57, 20-33.
- Radha, K.V., Regupathi, I., Arunagiri, A., Murugesan, T., 2005. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochem.* 40, 337-3345.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluents: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource. Technol.* 77, 247-255.
- Santos A.M.P., Oliveira M.G., Maugeri F., 2007. Modelling termal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. *Bioresource. Technol.* 98, 3142-3148.

- Spiros, N.A., Lee, J., 1993. Mathematical Modeling of the Production of Cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*: Effect of L-Valine. *Biotechnol. Progr.* 9, 54-63.
- Tavares, A.P.M., Coelho, M.A.Z, Coutinho, J.A.P., Xavier, A.M.R.B., 2005. Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 669-676.
- Tauber, M.M., Gübitz, G.M., Rehorek, A., 2008. Degradation of azo dyes by oxidative processes – Laccase and ultrasound treatment. *Bioresource Technol.* 99, 4213-4220.
- Thiruchelvam, A.T., Ramsay, J.A., 2007. Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirrer tank reactor. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 74, 547-554.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* – Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267, 23688-23695.

# Capítol 9

## Conclusions generals

---

- L'enzim lacasa és un dels principals catalitzadors de la biodegradació de colorants tèxtils amb el fong *Trametes versicolor*. Tanmateix la degradació amb fong dona generalment millors resultats que la degradació enzimàtica, tant en termes de percentatge de decoloració com en grau de transformació.
- Només aquells colorants tòxics pel fong donen pitjors resultats. Però la toxicitat depèn de la concentració de forma que quan la concentració és inferior a la concentració subtòxica, la degradació amb fong és més elevada que la degradació amb enzim.
- El fong posseeix un sistema enzimàtic complex que permet fins i tot arribar a la mineralització i per tant s'obtenen transformacions que arriben un pas més lluny que no pas amb l'enzim lacasa.
- La identificació dels productes de la degradació enzimàtica de varis colorants de la família Ió Arilcarbeni ha permès establir que l'atac té lloc a l'estructura en els anells mono-N i di-N,N o,p-amines que contribueixen a la ressonància. Per altra part, un anell sense substituents dona lloc a l'àcid benzoic com a producte estable. S'ha comprovat que aquest es pot degradar en el tractament amb fong.
- Malgrat que la velocitat de degradació d'un colorant rarament es pot correlacionar amb el nivell enzimàtic, aquest es pot utilitzar com un indicador de l'activitat metabòlica del fong.

- En condicions limitants de creixement, mantenir els nivells de glucosa i nitrogen baixos afavoreix la producció de lacasa. A més s'ha comprovat que els colorants indueixen la producció enzimàtica, sempre i quan aquest contingui nitrogen en la seva estructura i que per tant no requereixen font de nitrogen inorgànica per mantenir la producció enzimàtica.
  
- S'ha desenvolupat un model matemàtic que descriu la producció enzimàtica i la degradació del colorant amb totes les etapes proposades segons el mecanisme de degradació. Aquestes són: adsorció del colorant sobre la biomassa, degradació intracel·lular del colorant, excreció de l'enzim i degradació extracel·lular del colorant.
  
- S'ha determinat que l'etapa d'adsorció és l'etapa crítica de tot el procés, per tant el tractament en discontinus repetits serà el mode d'operació més adequat doncs afavoreix una ràpida adsorció. Treballar amb discontinus repetits suposa obtenir alts rendiments de decoloració i elevades produccions enzimàtiques al llarg dels diferents cicles; seria a més l'operació que millor s'adaptaria a l'entrada d'efluents industrials tèxtils (variables en tipologies de colorants a tractar i concentracions).
  
- El model prediu adequadament el comportament del sistema fins i tot en condicions d'operació diferents a les emprades per calibrar el model.
  
- Malgrat que el model matemàtic s'ha calibrat i validat utilitzant la mescla comercial de colorants Gris Lanaset G com a contaminant model, es pot re calibrar fàcilment per qualsevol altre tipus de degradació de contaminant que segueixi el mateix mecanisme.

# Annex I

## **Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor***

---

Aquest annex conté els resultats publicats:

**Revista:** Water research. 2004, Volum 38, pàgines 2166-2172

**Autors:** Paqui Blánquez, Núria Casas, Xavier Font, Xavier Gabarrell, Montserrat Sarrà, Glòria Caminal i Teresa Vicent.

# Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*

P. Blázquez<sup>a</sup>, N. Casas<sup>a</sup>, X. Font<sup>c</sup>, X. Gabarrell<sup>a</sup>, M. Sarrà<sup>a</sup>,  
G. Caminal<sup>b</sup>, T. Vicent<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament d'Enginyeria Química, i Unitat d'Enginyeria Bioquímica, del CeRBA, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C.C. Nord, Bellaterra 08193, Spain*

<sup>b</sup> *Unitat de Biocatàlisi aplicada Associada al IQAB (CSIC-UAB), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain*  
<sup>c</sup> *Escola Universitaria Politècnica del Medi Ambient, Mollet del Vallès, Spain*

Received 1 April 2003; received in revised form 15 December 2003; accepted 5 January 2004

## Abstract

The biodegradation of Grey Lanaset G, which consists of a mixture of metal complexed dye, was studied. Experiments were carried out in a bioreactor with retained pellets of the fungus *Trametes versicolor* that was operated under conditions of laccase production. Although decolorization was highly efficient (90%), no direct relationship to extracellular enzyme was apparent. Moreover, the extracellular enzyme was found to be unable to degrade the dye in vitro. The process involves several steps. Thus, the initial adsorption of the dye and its transfer into cells is followed by breaking of the metal complex bond in the cells release of the components. The metal (Cr and Co) contents of the biomass and treated solutions, and their closer relationship to intracellular enzyme and degradation of the dye, confirm the initial hypothesis.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Trametes versicolor*; Textile dye; Fluidized bioreactor; Intracellular and extracellular laccase; Decolorization steps

## 1. Introduction

The colour of textile effluents is due to the dyes. Dyes vary in chemical composition, but share a common feature: they are highly stable to external agents such as chemical compounds or light. This makes it difficult to remove colour from the wastewater and low concentrations of dye are visible [1]. Most synthetic industrial dyes possess an azo bond connected to various aromatic structures; some, however, are polymeric structures containing metals.

Conventional methods for the removal of colour from textile effluents are physical or chemical methods (coagulation–flocculation, adsorption,...) [2,3]. The coagulation–flocculation process has a major opera-

tional problem: the production of abundant sludge. On the other hand, adsorption is quite expensive as it usually involves the use of powdered activated carbon as adsorbent. The dye is transferred from the liquid to solid phase undegraded and removing it from the adsorbent is difficult, which hinders the reuse of powdered activated carbon. Recently, some authors used biomass as low cost adsorbents [4–6]. In the activated sludge process, decolorization is generally accomplished by adsorption of the dyes on bacteria rather by oxidation though aerobic metabolism.

The ability of white-rot fungi to degrade a wide range of synthetic chemicals including dyes is widely documented [7–17] and is a result of the non specificity of their extracellular ligninolytic enzyme system [7–13], which produces enzymes such as lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase. Although early studies focused on the fungus *Phanerochaete*, in recent years fungi such as *Trametes versicolor*,

\*Corresponding author. Tel.: +34-93581-2142; fax: +34-93581-2133.

E-mail address: teresa.vicent@uab.es (T. Vicent).



*Bjerkandera*, *Clitocybula dusenii* and *Pleurotus eryngii*, have been tested for the decolorization of wastewaters [7–12,14–17].

Most biological decolorization work involves azo or diazo dyes, or a combination thereof [8–10,12,14,15,18,19]. Azo dyes constitute the largest class of water-soluble synthetic dyes and exhibit the greatest variety of colours; also, most are resistant to conventional aerobic biodegradation processes. Some authors have examined various microorganisms (generally fungi) with a view to identifying most efficient ones for decolorizing dyes [8,12,15,16]. Other have shown the ability of new microorganisms to decolorize various dyes [7,20,21]. In some studies, the type of dye or its chemical composition was altered by changing the substituent on the phenol ring or between two azo bonds, and the mineralization or transformation of the dye was compared depending on the type of substituent used [14]; the chemical structure of both the phenol ring and that distal to the phenolic moiety were found to affect the mineralization kinetics of the dye.

Reported papers on this topic can be classified into two groups. In one, the authors provide no information about enzyme activity during the decolorization process [15,21] or the information is not related to the effect [14,17,19]. Some authors explain the process in terms of bioadsorption mainly [4,5,22,23]. The other group of papers show the occurrence of degradation or biotransformation in the dye and relate the decolorization with most of the ligninolytic enzymes produced [8,12,14,20]. In some cases, a purified enzyme (usually laccase or manganese peroxidase) was used and the rate of decolorization was also found to depend on the structure and substituents of the dye molecule [9,10,18].

However, the biodegradation of dyes containing a metal bond does not seem to have been studied to date. Grey Lanaset G (Ciba) is a mixture of metal complex dyes containing chromium and cobalt. In this paper, we evaluate dye degradation from the results of spectrophotometric colour analysis and metal atomic absorption analysis. A simple mechanism for the decolorization process is proposed and the optimisation of these stages would allow to design the dye biodegradation process.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Dye

Grey Lanaset G, which is a commercial mixture of several metal complex dyes, was complementarily supplied by Ciba (ref. 080173.5).

### 2.2. Strain

*Trametes versicolor* was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC # 42530). The fungus was maintained on 2% malt agar slants at 25°C until use. Subcultures were routinely prepared as required from the mother culture.

### 2.3. Media and culture conditions

A mycelial suspension of *Trametes versicolor* was obtained by inoculating four 1 cm<sup>2</sup> plugs from the growing zone of fungi on malt agar (2%) to a 500 ml Erlenmeyer flask containing 150 ml of malt extract medium (2%). Flasks were placed in an orbital shaker (135 rpm,  $r = 25$  mm) at 25°C. After 4–5 days, a thick mycelial mass was formed, that was ground with a X10/20 (Ystral GmbH) homogenizer. The resulting mycelial suspension was stored in sterilized saline solution (0.85% NaCl) at 4°C. This suspension was used to obtain pellets by inoculating 1 ml of the suspension in 250 ml malt extract medium (2%) (adjusted to pH 4.5) in a 11 Erlenmeyer flask. The flask was incubated in an orbital shaker (135 rpm,  $r = 25$  mm) at 25°C for 5–6 days. The pellets thus obtained can be stored in sterilized saline solution (0.85% NaCl) at 4°C where they will remain active for up to 2 months without losing their morphology.

### 2.4. Synthetic dye wastewater

The batch reactor medium contained per litre: 8 g glucose, 1.9 g NH<sub>4</sub>Cl, 11 ml of a supplemented medium [24], 100 ml of 2,2-dimethylsuccinate buffer (80 mM) and 0.15 g dye. The pH was adjusted to 4.5 with 0.5 M NaOH and the solution was sterilized at 120°C for 30 min. The culture medium was inoculated with an amount of pellets equivalent to 3.2 g/l dry weight. For continuous operation, the wastewater feed consisted only of dye (0.15 g/l), glucose (2 g/l) and supplemented medium (11 ml/l).

### 2.5. Equipment and operating conditions

A glass fluidized bioreactor with a useful volume of 1500 ml was furnished with a pH controller in order to maintain pH 4.5. Fluidized conditions in the reactor were maintained by using air pulses [25]. The aeration rate was 0.8 l/min. The temperature was maintained at 25°C. For the continuous process, a hydraulic residence time of 120 h was used and the biomass, in pellet form, was retained in the bioreactor throughout the experiment with no loss in the effluent.

## 2.6. *In vitro* dye biodegradation

The reactor broth was centrifuged at  $10\,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The supernatant was passed through filters of  $0.45\ \mu\text{m}$  pore size and the pH adjusted to 4.5. The laccase capacity to degrade the dye was evaluated in three different assays. In one, a sample of the filtered solution was used directly. In the second, the filtered solution was concentrated 3.7 times by ultrafiltration (Stainless Steel Minitan II). In the third, the ultrafiltered solution was diafiltered against 250 mM sodium malonate buffer (volume ratio  $\frac{1}{10}$ ). Finally, the biodegradation capacity was determined by adding a 150 mg/l concentration of dye to 100 ml of each solution obtained. The dye concentration and enzyme activity were measured after a 24 h period.

## 2.7. Analytical methods

**Colour determination:** Spectrophotometric measurements were carried out at the visible maximum absorbance, 590 nm on a PV 8620 Philips spectrophotometer.

**Glucose determination:** Glucose concentrations were measured with an YSI 2000 enzymatic analyser from Yellow Springs Instruments and Co.

**Laccase activity:** Enzymatic activity was determined using a modified version of the method of Paszczyński [26] for the determination of manganese peroxidase. The reaction mixture used consisted of 200  $\mu\text{l}$  of 250 mM sodium malonate at pH 4.5, 50  $\mu\text{l}$  of 20 mM 2,6-dimethoxyphenol (DMP) and 600  $\mu\text{l}$  of sample. DMP is oxidized by laccase even in the absence of a cofactor. Changes in the absorbance at 468 nm were monitored for 2 min on a Varian Cary 3 UV/Vis spectrophotometer at  $30^\circ\text{C}$ . One activity unit (AU) was defined as the number of micromoles of DMP oxidized per minute. The DMP extinction coefficient is  $10,000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ .

**Intracellular laccase activity:** The biomass used was filtered, washed with water and resuspended in 250 mM sodium malonate buffer at pH 4.5. Samples of 3 ml were taken and disrupted in a Constant Cell Disruption System (Constant Systems LTD) using one shot at 2.86 atm. Finally, the mixture was centrifuged at  $20\,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min. The laccase assay was conducted on the clear liquid.

**Metals (chromium and cobalt):** Metal concentrations were measured by flame atomic absorption spectroscopy on a Perkin-Elmer 2100 spectrophotometer, using a nitroacetylene flame for Cr and an air-acetylene one for Co.

## 3. Results and discussion

Two types of experiments were carried out. In one, the batch operation mode was used. In the other, after a

short period of batch operation and once the glucose concentration was about 2 g/l, the system was switched to continuous operation. The wastewater feed was pumped at a flow rate of  $0.301\ \text{day}^{-1}$ . The biomass was retained in the bioreactor while the treated solution was continuously withdrawn from it.

The variables analyzed in both types of experiments were the glucose concentration, dye concentration and laccase activity in the solution. The percent decolorization was calculated as the difference in colour between the inlet and outlet concentration divided by the inlet concentration in the continuous process; or that between the initial and final dye concentrations in the batch process.

Fig. 1 shows the results of a five days batch process, during which the glucose was depleted. Although the maximum laccase activity (1685 AU/l) was reached on day four, the decolorization occurred largely within the first 24 h when the extracellular laccase concentration in the broth was very low. The final colour reduction was 90%. No MnP activity was detected.

Fig. 2 shows the results obtained in a continuous process. After a 5-day batch stage, continuous operation was maintained for 40 days. The maximum enzyme activity was 2028 AU/l. It was reached after 21 days remained at high levels for a further 10 days, after, which extracellular enzyme activity decreased through the end of the run. By contrast, the percent decolorization achieved under continuous operation conditions remained virtually constant at 90%. Therefore, no direct relationship between extracellular enzyme activity and decolourization rate exists. However, low enzyme activity may be required to catalyze the initial colour reduction process.

In both processes, the most substantial colour reduction in the medium occurred within the first 24 h,

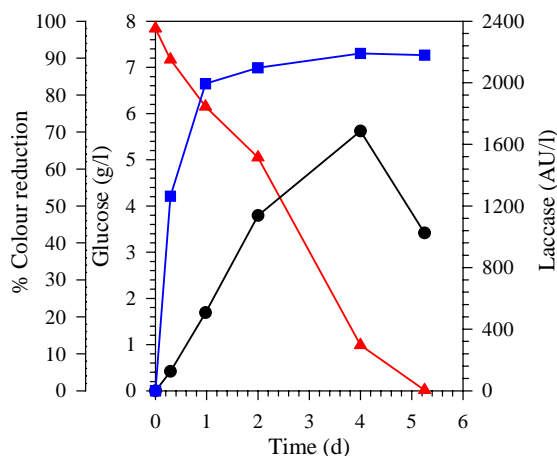


Fig. 1. Time course of glucose concentration (▲), laccase activity (●) and percentage of colour removal (■) during the batch process.

during which the pellets became completely dark. This was clearly the result of the dye being adsorbed on the biomass. The dye adsorption process had previously been studied [17]. The adsorption equilibrium of Grey Lanaset G on the pellets was reached within 24 h and conformed to a Langmuir isotherm. These tests were carried out on dead biomass where the dye changed phase from the solution to become adsorbed to the surface of the fungus. The dye was desorbed by less than 5%, so, its adsorption was virtually irreversible. On the other hand our microorganisms were alive and colour reduction of the biomass was observed after 24 h of treatment with no increase in colour of the liquid phase.

Pellets became quite discoloured during the continuous process, even when the dye was continuously fed to the reactor, pellets did not darken as in the firsts few

hours of treatment, rather they remained quite discoloured. This can be ascribed to the reactor being the continuous flow type and fully homogenized, so the dye concentration in the effluent was the same as inside the reactor and hence very low. Fig. 3 shows the significant difference between the colour of the solution and those of the pellets obtained after being in contact for 1 h and for 42 days. Both the solution and the biomass were darker after 1 h than after 42 days of treatment, which reflects that the dye disappeared from both phases during the process.

Grey Lanaset G is a commercial mixture of several metal complex dyes. The chemical formula is unavailable, because it is a patented dye; based on its specifications, however, the dye is known to contain cobalt (0.79%) as an organo-metal complex and

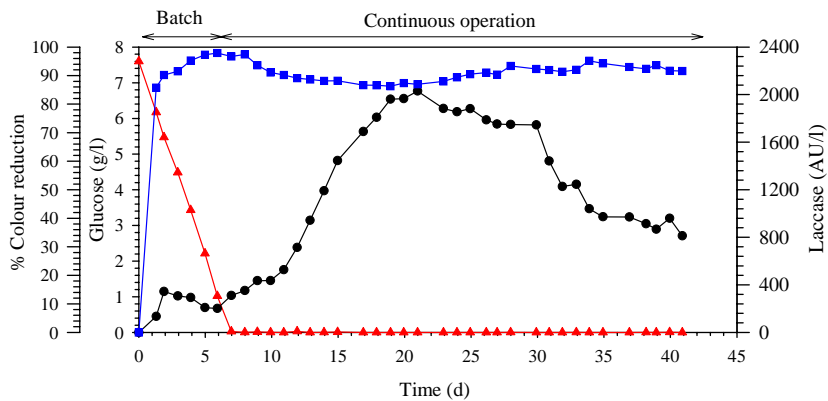


Fig. 2. Glucose concentration (▲), laccase activity (●) and percentage of colour removal (■) during the continuous biodegradation of the dye Grey Lanaset G by *Trametes versicolor*.

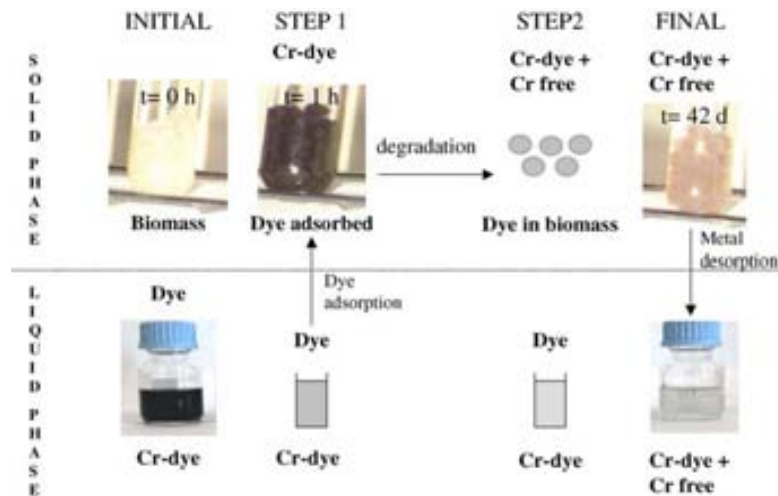


Fig. 3. Scheme of the proposed mechanism for the dye biodegradation and how the chromium is, (Cr-dye means chrome bound to colorant whereas Cr-free means chrome non bound). Pictures show the initial, 1 h and 42 days biomass (on the top); and initial and final wastewater (on the bottom).

chromium (2.5%) as a Cr III organo-metal complex. The contents in both metals were determined to facilitate a better understanding of the decolorization mechanism.

The hypothesis behind the dye degradation mechanism relies on experimental findings. Fig. 3 shows the scheme of the proposed mechanism. The dye is first adsorbed by the microorganism (step 1) and then biodegraded within it (step 2), and being finally the metals are released into the medium, where they are separated on the basis of the chromophoric group or discoloured through their alteration.

The initial and final metal concentrations in the solution and biomass were determined in the batch processes; in the continuous process, analyses were performed in the feed flow effluent, the average in the flow out and the biomass at the end of the process. Similar results were obtained for both Cr and Co (see Table 1). From these results, the percent contents of the different forms of the metals were calculated. Table 2 shows the metals contents in each phase as percentages of the total metal contents in the outlet. At the end of the process, metals can be either bound to the dye molecule in the culture medium (Cr-dye in Fig. 3), free in the medium (Cr-free in Fig. 3) or in the biomass. The last form cannot be determined if the metals in the biomass are free or dye-bound as they change over time. Free Cr was determined as the difference between as total Cr measured and calculated dye-bound Cr in the liquid phase. The two metals exhibited nearly identical proportions in the batch process. In the continuous processes they exhibited a slight difference that might be due to an analytical error or to the different adsorption

rates of the metals. Only Cr is considered in the discussion of the results because it presents a higher concentration than Co in the dye, even though the arguments applies to both metals.

A general balance of Cr between the inlet and the outlet values reveals a loss of about 10%. This is acceptable because the metal concentrations were very low. In both the batch and continuous process, between 7.5% and 8% of Cr in the effluent was bound to the dye molecule. In the batch process, 37% of metal at the end of the process was free in the medium, as was 54% in the continuous process. These differences are related to the metal bond to the biomass. In the batch process, 55% of metal was in the biomass, while only 37% was in the continuous process. This difference can be ascribed to the batch process being allowed to develop for only five days, during which the desorption equilibrium of the metals probably could not be reached.

Based on the proposed mechanism, the degradation of the dye may be related to intracellular enzyme activity, the variation of which may be consistent with the degree of decolorization obtained. These hypothesis was tested in a new batch experiment where we examined intracellular enzyme activity. Fig. 4 shows the results obtained in the second batch process. Decolorization amounted to about 98%. The figure shows the intra and extracellular activity profiles, as well as colour development in the liquid medium. Intracellular activity units were determined per gram of biomass, and extracellular ones per millilitre of solution, in the figure, however activities are expressed in total AU to facilitate the discussion.

Table 1

Concentration of chromium, cobalt and dye in each phase for the experiments corresponding to Fig. 1 (batch process) and Fig. 2 (continuous process)

	Batch process			Continuous process		
	Liquid phase (mg/l)		Solid phase (mg/g DCW)	Liquid phase (mg/l)		Solid phase (mg/g DCW)
	Initial	Final	Final	In	Out <sup>a</sup>	Final
Chromium	3.0	1.3	0.432	3.0	1.96	1.376
Cobalt	0.98	0.4	0.134	0.98	0.80	0.303
Dye	150.0	10.7	nd	150.0	12.68	nd

<sup>a</sup> Means average value and nd means not determined. DCW: dry cell weight.

Table 2

Metal content in each phase of the system at the end of the biodegradation processes

	Continuous process		Batch process		
	Cr	Co	Cr	Co	
Solid phase (biomass) (%)	37.2	24.3	55.0	55.1	
Liquid phase	Dye bounded (%)	8.1	7.5	7.4	7.5
	Free (%)	54.7	68.1	37.7	37.2

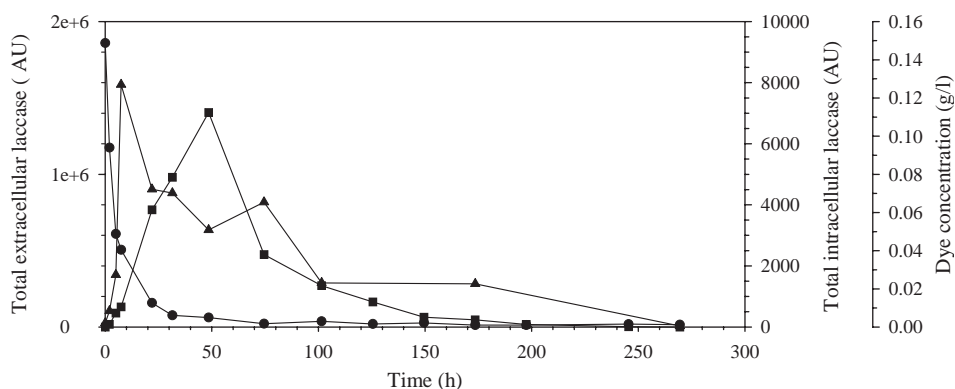


Fig. 4. Evolution over time of the total extracellular laccase (■), dye concentration (●) and total intracellular laccase (▲) for a batch process.

A large amount of biomass was required in each sample to be able to determine intracellular enzyme, so the Cr balance could not be established in this test. However, a percent decolorization of 90.6% after 22 h of treatment was determined, and 23% of the Cr was found not to be bound and hence at least a similar proportion of dye was degraded by the fungus. As it can be seen in Fig. 4, intracellular laccase activity peaked at 7936 AU at 32 h. However, the highest extracellular activity was detected at 48 h, time by which no dye remained in the medium.

In order to ascertain whether the extracellular enzyme laccase was responsible for the decolorization, a new experiment was carried out. After 48 h of batch conditions (when the extracellular enzyme activity was 692 AU/l), the *in vitro* enzyme capacity to degrade the dye was tested as described under Materials and methods. This experiment showed that, although the enzyme retained its activity after 24 h no decolorization was observed in any of the three fractions [culture broth (692 AU/l), broth by ultrafiltration concentrated (2560 AU/l) and dialysed concentrated broth (2092 AU/l)]. Although laccase (intra or extracellular) was invariably detected whenever some decolorization was observed, the results of this experiment clearly show that the presence of laccase, without the microorganism, does not suffice to degrade Gris Lanaset G, which contradicts results obtained by several authors [9,18].

#### 4. Conclusions

The mixture of metals containing dyes Grey Lanaset G was successfully biodegraded in a bioreactor filled with pellets of the fungus *Trametes versicolor*. The reactor was operated in the batch and continuous modes. In the latter case, the process proceed for more than 40 days with an acceptable decolorization efficiency

and no operational problems. Measurements of the extracellular enzyme activity ruled out a direct relationship with dye degradation. In addition, no decolorization was detected *in vitro*, when the biomass was withdrawn from the broth. Even when concentrated and dialyzed, the enzyme was unable to degrade the dye. Moreover, visual observations of the liquid and solid phases revealed that the colour had almost disappeared from both phases by the end of the process. Therefore, the microorganism is capable of degrading the dye. On the other hand, the presence of a high proportion of chromium and cobalt released from the dye is consistent with the breakage of the metal complex. All these results reveals that the degradation occurs in several steps including the initial adsorption of the dye onto the biomass, followed by its transfer into cells. Degradation occurs within cells and the resulting products are finally released. In the absence of the microorganism, not even a high concentration of extracellular enzyme is capable of degrading Grey Lanaset G.

#### Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Commission of Science and Technology (Project PPQ2000-0645-C02-01) and the AGBAR Foundation (Spain).

#### References

- [1] Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol* 2001;77:247–55.
- [2] Lin SH, Peng FC. Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. *Water Res* 1996;30:587–92.

- [3] Lambert SD, Graham NJD, Sollar CJ, Fowle GD. Evaluation of inorganic adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides. *Water Sci Technol* 1997;36:173–80.
- [4] Bustard M, McMullan G, McHale AP. Biosorption of textile dyes by biomass derived from *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Bioprocess Eng* 1998;19:427–30.
- [5] Dönmez G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme Microb Technol* 2002;30:363–6.
- [6] Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Marchant R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresour Technol* 2000;72:219–26.
- [7] Wesenberg D, Buchon F, Agathos SN. Degradation of dye-containing textile effluent by agaric white-rot fungus *Clitocybula duseinii*. *Biotechnol Lett* 2002;24:989–93.
- [8] Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. Evaluation of different fungi strains in the decolorisation of synthetic dyes. *Biotechnol Lett* 2000;22:1499–503.
- [9] Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, Zvauya R, Read J, Steiner W. Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res* 2002;36:1449–65.
- [10] Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M, Szewzyk U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl Environ Microb* 1998;64(8):2788–93.
- [11] Schliephake K, Lonergan G. Laccase variation during dye decolorisation in a 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnol Lett* 1996;18(8):881–6.
- [12] Robinson T, Chandran B, Nigam P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorisation of textile dyes. *Enzyme Microb Technol* 2001;29:575–9.
- [13] Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Res* 2002;36:1896–901.
- [14] Chagas EP, Durrant LR. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb Technol* 2001;29:473–7.
- [15] Swamy J, Ramsay JA. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb Technol* 1999;24:130–7.
- [16] Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G, de Bont JAM. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Tibtech* 1993;11:44–9.
- [17] Aretxaga A, Romero S, Sarrà M, Vicent T. Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. *Biotechnol Prog* 2001;17:664–8.
- [18] Soares GMB, Pesssoa Amorim MT, Oliveira-Campos AM, Hrdina R, Costa Ferreira M. Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase. *Enzyme Microb Technol* 2002;30:607–12.
- [19] Jarosz-Wiikolazka A, Kochman'ska-Redst J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dyes. *Enzyme Microb Technol* 2002;30:566–72.
- [20] Hatvani N, Mécs I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme Microb Technol* 2002;30:381–6.
- [21] Sani RK, Banerjee UCH. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme Microb Technol* 1999;24:433–7.
- [22] Kapdan IK, Kargi F, McMullan G, Marchant R. Biological decoloration of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in a packed bed column reactor. *Environ Technol* 2000;22:231–6.
- [23] Kapdan IK, Kargi F. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme Microb Technol* 2002;30:195–9.
- [24] Kirk TK, Schultz E, Connors WJ, Lorenz LF, Zeikus JG. Influence of culture parameters on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* 1978;117:227–85.
- [25] Sanromán A, Chamy R, Núñez MJ, Lema JM. Enzymatic hydrolysis of starch in a fixed-bed pulsed-flow reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 1991;28–29:527–38.
- [26] Paszczynski A, Crawford RL, Huynh VB. Manganese peroxidase of *Phanerochaete Chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol* 1988;161:264–70.