



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 183 730**

② Número de solicitud: 200101670

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C02F 3/34

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **17.07.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2003**

Fecha de concesión: **20.10.2003**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.2003**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.11.2003**

⑦ Titular/es: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA  
USC - Edificio CACTUS - CITT  
Campus Universitario Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Feijoo Costa, Gumersindo;  
Lema Rodicio, Juan Manuel;  
Moreira Vilar, María Teresa;  
López Díaz, Carmen y  
Mielgo Iza, Iñaki**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos presentes en efluentes industriales mediante reactores enzimáticos y su aplicación en la decoloración de tintes industriales.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos presentes en efluentes industriales mediante reactores enzimáticos y su aplicación en la decoloración de tintes industriales empleando manganeso peroxidasa libre o inmovilizada en reactores enzimáticos operados en discontinuo, semicontinuo y continuo. El procedimiento se basa en una estrategia de operación que permita un control sobre la velocidad de adición del ión  $Mn^{+2}$ , peróxido de hidrógeno y de agentes quelantes tales como ácido acético y ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena abierta.

ES 2 183 730 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista en el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCION

Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos presentes en efluentes industriales mediante reactores enzimáticos y su aplicación en la decoloración de tintes industriales.

En diversos procesos de la industria textil, cosmética, papelería, alimentaria o farmacéutica se utilizan numerosos colorantes orgánicos sintéticos. Basándose en la estructura química de los grupos cromóforos, los tintes se clasifican en tres grupos fundamentales (Figura 1): a) tipo azo, el grupo más extendido (por ejemplo, Rojo Congo, Orange II); b) tipo antraquinona y antrapiridona (Poly R-478 y Poly B-411, respectivamente); y, c) tipo talocianina (por ejemplo, Reactive Blue 38) (Zollinger, H. 1987. *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. VCH Publishers, Weinheim).

La eliminación del color de los efluentes generados en estos procesos es un problema medioambiental de especial importancia. Aunque podrían aplicarse tratamientos físico-químicos, tales como la coagulación-sedimentación, adsorción, oxidación con ozono o cloro, intercambio iónico sobre resinas sintéticas, osmosis inversa etc., para la eliminación del color, todos estos procesos presentan como desventajas los elevados costes de operación y limitada aplicabilidad (Dubrow, S.F. *et al.*, 1996. En: *Environmental Chemistry of Dyes and Pigments*. John Wiley & Sons, New York, pp. 75-94). Los procesos convencionales de tratamiento biológico (aerobioanaerobio), si bien han sido aplicados con éxito en el tratamiento y detoxificación de numerosos efluentes industriales, son relativamente ineficaces en la decoloración de los mismos (Banat, I.M. *et al.* 1996. *Bioresource Technol.* 58:217-227; Delée, W. *et al.* 1998. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73:323-335).

Una alternativa biotecnológica factible en el tratamiento de estos efluentes reside en la utilización de los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca, los cuales se caracterizan por sintetizar un complejo enzimático extracelular (fundamentalmente peroxidadas y oxidadas) capaz de oxidar un polímero tan complejo e irregular como la lignina. Esta característica ha permitido su aplicación con éxito en procesos tales como la degradación de compuestos orgánicos xenobióticos de alto peso molecular como son los polifenoles y poliaromáticos (Field, J.A. *et al.*, 1993. *Trends Biotechnol.* 11:44-49), decoloración de efluentes industriales (Banat, I.M. *et al.*, 1996. *Bioresource Technol.* 58:217-227) y bioblanqueo de pasta de papel (Moreira, M.T. *et al.*, 1997. *J. Biotechnol.* 53:237-251). Asimismo, se han publicado diversas patentes en las que se describe la posible utilidad de los hongos de podredumbre blanca en el tratamiento de tintes tipo azo (Paszczynski, A. *et al.*, 1997. US005618726A), así como de sus peroxidadas extracelulares (Barfoed, M y Kirk, O. 1996. US6036729; Rochefort, D. *et al.*, 1999. WO9954545).

Entre las diferentes enzimas que constituyen el complejo enzimático extracelular oxidativo de los hongos de podredumbre blanca, la manga-

neso peroxidasa (MnP) tiene un papel relevante en los procesos antes mencionados. La principal función de la MnP es la oxidación del  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , para lo cual necesita la presencia del  $H_2O_2$  como oxidante (Kuan, I.C. *et al.*, 1993. *J. Biol. Chem.* 268:20064-20070). El ión  $Mn^{+3}$ , estabilizado en presencia de ácidos dicarboxílicos, posee un alto potencial redox que permite la oxidación de una gran variedad de compuestos xenobióticos de estructura compleja (Field, J.A. *et al.*, 1993. *Trends Biotechnol.* 11:44-49). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito una metodología para la degradación de compuestos por MnP libre y/o inmovilizado en reactores, dada la dificultad en el establecimiento de una estrategia de operación adecuada que defina con precisión la velocidad de adición de los cofactores o cosustratos necesarios en su ciclo catalítico. Especial atención merece el control de la dosificación de peróxido de hidrógeno, el cual en concentraciones excesivas elevadas produce una fuerte desactivación de la MnP.

La presente invención se refiere a un procedimiento que permite la decoloración y degradación de compuestos xenobióticos por MnP en sistemas con enzimas libres o inmovilizadas operados en reactores enzimáticos discontinuos, semicontinuos y continuos. Además de reactores agitados discontinuos, la técnica podría implementarse en reactores acoplados a unidades de membrana (ultrafiltración, nanofiltración y microfiltración) que permitirían la recirculación de la enzima. En la Figura 2 se esquematiza la configuración de este tipo de reactores, en la que se señalan los diferentes compuestos que deben ser alimentados al reactor para el buen funcionamiento del sistema. Asimismo, este procedimiento se puede aplicar en reactores de lecho fijo, fluidizado y airlift con enzimas inmovilizadas en diferentes soportes. En la Figura 3 se representa el diagrama de flujo para reactores con enzima inmovilizada.

El procedimiento a seguir consiste en diversas etapas que a continuación se establecen:

Se plantea la utilización de MnP libre o inmovilizada en reactores con y sin agitación. La velocidad de adición o carga de enzima en el reactor debe ser tal que permita mantener una concentración enzimática comprendida entre 50 y 500 U  $L^{-1}$ . La temperatura y pH en el reactor deben controlarse en valores comprendidos en un rango de 10 - 50°C y de 4 - 8, respectivamente. Con el objetivo de estabilizar y optimizar la acción catalítica de MnP, es necesario añadir agentes quelantes tales como ácido acético ó ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena abierta (por ejemplo, ácido oxálico y glicólico) hasta alcanzar en el reactor concentraciones comprendidas entre 0,05 y 10 mM. La carga del compuesto orgánico a degradar al reactor ha de ser tal que se establezca una concentración máxima en el mismo de 1 g  $L^{-1}$ .

Otra característica del procedimiento se basa en la adecuación de las velocidades de adición de los sustratos implicados en el ciclo catalítico de la  $MnP:H_2O_2$  y  $Mn^{+2}$ . Debido al efecto que ejerce una elevada concentración de  $H_2O_2$  sobre la desactivación de la enzima, su velocidad de adición debe mantenerse entre 5 y 100  $\mu moles L^{-1} min^{-1}$ . El ión  $Mn^{+2}$  debe mantenerse en un rango de 0,2

y 2  $\mu\text{moles L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

#### Ejemplo 1

*Decoloración del tinte tipo talocianina (Reactive Blue 38) mediante manganeso peroxidasa en reactores de tanque agitado operados en discontinuo*

Se aplicó el procedimiento descrito anteriormente para la decoloración de Reactive Blue 38 mediante manganeso peroxidasa (MnP) en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 200 mL. La carga de tinte y de enzima inicial fue de 0,1 g  $\text{L}^{-1}$  y de 200 U  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Como agente quelante se adicionó 1 mM de acetato sódico a pH 4,5. La concentración de  $\text{Mn}^{+2}$  correspondió a 33  $\mu\text{M}$  y la velocidad de adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se estableció en 65  $\mu\text{moles L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

En la Figura 4 se muestra el porcentaje de decoloración ( $\bullet$ ) del tinte Reactive Blue 38 y la evolución de la actividad enzimática ( $\Delta$ ) a lo largo de una hora de incubación. El grado de decoloración se estableció mediante la medida de la absorbancia en el efluente a 610 nm. Los resultados obtenidos muestran que tras 20 minutos de operación se alcanza un porcentaje de decoloración superior al 80 %, siendo el valor máximo del 90 % para un tiempo de residencia de una hora.

#### Ejemplo 2

*Decoloración del tinte Orange II (tipo azo) mediante manganeso peroxidasa en un reactor enzimático de tanque agitado operado en continuo*

En este segundo ejemplo se aplicó el procedimiento a la decoloración de Orange II (tinte tipo azo) con MnP libre en un reactor de tan-

que agitado con volumen útil de 250 mL acoplado a un sistema de ultrafiltración (Prep./Scale<sup>TM</sup>-TFF Millipore) con membrana de tamaño de poro de 10 kDa con el objetivo de retener la enzima y recircularla al reactor (Figura 2). Las velocidades de adición ( $\mu\text{moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) de cada compuesto/sustrato fueron las siguientes: Orange II, 17.850; Acido acético, 625;  $\text{Mn}^{+2}$ , 33 y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 55. La velocidad de alimentación de MnP se mantuvo en 25 U  $\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Las condiciones de operación fueron: temperatura, 20°C; pH, 4,5; tiempo de residencia, 1 h; razón de recirculación (Recirculación/Caudal de alimentación), 1:5.

La degradación de Orange II se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (Hewlett Packard ChemStation Chromatograph, España) acoplado a un detector de diodos HP1090M Series II, con una columna Spherisorb ODS2 (200 por 4,6-mm; relleno de 5  $\mu\text{m}$ ) (Phase Separations Ltd. Deeside, UK), monitorizando la absorbancia a 480 y 210 nm. Se utilizó como eluyente una mezcla acetonitrilo-agua (90 %-10 %) a una velocidad de flujo de 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$  y 35°C.

En la Figura 5 se representa la concentración de Orange II a la entrada ( $\circ$ ) y salida ( $\bullet$ ) del reactor, así como la actividad enzimática ( $\Delta$ ) en el mismo. Los resultados obtenidos indican la elevada eficacia en la degradación de Orange II, entre el 90 y 95 %. Estos valores corresponden a la obtención de un efluente transparente frente a un influente naranja fuerte.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos presentes en efluentes industriales mediante reactores enzimáticos y su aplicación en la decoloración de tintes industriales, **caracterizado** por la utilización de manganeso peroxidasa, peróxido de hidrógeno, agentes quelantes, manganeso<sup>+2</sup>, en reactores operados en discontinuo, semicontinuo y continuo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por una velocidad de adición de la enzima manganeso peroxidasa tal que la concentración en el reactor se encuentra comprendida en un rango de 50 a 500 U L<sup>-1</sup>.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 y 2, **caracterizado** por la aplicación de la enzima libre o inmovilizada; la enzima libre en un reactor de membrana con recirculación; y la aplicación de la enzima inmovilizada en un reactor de lecho fijo, lecho fluidizado y airlift.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición continua o semicontinua de peróxido de hidrógeno al reactor con velocidades comprendidas entre 5 y 100  $\mu\text{moles L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

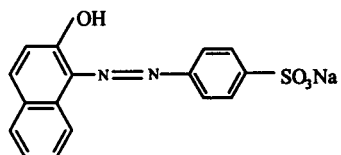
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición al reactor de agentes quelantes, tales como ácido acético y ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena abierta, y una velocidad de adición del quelante tal que la concentración en el reactor esté comprendida entre 0,05 y 10 mM.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por la aplicación de una velocidad de adición de Mn<sup>+2</sup> en un rango de 0,2 a 2  $\mu\text{moles L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

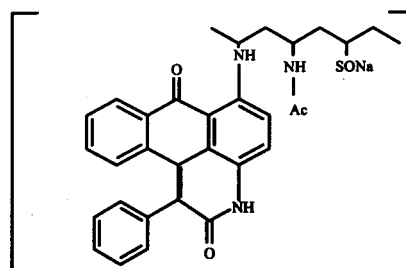
7. Procedimiento según todas las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la operación del sistema degradativo a temperaturas entre 10 y 50°C y a un pH de operación entre un rango de valores de 4 y 8.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

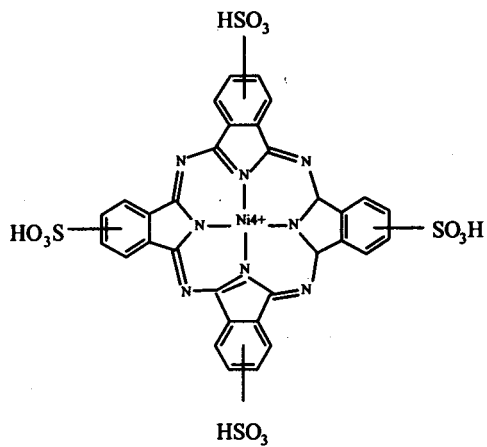
Tipo azo: Orange II



Tipo antraquinona: Poly R-478



Tipo talocianina: Reactive Blue 38



**Figura 1**

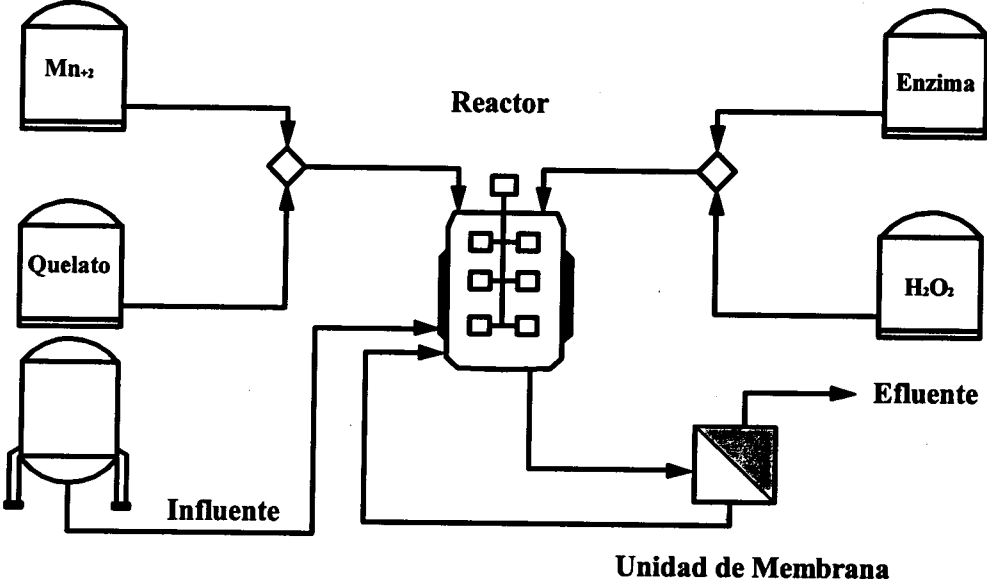
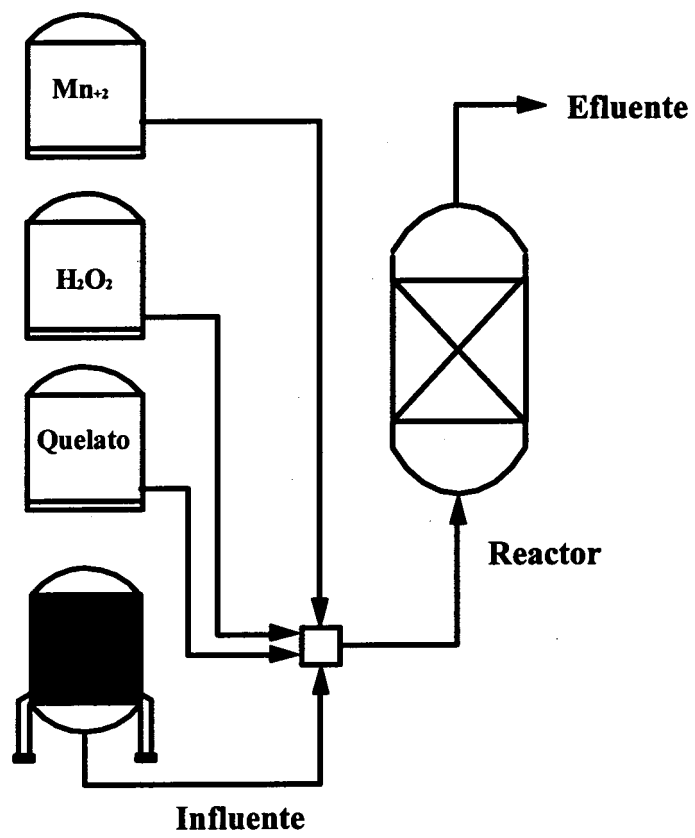
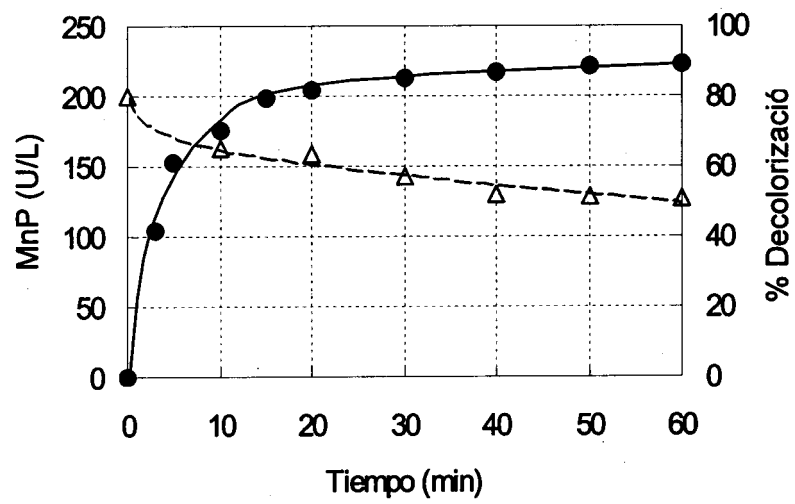


Figura 2

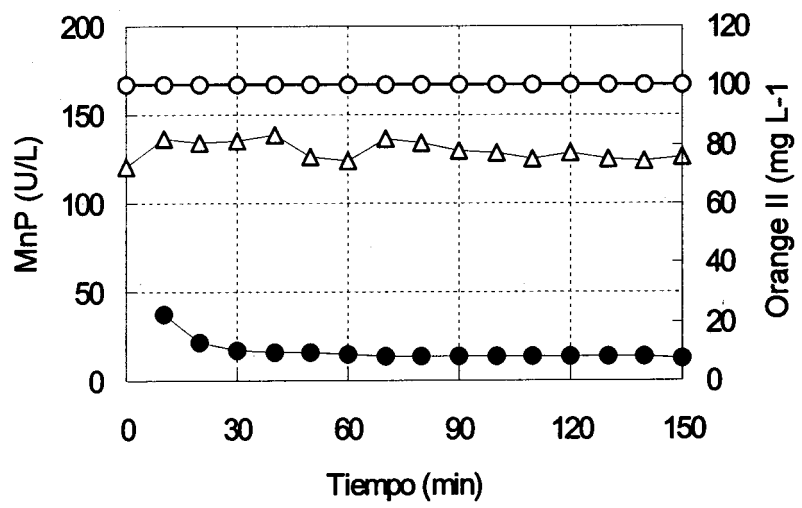


**Figura 3**



**Figura 4**





**Figura 5**



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C02F 3/34

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BANAT et al. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review, Bioresource Technology, Vol. 58, (1996), páginas 217-227. Resumen, página 219.	1-7
A	US 5691193 A (PAICE) 25.11.1997, ejemplos 1,3,4; reivindicación 1.	1-7
A	MOREIRA et al. Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains, J. of Biotech., 53, (1997), 237-251.	1-7
A	FIELD et al. Screening for lignolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics, Tibtech., (1993), Vol. 11, páginas 44-49.	1-7

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

12.12.2002

**Examinador**

M. Ojanguren Fernández

**Página**

1/1