



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 373 729**

21 Número de solicitud: 201031162

51 Int. Cl.:  
**C02F 3/34** (2006.01)  
**C12N 9/08** (2006.01)  
**C12S 3/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **27.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**08.02.2012**

71 Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edificio EMPRENDIA-Campus Sur**  
**15782 Santiado de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Lema Rodicio, Juan Manuel;**  
**Moreira Vilar, María Teresa;**  
**Feijoo Costa, Gumersindo;**  
**Taboada Puig, Roberto;**  
**Eibes González, Gemma y**  
**Lú-Chau, Thelmo**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales mediante un sistema en dos etapas.**

57 Resumen:

Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales mediante un sistema en dos etapas. La primera etapa (etapa I) caracterizada por la utilización de la enzima manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP), agentes quelantes, manganeso (II) y peróxido de hidrógeno en reactores agitados para la generación de especies oxidativas de manganeso (III). La salida del reactor enzimático (etapa I) se separa en dos corrientes utilizando una membrana de ultrafiltración. Una corriente contiene la/s enzima/s (MnP o VP y/o GOD) que es retornada al reactor enzimático (etapa I) mientras que la segunda corriente, que contiene las especies oxidativas de manganeso (III) se introduce en el reactor de degradación (etapa II) en donde se lleva a cabo la degradación de compuestos recalcitrantes, en reactores agitados. El manganeso es recuperado por un equipo de ósmosis inversa que lo retorna al reactor enzimático (etapa I).

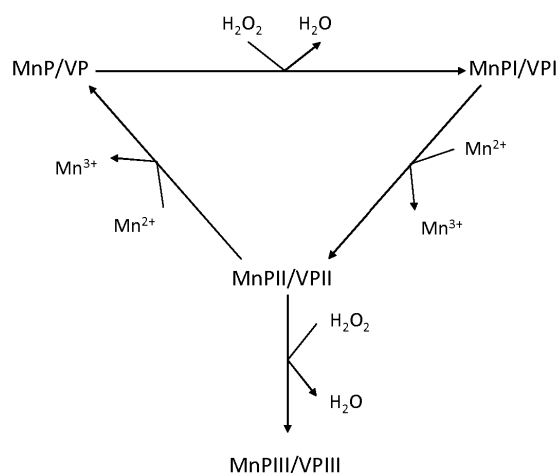


Figura 1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales mediante un sistema en dos etapas.

## Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales mediante un sistema en dos etapas. En un reactor enzimático (etapa I) se generan especies oxidativas de  $Mn^{3+}$ -quelato, como producto del ciclo catalítico de la enzima MnP o VP, que tras ser separadas de la enzima utilizando un sistema de ultrafiltración, son utilizadas, en un reactor de degradación (etapa II), como agentes oxidantes de compuestos orgánicos recalcitrantes, tales como tintes industriales, compuestos farmacéuticos y de cuidado personal, disruptores endocrinos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.

## Estado de la técnica

Los hongos de podredumbre blanca son microorganismos capaces de degradar la lignina. Esta capacidad viene asociada a la producción y secreción de un complejo enzimático extracelular. La capacidad de oxidar un polímero tan complejo como la lignina ha planteado la posible utilización de estos microorganismos para su aplicación en procesos de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes de alto peso molecular como son los polifenoles y poliaromáticos (Field J.A. *et al.*, 1992; *Appl Environ Microb* **58**:2219-2226), decoloración de efluentes industriales (Banat I.M. *et al.*, 1996; *Bioresource Technology* **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 peroxidasas extracelulares (Barfoed M. y Kirk O., 1996. US6036729; Rochefort D. *et al.*, 1999. WO9954545; Feijoo G., *et al.*, 2004. EP1457463A1). Entre las enzimas extracelulares producidas se encuentran fundamentalmente dos familias: oxidasas como la Lacasa (Lac) y peroxidasas como la Manganese Peroxidasa (MnP), Lignina Peroxidasa (LiP) y Peroxidasa Versátil (VP). La VP es capaz de oxidar  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  y compuestos aromáticos no fenólicos.

El ciclo catalítico de las enzimas MnP y VP se inicia con la oxidación, mediante  $H_2O_2$ , de la enzima en su estado original para formar la especie oxidada MnPI/VPI, que es dos estados de oxidación superior a la forma nativa. Este compuesto es reducido por un ión de  $Mn^{2+}$ , que se oxida a  $Mn^{3+}$ , pasando a la forma MnPII/VPII, un estado de oxidación superior a la forma nativa de la enzima. Finalmente esta forma oxidada otro ión de  $Mn^{2+}$ , para formar  $Mn^{3+}$ , y vuelve a su forma nativa MnP/VP. Un exceso de concentración de  $H_2O_2$  puede conducir a la formación de la especie inactiva de la enzima MnPIII/VPIII. Este ciclo catalítico se muestra en la figura 1.

La oxidación de  $Mn^{2+}$  genera  $Mn^{3+}$  que es una especie oxidativa fuerte (1,54 V) y actúa como mediador en la degradación de compuestos orgánicos (Cui and Dolphin 1990; *Holzforschung* **44**:279-283). Esto supone que el compuesto diana no es oxidado directamente por la enzima sino que es oxidado por el ión  $Mn^{3+}$ . Esta especie es inestable por lo que es necesaria la presencia de agentes quelantes (por ejemplo ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena abierta tales como ácido malónico, oxálico, glicólico, etc ...) que formen complejos con el  $Mn^{3+}$ , capaces de oxidar moléculas orgánicas (Martínez A.T., 2002; *Enzyme Microb Tech* **30**:425:4441 Kishi K. *et al.*, 1994; *Biochemistry* **33**:8694-87011 Kuan I.C. *et al.*, 1993; *P Natl Acad Sci USA* **90**:1242-1246).

Las especies  $Mn^{3+}$ -quelato tienen muchas ventajas como agentes oxidantes comparadas con las enzimas, ya que al no ser proteínas, son más tolerantes a condiciones extremas como altas temperaturas, pH, agentes oxidantes, detergentes y proteasas. Además, debido a su pequeño tamaño molecular, pueden atravesar micro-barreras inaccesibles para las proteínas.

Uno de los mayores inconvenientes que tiene la utilización de enzimas para la biodegradación de compuestos recalcitrantes recae en el elevado consumo de enzima y su tendencia a la inactivación a lo largo del proceso. Un sistema más eficiente debería, por tanto, enfocarse en la reducción del consumo de enzima y en el aumento de su estabilidad. Este objetivo se puede conseguir a través de la separación del proceso en dos etapas; en una primera etapa, se activa el ciclo catalítico de la enzima MnP o VP para generar el complejo  $Mn^{3+}$ -quelato y, en la segunda, se utiliza el complejo en la degradación de un compuesto recalcitrante. De este modo, la enzima se encuentra en las mejores condiciones posibles ya que siempre permanece en contacto con los cofactores de su ciclo catalítico a condiciones de pH y temperatura moderadas y en ausencia de los compuestos orgánicos recalcitrantes. Otros autores han propuesto la utilización de la enzima manganoso peroxidasa en dos etapas (Grabski *et al.*, 1998; *Biotechnol Bioeng* **60**:2014-2151 Sasaki *et al.*, 2001; *Appl Environ Microb* **67**:2208-2212). Ambos propusieron un sistema en donde la enzima manganoso peroxidasa es inmovilizada sobre un soporte e introducida en una columna, de tal modo que la enzima es retenida en el interior de la columna mientras que el  $Mn^{3+}$ -quelato es separado y utilizado en una segunda etapa para la degradación de clorofenoles o el bioblanqueo de la pasta de papel, respectivamente. Los procesos de inmovilización de enzimas, como los utilizados por Grabski y Sasaki, presentan muchos inconvenientes, tales como baja retención de la actividad enzimática, baja reproducibilidad, baja resistencia mecánica, etc. (Schoevaart R. *et al.*, 2004; *Biotechnol Bioeng* **87**:754-762), además de que la utilización de soportes para inmovilizar las enzimas encarecen mucho el proceso ya que normalmente están hechos de materiales muy caros.

Por otra parte, el manganeso presenta un límite ambiental de 0,05 mg L<sup>-1</sup>, por lo que su vertido en las aguas ha de ser controlado; los trabajos presentados por Grabski y Sasaki no describen ningún sistema de recuperación de manganeso.

5

### Descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales mediante un sistema en dos etapas.

10

La primera etapa (etapa I) se caracteriza por la utilización de la enzima manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP), agentes quelantes, manganeso (II) y peróxido de hidrógeno en reactores agitados (reactor enzimático) operados en continuo, semicontinuo o discontinuo para la generación de especies oxidativas de manganeso (III).

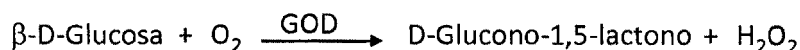
15

La adición de peróxido de hidrógeno puede ser directamente u, opcionalmente, generada *in situ* por la enzima glucosa oxidasa (GOD) utilizando glucosa como sustrato, tal y como se indica en la ecuación 1.

Ecuación 1

20

*Reacción de la enzima glucosa oxidasa con la glucosa*



25

La salida del reactor enzimático se separa en dos corrientes utilizando una membrana de ultrafiltración. Una corriente contiene la/s enzima/s (MnP o VP y/o GOD) que es retornada al reactor enzimático (etapa I) mientras que la segunda corriente, que contiene las especies oxidativas de manganeso (III) se introduce en el reactor de degradación (etapa II).

30

La segunda etapa (etapa II) se caracteriza por llevar a cabo la degradación del compuesto recalcitrante, en reactores en continuo, semicontinuo o discontinuo, utilizando las especies oxidativas de manganeso (III) generadas en el reactor enzimático (etapa I), y por la utilización de un equipo de ósmosis inversa para la recuperación de manganeso que es retornado al inicio del proceso.

35

El uso de la membrana de ultrafiltración permite el uso de las enzimas MnP, VP y GOD en forma libre en el reactor enzimático (etapa I), es decir, no es necesaria su inmovilización. Esto supone una reducción elevada de los costes de operación tanto por la pérdida de actividad enzimática asociada al proceso de inmovilización, como por el alto coste de los soportes utilizados para la inmovilización.

40

El uso de un equipo de ósmosis inversa permite la casi total recuperación del manganeso utilizado, reduciéndose su consumo y evitando su vertido al ambiente. De este modo se reducen costes de operación asociados al consumo de manganeso (II) asegurando que los vertidos de este metal al ambiente están siempre por debajo del límite ambiental.

45

En la presente invención se plantea la utilización de la enzima MnP o VP en el reactor enzimático (etapa I) en forma libre, en reactores con agitación. La velocidad de adición de la enzima manganeso peroxidasa o peroxidasa versátil debe ser tal que permita mantener la actividad enzimática en el reactor enzimático (etapa I) comprendida entre 25 y 500 U L<sup>-1</sup> y, opcionalmente, cuando el peróxido es generado *in situ* por la enzima glucosa oxidasa, se debe mantener una velocidad de adición de GOD tal que la relación entre MnP o VP y GOD sea 1,43 (mg<sub>MnP</sub> o VP/mg<sub>GOD</sub>). La adición de peróxido de hidrógeno en el reactor enzimático (etapa I) puede ser continua o semicontinua con una velocidad comprendida entre 5 y 100 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y, opcionalmente, cuando el peróxido de hidrógeno es generado *in situ* por la enzima glucosa oxidasa, la velocidad mínima de adición de glucosa debe ser de 50 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

50

Con el objetivo de estabilizar y optimizar la acción catalítica de la enzima, se deben adicionar agentes quelantes (por ejemplo ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena abierta tales como ácido malónico, oxálico, glicólico, etc...) en el reactor enzimático (etapa I) con una velocidad comprendida entre 5 y 250 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. La adición al reactor enzimático (etapa I) de manganeso (II) debe mantenerse con una velocidad comprendida entre 0,5 y 100 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. La temperatura del reactor enzimático (etapa I) debe mantenerse entre 10 y 50°C y los valores de pH entre 4 y 8.

60

Como sistema de control de dosificación del sustrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o glucosa) en el reactor enzimático (etapa I), se introduce un sensor de oxígeno disuelto. El valor de oxígeno disuelto en estado estacionario es el resultante del balance entre el oxígeno consumido y el producido como consecuencia de la actividad enzimática. Una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorece su reacción con el Mn<sup>3+</sup>-quelato generado enzimáticamente, de manera que se libera mayor cantidad de oxígeno (Martínez M.J. *et al.*, 1996; *Eur J Biochem*, **237**:424-432). Consecuentemente, un valor elevado de oxígeno disuelto indica un exceso en la velocidad de adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a la estequiométricamente necesaria para la reacción enzimática. En caso de detectar niveles altos de oxígeno disuelto, el sistema de control envía una señal a la bomba de dosificación de sustrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o glucosa) para reducir su caudal. Del mismo modo, en

65

caso de detectar niveles bajos de oxígeno, el sistema de control envía una señal a la bomba de dosificación de sustrato enzimático ( $\text{H}_2\text{O}_2$  o glucosa) para aumentar su caudal.

5 Durante la etapa II, en el reactor de degradación, se plantea la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos farmacéuticos y de cuidado personal, tintes industriales, compuestos disruptores endocrinos, etc.) mediante la oxidación por parte de las especies oxidativas de manganeso (III) generadas en el reactor enzimático (etapa I). La temperatura del reactor de degradación (etapa II) debe mantenerse entre 10 y 90°C y los valores de pH entre 3 y 9.

10 La salida del reactor de degradación (etapa II) que presenta un alto contenido en manganeso (II) y manganeso (III) se introduce en un equipo de ósmosis inversa para la recuperación del manganeso y su retorno al reactor enzimático (etapa I), de este modo, se minimiza su consumo y se evita su vertido al ambiente. La relación entre los caudales de la línea de concentrado (aquella que se retorna al reactor enzimático (etapa I)) y la línea de permeado (aquella que sale del proceso con los productos de degradación) debe ser, como mínimo, igual a 2.

15

### Descripción de las figuras

20 Figura 1. Ciclo catalítico de las enzimas MnP y VP. El ciclo catalítico se inicia con la oxidación, mediante  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de la enzima en su estado original para formar la especie oxidada MnPI/VPI, que es dos estados de oxidación superior a la forma nativa. Este compuesto es reducido por un ión de  $\text{Mn}^{2+}$ , que se oxida a  $\text{Mn}^{3+}$ , pasando a la forma MnPII/VPII, un estado de oxidación superior a la forma nativa de la enzima. Finalmente esta forma oxida otro ión de  $\text{Mn}^{2+}$ , para formar  $\text{Mn}^{3+}$ , y vuelve a su forma nativa MnP/VP. Un exceso de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede conducir a la formación de la especie inactiva de la enzima MnPIII/VPPIII.

25

Figura 2. Diagrama esquemático del sistema de producción del complejo  $\text{Mn}^{3+}$ -quelato y su aplicación en la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes. Q.C: controlador de caudal; OT: medidor de oxígeno disuelto. La primera etapa (etapa I) se caracteriza por la utilización de la enzima manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP), agentes quelantes, manganeso (II) y peróxido de hidrógeno en reactores operados en continuo, semicontinuo o discontinuo para la generación de especies oxidativas de manganeso (III). La adición de peróxido puede ser directamente u, opcionalmente, generada *in situ* por la enzima glucosa oxidasa (GOD) utilizando glucosa como sustrato. La salida del reactor enzimático se separa en dos corrientes utilizando una membrana de ultrafiltración. Una corriente contiene la/s enzima/s (MnP o VP y/o GOD) que es retornada al reactor enzimático (etapa I) mientras que la segunda corriente, que contiene las especies oxidativas de manganeso (III) se introduce en el reactor de degradación (etapa II). La segunda etapa (etapa II) se caracteriza por llevar a cabo la degradación del compuesto recalcitrante, en reactores en continuo, semicontinuo o discontinuo, utilizando las especies oxidativas de manganeso (III) generadas en el reactor enzimático (etapa I), y por la utilización de un equipo de osmosis inversa para la recuperación de manganeso que es retornado al inicio del proceso. Como sistema de control de dosificación del sustrato enzimático ( $\text{H}_2\text{O}_2$  o glucosa) en el reactor enzimático (etapa I), se introduce un sensor de oxígeno disuelto.

30

35 Figura 3. Resultados de degradación de los estrógenos (a) estrona (E1), (b)  $17\beta$ -estradiol (E2) y (c)  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) con  $\text{Mn}^{3+}$ -malonato. Cromatogramas de las muestras a tiempo inicial y tras un minutos de degradación

40

Figura 4. Perfil de degradación de antraceno con  $\text{Mn}^{3+}$ -malonato.

45

Figura 5. Perfil de producción en continuo de  $\text{Mn}^{3+}$ -malonato (■) y su aplicación en la degradación en continuo del tinte azo, Orange II (○).

50

Figura 6. Perfil de producción en continuo de  $\text{Mn}^{3+}$ -malonato (■) mediante un sistema combinado de VP y GOD.

55

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

60

*Generación en continuo del complejo  $\text{Mn}^{3+}$ -malonato y su aplicación en la degradación en discontinuo de tres compuestos estrógenos: estrona (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2) y  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) como ejemplos de compuestos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP)*

65 Se aplicó el procedimiento descrito anteriormente para la generación del complejo  $\text{Mn}^{3+}$ -quelato, mediante VP en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 200 mL. La concentración inicial de enzima fue de 100 U  $\text{L}^{-1}$ . Como agente quelante se adicionó malonato sódico de forma continua a una velocidad de 66  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$  a pH 4,5. La velocidad de adición de  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue 12,5 y 8  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ , respectivamente. La velocidad de generación de complejo fue de 7,3  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ , o de forma equivalente, a una concentración de 350  $\mu\text{M}$  y un caudal de 5,5  $\text{mL min}^{-1}$ . El complejo generado se aplicó en la segunda etapa en un reactor de degradación de mezcla completa de volumen útil 25 mL en una operación en discontinuo. El reactor de degradación operó con una mezcla de tres estrógenos en una concentración inicial de 2,5  $\text{mg L}^{-1}$ , temperatura 25°C y agitación 150 rpm. El grado de degradación se estableció mediante la medida de la concentración de los estrógenos por cromatografía líquida (HPLC)

## ES 2 373 729 A1

tras 1 minuto de reacción. Los resultados muestran que se logró la completa oxidación de los 3 compuestos de forma prácticamente inmediata tras 1 minuto de operación (Figura 3).

### 5 Ejemplo 2

*Generación en continuo del complejo Mn<sup>3+</sup>-malonato y su aplicación en la degradación en discontinuo del antraceno (HAP)*

10 Se aplicó el procedimiento descrito anteriormente para la generación del complejo Mn<sup>3+</sup>-quelato, mediante VP en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 200 mL. La concentración inicial de enzima fue de 100 U L<sup>-1</sup>. Como agente quelante se adicionó malonato sódico de forma continua a una velocidad de 66 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> a pH 4,5. La velocidad de adición de Mn<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue 12,5 y 8 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectivamente. La velocidad de generación de complejo fue de 7,3 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, o de forma equivalente, a una concentración de 350 μM y un caudal de 5,5  
15 mL min<sup>-1</sup>. El complejo generado se aplicó en la segunda etapa en un reactor de degradación de mezcla completa de volumen útil 10 mL en una operación en discontinuo. El reactor operó con una concentración inicial de antraceno de 12,5 mg L<sup>-1</sup> (la solubilidad del antraceno se incrementó por la adición de acetona hasta una concentración final de 36% v/v) a 25°C y 150 rpm. El grado de degradación se estableció mediante la medida de la concentración del antraceno por cromatografía líquida (HPLC) tras 4 horas, 2, 3 y 6 días de reacción. Los resultados muestran que se obtuvo una  
20 oxidación del 90% tras seis días de operación (Figura 4).

### Ejemplo 3

25 *Generación en continuo del complejo Mn<sup>3+</sup>-malonato y su aplicación en la degradación en continuo del tinte azo Orange II*

Se aplicó el procedimiento descrito anteriormente para la generación del complejo Mn<sup>3+</sup>-quelato, mediante VP en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 200 mL. La concentración inicial de enzima fue de 100 U L<sup>-1</sup>. Como  
30 agente quelante se adicionó malonato sódico de forma continua a una velocidad de 250 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> a pH 4,5. La velocidad de adición de Mn<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue 12,5 y 8 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectivamente. La velocidad de generación de complejo fue de 5,2 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, o de forma equivalente, a una concentración de 400 μM y un caudal de 3,4 mL min<sup>-1</sup>. El complejo generado se empleó en la degradación en continuo de Orange II en un reactor agitado de mezcla completa de volumen útil 200 mL, a 25°C y 150 rpm. La velocidad de adición del complejo Mn<sup>3+</sup>-malonato fue 3  
35 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> mientras que el del tinte fue 1,43 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. El grado de decoloración se estableció mediante la medida de la absorbancia en el efluente a 480 nm. Los resultados muestran que se obtuvo una oxidación cercana al 60% durante el estado estacionario (Figura 5).

El porcentaje de recuperación de Mn<sup>2+</sup> expresado como el caudal másico de la línea de concentrado (línea que se conecta con la línea de entrada al reactor enzimático) y la línea de alimentación del equipo de osmosis inversa (procedente del reactor de degradación) fue del 96%.

### Ejemplo 4

45 *Generación en continuo del complejo Mn<sup>3+</sup>-malonato mediante un sistema combinado de glucosa oxidasa y peroxidasa versátil*

Se aplicó el procedimiento descrito anteriormente para la generación del complejo Mn<sup>3+</sup>-quelato, mediante VP y  
50 GOD en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 10 mL. La actividad inicial de la enzima VP fue de 25 U L<sup>-1</sup>. Como agente quelante se adicionó malonato sódico de forma continua a una velocidad de 177 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> a pH 4,5. La velocidad de adición de Mn<sup>2+</sup> y glucosa fue 88,6 y 50 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectivamente. La velocidad de generación de complejo fue de 31 μmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, o de forma equivalente, a una concentración de 350 μM y un caudal de 0,886 mL min<sup>-1</sup>. Los resultados se muestran en la figura 6.  
55

60

65

## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales que comprende un sistema en dos etapas:

10 - La primera etapa (etapa I) está **caracterizada** por la utilización de la enzima manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP), agentes quelantes, manganeso (II) y peróxido de hidrógeno en reactores agitados (reactor enzimático) operados en continuo, semicontinuo o discontinuo para la generación de especies oxidativas de manganeso (III), y una membrana de ultrafiltración, y

15 - La segunda etapa (etapa II) está caracterizada por llevarse a cabo la degradación de compuestos recalcitrantes, en reactores en continuo, semicontinuo o discontinuo, utilizando las especies oxidativas de manganeso (III) generadas en el reactor enzimático (etapa I), y por la utilización de un equipo de ósmosis inversa para la recuperación de manganeso, que es retornado al reactor enzimático.

20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el peróxido de hidrógeno se adiciona directamente al reactor enzimático u, opcionalmente, el peróxido de hidrógeno es generado *in situ* añadiendo la enzima glucosa oxidasa (GOD) utilizando glucosa como sustrato.

25 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por el control de velocidad de adición del sustrato enzimático ( $H_2O_2$  o glucosa) en base a la medición de oxígeno disuelto en el reactor enzimático (etapa I).

30 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la separación de la salida del reactor enzimático (etapa I) en dos corrientes utilizando una membrana de ultrafiltración, donde una corriente contiene la/s enzima/s (MnP o VP y/o GOD) que es retornada al reactor enzimático (etapa I) mientras que la segunda corriente, que contiene las especies oxidativas de manganeso (III) se introduce en el reactor de degradación (etapa II).

35 5. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por una velocidad de adición de la enzima manganeso peroxidasa o peroxidasa versátil tal que la actividad enzimática en el reactor enzimático (etapa I) se encuentre en un rango de 25 a 500 U L<sup>-1</sup>; y, opcionalmente, cuando el peróxido es generado *in situ* por la enzima glucosa oxidasa, caracterizado por una velocidad de adición de GOD tal que la relación entre MnP o VP y GOD sea 1,43 ( $mg_{MnP \text{ o } VP}/mg_{GOD}$ ).

40 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición continua o semicontinua de peróxido de hidrógeno en el reactor enzimático (etapa I) con velocidades comprendidas entre 5 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; y, opcionalmente, cuando el peróxido de hidrógeno es generado *in situ* por la enzima glucosa oxidasa, caracterizado por una velocidad mínima de adición de glucosa de 50  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

45 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición al reactor enzimático (etapa I) de agentes quelantes con una velocidad comprendida entre 5 y 250  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

8. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición al reactor enzimático (etapa I) de manganeso (II) con una velocidad comprendida entre 0,5 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

9. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la operación del reactor enzimático (etapa I) a temperaturas comprendidas entre 10 y 50°C y a valores de pH comprendidos entre 4 y 8.

50 10. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la operación del reactor de degradación (etapa II) a temperaturas comprendidas entre 10 y 90°C y a valores de pH comprendidos entre 3 y 9.

55 11. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la operación de un equipo de ósmosis inversa, tras el reactor de degradación (etapa II), con una relación mínima entre los caudales de la corriente de concentrado y la corriente de permeado igual a 2.

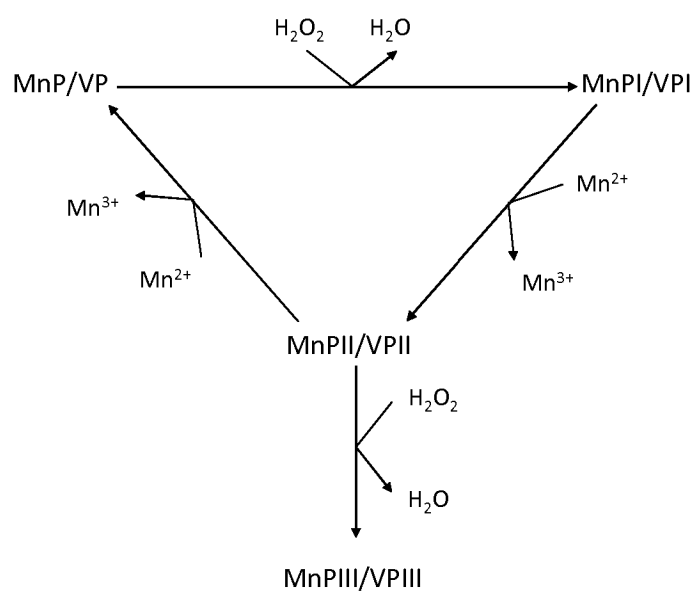


Figura 1

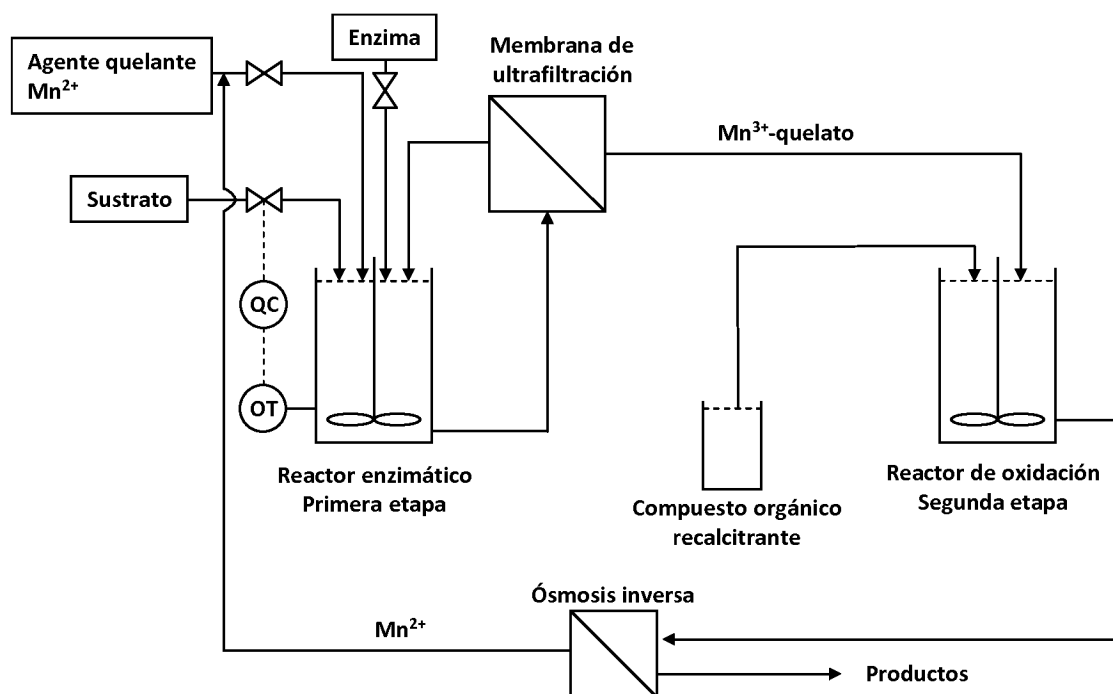


Figura 2

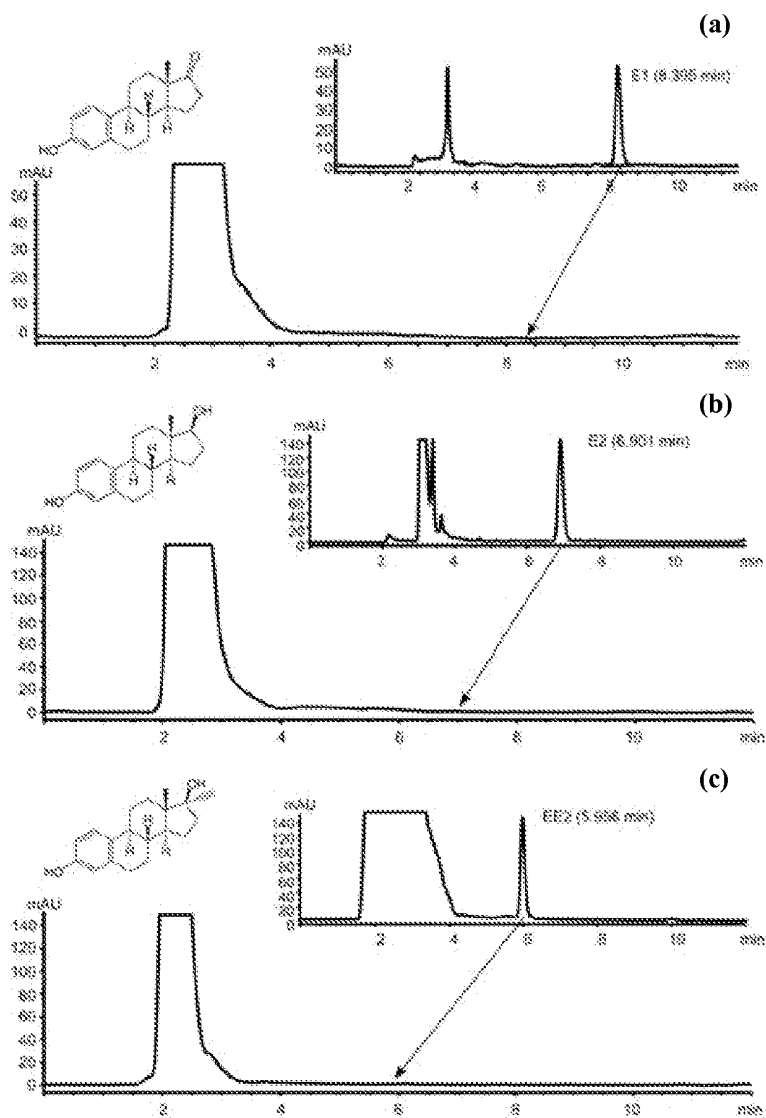


Figura 3

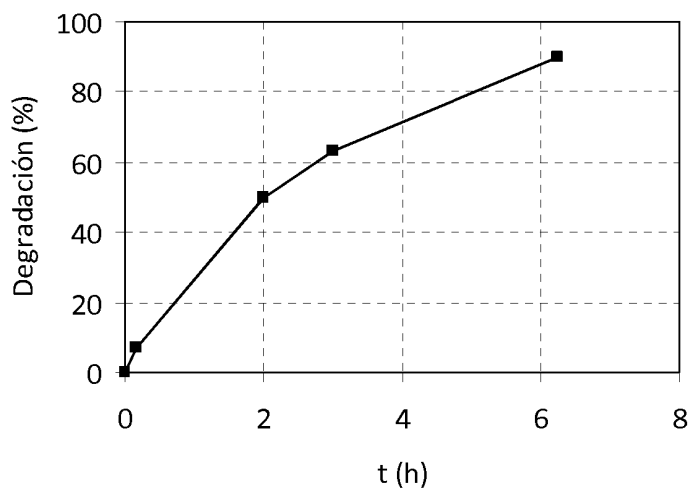


Figura 4



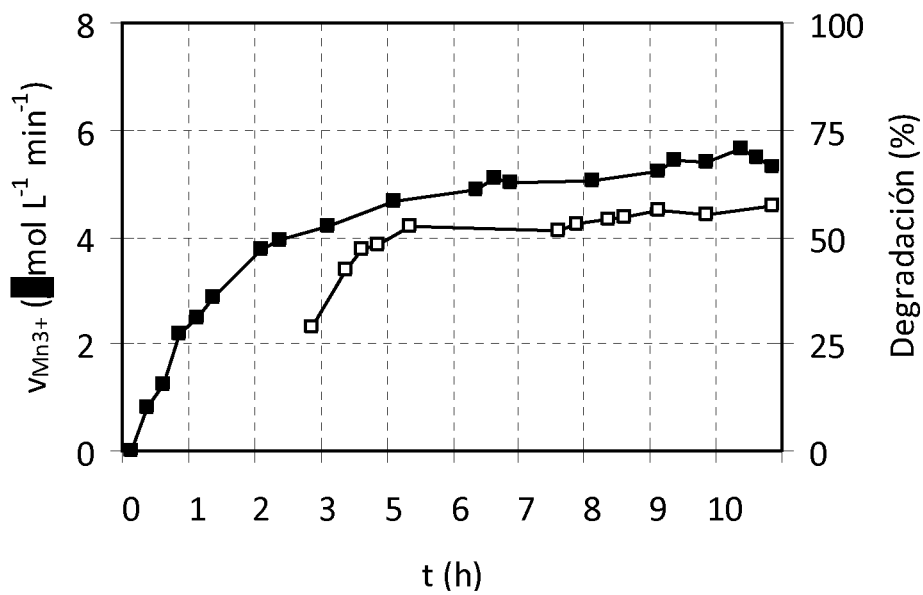


Figura 5

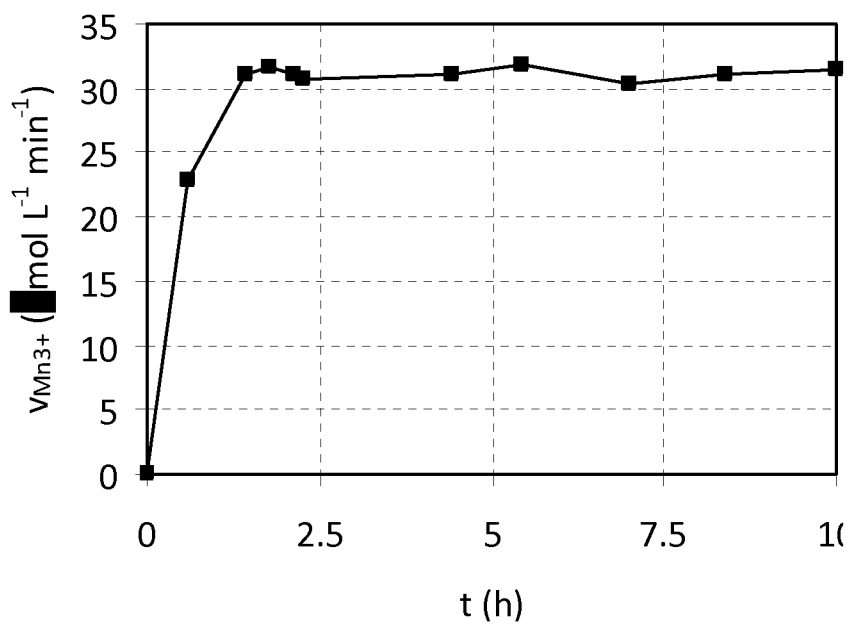


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031162

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 93/20959 A1 (PROMEGA CORPORATION ) 28.10.1993, páginas 9 - 11.	1-11
A	EIBES, G. ET AL. "Operation of a two-phase partitioning bioreactor for the oxidation of anthracene by the enzyme manganese peroxidase". Chemosphere 66 (2007) 1744-1751.	1-11
A	GRABSKI, A. ET AL. "Immobilization of Manganese Peroxidase from Lentinula edodes and Its Biocatalytic Generation of Mn(III)-Chelate as a Chemical Oxidant of Chlorophenols". Biotechnology and Bioengineering 60, 2 (1998) 204-215.	1-11
A	SASAKI, T. ET AL. "New Pulp Biobleaching System Involving Manganese Peroxidase Immobilized in a Silica Support with Controlled Poro Sizes". Applied and Environmental Microbiology 67 (5) 2001. 2208-2212.	1-11

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 nº:

Fecha de realización del informe  
26.07.2011

Examinador  
B. Aragón Urueña

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C02F3/34** (2006.01)

**C12N9/08** (2006.01)

**C12S3/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C02F, C12N, C12S

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.07.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 93/20959 A1 (PROMEGA CORPORATION )	28.10.1993
D02	EIBES, G. ET AL. "Operation of a two-phase partitioning bioreactor for the oxidation of anthracene by the enzyme manganese peroxidase". Chemosphere 66 (2007) 1744-1751.	14.08.2006
D03	GRABSKI, A. ET AL. "Immobilization of Manganese Peroxidase from <i>Lentinula edodes</i> and Its Biocatalytic Generation of Mn(III)-Chelate as a Chemical Oxidant of Chlorophenols". Biotechnology and Bioengineering 60, 2 (1998) 204-215.	20.10.1998

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la presente invención es un procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en efluentes industriales.

El documento D01 divulga el tratamiento de degradación de compuestos haluros orgánicos presentes en efluentes. Para ello, en primer lugar, se realiza la reacción entre la enzima peroxidasa y el sustrato Mn (II) en presencia de peróxido de hidrógeno formándose como producto intermedio un complejo de Mn (III) en un reactor que dispone de una membrana semipermeable. Formado el intermedio este pasa a través de la membrana al segundo compartimento donde se lleva a cabo la degradación de los compuestos recalcitrantes del efluente a tratar mediante la reacción con el intermedio de Mn(III) generado anteriormente (ver pág. 9-11).

El documento D02 recoge la oxidación de antraceno mediante la enzima manganeso peroxidasa en un bioreactor bifásico. En un compartimento del reactor se encuentra la fase acuosa donde está presente la enzima MnP y los cofactores y sustratos necesarios para el ciclo catalítico: peróxido de hidrógeno y Mn (II). En la fase orgánica se encuentra el antraceno el cual se transfiere a la fase acuosa para que tenga lugar su oxidación por los iones Mn(III) generados durante el ciclo catalítico. Se definen las condiciones del ciclo catalítico: adición peróxido de hidrógeno en velocidades entre 5-100µM/min; y de oxidación: 25°C, ph 4.5 y actividad enzimática mayor a 100 U/l.

El documento D03 divulga el empleo de la enzima manganeso peroxidasa inmovilizada como biocatalizador de la formación de los complejos quelatos-Mn(III) para el tratamiento de clorofenoles. El tratamiento consiste en un primer reactor donde tiene lugar la formación del complejo oxidativo de Mn(III) tras la reacción de peróxido de hidrógeno, Mn (II), agentes quelantes y la presencia de la enzima Mn Peroxidasa inmovilizada. En un segundo reactor se trata los compuestos recalcitrantes con los complejos oxidativos de Mn(III) obtenidos anteriormente. Finalmente se obtienen los productos oxidados y los productos restantes son purificados obteniéndose Mn (II).

Ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan el total de la invención tal y como se reivindica en la reivindicación 1 relativo al procedimiento de degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes a través de una primera fase en la que tiene lugar la generación de especies oxidativas de manganeso con el empleo de la enzima manganeso peroxidasa y una segunda fase en la reaccionan dichas especies oxidativas con los compuestos recalcitrantes utilizándose un equipo de ósmosis inversa para la recuperación de manganeso. Por tanto la invención definida en las reivindicaciones 1-11 de la solicitud es nueva y tiene actividad inventiva. (Art. 6.1 y Art. 8.1 Ley Patentes).