

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 741**

21 Número de solicitud: 201430762

51 Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.06.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA-Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**LEMA RODICIO, Juan Manuel;
MOREIRA VILAR, María Teresa;
FEIJOO COSTA, Gumersindo;
ARCA RAMOS, Adriana y
EIBES GONZÁLEZ, Gemma**

74 Agente/Representante:

PARDO SECO, Fernando Rafael

54 Título: **Procedimiento y sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos en aguas residuales mediante un reactor enzimático de membrana cerámica**

57 Resumen:

Procedimiento y sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos en aguas residuales mediante un reactor enzimático de membrana cerámica. La invención se refiere a un procedimiento y sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de EDAR o efluentes industriales por enzimas ligninolíticas, del tipo peroxidasa o lacasa, en reactores enzimáticos de membrana (REM) cerámica de ultrafiltración o nanofiltración. El agua a tratar, tras un pretratamiento de filtración para minimizar la concentración de coloides, se introduce en el reactor, donde se encuentra la enzima: peroxidasa o lacasa, en forma libre. La salida del reactor se bombea a la membrana cerámica, separándose en dos corrientes. La corriente de retenido, que contiene la enzima, se recircula al reactor. La corriente de permeado, que constituye el efluente del REM, está libre de microcontaminantes y puede descargarse al ambiente acuático.

ES 2 469 741 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos en aguas residuales mediante un reactor enzimático de membrana cerámica.

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento y un sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos del tipo de compuestos farmacéuticos y de cuidado personal además de compuestos disruptores endocrinos presentes en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales tras el tratamiento secundario, así como en efluentes industriales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La descarga al medio acuático de microcontaminantes orgánicos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARs) constituye un importante problema ambiental debido a los posibles efectos perjudiciales que estos compuestos químicos tienen sobre los seres vivos, incluso a concentraciones traza ($\mu\text{g/L}$). Destacan los Compuestos Disruptores Endocrinos (CDE), un grupo de sustancias de origen natural o antropogénico (por ejemplo fármacos, pesticidas, productos cosméticos y de cuidado personal, retardantes de llama, hormonas y otros químicos industriales) con la capacidad de alterar las funciones del sistema endocrino y, en consecuencia, causar efectos adversos en un organismo o su progenie. Estos compuestos llegan a las EDAR provenientes de diversas fuentes: aguas residuales domésticas, industriales, aguas de escorrentía, etc. Dado que los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales no están diseñados para eliminar este tipo de compuestos, su eliminación en plantas de tratamiento es parcial, liberándose de forma continua al medio ambiente. En aquellos casos en los que el medio acuático sirve a la vez como sumidero de efluentes de depuradoras y de fuente para la potabilización de agua, resulta especialmente importante evitar la descarga de estos microcontaminantes.

- 25 También, en los efluentes de empresas químicas o farmacéuticas resulta muy característico, incluso tras un sistema de tratamiento convencional, la presencia de microcontaminantes orgánicos en concentraciones bajas pero suficientes para ejercer un efecto potencial sobre el medio acuático.

- 30 En los últimos años se han desarrollado diferentes tratamientos o post-tratamientos para la eliminación de microcontaminantes orgánicos basados en procesos de oxidación avanzada como fotodegradación, fotocatalisis, ozonización, hipoclorito u óxidos de cloro, ultrasonidos, etc. No obstante, estos procedimientos, por lo general, son caros, presentan baja especificidad (Esplugas S. et al., 2002; *Water Res* 36: 1034–1042), y en ocasiones, generan subproductos que potencialmente pueden resultar más dañinos o que reaccionan con otros componentes de la matriz acuosa, originando compuestos con una estrogénicidad similar o incluso mayor que el de partida (Shappell N.W. et al., 2008; *Environ Sci Technol* 42: 1296-1300).

- 35 El tratamiento enzimático se plantea como una alternativa para la transformación de estos microcontaminantes en productos menos tóxicos, bien porque se favorezca una polimerización o bien porque se efectúe la transformación en moléculas sin acción farmacológica o disruptora endocrina. Eventualmente, pueden transformarse en productos más fácilmente degradables (Galliker P. et al., 2010; *J Colloid Interface Sci* 349: 98-105).

- 40 Las enzimas oxidativas producidas por hongos de podredumbre blanca se han aplicado con éxito para llevar a cabo la eliminación de diferentes compuestos disruptores endocrinos, tales como bisfenol A, nonilfenol, triclosan, así como la eliminación de la actividad estrogénica asociada a los mismos (Cabana H. et al., 2007; *Eng Life Sci* 7: 429-456). Las enzimas extracelulares secretadas por los hongos pueden pertenecer a dos tipos: peroxidadas, tales como manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y peroxidasa versátil (VP) u oxidadas, tales como lacasa (Lac).

- 45 Las peroxidadas son hemo-proteínas que requieren la presencia de peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para llevar a cabo la oxidación de los sustratos. Presentan potenciales de oxidación de hasta 1,51 V. La lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.13) es capaz de oxidar tanto sustratos fenólicos como sustratos aromáticos no fenólicos siendo el alcohol veratrílico uno de los sustratos más comunes de la enzima. La enzima manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.14) requiere del Mn^{2+} para cerrar su ciclo catalítico oxidándolo a Mn^{3+} (E_0 1,54 V), el cual difunde y es capaz de oxidar tanto las unidades fenólicas como las no fenólicas a través de reacciones de peroxidación de lípidos. Con el fin de incrementar la estabilidad de los iones Mn^{3+} en la fase acuosa se adicionan ácidos orgánicos para formar el complejo Mn^{3+} -ácido orgánico (E_0 0,9-1,2 V). La peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.16) combina las propiedades catalíticas de las dos enzimas anteriores, ya que oxida eficientemente compuestos no fenólicos de alto potencial redox, como el alcohol veratrílico (utilizado por la LiP) o Mn^{2+} (utilizado por la MnP) (Ruiz-Dueñas F.J. et al., 2009 ; *J Exp Bot* 60(2):441-52). Además, oxida fenoles en ausencia de Mn^{2+} .

La capacidad de las peroxidasas para degradar compuestos disruptores endocrinos ha quedado demostrada en un gran número de trabajos. Como ejemplos se puede señalar que Hirano et al. llevaron a cabo la degradación de Bisfenol A (BPA) utilizando la enzima MnP (Hirano T. et al., 2000; *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1958-1962). Esta misma enzima se utilizó con éxito para eliminar la hormona estrona y la actividad estrogénica asociada (Tamagawa Y. et al., 2006; *Chemosphere* 65: 97-101). Taboada et al. usaron la enzima peroxidasa versátil inmovilizada en CLEAs para eliminar bisfenol A, nonilfenol, triclosan y 17 α -estradiol (Taboada-Puig R. et al., 2011; *Bioresour Technol* 102: 6593-6599).

La lacasa (EC.1.10.3.2) es una oxidasa que cataliza la oxidación monoelectrónica de sustratos fenólicos o aminas aromáticas, y los transforma en los correspondientes radicales con la consiguiente reducción del oxígeno molecular a agua. La baja especificidad de sustrato, el empleo de oxígeno como aceptor final de electrones (en lugar del H₂O₂ utilizado por las peroxidasas) y la generación de agua como único subproducto de la reacción (Paice M.G. et al., 1995; *J Pulp Paper Sci* 21: 280-284), confieren a la lacasa una alta aplicabilidad en diversos procesos biotecnológicos. A pesar de que poseen un E₀ máximo de 0,8 V, inferior al de las peroxidasas ligninolíticas, la presencia de sustratos de bajo peso molecular, denominados mediadores, permite la oxidación de un amplio rango de compuestos fenólicos y no fenólicos (Morozova O. et al., 2007; *Appl Biochem Microbiol* 43: 523-535| Cañas A.I. et al., 2009; *Biotechnol Adv* 28: 694-705).

En varios estudios se ha demostrado la capacidad de la enzima lacasa para eliminar microcontaminantes. Como ejemplos se puede señalar que Auriol et al. emplearon lacasa de *Trametes versicolor* para eliminar la actividad estrogénica asociada a hormonas naturales y sintéticas (Auriol M. et al., 2008; *Chemosphere* 70:445-452). Lloret et al. usaron lacasa de *Myceliophthora thermophila* para eliminar diversos microcontaminantes del grupo de los antiinflamatorios: naproxeno, diclofenaco y diversas hormonas (Lloret L. et al., 2010; *Bioch Eng Journal* 51:124-131). Esta misma lacasa también se aplicó con éxito para degradar bisfenol A, nonilfenol y triclosan (Cabana H. et al., 2007; *Chemosphere* 67(4):770-778).

No obstante, el empleo de enzima en forma libre en un reactor operado en continuo como tratamiento terciario no resulta económicamente viable debido al elevado consumo de enzima, dado que ésta abandonaría el reactor con el efluente tratado. Como alternativa se puede plantear el empleo de enzima inmovilizada, aunque conlleva una serie de desventajas como la disminución de actividad enzimática, limitaciones a la transferencia de materia, coste extra, aumento del volumen de catalizador y la necesidad de buscar un método adecuado de inmovilización (Bornscheuer U.T., 2003; *Angew Chem Int Ed* 42: 3336-3337).

La enzima en forma libre puede emplearse si se acopla una unidad de membrana al reactor con el objetivo de separar y retener la enzima. Esta configuración de Reactor Enzimático de Membrana (REM) permite una retención del biocatalizador en el sistema mientras que los productos de degradación y otros compuestos permeables abandonan el mismo con la corriente de permeado, que constituye el efluente del REM.

El sistema de reactor enzimático de membrana basado en el uso de manganeso peroxidasa inmovilizada o libre se ha aplicado con éxito a la eliminación de tintes industriales (López C. et al., 2002; *J Biotechnol* 99: 249-257) y los resultados se recogen en la solicitud de patente (Lema et al. 2004, EP1457463 A1). La configuración de REM empleando una membrana polimérica (polietersulfona) de tamaño de corte de 10 kDa ha sido utilizada de un modo eficaz para la eliminación de estrógenos presentes en el efluente del tratamiento secundario de EDAR por lacasa libre de *Myceliophthora thermophila* (Lloret L. et al., 2013; *Environ Sci Technol* 47: 4536-4543). Sin embargo, no se ha podido aplicar con éxito para la eliminación de otros CDEs como bisfenol A, nonilfenol o triclosan debido al alto grado de adsorción de los mismos al material polimérico de la membrana. Se ha demostrado que el bisfenol A y otros microcontaminantes orgánicos son retenidos por membranas poliméricas (Agenson K.O. et al., 2003; *J Membr Sci* 225: 91-103| Kimura K. et al., 2004; *J Membr Sci* 245: 71-78| Zhang Y. et al., 2006; *Water Res* 40: 3793-3799) y el microcontaminante retenido en la membrana podría ser eventualmente expulsado de nuevo con el permeado, especialmente en aquellos casos en los que la concentración de microcontaminantes en el influente al REM muestre una elevada variabilidad (Zhang Y. et al., 2006; *Water Res* 40: 3793-3799).

El empleo de membranas inorgánicas, como por ejemplo cerámicas, constituye una alternativa a las poliméricas ya que su superficie hidrofílica minimiza el efecto de adsorción. Además, son químicamente inertes, esto es, resistentes al ataque de agentes químicos y a la corrosión, tienen un mayor rango de operabilidad frente al pH y la temperatura que las poliméricas y su limpieza es más sencilla. Como desventaja, presentan por lo general un mayor coste de capital frente a las membranas poliméricas, aunque este factor puede verse compensado por el mayor tiempo de vida útil de las membranas inorgánicas. Recientemente, otros autores han propuesto el uso de una membrana cerámica en un reactor enzimático para eliminar el antibiótico tetraciclina en altas concentraciones (de Cazes M. et al., 2014; *Catal Today*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2014.02.051>). En dicho sistema, la membrana de tamaño de poro igual a 0,2 μ m se emplea únicamente como soporte de inmovilización de la enzima lacasa. Debido a las dimensiones de dicha enzima (6,5 x 5,5 x 4,5 nm) (Piontek K. et al., 2002; *J Biol Chem* 277: 37663-37669), esta membrana no es capaz de retener a la enzima en forma libre, de modo que este sistema presenta las desventajas propias de la inmovilización enzimática.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de EDAR o efluentes industriales por enzimas ligninolíticas, peroxidasas o lacasas mediante el uso de reactores enzimáticos de membrana cerámica de ultrafiltración o nanofiltración.

El procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales comprende:

- a) aplicar un pretratamiento que disminuye la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el efluente;
- b) bombear el efluente hacia una vasija de reacción que contiene enzima ligninolítica;
- c) controlar la actividad enzimática para que esta sea mayor que un umbral mínimo;
- d) bombear el efluente hacia una membrana cerámica;
- e) recircular la corriente de retenido que se genera en la membrana cerámica y que contiene la enzima hacia la vasija de reacción; y
- f) descargar al medio acuático la corriente de permeado de la membrana.

El pretratamiento disminuye la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el agua a tratar, con el fin de maximizar la estabilidad enzimática en el reactor así como de minimizar el ensuciamiento de la membrana cerámica. En una realización particular de la invención el pretratamiento comprende hacer circular el efluente de la depuradora a través de un lecho de arena de granulometría inferior a 1 mm. En una realización particular de la invención el pretratamiento comprende utilizar una membrana de microfiltración, antes de introducirlo en el REM.

En otro aspecto de la invención el caudal del efluente introducido en la vasija de reacción se determina en función del tiempo de residencia hidráulico (TRH) en la vasija de reacción, definido como el cociente entre el volumen de reacción en la vasija y el caudal del efluente que entra para ser tratado; y el porcentaje de contaminantes que se quiere eliminar.

En el caso de que la concentración de contaminantes en la corriente de permeado esté por encima de un valor máximo fijado, se incrementa el TRH, reduciendo el caudal del efluente que entra a la vasija de reacción o reactor.

En la vasija de reacción se encuentra la enzima ligninolítica, en forma libre. Cuando se utilice una enzima peroxidasa la actividad está comprendida en el rango 50-1000 U/L. La actividad de la enzima LiP se determina mediante el ensayo descrito por Tien y Kirk (Tien M. y Kirk T.K., 1984; *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2280-2284) y la medida de la actividad MnP o VP se hace usando el ensayo recogido por Taboada-Puig et al. (Taboada-Puig R. et al., 2011; *Biotechnol Prog* 27(3): 668-676). Si se usa una enzima lacasa, la actividad enzimática está comprendida en el rango 100-1500 U/L, de acuerdo al protocolo de medida detallado en la bibliografía (Arca-Ramos A. et al., 2012; *Process Biochem* 47:1115-1121). La temperatura de operación en el reactor debe estar en el rango 10-40 °C, preferentemente 25°C; y el pH debe estar comprendido entre 3-8; preferentemente pH 4,5 en el caso de peroxidasas y pH 6-7 en el caso de lacasa.

En una realización particular la vasija de reacción (reactor) comprende un reactor de tanque agitado.

El control de la actividad enzimática comprende:

- a) medir la actividad enzimática en la vasija de reacción;
- b) si la actividad enzimática en la vasija de reacción es menor que un valor mínimo añadir enzima en forma de pulsos; y
- c) repetir los pasos a y b hasta que la actividad enzimática en la vasija de reacción sea mayor que el valor mínimo fijado.

Durante la operación se lleva a cabo la medida periódica de la actividad enzimática en la vasija y cuando la actividad descienda de 50 U/L para peroxidasas o de 100 U/L en el caso de lacasa, deberá adicionarse enzima fresca al reactor.

En el caso de utilizar una peroxidasa, deberá adicionarse peróxido de hidrógeno al reactor con velocidad comprendida entre 5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. Si la enzima peroxidasa es manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP) además se añade en continuo ácido orgánico dicarboxílico, tal como ácido malónico u oxálico, a una velocidad de 1-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

En el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa se introducen en el reactor los cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa: alcohol veratrílico, a una velocidad de entre 0,5-1000

$\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ en el caso de que la enzima sea lignino peroxidasa (LiP), y Mn^{+2} , a una velocidad de entre 0,5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$, en el caso de que la enzima sea manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP).

5 En el caso de que la enzima utilizada sea lacasa se mide la concentración de oxígeno disuelto en el reactor mediante un sensor de oxígeno disuelto de tal modo que cuando dicha concentración sea menor que 4 mg/L, se procede a la aireación u oxigenación, bien en continuo o bien mediante pulsos a través de un difusor, del reactor. Estos pulsos tendrán la duración suficiente para que la concentración de oxígeno disuelto alcance al menos el 90% de la concentración de oxígeno correspondiente a la saturación.

10 El caudal de la corriente de salida del reactor se bombea al módulo donde se encuentra la membrana cerámica. Una parte de esta corriente atraviesa la membrana, libre de enzima, constituyendo el efluente del sistema o permeado. El caudal de la corriente de permeado debe coincidir con el caudal del influente al reactor en estado estacionario y se ajusta mediante una válvula de regulación de flujo situada al final del módulo de membrana. La corriente que no atraviesa la membrana es el retenido, que contiene la enzima y es devuelta al reactor en la corriente de recirculado. Se debe medir sistemáticamente la presión transmembrana con el fin de determinar el momento para proceder a la limpieza química de la membrana. Asimismo, se toman muestras periódicas del influente al REM y del permeado para determinar la concentración de microcontaminantes tras el tratamiento enzimático en el reactor. En el caso de que dicha concentración sea superior a la prefijada, se deberá incrementar el tiempo de residencia hidráulico en el reactor.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de EDAR o en efluentes industriales por enzimas ligninolíticas, peroxidadas o lacasas mediante el uso de reactores enzimáticos de membrana cerámica de ultrafiltración o nanofiltración que comprende:

- 25
- a) un sistema de pretratamiento (102) que reduce la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el efluente;
 - b) un primer sistema de bombeo (104);
 - 30 c) una vasija de reacción (106) o reactor que comprende una solución de enzima ligninolítica (108);
 - d) un sistema de control de actividad enzimática (110) de la solución contenida en la vasija de reacción;
 - e) un segundo sistema de bombeo (112);
 - f) una membrana cerámica (114);
 - g) un sistema de recirculación (116);
 - 35 h) un sistema de medida de microcontaminantes en la vasija de reacción enzimática y en el permeado de la membrana cerámica.

40 En una realización particular el sistema de pretratamiento comprende un sistema de tratamiento de filtración por membrana de microfiltración. En otra realización particular el sistema de pretratamiento comprende un filtro de arena de granulometría inferior a 1 mm.

En el sistema de eliminación de microcontaminantes, el primer sistema de bombeo bombea el efluente desde el sistema de pretratamiento hacia la vasija de reacción.

45 En una realización particular la vasija de reacción o reactor comprende un reactor de tanque agitado.

La enzima lignolítica introducida en el reactor se selecciona de entre peroxidasa y lacasa.

El sistema de control de actividad enzimática comprende:

- 50
- a) un sensor de actividad enzimática; y
 - b) un sistema de adición en pulsos de enzima.

El sistema de adición de enzima añade enzima al reactor cuando la actividad enzimática es menor que 50 U/L, en el caso de utilizar peroxidasa, y menor que 100 U/L, cuando la enzima utilizada es lacasa.

55 La temperatura de operación del reactor está comprendida en el rango 10-40 °C, preferentemente 25 °C, y el pH de la mezcla contenida en el reactor está comprendido en el rango 3 a 8, preferentemente pH 4,5 en el caso de peroxidadas, y pH comprendido en el rango 6-7 en el caso de lacasa.

60 En el caso de que la enzima utilizada sea de tipo manganeso peroxidasa (MnP) o del tipo peroxidasa versátil (VP) el sistema de eliminación de microcontaminantes además comprende un sistema de adición (118) en continuo de peróxido de hidrógeno, el cual es añadido con una velocidad comprendida en el rango 5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. El sistema de eliminación de microcontaminantes además comprende un sistema de adición en continuo de ácido orgánico dicarboxílico cuando la enzima utilizada es manganeso peroxidasa, el cual es

65 añadido con una velocidad comprendida en el rango 1-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

En el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa el sistema de eliminación de microcontaminantes además comprende un sistema de adición de cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico. Dicho sistema de adición incorpora alcohol veratrílico, cuando la enzima utilizada es lignino peroxidasa (LiP), a una velocidad comprendida en el rango 0,5- 1000 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$, y Mn^{+2} si la enzima utilizada es una enzima del tipo manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP), a una velocidad comprendida en el rango 0,5 - 100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

En el caso de que la enzima utilizada sea una lacasa la vasija de reacción además comprende un sistema de control de oxígeno (122) disuelto en la mezcla efluente y enzima. Dicho sistema de control (122) comprende:

- a) un sensor de medida de la concentración de oxígeno disuelto; y
- b) un sistema de aireación u oxigenación.

Cuando la concentración de oxígeno disuelto es inferior a 4 mg/L el sistema de aireación actúa llevando a cabo una aireación en continuo o mediante pulsos utilizando un difusor.

El segundo sistema de bombeo (112) bombea la mezcla de la vasija de reacción hacia la membrana cerámica (114). El sistema de recirculación (116) bombea la corriente de retenido, que contiene la enzima, hacia la vasija de reacción. El sistema de medida de presión transmembrana (124) mide la presión transmembrana con el fin de determinar el momento para proceder a la limpieza química de la membrana. Asimismo, el sistema de medida de microcontaminantes toma muestras periódicas del influente al REM y del permeado para determinar la concentración de microcontaminantes tras el tratamiento enzimático en el reactor

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del método y sistema anteriormente descritos para la eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades detalladas en las figuras se ilustran a modo de ejemplo y no a modo de limitación:

Figura 1. Diagrama esquemático del sistema de reactor enzimático de membrana cerámica y su aplicación en la eliminación de microcontaminantes. El influente al reactor, con una determinada concentración de microcontaminantes, se bombea en continuo a la vasija de reacción, donde se encuentra la enzima en disolución. Dicha enzima se adiciona al sistema en pulsos periódicos cuando la actividad es inferior a la requerida. La corriente de salida del reactor se bombea hacia el módulo de membrana cerámica. En el reactor se dispone de sensores de oxígeno, pH y temperatura y de un controlador de nivel. En el módulo de membrana se encuentran dos manómetros para medir la presión transmembrana. De la membrana salen dos corrientes: la corriente de retenido, que contiene la enzima y que se recicla al reactor, y la de permeado, cuyo caudal se fija para que sea idéntico al del influente al reactor, y que se puede descargar al ambiente acuático al estar libre de microcontaminantes.

Figura 2. Perfiles de concentración de BPA (O) y de NP (\diamond) en el influente al REM, actividad lacasa (\blacktriangle) en el reactor de tanque agitado y concentración de BPA (\bullet) y de NP (\blacklozenge) a la salida del REM.

Figura 3. Perfiles de concentración (porcentaje respecto a la concentración en la corriente de entrada) de BPA (\bullet) en la corriente de salida del REM y la actividad (porcentaje respecto a la actividad a tiempo 0 h) de lacasa (\blacktriangle) en el reactor de tanque agitado para el tratamiento en continuo de BPA (85 $\mu\text{g/L}$) por lacasa con TRH de 5 h.

Figura 4. Perfiles de concentración (porcentaje respecto a la concentración en la corriente de entrada) de BPA (\bullet) en la corriente de salida del REM y la actividad (porcentaje respecto a la actividad a tiempo 0 h) de lacasa (\blacktriangle) en el reactor de tanque agitado para el tratamiento en continuo de BPA (85 $\mu\text{g/L}$) por lacasa con TRH de 7,5 h.

Figura 5. Perfiles de concentración (porcentaje respecto a la concentración en la corriente de entrada) de BPA (\bullet) en la corriente de salida del REM y la actividad (porcentaje respecto a la actividad a tiempo 0 h) de lacasa (\blacktriangle) en el reactor de tanque agitado para tratamiento en continuo de BPA (85 $\mu\text{g/L}$) por lacasa con TRH de 10 h.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

El procedimiento anteriormente descrito se aplicó para el tratamiento de los compuestos: bisfenol A (BPA) y nonilfenol (NP) mediante lacasa libre en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 1,5 L acoplado a una membrana de nanofiltración de cerámica con tamaño de poro de 1 nm con el objetivo de retener la enzima y

recircularla al reactor de acuerdo al esquema recogido en la Figura 1. La concentración media de enzima fue 400 U/L y las concentraciones de BPA Y NP en el influente fueron de 64 µg/L y 48 µg/L, respectivamente. Las condiciones de operación se detallan a continuación: temperatura, 25°C; pH 6; agitación, 250 rpm; razón de recirculación (recirculación/efluente), 3:1; tiempo de residencia, 2 h.

- 5 La desaparición de BPA Y NP se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad de la enzima se determinó espectrofotométricamente. Los resultados muestran que en el estado estacionario se elimina más del 80% del BPA y más del 97% de NP (Figura 2).

Ejemplo 2

- 10 Se aplicó el procedimiento anteriormente descrito para la eliminación de bisfenol A por lacasa libre en un reactor de tanque agitado con volumen útil de 1,5 L acoplado a una membrana de nanofiltración de cerámica con tamaño de poro de 1 nm con el objetivo de retener la enzima y recircularla al reactor (Figura 1). La concentración inicial de enzima fue de 1.000 U/L y la concentración del contaminante en el influente al REM fue de 85 µg/L. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura, 25°C; pH 6; agitación, 250 rpm; razón de recirculación (recirculación/efluente), 4:1.

- 15 Se realizaron experimentos a distintos tiempos de residencia hidráulico (TRH) 5 h, 7,5 h y 10 h. Antes del inicio de los ensayos se comprobó que la concentración de BPA en la corriente de entrada y salida del REM en ausencia de enzima eran idénticos, lo cual permite confirmar que la eliminación de BPA se debe exclusivamente a la acción enzimática.

- 20 La eliminación del BPA se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad de la enzima se determinó espectrofotométricamente.

Los resultados (Figuras 3, 4 y 5) muestran que el porcentaje de eliminación es superior al 92% operando a todos los TRH considerados y se incrementa con el TRH de tal modo que para 10 h la eliminación del BPA fue completa (Figura 5). Asimismo, la enzima mostró una elevada estabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales que comprende:
 - a. aplicar un pretratamiento que disminuye la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el efluente;
 - 5 b. bombear el efluente hacia una vasija de reacción que contiene enzima ligninolítica;
 - c. controlar la actividad enzimática para que esta sea mayor que un umbral mínimo;
 - d. bombear el efluente hacia una membrana cerámica;
 - e. recircular la corriente de retenido que se genera en la membrana cerámica y que contiene la enzima hacia la vasija de reacción; y
 - 10 f. descargar al medio acuático la corriente de permeado de la membrana.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el pretratamiento comprende un tratamiento de filtración.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el pretratamiento comprende la utilización de una membrana de microfiltración o un filtro de arena de granulometría inferior a 1 mm.
- 15 4. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el caudal del efluente introducido en la vasija de reacción se determina en función del tiempo de residencia hidráulico (TRH) en la vasija de reacción, definido como el cociente entre el volumen de reacción en la vasija y el caudal del efluente que entra para ser tratado; y el porcentaje de contaminantes que se quiere eliminar.
- 20 5. El procedimiento, según la reivindicación 4, caracterizado porque si la concentración de contaminantes en la corriente de permeado está por encima de un valor máximo fijado, se incrementa el TRH, reduciendo el caudal del efluente que entra a la vasija de reacción.
6. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima ligninolítica se selecciona de entre peroxidadasas o lacasas.
- 25 7. El procedimiento, según la reivindicación 6, caracterizado porque la actividad de la enzima peroxidasa en forma libre está comprendida en el rango 50-1000 U/L.
8. El procedimiento, según las reivindicación 6, caracterizado porque la actividad de la enzima lacasa en forma libre está comprendida en el rango 100-1500 U/L.
9. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 8, caracterizado porque la vasija de reacción comprende un reactor de tanque agitado.
- 30 10. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 8, caracterizado porque la temperatura de operación de la vasija de reacción está comprendida en el rango 10 a 40 °C.
11. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 8, caracterizado porque el pH de la mezcla efluente y enzima en la vasija de reacción está comprendido en el rango 3 a 8.
- 35 12. El procedimiento según las reivindicaciones 1 y 4 a 11, caracterizado porque el control de la actividad enzimática comprende:
 - a. medir la actividad enzimática en la vasija de reacción;
 - b. añadir enzima en forma de pulsos si la actividad enzimática en la vasija de reacción es menor que un valor mínimo; y
 - 40 c. repetir los pasos a y b hasta que la actividad enzimática en la vasija de reacción sea mayor que el valor mínimo fijado.
13. El procedimiento según la reivindicación 12 caracterizado porque el valor mínimo de actividad enzimática es de 50 U/L en el caso de que la enzima sea peroxidasa.

14. El procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el valor mínimo de actividad enzimática es de 100 U/L en el caso de que la enzima sea lacasa.
- 5 15. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-14, caracterizado porque si la enzima utilizada es una enzima del tipo peroxidasa se añade en continuo en la vasija de reacción peróxido de hidrógeno.
16. El procedimiento, según la reivindicación 15, caracterizado porque el peróxido de hidrógeno se añade con una velocidad comprendida entre 5 y 100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 10 17. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 16, caracterizado porque si la enzima utilizada es manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP) además se añade en continuo ácido orgánico dicarboxílico.
18. El procedimiento, según la reivindicación 17, caracterizado porque el ácido orgánico dicarboxílico se añade con una velocidad comprendida entre 1 y 100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
19. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-18, caracterizado porque además se añade en la vasija de reacción el cofactor necesario para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa.
- 15 20. El procedimiento, según la reivindicación 19, caracterizado porque el cofactor comprende alcohol veratrílico en el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa del tipo lignino peroxidasa (LiP).
21. El procedimiento, según la reivindicación 20, caracterizado porque el alcohol veratrílico se introduce a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 20 22. El procedimiento, según la reivindicación 19, caracterizado porque el cofactor comprende Mn^{+2} en el caso de que la enzima utilizada sea peroxidasa del tipo manganeso peroxidasa (MnP) o del tipo peroxidasa versátil (VP).
23. El procedimiento, según la reivindicación 22, caracterizado porque el Mn^{+2} se introduce a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 25 24. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque además comprende medir la concentración de oxígeno disuelto en la vasija de reacción cuando la enzima utilizada es de tipo lacasa.
25. El procedimiento, según la reivindicación 24, caracterizado porque si la concentración de oxígeno es inferior a 4 mg/L se procede a la aireación u oxigenación, bien en continuo o bien mediante pulsos a través de un difusor.
- 30 26. El procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el caudal de la corriente bombeada hacia la membrana cerámica es superior al caudal del efluente introducido en la vasija de reacción.
27. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la corriente de retenido que contiene la enzima se recircula al reactor.
- 35 28. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque se mide la presión transmembrana.
29. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se mide periódicamente la concentración de microcontaminantes en la vasija de reacción enzimática y en el permeado de la membrana cerámica.
- 40 30. Un sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundarios (100) de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales que comprende:
- 45 a. un sistema de pretratamiento (102) que reduce la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el efluente;
- b. un primer sistema de bombeo (104);
- c. una vasija de reacción (106) que comprende una solución de enzima ligninolítica (108);

- d. un sistema de control de actividad enzimática (110) de la solución contenida en la vasija de reacción;
 - e. un segundo sistema de bombeo (112);
 - f. una membrana cerámica (114);
 - 5 g. un sistema de recirculación (116); y
 - h. un sistema de medida de microcontaminantes en la vasija de reacción enzimática y en el permeado de la membrana cerámica.
31. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque el sistema de pretratamiento comprende un sistema de tratamiento de filtración por membrana de microfiltración.
- 10 32. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque el sistema de pretratamiento comprende un filtro de arena de granulometría inferior a 1 mm.
33. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque el primer sistema de bombeo bombea el efluente desde el sistema de pretratamiento hacia la vasija de reacción.
- 15 34. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque la vasija de reacción comprende un reactor de tanque agitado.
35. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque la enzima lignolítica se selecciona de entre peroxidasa y lacasa.
36. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque el sistema de control de actividad enzimática comprende:
- 20 a. un sensor de actividad enzimática; y
- b. un sistema de adición en pulsos de enzima.
37. El sistema, según la reivindicación 36, caracterizado porque el sistema de adición de enzima añade enzima cuando la actividad enzimática es menor que un valor mínimo de actividad enzimática.
- 25 38. El sistema, según la reivindicación 37, caracterizado porque el valor mínimo de actividad enzimática es de 50 U/L cuando la enzima utilizada es peroxidasa.
39. El sistema, según la reivindicación 37, caracterizado porque el valor mínimo de actividad enzimática es de 100 U/L cuando la enzima utilizada es lacasa.
40. El sistema, según las reivindicaciones 30 y 33 a 39, caracterizado porque la temperatura de operación de la vasija de reacción está comprendida en el rango 10 a 40 °C.
- 30 41. El sistema, según las reivindicaciones 30 y 33 a 39, caracterizado porque el pH de la mezcla efluente y enzima de la vasija de reacción está comprendida en el rango 3 a 8.
42. El sistema, según las reivindicaciones 30 y 33 a 41, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de adición (118) en continuo de peróxido de hidrógeno cuando la enzima utilizada es del tipo manganeso peroxidasa (MnP) o del tipo peroxidasa versátil (VP).
- 35 43. El sistema, según la reivindicación 42, caracterizado porque el sistema de adición añade peróxido de hidrógeno con una velocidad comprendida en el rango 5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
44. El sistema, según la reivindicación 42, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de adición en continuo de ácido orgánico dicarboxílico cuando la enzima utilizada es manganeso peroxidasa.
- 40 45. El sistema, según la reivindicación 44, caracterizado porque el sistema de adición añade ácido orgánico dicarboxílico con una velocidad comprendida en el rango 1-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
46. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque la vasija de reacción además comprende un sistema de adición del cofactor (120) necesario para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa.

47. El sistema, según la reivindicación 46, caracterizado porque el cofactor comprende alcohol veratrílico si la enzima utilizada es lignino peroxidasa (LiP).
48. El sistema, según la reivindicación 46, caracterizado porque el alcohol veratrílico se añade a una velocidad comprendida en el rango 0,5- 1000 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 5 49. El sistema, según la reivindicación 46, caracterizado porque el cofactor comprende Mn^{+2} si la enzima utilizada es una enzima del tipo manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP).
50. El sistema, según la reivindicación 49, caracterizado porque el Mn^{+2} se añade a una velocidad comprendida en el rango 0,5- 100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 10 51. El sistema, según las reivindicaciones 30 y 33-50, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de control de oxígeno (122) disuelto en la mezcla efluente y enzima en el caso de que la enzima utilizada sea lacasa.
52. El sistema, según la reivindicación 51, caracterizado porque el sistema de control de oxígeno comprende:
- 15 a. un sensor de medida de la concentración de oxígeno disuelto; y
- b. un sistema de aireación u oxigenación.
53. El sistema, según la reivindicación 52, caracterizado porque el sistema de aireación u oxigenación airea la mezcla cuando la concentración de oxígeno disuelto es inferior a 4 mg/L.
54. El sistema, según la reivindicación 52, caracterizado porque la aireación se lleva a cabo en continuo.
- 20 55. El sistema, según la reivindicación 52, caracterizado porque la aireación se lleva a cabo mediante pulsos utilizando un difusor.
56. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque el segundo sistema de bombeo bombea la mezcla de la vasija de reacción hacia la membrana cerámica.
57. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque el sistema de recirculación bombea la corriente de retenido que contiene la enzima hacia la vasija de reacción.
- 25 58. El sistema, según la reivindicación 30, caracterizado porque además comprende un sistema de medida de la presión transmembrana (124) en la membrana cerámica.
59. Uso del método, según las reivindicaciones 1 a 29, y del sistema, según las reivindicaciones, 30 a 58, para la eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales.

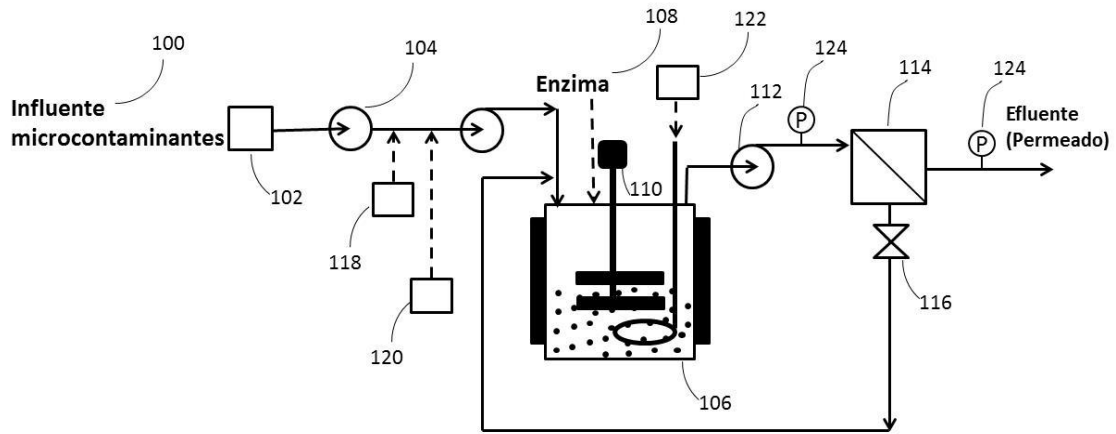


FIGURA 1

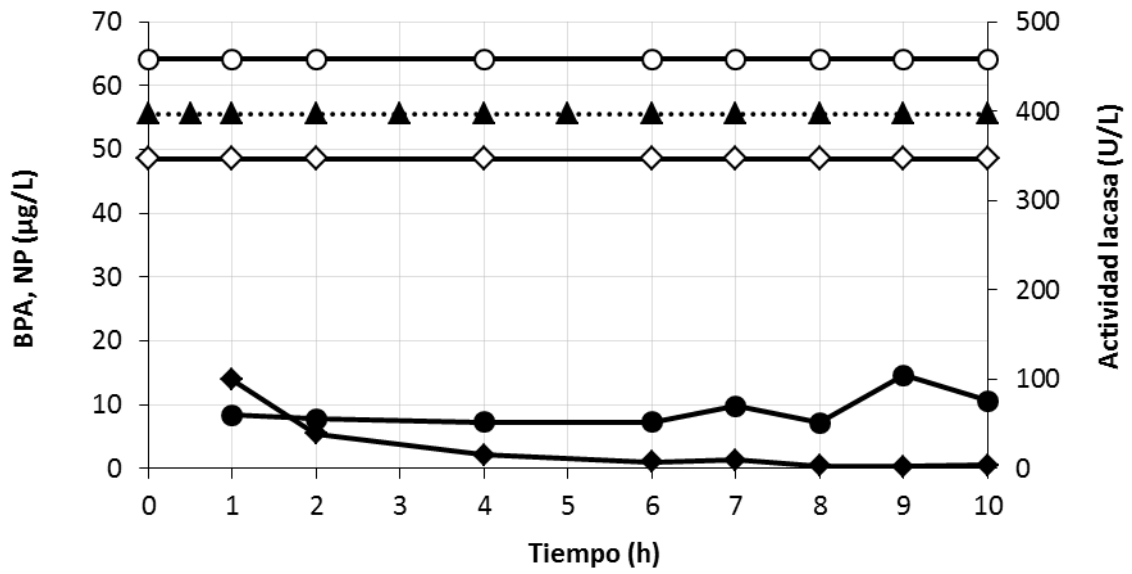


FIGURA 2

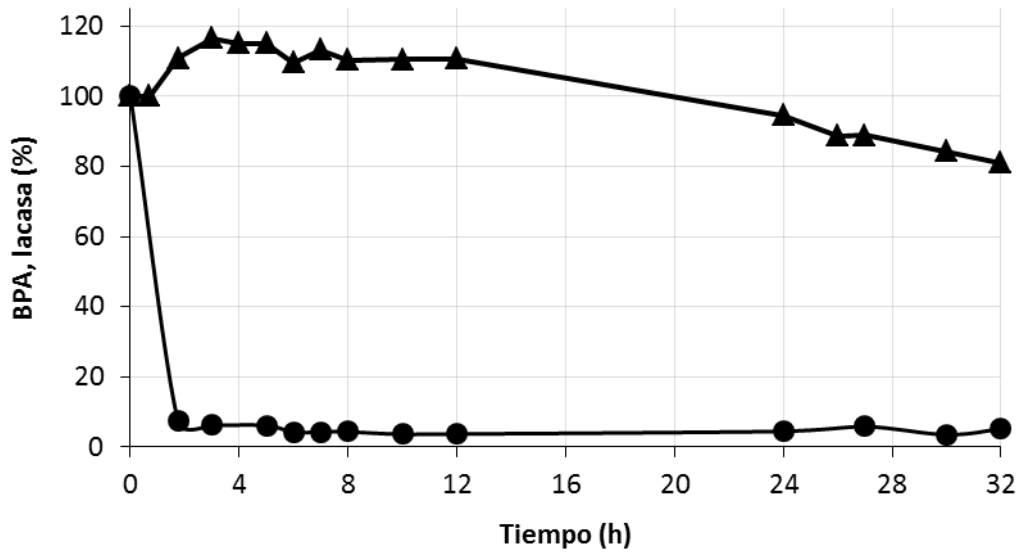


FIGURA 3

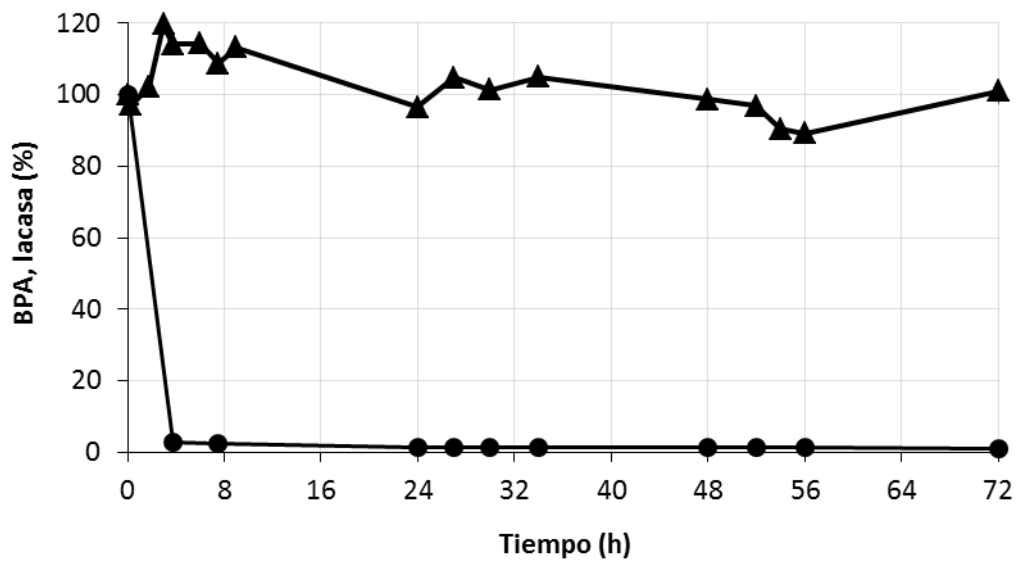


FIGURA 4

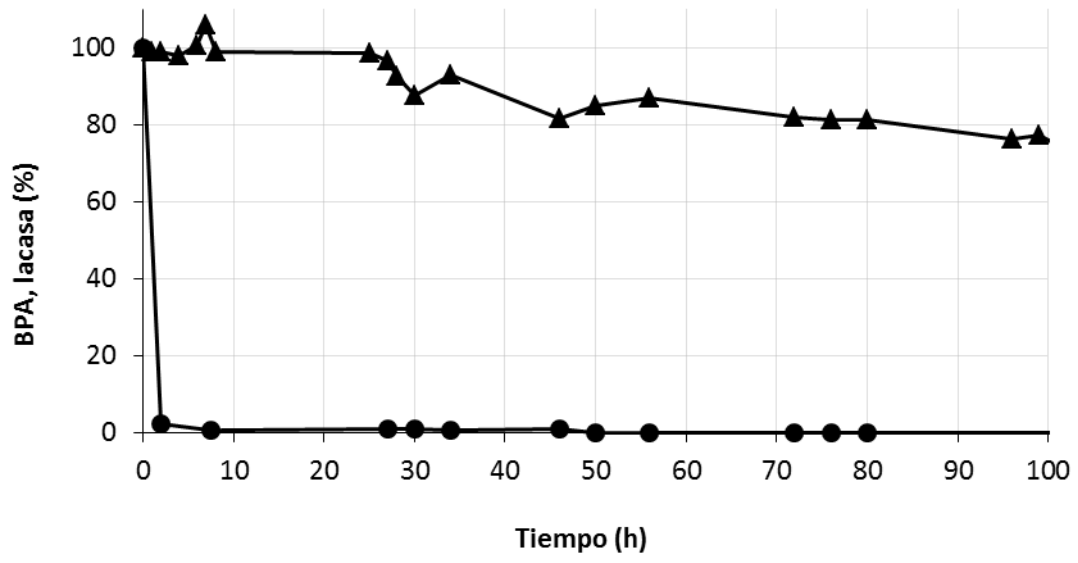


FIGURA 5



- ②① N.º solicitud: 201430762
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.05.2014
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C02F3/34** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LLORET et al. Degradation of estrogens by laccase from Myceliophthora in fed-batch and enzymatic membrane reactors. Journal of Hazardous Materials, 2012, Vol. 213-214, páginas 175-183, apartado 2.3.2.	1-59
A	TABOADA R. Removal of Endocrine Disrupting Chemicals by the Lignolytic Enzyme Versatile Peroxidase. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, diciembre 2012, capítulo 7.	1-59
A	KRAWCZYK et al. Combined membrane filtration and enzymatic treatment for recovery of high molecular mass hemicelluloses from chemithermomechanical pulp process water. Chemical Engineering Journal, 2013, Vol. 225, páginas 292-299, apartado 2.	1-59
A	CASTILLO et al. Degradation of estrogens by laccase from Trametes versicolor in enzymatic membrane reactors. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Cancún, Mexico, 27.06.2013.	1-59
A	LLORET et al. Continuous Biotransformation of Estrogens by Lacasse in an Enzymatic Membrane Reactor. Chemical Engineering Transactions, 2012, Vol. 27.	1-59
A	US 20110110894 A1 (DRAHOS et al.) 12.05.2011, líneas 133-144; figura 1.	1-59
A	WO 2489639 A1 (MIMAKI ENGINEERING CO, LTD) figura 1; párrafos [30-44].	1-59

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
09.06.2014

Examinador
A. Rúa Aguete

Página
1/4

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

C02F

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, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.06.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-59	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-59	SI
	Reivindicaciones	NO

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	LLORET et al. Degradation of estrogens by laccase from Myceliophthora in fed-batch and enzymatic membrane reactors. Journal of Hazardous Materials, Vol. 213-214, páginas 175-183, apartado 2.3.2.	2012
D02	TABOADA R. Removal of Endocrine Disrupting Chemicals by the Lignolytic Enzyme Versatile Peroxidase. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, capítulo 7.	Diciembre 2012
D03	KRAWCZYK et al. Combined membrane filtration and enzymatic treatment for recovery of high molecular mass hemicelluloses from chemithermomechanical pulp process water. Chemical Engineering Journal, Vol. 225, páginas 292-299, apartado 2.	2013
D04	CASTILLO et al. Degradation of estrogens by laccase from Trametes versicolor in enzymatic membrane reactors. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Cancún, Mexico.	27.06.2013

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 invención es un procedimiento y sistema para la eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales o efluentes industriales que comprende un reactor que contiene enzima lignolítica del tipo lacasa y peroxidasa, un sistema de control de la actividad enzimática en el reactor y una membrana cerámica acoplada al reactor para la retención y recirculación de la enzima.

El documento D1 divulga un procedimiento y sistema para la degradación de los estrógenos presentes en aguas residuales mediante el tratamiento con lacasa en un sistema de reactor enzimático de membrana. El sistema comprende un reactor de tanque agitado acoplado a una membrana polimérica de polietersulfona. El reactor está equipado con un sistema de control de la actividad enzimática. Para aumentar la eficiencia del sistema se aumenta el tiempo de contacto entre el sustrato y la enzima, reduciendo la frecuencia de adición de la enzima en forma de pulsos con lo que se consigue un ahorro de la enzima consumida. La membrana polimérica retiene la enzima de manera eficiente, con lo que se considera óptima para el tratamiento. (Ver apartados 2.3.1 y 2.3.2).

El documento D2 divulga un sistema de ultrafiltración enzimático para la eliminación de compuestos disruptores endocrinos mediante un reactor de tanque agitado al que se añade peroxidasa acoplado a una membrana de ultrafiltración de polietersulfona para el reciclado de la enzima al reactor. (Ver figura 7.2).

El documento D3 divulga un sistema y procedimiento para la recuperación de hemicelulosas de las aguas de proceso de la fabricación del papel mediante el paso por una membrana polimérica de microfiltración y una membrana cerámica de ultrafiltración previamente al tratamiento enzimático en un reactor de tanque agitado al que se añade lacasa y posterior paso por una membrana de ultrafiltración polimérica. (Ver apartado 2.4.3).

El documento D4 divulga un sistema para la degradación de estrógenos en un sistema de reactor enzimático de membrana en el que se utiliza una membrana cerámica como soporte de inmovilización de la enzima lacasa. (Ver introducción).

Ninguno de los documentos D1 a D4 citados o cualquier combinación relevante de los mismos revela un sistema y procedimiento para la eliminación de microcontaminantes orgánicos en aguas residuales por enzimas lignolíticas mediante el uso de reactores enzimáticos de membrana cerámica de ultrafiltración o nanofiltración, en el que se utiliza una membrana cerámica y no polimérica para la retención y reciclado de la enzima al reactor.

Por lo tanto la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1 a 59 de la solicitud es nueva e implica actividad inventiva. (Art. 6 y 8 de la LP).