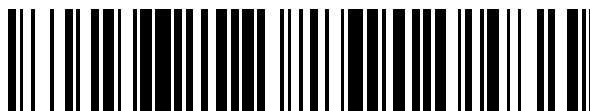


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 061**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/08** (2006.01)  
**C12P 3/00** (2006.01)  
**C12N 11/00** (2006.01)  
**A61L 2/16** (2006.01)  
**A01N 59/24** (2006.01)  
**A01N 63/00** (2006.01)  
**C12M 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02738292 .8**  
96 Fecha de presentación: **31.05.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1390480**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Procedimiento de producción enzimática de un agente de tratamiento en estado fluido**

30 Prioridad:  
**31.05.2001 FR 0107344**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.04.2012**

73 Titular/es:  
**TMI EUROPE**  
**3-11, RUE DE LA PERLERIE**  
**69120 VAULX EN VELIN, FR**

72 Inventor/es:  
**CASEZ, Hervé**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

ES 2 378 061 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción enzimática de un agente de tratamiento en estado fluido

5 La presente invención se refiere a la generación de un flujo concentrado y continuo de especies químicas oxigenadas y de sustratos oxidados, en fase líquida, que permite obtener soluciones que pueden usarse, por ejemplo, para el lavado, la descontaminación, la esterilización de diferentes productos alimentarios como el agua, pero también de materiales industriales, así como para la descontaminación y el saneamiento de fluidos y para la preparación de productos alimentarios, farmacéuticos y cosméticos.

10

Se conoce el uso para este fin de sistemas enzimáticos antimicrobianos naturales, como las oxidoreductasas, por ejemplo, el sistema lactoperoxidasa, y se han descrito numerosas aplicaciones.

15 Las propiedades de este sistema enzimático han sido estudiadas especialmente en "The lactoperoxidase system chemistry and biological significance" (1985) Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Cap. 8, pág. 143-178.

Este sistema antimicrobiano de lactoperoxidasa/tiocianato/peróxido de hidrógeno se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP-A-0.397.227 e incluye esquemáticamente tres componentes:

- 20 - una enzima: la lactoperoxidasa,  
 - un sustrato oxidable: el ion tiocianato ( $\text{SCN}^-$ )  
 - un donador de oxígeno: el peróxido de hidrógeno.

En este sistema, en medio líquido, la lactoperoxidasa cataliza la reacción de oxidación del tiocianato.

25

En presencia de peróxido de hidrógeno en cantidad suficiente y en condiciones de pH correctas, la reacción de oxidación se sigue hacia derivados oxiácidos todavía más oxidados.

30 Las especies químicas oxigenadas, solas o en combinación, obtenidas son de forma no limitativa, ion hipotiocianito  $\text{OSCN}^-$ , iones  $\text{O}_2\text{SCN}^-$  y  $\text{O}_3\text{SCN}^-$ , aniones superóxido  $\text{O}_2^-$  y trióxido  $\text{O}_3^-$  el ion hidroxilo  $\text{OH}^-$ , óxido nítrico  $\text{NO}$ , trióxido de dinitrógeno  $\text{N}_2\text{O}_3$ , dióxido de nitrógeno  $\text{NO}_2$ , peroxinitrito  $\text{ONO}_2$ , hidroperoxinitrito  $\text{ONHO}_2$ , dióxido de azufre  $\text{SO}_2$ , trióxido de azufre  $\text{SO}_3$ , ácido sulfuroso  $\text{HSO}_3$  y ácido hipocloroso  $\text{HOCl}$ .

35 Las especies químicas oxigenadas citadas anteriormente son conocidas por sus efectos bacteriostático y bactericida, sobre todo frente a numerosos microorganismos como bacterias, por ejemplo, *Pseudomonae*, *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* o *Campylobacter*, formas esporuladas y protozoos, virus, levaduras u hongos.

40 Este sistema antimicrobiano puede usarse así para la descontaminación por acción de las especies químicas oxigenadas obtenidas, especialmente los iones tiocianatos oxidados como  $\text{OSCN}^-$ ,  $\text{O}_2\text{SCN}^-$ ,  $\text{O}_3\text{SCN}^-$ , que son susceptibles de interaccionar con los componentes de las membranas celulares o de oxidar los contaminantes químicos.

45 En presencia de un sustrato que proporciona peróxido de hidrógeno que puede ser el peróxido de hidrógeno en sí o, por ejemplo, un peróxido metálico o un sistema enzimático complementario productor de peróxido de hidrógeno, siendo este sistema enzimático complementario, por ejemplo, una oxidoreductasa con un sustrato oxidable y de oxígeno como el sistema glucosa/glucosa-oxidasa en medio acuoso, es posible el uso del sistema completo y las propiedades de reacción de un sistema antimicrobiano semejante incluyen esquemáticamente tres etapas:

- 50 - la producción de peróxido de hidrógeno por el proveedor de peróxido de hidrógeno,  
 - la reacción de oxidación del tiocianato,  
 - la descontaminación por acciones de las especies químicas oxigenadas obtenidas.

Se han descrito numerosas aplicaciones.

55

Por ejemplo, según el documento WO-A-8.707.838 se describe un procedimiento para acondicionar en forma seca una composición antibacteriana que contiene lactoperoxidasa, tiocianato y un donador de oxígeno nativo con vistas a su uso ulterior.

A partir del documento US-C-5.403.450 se conoce el uso de instalaciones, en las que las oxidorreductasas están inmovilizadas, para convertir sustancias susceptibles de ser oxidadas contenidas como contaminación en el agua.

5 El documento JP-58.152.486 enseña, por ejemplo, la inmovilización de enzimas en partículas de polímeros para un uso repetido.

En la publicación «Comparison of the anti-bacterial activity of the hipotiocyanite anion towards streptococcus-lactis and escherichia-coli», Journal of General Microbiology, vol. 120, nº 2, 1980, páginas 513-516, Marshall y col. describen un procedimiento de preparación de un agente de tratamiento, en estado fluido, que comprende OSCN<sup>-</sup> separado de la lactoperoxidasa. Sin embargo, el OSCN<sup>-</sup> así preparado está unido a seferosa, y no se encuentra por tanto en estado libre, y presenta una estabilidad de 30 minutos aproximadamente.

10 Se conocen también sistemas de inmovilización de enzimas o sistemas enzimáticos en paredes de reactores, películas, bolas y otros soportes que incluyen una superficie específica importante.

15 Sin embargo, todos estos usos no son satisfactorios, debido al consumo excesivo de enzimas que conllevan:

- a causa de su acondicionamiento, por ejemplo, en forma seca, que implica un uso por atomización de los productos para tratar, y con ello cantidades de enzimas proporcionales a las superficies y a los volúmenes de productos para tratar,
- a causa de los bajos rendimientos de reacción de las enzimas inmovilizadas,
- a causa de la rápida degradación de las especies químicas oxigenadas que se generan.

20 El procedimiento según la invención permite resolver el conjunto de inconvenientes citados anteriormente porque permite producir un agente de tratamiento en estado fluido, por ejemplo, líquido, que comprende en estado libre al menos una especie química oxigenada, estable, con un rendimiento importante y una resistencia importante.

La presente invención tiene así por objeto un procedimiento de producción enzimática de un agente de tratamiento en estado líquido que comprende en estado libre el ion hipotiocianito (OSCN<sup>-</sup>), en el que:

30 a) se forma y se pone en movimiento un baño de reacción acuoso que comprende:

- un sustrato oxidable en fase acuosa elegido como tiocianato de sodio (NaSCN) o tiocianato de potasio (KSCN),
- un donador de oxígeno elegido como peróxido de hidrógeno,
- 35 - un agente coagulante elegido entre sales de aluminio o sales de hierro,
- un agente espesante elegido entre arcillas, caolín, sílice o silicatos,
- un agente floculante elegido entre floculantes poliméricos aniónicos o catiónicos, polisacáridos, heteropolisacáridos de tipo aniónico o poliacrilaminas, siendo este introducido en el baño de reacción acuoso después de la etapa de coagulación, y
- 40 - un agente catalizador enzimático en fase sólida y dividida distribuido en dicho baño, siendo dicho agente catalizador lactoperoxidasa,

45 para formar agregados de partículas sólidas inertes frente al agente catalizador enzimático, comprendiendo o incorporando dichos agregados, en estado libre, es decir, un estado de puesta en suspensión en los agregados sin formación de enlace iónico o covalente entre el agente catalizador y los agentes coagulante y floculante, estando dicho agente catalizador y dichos agregados distribuidos en el baño de reacción acuoso,

50 b) se separa el baño de reacción acuoso, en una fracción enriquecida con agregado, y una fracción desprovista de agregado, a partir de la cual se obtiene el agente de tratamiento.

El procedimiento de producción enzimática según la invención consiste así en poner en contacto:

- un agente catalizador enzimático elegido como lactoperoxidasa,
- un sustrato oxidable en fase acuosa susceptible de ser oxidado por acción de un donador de oxígeno, siendo dicho donador de oxígeno peróxido de hidrógeno, por catálisis por dicho agente catalizador enzimático, generando ion hipotiocianito (OSCN<sup>-</sup>) en estado libre, siendo dicho sustrato oxidable tiocianato de sodio (NaSCN) o tiocianato de potasio (KSCN),
- 55 - un agente coagulante elegido entre sales de aluminio o sales de hierro,
- un agente espesante elegido entre arcillas, caolín, sílice o silicatos, y

- un agente floculante elegido entre floculantes poliméricos aniónicos o catiónicos, polisacáridos, heteropolisacáridos de tipo aniónico o poliacrilaminas,

5 y permite obtener un agente de tratamiento en estado líquido, que comprende en estado libre el ion hipotiocianito (OSCN). El agente de tratamiento así obtenido es estable durante más de 10 horas.

Se entiende por especie química oxigenada en estado libre, una especie química en estado iónico cuya constante de disociación, en el pH de la solución obtenida, permite el desplazamiento del equilibrio de la reacción de disociación hacia la existencia en estado libre de dicha especie química oxigenada.

10

Se entiende por agregado toda formulación que permite mantener en fase sólida y dividida pero en estado libre en el medio de reacción el agente catalizador enzimático por adición de coagulante y de floculante en presencia de espesante que permite su aislamiento de dicho medio de reacción al final de la reacción y su reciclado.

15 En el marco de la presente invención, la formación de agregados se efectúa por adición sucesiva de un coagulante y de un floculante, se tiene así una etapa de coagulación que precede a la etapa de floculación.

20 El agente coagulante se elige entre sales de aluminio o de hierro, preferentemente como sulfato de aluminio, cloruro de aluminio, aluminato de sodio, polihidroxiclورو de aluminio, polihidroxisulfato de aluminio, polihidroxiclorosulfato de aluminio, policlorosulfato básico de aluminio, polihidroxiclorosilicato de aluminio, fluorosulfato de aluminio, sulfato ferroso, sulfato férrico, cloruro férrico, clorosulfato férrico, sosa u homopolímeros de cloruro de dimetildialilamonio.

Ventajosamente los coagulantes se añaden al medio de reacción, en proporciones que varían de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  a 10 g/l de medio de reacción.

25

Ventajosamente los floculantes se añaden al medio de reacción, en proporciones que varían de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  a 10 g/l de medio de reacción.

30 El agente espesante usado en el marco de la presente invención se elige entre arcillas, caolín, sílice o silicatos. Este agente espesante puede ser introducido en el baño simultáneamente a la introducción del agente catalizador enzimático o después de la formación del baño de reacción acuoso.

Ventajosamente el agente espesante se añade al medio de reacción, en proporciones que varían de 0,1 a 100 g/l de medio de reacción.

35

La invención presenta las variantes siguientes:

- el sustrato oxidable se introduce en el baño de reacción acuoso en fase acuosa;

40 - el agente catalizador enzimático se introduce en el baño de reacción en estado de fase sólida y dividida o en fase líquida;

- el agente catalizador enzimático se evacua del baño de reacción;

- el procedimiento se practica de manera continua o discontinua;

- se introduce en el baño un agente espesante;

- se introduce en el baño un agente corrector de pH;

45 - se introduce en el baño un donador de oxígeno en forma de un sistema enzimático complementario que produce peróxido de hidrógeno, y el agente catalizador enzimático comprende, además de la lactoperoxidasa, una enzima del tipo oxidoreductasa.

El conjunto de reactivos se implementa mediante su introducción en el reactor a razón de 0,2 a 10 g/l de volumen

50

útil. En formas de realización particulares, el pH del medio de dispersión del agregado puede estabilizarse o corregirse mediante adición de un agente corrector de pH, que se elegirá entre ácidos o bases minerales u orgánicos.

55 Ventajosamente las enzimas se añaden al medio de reacción, en proporciones que varían de 0,02 a 10 g/l de medio de reacción.

Ventajosamente los sustratos enzimáticos asociados se añaden al medio de reacción, en proporciones que varían de 0,05 mM a 15 mM por litro de medio de reacción.

El donador de oxígeno según la presente invención es peróxido de hidrógeno. De manera general puede usarse cualquier compuesto químico susceptible de producir peróxido de hidrógeno.

- 5 Ventajosamente el peróxido de hidrógeno se añade al medio de reacción, en proporciones que varían de 0,05 mM a 15 mM por litro de medio de reacción.

10 Cuando el donador de oxígeno está en forma de un sistema enzimático complementario que produce peróxido de oxígeno, éste comprende un sustrato oxidable y una enzima, por ejemplo, del tipo oxidorreductasa, específica de este sustrato. Así, cuando los sistemas enzimáticos usados son oxidorreductasas, para los que se realiza la etapa de producción del peróxido de hidrógeno, se añade al medio un sustrato oxidable solo o en asociación, y este sustrato se elegirá entre sustancias como glucosa, lactosa, xantina.

15 A modo de ejemplo se citarán los sistemas enzimáticos siguientes: glucosa oxidasa/glucosa, galactosa oxidasa/galactosa, urato oxidasa/urato, colina oxidasa/colina, glicina oxidasa/glicina, glutamato oxidasa/glutamato, alcohol oxidasa/alcohol.

Estos sistemas enzimáticos son capaces en presencia de oxígeno y de agua de producir peróxido de hidrógeno que se usará como donador de oxígeno en el sistema enzimático del procedimiento según la invención.

20 Alternativamente este donador de oxígeno puede elegirse entre microorganismos como *Streptococcus* y/o *Lactobacillus* que pueden producir peróxido de hidrógeno.

25 La implementación de la etapa b) del procedimiento según la invención, es decir, la etapa de separación del baño de reacción acuoso, en una fracción enriquecida en agente catalizador enzimático en fase sólida y dividida y una fracción desprovista en dicho agente catalizador, a partir de la cual se obtiene el agente de tratamiento, se realiza por medios de separación y recuperación de los agregados o las emulsiones. Entre los medios implementados se citarán a modo de ejemplo los medios usados clásicamente como decantación, flotación, centrifugado para las emulsiones y sedimentación, filtración frontal o tangencial o un centrifugado para los productos de floculación o 30 coagulación y/o la separación ciclónica.

El procedimiento según la invención permite producir grandes cantidades de solución de agente de tratamiento según la invención, que posee propiedades biocidas, que pueden usarse para limpieza, lavado y desinfección de materiales, máquinas, herramientas, productos textiles, recipientes y tuberías y locales y establecimientos 35 industriales agroalimentarios o establecimientos hospitalarios y de asistencia. El procedimiento permite igualmente la preparación de soluciones destinadas a la formulación de productos cosméticos y farmacéuticos destinados a la salud humana y/o animal y de productos alimentarios.

40 Permite igualmente producir soluciones de lavado para la descontaminación de superficie de productos alimentarios como, por ejemplo, frutas, verduras, hojas, pero también productos animales.

Estas soluciones biocidas podrán usarse mediante baño, pulverización, inyección, nebulización.

45 Será posible igualmente usar estas soluciones como constituyentes de una composición de producto, por ejemplo, agua de reconstitución de zumo de frutas después de deshidratación, concentración.

El procedimiento permite igualmente esterilizar y purificar aguas destinadas a la producción de aguas de bebidas para el consumo humano o animal, o aguas termales, aguas de piscinas, de baños.

50 El procedimiento según la invención permite igualmente el tratamiento de aguas contaminadas, aguas usadas o efluentes industriales, es decir, efluentes gaseosos por circulación en el líquido.

55 Los contaminantes químicos, por ejemplo, nitratos o fosfatos, son así oxidados, y también los contaminantes orgánicos, en función de los caudales y las concentraciones de oxidorreductasa, y la degradación podrá ser total o parcial.

La implementación del procedimiento según la invención puede efectuarse en un reactor (figura 1) constituido por un depósito compartimentado que puede estar cerrado en parte o en totalidad, metálico o de material sintético dotado de un orificio de carga (1) y de rebosamiento y/o de diafragmas de sifón, lo que permite el paso de un compartimento

al otro (2).

El reactor incluye tres o cuatro compartimentos de los que dos o tres están sometidos a una agitación permanente:

- 5 - el primero (3) está destinado a recibir el agente catalizador enzimático, el coagulante y el agente espesante, se somete a una agitación a velocidad rápida,
- el segundo (4) recibe el floculante y opcionalmente el corrector de pH, se somete a una agitación a velocidad lenta,
- el tercero en el que se efectúa el aporte de sustrato oxidable, así como el aporte del donador de oxígeno, es asiento de la reacción enzimática deseada y se somete igualmente a una agitación a velocidad lenta,
- 10 - en el cuarto compartimento, la separación del baño de reacción acuoso, en una fracción enriquecida en agente catalizador enzimático en fase sólida y dividida, y una fracción desprovista en dicho agente catalizador, a partir de la cual se obtiene el agente de tratamiento, se efectúa en un dispositivo de sedimentación laminar que incluye una alimentación baja (6), un rebosamiento (7) unido al orificio de salida colocado justo debajo del hilo de agua (8), un punto bajo de extracción dinámica de materiales sólidos sedimentados (9) con vistas a su evacuación (10) o de su
- 15 recuperación para su reciclado (11).

En una variante de realización, la implementación del procedimiento según la invención se efectúa en un reactor (figura 2) constituido por un depósito compartimentado que puede cerrarse en parte o en totalidad, metálico o de material sintético dotado de un orificio de carga (1) de rebosamiento que permite el paso de un compartimento a otro

- 20 y que incluye tres compartimentos en los que los dos primeros están sometidos a una agitación permanente.
- el primero, en el que se introduce el agente catalizador enzimático y el agente emulsionante, se somete a una agitación rápida,
- el segundo, en el que se efectúa el aporte de sustrato oxidable y que es asiento de la reacción enzimática
- 25 deseada, se agita a velocidad lenta;
- el tercer compartimento es un recipiente de recuperación (5) que permite el bombeo en continuo de la emulsión, de la solución que comprende al menos una especie química oxigenada en estado libre y sustratos residuales hacia una unidad de separación que puede ser un dispositivo de coalescencia, un flotador, una centrífuga (6), un filtro o un ciclón.

30 Mediante la aplicación del procedimiento según la invención a la producción de solución de especies químicas oxigenadas en solución por la implementación en forma de agente de floculación de la lactoperoxidasa, en presencia de 0,2 a 0,5 mM, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de 0,4 a 1 mM de KSCN, se obtiene una solución acuosa que contiene entre 0,05 y 0,35 mM de las especies químicas oxigenadas.

35 Esta solución usada para el lavado y la descontaminación de ensaladas mediante duchas y baños sucesivos a 10 °C permite una reducción significativa (2 a 5 Log, en promedio) de la población de contaminantes bacterianos como *Pseudomonas* (10<sup>5</sup> CFU/ml) y una reducción significativa de 1 a 2 Log en *Listeria* (10<sup>5</sup> CFU/ml) con respecto a las ensaladas tomadas como testigo no tratadas, con un tiempo de contacto del orden de 10 minutos.

40 Ejemplo

En un reactor según se describe en la figura 2, se introducen 0,25 g/l de lactoperoxidasa simultáneamente con 10 g/l de arcilla y 0,55 ml de coagulante, después de agitación y paso al compartimento de reacción, se introducen

45 cantidades variables de KSCN y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> según la tabla 1 mostrada a continuación.

Tabla 1

	1	2	3	4
<b>KSCN (mM)</b>	0,5	0,6	0,7	0,8
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM)</b>	0,3	0,4	0,5	0,6

Después de la reacción se efectúan extracciones para medir la actividad enzimática y se obtiene la tasa de especies

50 químicas libres.

Los iones hipotiocianito (OSCN<sup>-</sup>) son capaces de reaccionar con los grupos sulfhidrilo de una molécula de ácido (5,5'-ditiobis)-2-nitrobenzoico reducida previamente en presencia de un exceso de borohidruro de sodio.

55 Esta molécula reducida absorbe la luz a una longitud de onda de 412 nm.

Cuando los iones hipotiocianito ( $\text{OSCN}^-$ ) oxidan los grupos sulfhidrilo, la absorbancia a 412 nm disminuye proporcionalmente a la cantidad de iones presentes en la muestra, lo que permite cuantificarlos.

El ion tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) es capaz de reaccionar con  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido, para formar un producto coloreado cuya cantidad, proporcional a la de tiocianato presente, puede medirse por fotometría para una longitud de onda de 450 nm.

La medida de la cantidad de tiocianato contenido en una muestra necesita la realización de una gama de calibración.

10

Tabla 2

		1	2	3	4
<b>OSCN<sup>-</sup></b>	<b>ADO<sub>412nm</sub></b>	0,855 1/2	0,999 <sup>1/2</sup>	1,250 1/2	1,320 1/2
	<b>[OSCN]mM</b>	0,190	0,220	0,275	0,290
<b>SCN<sup>-</sup> Inicial</b>	<b>DO<sub>450nm</sub></b>	0,242	0,252	0,279	0,310
	<b>[SCN] mM</b>	0,67	0,70	0,77	0,86
<b>SCN<sup>-</sup> residual</b>	<b>DO<sub>450nm</sub></b>	0,184	0,186	0,210	0,237
	<b>[SCN]mM</b>	0,51	0,52	0,58	0,66
<b>pH</b>		6,66	6,62	6,63	6,59
<b>Calidad de coagulación</b>		3/5	3/5	3/5	2,5/5

La actividad enzimática inicial del reactor está controlada en el ensayo n° 4. Esta se realiza a partir de 50 µl de coagulado y corresponde a:

15

$$\Delta DO_{405nm} / 10 \text{ segundos} = 1,023$$

La actividad enzimática se mide con ayuda de un sustrato cromógeno, el 2-2'-azino-bis o ABTS, por colorimetría a 405 nm.

20 La lactoperoxidasa cataliza la oxidación de ABTS en presencia de peróxido de hidrógeno. La molécula de ABTS oxidada presenta la característica de absorber a 405 nm, lo que permite medir la actividad de una solución enzimática según la cantidad de ABTS oxidada producida (proporcional a la  $\text{DO}_{405nm}$  de acuerdo con la ley de Beer-Lambert) por unidad de tiempo, midiendo en modo continuo la absorbancia a 405 nm.

25 *Seguimiento de la estabilidad de la solución*

Se efectúa un seguimiento de la evolución de la concentración de ion hipotiocianito  $\text{OSCN}^-$  en las soluciones a la salida de un reactor por los procedimientos descritos anteriormente.

30 Los resultados obtenidos se ilustran en las figuras 3 y 4, que representan curvas de la evolución de la concentración de ion hipotiocianito  $\text{OSCN}^-$ , en agua en salida del reactor en un periodo de 1 día (figura 4) y 4 días (figura 3).

Los resultados obtenidos muestran (ver figura 4) que después de 10 horas la concentración de  $\text{OSCN}^-$  pasa de 600 mM a 500 mM, y que después de 20 horas esta concentración sólo ha descendido en un 50 %.

35

En un periodo de 4 días, se obtiene (ver figura 3) una curva que muestra una concentración residual de ion hipotiocianito  $\text{OSCN}^-$ , después de 80 horas, igual al 16 % de la concentración inicial.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de producción enzimática de un agente de tratamiento en estado líquido que comprende en estado libre el ion hipotiocianito (OSCN),  
 5 donde:
- a) se forma y se pone en movimiento un baño de reacción acuoso que comprende:
- un sustrato oxidable en fase acuosa seleccionado de tiocianato de sodio (NaSCN) o tiocianato de potasio (KSCN),
  - 10 - un donador de oxígeno seleccionado de peróxido de hidrógeno,
  - un agente coagulante seleccionado de entre sales de aluminio o sales de hierro,
  - un agente espesante seleccionado de entre arcillas, caolín, sílice o silicatos,
  - un agente floculante seleccionado de entre floculantes poliméricos aniónicos o catiónicos, polisacáridos, heteropolisacáridos de tipo aniónico o poliacrilaminas, dicho agente floculante que se introduce en el baño de  
 15 reacción acuoso después de la etapa de coagulación, y
  - un agente catalizador enzimático en fase sólida y dividida, distribuido en dicho baño, siendo dicho agente catalizador lactoperoxidasa,
- para formar agregados de partículas sólidas, que son inertes frente al agente catalizador enzimático, dichos  
 20 agregados comprenden o incorporan dicho agente catalizador en estado libre, es decir, un estado de suspensión en los agregados sin formación de enlaces iónico o covalente entre el agente catalizador y los agentes coagulante y floculante, y estando dichos agregados distribuidos en el baño de reacción acuoso,
- b) se separa el baño de reacción acuoso, en una fracción enriquecida con agregado, y una fracción desprovista de agregado, a partir de la cual se obtiene el agente de tratamiento.  
 25
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el agente catalizador enzimático se introduce en el baño de reacción en estado de fase sólida y dividida.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el agente catalizador enzimático se  
 30 introduce en el baño de reacción en fase líquida.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el sustrato oxidable se introduce en el baño de reacción acuoso en fase acuosa.
- 35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el donador de oxígeno se introduce en el baño de reacción acuoso en fase acuosa.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el agente catalizador enzimático se evacua del baño de reacción.  
 40
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se lleva a cabo de manera continua o discontinua.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el agente coagulante  
 45 se selecciona entre sulfato de aluminio, cloruro de aluminio, aluminato de sodio, polihidroxiclورو de aluminio, polihidroxisulfato de aluminio, polihidroxiclorosulfato de aluminio, policlorosulfato básico de aluminio, polihidroxiclorosulfato de aluminio, fluorosulfato de aluminio, sulfato ferroso, sulfato férrico, cloruro férrico y clorosulfato férrico.
- 50 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** se introduce de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  a 10 g/l de agente coagulante.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** se introduce de 0,1 a 100 g/l de agente espesante.  
 55
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** se introduce de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  a 10 g/l del agente floculante.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** se introduce en el



baño un agente corrector de pH.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** en el baño se introduce un donador de oxígeno en forma de un sistema enzimático complementario que produce peróxido de hidrógeno, y el agente catalizador enzimático comprende, además de la lactoperoxidasa, una enzima del tipo oxidoreductasa.

FIGURA 1

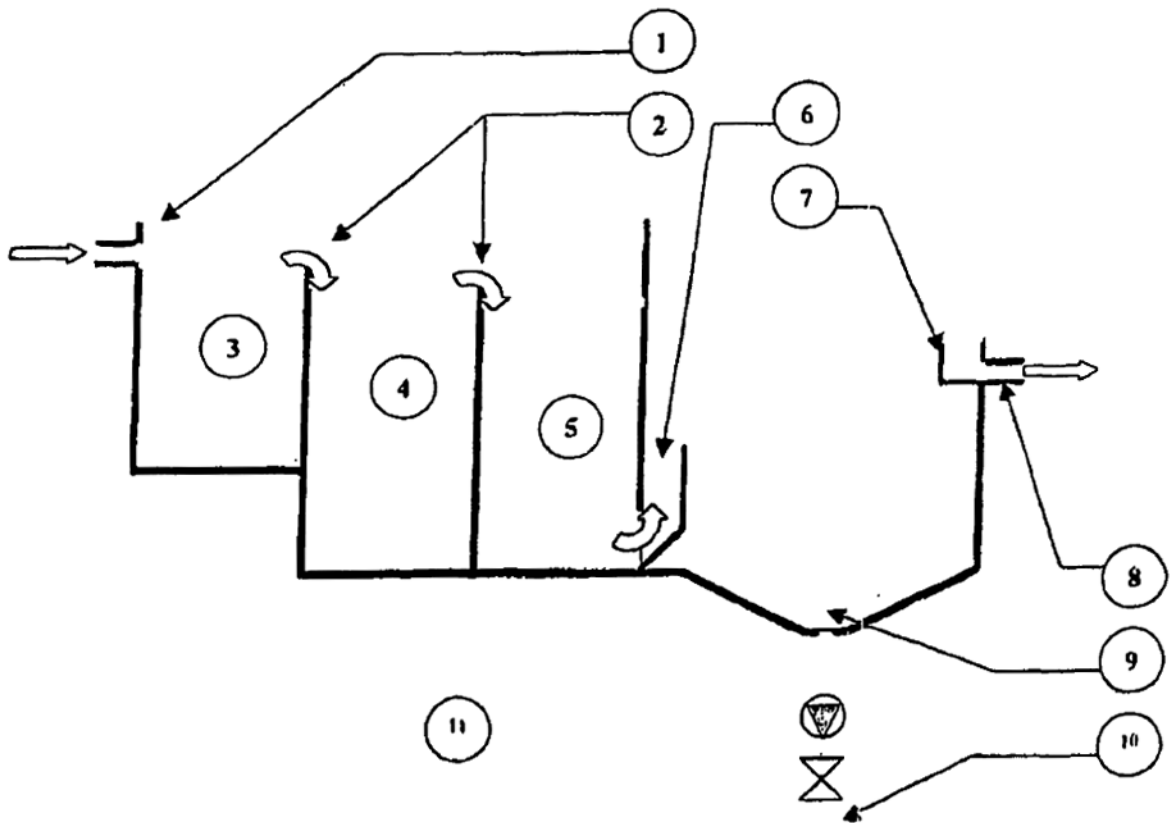


FIGURA 2

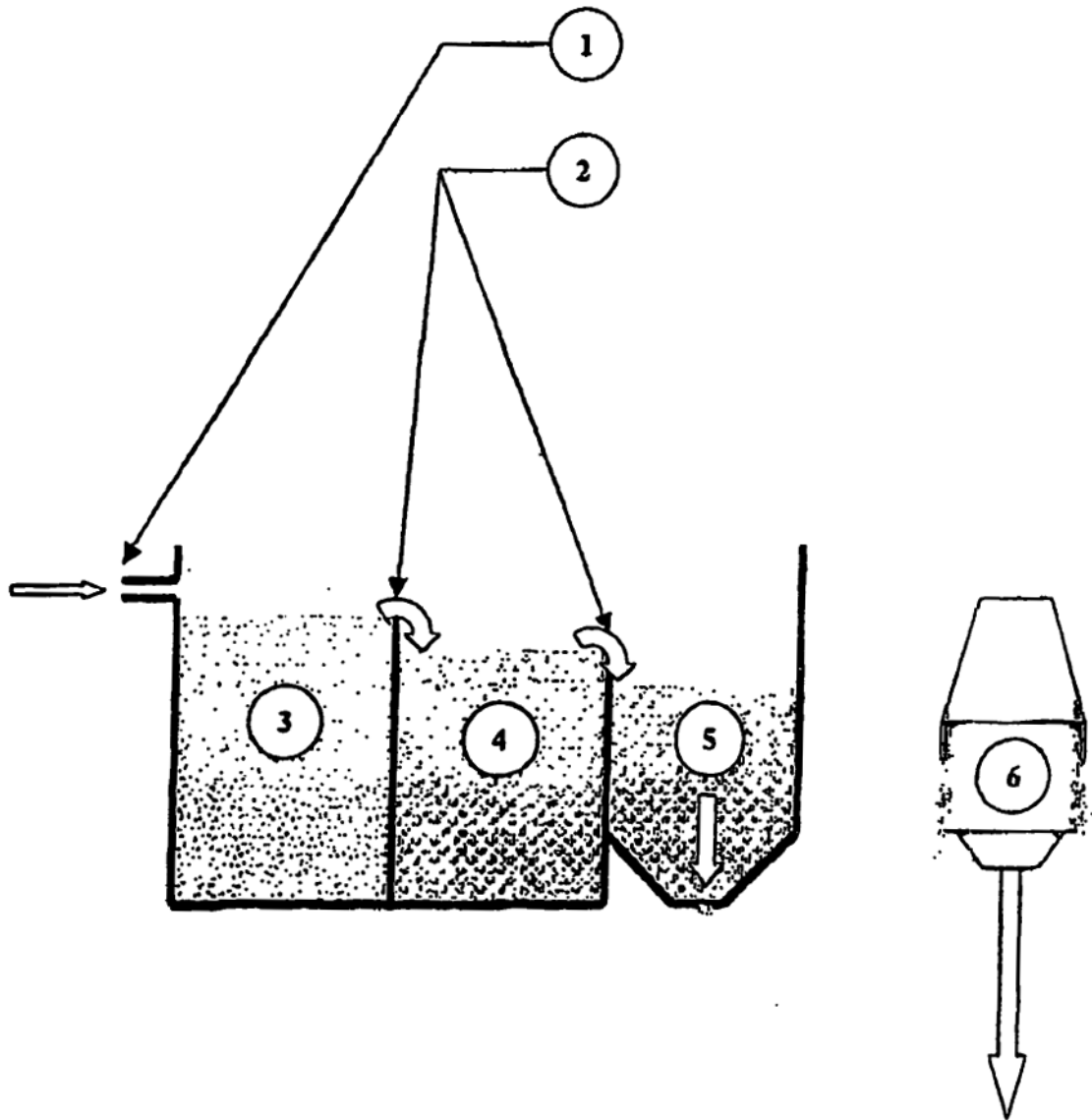


FIGURA 3

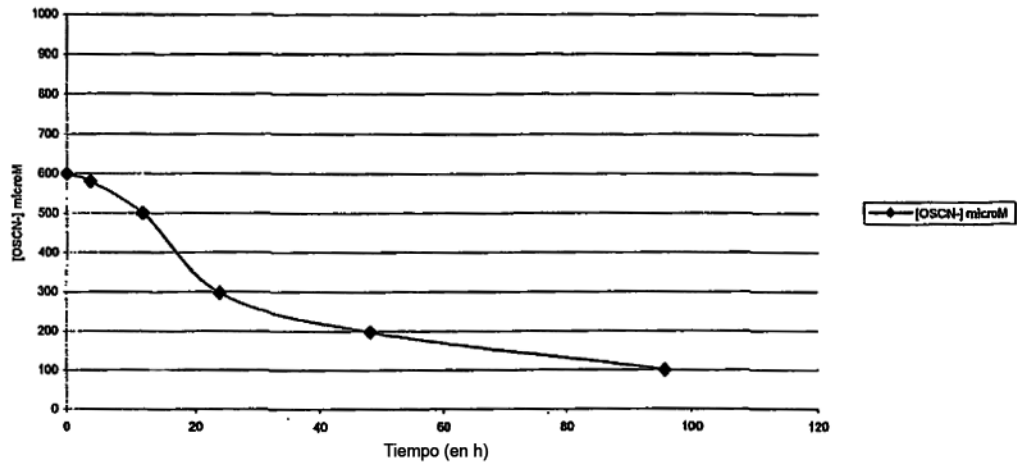


FIGURA 4

