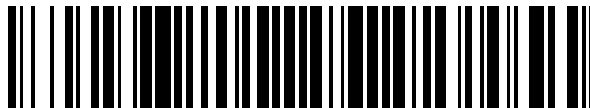


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 215**

51 Int. Cl.:

**A62D 3/00** (2007.01) **C02F 9/00** (2006.01)

**A62D 3/02** (2007.01)

**B09B 3/00** (2006.01)

**B09C 1/10** (2006.01)

**C02F 1/00** (2006.01)

**C02F 3/00** (2006.01)

**C02F 3/34** (2006.01)

**C12N 9/28** (2006.01)

**C12Q 1/40** (2006.01)

**C02F 11/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06802864 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1924717**

54 Título: **Métodos para mejorar la deshidratación de lodo con tratamiento con alfa-amilasa**

30 Prioridad:

**02.09.2005 US 714121 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.11.2014**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)  
77 Perry Chapel Church Road  
Franklinton, NC 27525 , US**

72 Inventor/es:

**DELOZIER, GREGORY y  
HOLMES, JASON**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 523 215 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

Métodos para mejorar la deshidratación de lodo con tratamiento con alfa-amilasa

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a métodos para el aumento de la deshidratación de residuos (es decir lodo) generado por operaciones de tratamiento de aguas residuales convencionales.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Lodo, generado durante el curso de tratamiento de aguas residuales convencionales, es normalmente deshidratado (es decir concentrado) antes de la disposición a través de la incineración, aplicación sobre el terreno, depósito sobre el terreno, compostaje, etc. Un escenario de deshidratación básica implica formar fuertes flóculos de lodo resistentes a fuerte cizalladura a través de la adición de un agente de preparación (por ejemplo sulfato férrico) y/o un agente floculante (por ejemplo polielectrolito) seguido de separación mecánica de sólido/líquido a través de espesadores en cinta por gravedad, prensas de cinta coladora, o centrifugadoras. Por la deshidratación del lodo, la planta de tratamiento de aguas residuales (WWTP) mejora la cantidad de sólidos por unidad volumétrica de lodo (es decir sólidos de la torta) que en última instancia debe ser dispuesta. Los beneficios de sólidos de la torta mayores incluyen: volumen de lodo deshidratado reducido (menos lodo para ser "gestionado" por la planta); costes anuales de transporte inferiores (transporte del lodo a vertederos o sitios de aplicación sobre el terreno); menos agua para ser evaporada antes de que el lodo pueda ser incinerado (aumentando el valor de energía neta del lodo cuando la incineración se usa para fines de cogeneración); una alimentación más concentrada a digestores; y volumen reducido de lodo para ser depositado o aplicado sobre el terreno.

[0003] La composición genérica de lodo es generalmente aproximadamente 90-99% de agua, la parte restante siendo sólidos totales, con masa celular real (es decir células bacterianas) que representa aproximadamente 10% de los sólidos totales. El 90% restante de los sólidos totales consiste en sustancia polimérica extracelular (EPS, por sus siglas en inglés) que forma una matriz hidratada dentro de la cual las células bacterianas son dispersadas. Deshidratación de lodo, independientemente de los medios usados para generar el lodo, ha sido en gran medida asociada a la fracción de EPS del lodo entero. EPS está compuesta de detrito de lisis celular (por ejemplo ácido nucleico, lípidos/fosfolípidos, proteína, etc.), productos extracelulares activamente segregados (por ejemplo polisacáridos y proteínas), productos de actividad enzimática extracelular enlazada a EPS (por ejemplo polisacáridos), material adsorbido de aguas residuales (por ejemplo sustancias húmicas, cationes polivalentes). Debido a esta naturaleza compleja de EPS y la presencia predominante de polisacáridos y proteína, EPS es generalmente caracterizado por la proporción de carbohidratos a proteínas (EPS<sub>carb:prot</sub>). Mientras EPS<sub>carb:prot</sub> puede variar desde el lodo primario al lodo primario dependiente de numerosos parámetros operativos del WWTP, la composición de EPS dentro de lodos secundarios es algo más específica de la digestión: lodo anaeróbicamente digerido EPS<sub>carb:prot</sub> tiende a ser menor que la unidad mientras que el lodo aeróbicamente digerido EPS<sub>carb:prot</sub> es mayor que la unidad. En cualquier caso, estos componentes primarios se consideran ser sustancias hidratables claves dentro de flóculos de lodo que eficazmente enlazan el agua y resisten a la deshidratación.

[0004] Métodos que interrumpen la capacidad higroscópica y/o integridad mecánica de flóculos de lodo se considera que mejoran la deshidratación del lodo entero tras la floculación polimérica. La mayor parte de tales métodos se han focalizado en la capacidad de químicas nuevas (por ejemplo pretratamiento con ácido, acondicionadores catiónicos polivalentes) y procesos (pretratamiento de alta temperatura, descarga eléctrica, sonicación) para interrumpir componentes EPS y mejorar la deshidratación. Existen varios documentos que describen el uso de enzimas para hidrólisis selectiva en la EPS para reducir el volumen de lodo, con resultados variables. Ver DE 10249081, US 2003/014125, WO 91/10723, y DE 3713739.

[0005] EP 291665 (Röhm GmbH) divulga un método para deshidratar el lodo biológico por tratamiento del lodo con enzimas hidrolíticas, y posteriormente con un agente floculante sintético.

55 **Resumen de la invención**

[0006] La presente invención se refiere a métodos para el aumento de la deshidratación de lodo que comprende el tratamiento del lodo antes de la deshidratación mecánica con una composición enzimática que incluye una alfa-amilasa con al menos 90% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en SEC ID n°: 1, donde la alfa-amilasa es derivada de una cepa de *Geobacillus stearothermophilus*. En una forma de realización preferida, la invención se refiere a métodos para el aumento de la deshidratación de lodo que comprende tratar el lodo con una composición enzimática que comprende una alfa-amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0007] En otra forma de realización, el tratamiento comprende una composición enzimática que incluye una alfa-amilasa y al menos una enzima adicional, tal como, una proteasa, una lipasa, una celulasa, una hemicelulasa, una oxidoreductasa, una lacasa, una glicosil hidrolasa y/o una esterasa.

[0008] El tratamiento enzimático es preferiblemente adicionado antes de la preparación de lodo (es decir, antes de la coagulación y/o floculación).

### Breve descripción de los dibujos

5

[0009]

Fig. 1 muestra sólidos de la torta deshidratados como función del aumento de niveles de pretratamiento de alfa-amilasa de *G. stearothermophilus*.

10 Fig. 2 muestra volumen de la torta deshidratado generado por unidad de tiempo como función de dosis de alfa-amilasa de *G. stearothermophilus*.

Fig. 3 muestra sólidos de la torta deshidratados como función del pretratamiento enzimático.

Fig. 4 muestra volumen de la torta deshidratado como función del pretratamiento enzimático.

Fig. 5 muestra sólidos de la torta deshidratados como función del pretratamiento enzimático.

15 Fig. 6 muestra volumen de la torta deshidratado como función del pretratamiento enzimático.

Fig. 7 muestra sólidos de la torta deshidratados como función del pretratamiento enzimático.

### Descripción detallada de la invención

20 [0010] La presente invención se refiere a un medio enzimático para facilitar y/o mejorar el proceso de deshidratación de lodos, tal como, lodos generados durante el tratamiento convencional de aguas residuales.

[0011] Los varios procesos para tratar aguas residuales industriales y municipales frecuentemente generan lodo como un subproducto de operación apropiada. Los lodos generados por la industria del tratamiento de aguas residuales son clasificados no solo por la fuente de aguas residuales (es decir municipales o industriales) sino también por estadios específicos del proceso del tratamiento de aguas residuales. En la clasificación más amplia, el lodo es considerado primario, secundario o terciario. Lodos primarios son normalmente considerados "crudos" puesto que son frecuentemente el resultado del asentamiento de sólidos de aguas residuales crudas influyentes pasados a través de depuradores primarios. En la mayoría de casos, agua aclarada es luego enviada a cuencas de lodo activado (ASB, por sus siglas en inglés) donde los flóculos suspendidos de microorganismos eliminan contaminantes solubles del agua. Como los microorganismos se replican, ellos deben ser periódicamente eliminados del ASB para evitar un crecimiento excesivo. Su eliminación tiene lugar en depurador secundario que recibe el afluente del ASB. Este "lodo secundario" es considerado "lodo activado de residuo" (WAS, por sus siglas en inglés) y tiene una presencia relativamente universal a WWTPs utilizando sistemas de eliminación de nutrientes biológicos (BNR, por sus siglas en inglés). Para reducir el volumen de (y estabilizar) este lodo secundario, el lodo se puede enviar a digestores aeróbicos (aireación ambiental u oxígeno puro) o anaeróbicos que se pueden accionar bajo condiciones bien mesofílicas o termofílicas. El lodo "terciario" resultante es luego conocido como "lodo digerido" y puede ser además clasificado según las características de digestión (por ejemplo lodo termofílico digerido aeróbicamente). Así, como se puede observar, se producen innumerables tipos de lodo durante el tratamiento de aguas residuales. No obstante, pueden ser agrupados libremente como:

- 40
1. lodo primario o crudo;
  2. lodo secundario o activado; y
  3. lodo terciario, estabilizado o digerido

45 [0012] Independientemente del medio por el que fue generado, lodo producido durante las operaciones de tratamiento de aguas residuales, normalmente utilizando algunos medios de retirada de nutriente biológico, contendrá sustancias que sirven como sustratos para hidrólisis enzimática. En la mayoría de casos, este sustrato está presente como un componente de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que comprenden la mayoría de los sólidos de lodo. La composición de EPS varía de lodo a lodo dependiendo de más variables con la naturaleza de las aguas residuales que deben ser tratadas, el proceso de tratamiento empleado y las condiciones de tratamiento. Monosacáridos específicos (por ejemplo glucosa, manosa, galactosa, etc.) tienden a estar universalmente presentes dentro de EPS de lodo. Considerando esto, aunque la composición total del EPS de residuos puede diferir inmensamente, hay algún grado de similitud en el tipo de enlaces glicosídicos presente en los componentes de lodo.

55 [0013] Según la presente invención, composiciones de alfa-amilasa descritas aquí se pueden aplicar a todos los residuos asociados al tratamiento de aguas residuales convencionales específicamente para mejorar la deshidratación. En una forma de realización preferida, las composiciones de alfa-amilasa se aplican a lodos primarios y secundarios generados durante el tratamiento de agua de residuos municipales e industriales. En otra forma de realización preferida, las composiciones de alfa-amilasa se aplican a lodo primario de depuradores primarios, lodo activado de residuos, lodo activado de retorno, lodo aeróbicamente digerido y/o lodo anaeróbicamente digerido. Un fin de la presente invención es facilitar o mejorar el proceso de deshidratación de lodo que comprende tratar el lodo con una alfa-amilasa, preferiblemente, antes de las operaciones de preparación y de deshidratación de lodo convencionales.

60 [0014] El proceso para mejorar la deshidratación de lodo según la presente invención comprende los siguientes pasos:  
 a) generar lodo, tal como, durante el tratamiento convencional de aguas residuales;  
 65 b) tratar el lodo con una composición enzimática de alfa-amilasa, donde la alfa-amilasa tiene al menos 90% de identidad a la alfa-amilasa como se muestra en SEC ID n°: 1, y donde la alfa-amilasa es derivada de una cepa de *Geobacillus*

*stearothermophilus*;

- c) opcionalmente, preparar el lodo con aditivos de coagulación y/o floculación ;
- d) deshidratar el lodo tratado con alfa-amilasa con el equipamiento convencional.

5 [0015] Además de los pasos anteriores otros pasos opcionales pueden ser incluidos, tal como, por ejemplo, tratamiento del lodo con enzimas tanto antes como después de los pasos de digestión/estabilización.

10 [0016] Alfa-amilasas para usar en el tratamiento enzimático son aquellas derivadas de cepas de *Geobacillus stearothermophilus* (precedentemente *Bacillus*). Como se utiliza en este caso "derivado de", como en, por ejemplo, "derivado de *Geobacillus stearothermophilus*" significa una enzima alfa-amilasa tipo salvaje y sus variantes. Tales enzimas también pueden prepararse sintéticamente, como es bien conocido en la técnica.

15 [0017] En una forma de realización particularmente preferida, la alfa-amilasa es la composición enzimática de alfa-amilasa comercial AQUAZYM ULTRA™ (disponible de Novozymes North America, Inc.) Alfa-amilasas preferidas están descritas en las solicitudes PCT nos. WO 96/23873 y WO 99/19467. En otra forma de realización preferida, la composición enzimática comprende una alfa-amilasa con al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad a una alfa-amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* como se muestra en SEC ID nº: 1. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el Software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de Gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10. Parámetros de alineamiento por pares son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5, y diagonales=5.

25 [0018] La alfa-amilasa se aplica en cantidades eficaces para facilitar o mejorar el proceso de deshidratación de lodo comprendiendo tratar el lodo con una alfa-amilasa, preferiblemente, antes de las operaciones de preparación y de deshidratación de lodo convencionales. Ejemplos de cantidades adecuadas incluyen 2 a 140 g de proteína por kg de sólidos totales suspendidos, 2 a 70 g de proteína por kg de sólidos totales suspendidos, 2 a 35 g de proteína por kg de sólidos totales suspendidos, de forma más preferible 2 a 15 g de proteína por kg de sólidos totales suspendidos, 2-8 g de proteína por kg de sólidos totales suspendidos, y 2 a 5 g de proteína por kg de sólidos totales suspendidos.

30 [0019] La alfa-amilasa se puede aplicar bajo condiciones adecuadas para condiciones de tratamiento de lodo, tal como, por ejemplo, temperaturas de 5 a 40°C, condiciones de pH de 4 a 10, y para un tiempo de tratamiento de 0,5 a 30 horas, tal como, 1 min. a 24 horas, 30 min. a 12 horas, y 1 hora a 2 horas.

35 [0020] El tratamiento de alfa-amilasa también puede implicar la adición de una o varias enzimas adicionales. Enzimas adicionales preferidas incluyen una proteasa, una lipasa, una celulasa, una hemicelulasa, una oxidoreductasa, una lacasa, una glicosil hidrolasa y/o una esterasa.

## EJEMPLOS

40 Ejemplo 1. Alfa-amilasa de *G. stearothermophilus* mejora la deshidratación de lodo activado de residuos industriales

Procedimiento:

45 [0021]

1. 400 ml de lodo activado de residuos, cosechado de una cuenca de lodo activado de Novozymes North America, (1.4% TS, pH 7.2) fueron adicionados a (6) matraces de 500 ml.
2. El contenido de cada matraz fue luego dosificado con alfa-amilasa formulada de *G. stearothermophilus* (AQUAZYM ULTRA™) según el programa más abajo:

50

Prueba #	Dosis (g proteína/DT TSS)	Vol de Lodo (ml)	TSS(%)
1	0	400	1.4
2	3.486	400	1.4
3	6.971	400	1.4
4	13.943	400	1.4
5	41.829	400	1.4
6	69.714	400	1.4

60 3. Los matraces fueron luego agitados, a temperatura ambiente, durante 60 minutos utilizando un agitador rotatorio (asegurando que los RPMs fueron suficientes para evitar que los sólidos de lodo formen zonas de separación dentro del matraz sin sobrecortar los flóculos de lodo por agitación excesiva).

4. Al final de la incubación, el lodo contenido dentro de cada matraz fue acondicionado, deshidratado y el grado de deshidratación determinado según el procedimiento más abajo:

- 65
- a. El contenido de los matraces fue transferido a un vaso de precipitados de plástico de 500 ml.
  - b. Una dilución de 0.5% p/p de emulsión de polímero (Cytec CPAM), preparado al menos 30 minutos antes de

aplicación, se añadió al lodo para asegurar una dosis de 6.5 kg sólidos de lodo de polímero/DT.

c. Un propulsor fue usado para mezclar lentamente el lodo durante 15 segundos (empíricamente determinado para asegurar una floculación adecuada del lodo).

5 d. Después de la floculación (es decir "preparación"), el lodo fue rápidamente vertido en la cápsula de drenaje por acción de la gravedad de la Crown Press (Phipps & Bird, Richmond, Virginia) y dejado drenar durante 60 segundos (el volumen de filtrado recogido durante este drenaje por acción de la gravedad se considera filtrado "sin drenaje").

e. La torta de lodo fue luego transferida a la correa inferior de la Crown Press (idealmente, como una unidad/pastel de lodo) e inmediatamente prensada según el programa de presión siguiente:

Presión (psi)	10	0	20	0	30	0	40	0	50	0	60	0	70
Duración (segundos)	30	10	15	10	15	10	10	10	10	10	10	10	10

10

f. Los sólidos % en la torta deshidratada fueron determinados según métodos estándares para el examen de agua y aguas residuales 2540 B. "Sólidos totales secados a 103-105°C". TSS dentro del filtrado total recuperado del drenaje por acción de la gravedad y prensado fue determinado también.

15

g. Estos valores fueron usados para determinar el volumen total de lodo prensado (se presume que representa una base "por unidad de tiempo" ) por un balance de masa (teniendo en cuenta el volumen adicional en la alimentación debido a la adición polimérica).

20

[0022] Figuras 1 y 2 presentan los resultados de la prueba que claramente muestran que dosis pequeñas de alfa-amilasa de *G. stearothermophilus* pueden aumentar los sólidos de la torta hasta en un 0,56% y simultáneamente reducir el volumen de la torta deshidratada un 3,34%. Considerando que el porcentaje de sólidos totales de NZWAS es 1.4%, adición 0.5 kg de la versión formulada de la enzima por tonelada seca de sólidos equivale a una dosificación de 7 ppm en la alimentación de lodo. Esto significa que los beneficios se pueden obtener con niveles de adición de enzimas relativamente bajos.

25

Ejemplo 2. Aumento de la deshidratación de lodo primario municipal.

Procedimiento:

[0023]

30

1. 400 ml de lodo primario (3% TSS, pH 6.8), recién cosechado de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales locales fueron divididos en partes alícuotas en (2) matraces de 500 ml.

2. Los matraces fueron luego dosificados según el programa a continuación:

Prueba #	Enzima	Dosis (g proteína/DT TSS)	Lodo Vol (ml)	TSS(%)
1	Control	0	400	3
2	$\alpha$ -amilasa de <i>G. stearothermophilus</i>	4.601	400	3

35

3. Todos los matraces fueron incubados, preparados y deshidratados según el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

40

[0024] Las Figuras 3 y 4 presentan las características de torta deshidratada obtenidas del lodo primario pretratado enzimáticamente cosechado de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales locales. Otra vez, después de solo 60 minutos de incubación, el pretratamiento con  $\alpha$ -amilasa de *G. stearothermophilus* es capaz de mejorar sólidos de la torta (~1.43% aumento) y simultáneamente reducir el volumen de lodo deshidratado (7.5% reducción).

Ejemplo 3. aumento la deshidratación de lodo activado de residuos municipales.

Procedimiento:

45

[0025]

1. Lodo activado de retorno recién cosechado, RAS, de una planta de tratamiento de aguas residuales locales fue dejado reposar bajo condiciones quiescentes durante 60 min.

2. El sobrenadante fue decantado y el TSS determinado para el lodo reposado.

50

3. 400 ml del lodo activado de retorno reposado (0.77% TSS, pH 6.5) fueron adicionados a (6) matraces de 500 ml.

4. El contenido de cada matraz fue luego dosificado según el programa a continuación con una alfa-amilasa o una alfa-amilasa maltogénica (alfa-amilasa A: una alfa-amilasa de *G. stearothermophilus*; alfa-amilasa B: una variante de *G. stearothermophilus*; alfa-amilasa C: una alfa-amilasa maltogénica; alfa-amilasa D: STAINZYME disponible de Novozymes):

55

Prueba #	Enzima	Dosis (g proteína/DT TSS)	Lodo Vol (ml)	TSS(%)
1	Control	0	400	0.77
2	$\alpha$ -amilasa A de <i>G. stearothermophilus</i>	13.943	400	0.77
3	$\alpha$ -amilasa B (variante de $\alpha$ -amilasa de <i>G.</i>	13.943	400	0.77

	<i>stearothermophilus</i> )			
4	Alfa-amilasa maltogénica C	13.943	400	0.77
5	$\alpha$ -amilasa D (STAINZYME)	13.943	400	0.77
6	Control	0	400	0.77

5. Todos los matraces fueron luego incubados, preparados y deshidratados según el procedimiento perfilado en el ejemplo 1.

5 [0026] La Figura 5 presenta los resultados obtenidos directamente de la torta deshidratada (es decir sólidos de la torta) y figura 6 presenta aquellas obtenidas de un cálculo del balance de masa (es decir volumen de la torta por unidad de tiempo). Los resultados claramente muestran que por tratamiento previo del WAS municipal espesado con 1 kg de  $\alpha$ -amilasa de *G. stearothermophilus* por tonelada en seco de sólidos de lodo, el efecto es bastante drástico.

10 [0027] Sólidos de la torta fueron aumentados en más del 7% que, tomado con el porcentaje de sólidos en el prensado, produce una reducción en el volumen total de la torta que debe en última instancia ser eliminado, sobre un 40%. De manera interesante, una variante de la  $\alpha$ -amilasa de *G. stearothermophilus* fue también encontrada para mejorar la deshidratación del WAS. No obstante, la actividad de la alfa-amilasa A de *G. stearothermophilus* es aproximadamente dos veces aquella de la variante de alfa-amilasa B de *G. stearothermophilus*.

15 Ejemplo 4. Aumento de la deshidratación de lodo activado de residuos de procesadoras de pulpa y papel.

Procedimiento:

20 [0028]  
 1. 600 g de lodo biológico de procesadora de pulpa (obtenido de operaciones de tratamiento de aguas residuales en una fábrica de papel sueca) fueron colocados en (3) vasos de precipitación de 1000 ml.  
 2. Mientras se agitaban todos los residuos con una barra de agitación en un placa de agitación, alfa-amilasa de *G. stearothermophilus* fue dosificada en cada vaso de precipitados según el programa a continuación:

25

Vaso de precipitados #	Enzima	Dosis (g de proteína/DT TSS)	TS (%)
1	$\alpha$ -amilasa A de <i>G. stearothermophilus</i>	0	1.05
2	$\alpha$ -amilasa A de <i>G. stearothermophilus</i>	6.971	1.05
3	$\alpha$ -amilasa A de <i>G. stearothermophilus</i>	13.943	1.05

3. Después de 60 minutos de agitación, 500 ml de cada lodo fue preparado con 9.71 kg de Fennopal K594 (Kemira; Suecia) por tonelada seca de sólidos de lodo.

30 4. El lodo floculado fue inmediatamente vertido en un embudo equipado con una tela de prensa de cinta coladora y se dejó drenar libremente durante 5 minutos, tiempo durante el cual el peso de filtrado como función de tiempo de drenaje fue registrado (realizado por la captura del filtrado dentro de un cilindro graduado de 1 L de tara colocado en una escala digital)

5. Al cabo de 5 minutos, una muestra del filtrado fue recogida para determinar TS%

35 6. La torta de lodo resultante fue transferida a un barco de pesaje de aluminio y homogeneizada (con una espátula) para asegurar humedad constante.

7. 60 g de lodo húmedo fueron colocados en un filtro de café y deshidratado durante 20 minutos dentro de un dispositivo a medida diseñado para simular una prensa de cinta coladora.

8. El peso del lodo floculado restante en el barco de pesaje fue registrado y luego el barco fue colocado para secarse durante toda la noche a 105°C, tiempo después del cual los sólidos del lodo espesado fueron determinados.

40 9. Después de los 20 minutos de prensado, las tortas de lodo deshidratado fueron eliminadas de ambos dispositivos y usadas para determinar el porcentaje de sólidos de la torta obtenibles a través de cada método.

45 10. Para justificar las diferencias en la cantidad total de sólidos en los 60 g de lodo húmedo prensado en el simulador de prensa coladora a medida (una consecuencia de diferentes grados de eliminación de agua durante los estadios de espesamiento individuales), los sólidos de la torta calculados para cada muestra de lodo prensado individuales fueron multiplicados por el porcentaje de sólidos obtenidos durante su espesamiento y luego el producto fue dividido por el promedio de sólidos espesados obtenidos de todas las muestras de la prueba.

50 [0029] Tras la deshidratación mecánica a través de la simulación de prensa de cinta coladora, los sólidos de la torta fueron mejorados por 7 puntos de porcentaje, por tratamiento previo del lodo con 6,971 g de  $\alpha$ -amilasa de *G. stearothermophilus* por tonelada seca de sólidos de lodo totales sobre el control no tratado. La mejora fue ligeramente inferior cuando la dosis enzimática fue doblada (posiblemente debido a hidrólisis excesiva de los flóculos de lodo que conducen a la pérdida de integridad mecánica y fragmentación).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0030]

- 5 <110> DeLozier, Gregory  
Holmes, Jason
- <120> Métodos para mejorar la deshidratación de lodo con tratamiento con alfa amilasa
- 10 <130> 10872.204-WO
- <160> 1
- <170> Versión de patentIn 3.3
- 15 <210> 1  
<211> 487  
<212> PRT  
<213> Geobacillus Stearothermophilus
- 20 <400> 1

ES 2 523 215 T3

Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Pro  
 1 5 10 15

Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn Leu  
 20 25 30

Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 35 40 45

Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 65 70 75 80

Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met Gln  
 85 90 95

Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly Thr  
 100 105 110

Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln Glu  
 115 120 125

Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro  
 130 135 140

Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe  
 145 150 155 160



ES 2 523 215 T3

Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr Lys  
 165 170 175  
 Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Asn  
 180 185 190  
 Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro  
 195 200 205  
 Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr  
 210 215 220  
 Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe  
 225 230 235 240  
 Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys  
 245 250 255  
 Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu  
 260 265 270  
 His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala  
 275 280 285  
 Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala Phe  
 290 295 300  
 Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala  
 325 330 335  
 Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe  
 340 345 350  
 Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr  
 355 360 365  
 Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile Asp  
 370 375 380  
 Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp  
 385 390 395 400

ES 2 523 215 T3

Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val Thr  
405 410 415

Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
420 425 430

Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe  
435 440 445

Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp  
450 455 460

Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val  
465 470 475 480

Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser  
485

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para mejorar la deshidratación de lodo que comprende la adición de una alfa-amilasa al lodo antes del equipo de deshidratación mecánica, donde la alfa-amilasa es una alfa-amilasa con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en SEC ID n°: 1, y donde la alfa-amilasa es derivada de una cepa de *Geobacillus stearothermophilus*.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa tiene al menos 90% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en SEC ID n°: 1 como se determina utilizando el método Clustal (Higgins, 1989, CBIOS 5: 151-153) utilizando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de gap de 10 y penalización de longitud de gap de 10; los parámetros de alineamiento de pares son Ktuple=1, penalización de gap=3, ventanas=5, y diagonales=5.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la alfa-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en la SEC ID n°: 1.
4. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la alfa-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en la SEC ID n°: 1.
- 20 5. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la alfa-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en la SEC ID n°: 1.
- 25 6. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la alfa-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en la SEC ID n°: 1.
7. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la alfa-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad a la alfa-amilasa mostrada en la SEC ID n°: 1.
- 30 8. Método según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 1.
9. Método según la reivindicación 1, donde la dosis de alfa-amilasa está comprendida entre 2 y 140 g, preferiblemente entre 2 y 70 g, de forma más preferible entre 2 y 35 g, incluso de forma más preferible entre 2 y 8 g, o de la forma más preferible entre 2 y 5 g por tonelada de sólidos totales suspendidos en seco.
- 35 10. Método según la reivindicación 1, donde la enzima se deja incubar con el lodo durante 1 minuto hasta 24 horas, preferiblemente durante 30 minutos a 12 horas, o 1 hora a 2 horas.
- 40 11. Método según la reivindicación 1, donde el lodo se genera durante operaciones de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales convencionales.
12. Método según la reivindicación 9, donde el lodo es seleccionado del grupo que consiste en el lodo primario de depuradores primarios, lodo activado de residuos, lodo activado de retorno, lodo digerido anaeróbicamente y lodo digerido aeróbicamente.
- 45 13. Método según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa se añade en combinación con una o varias proteasas, lipasas, celulasas, hemicelulasas, oxidorreductasas, lacasas, glicosil hidrolasas y/o esterases.

FIG. 1

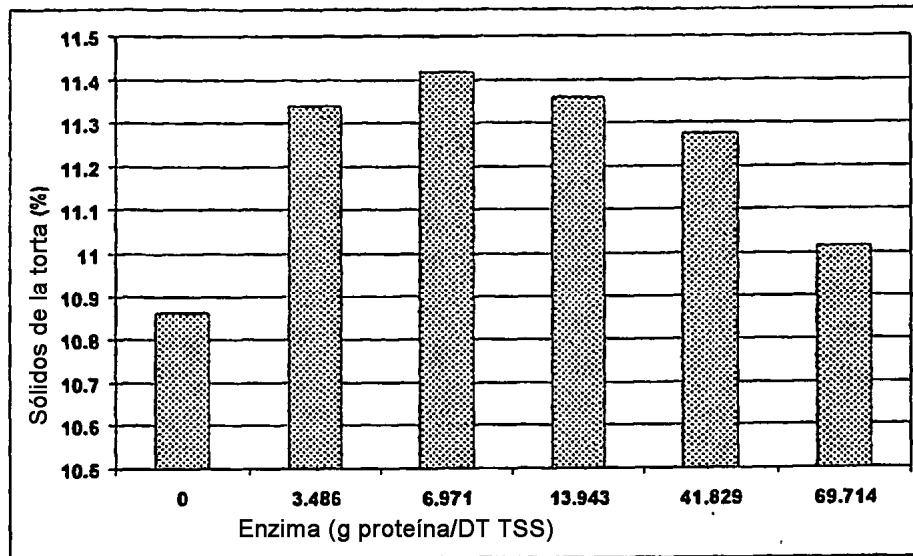
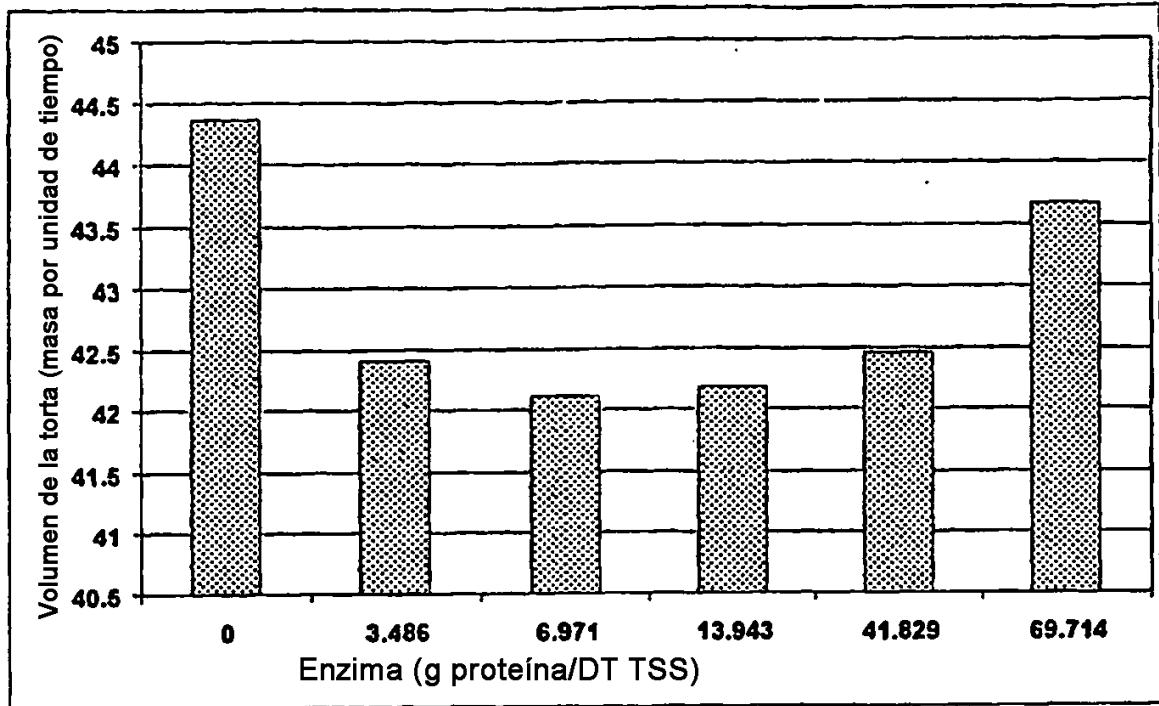


FIG. 2



**FIG. 3**

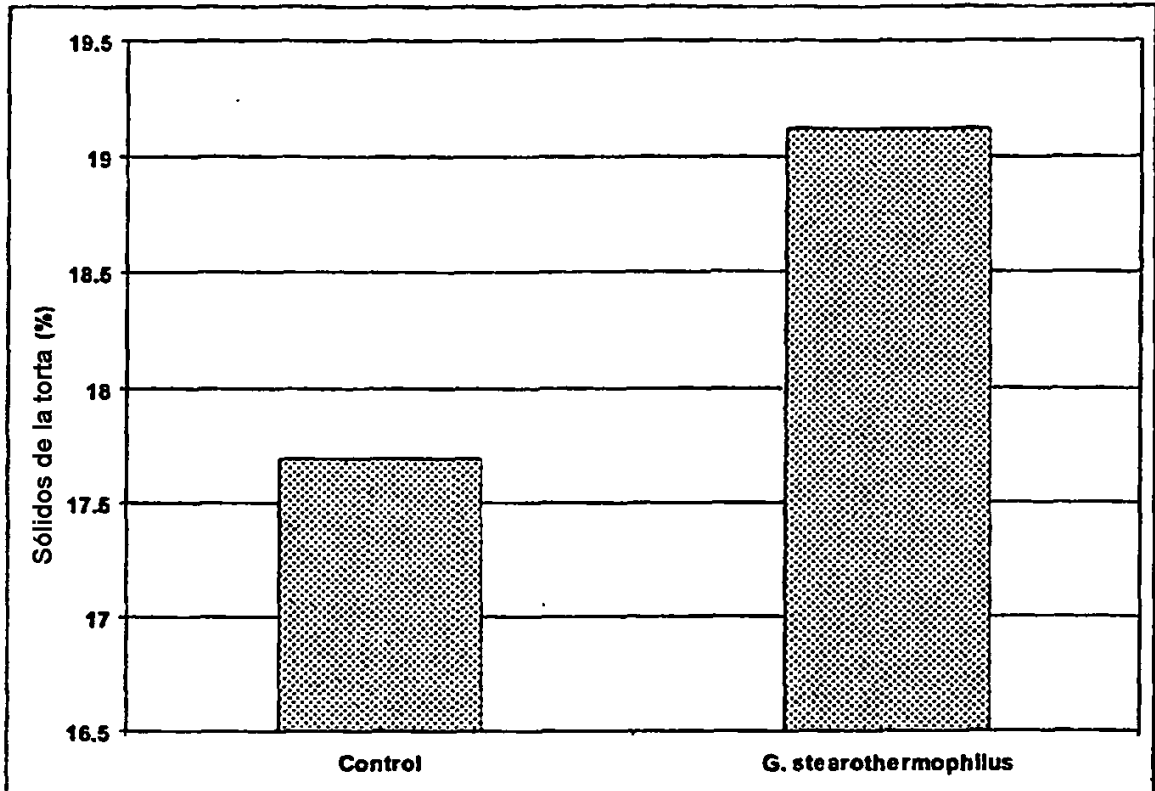


FIG. 4

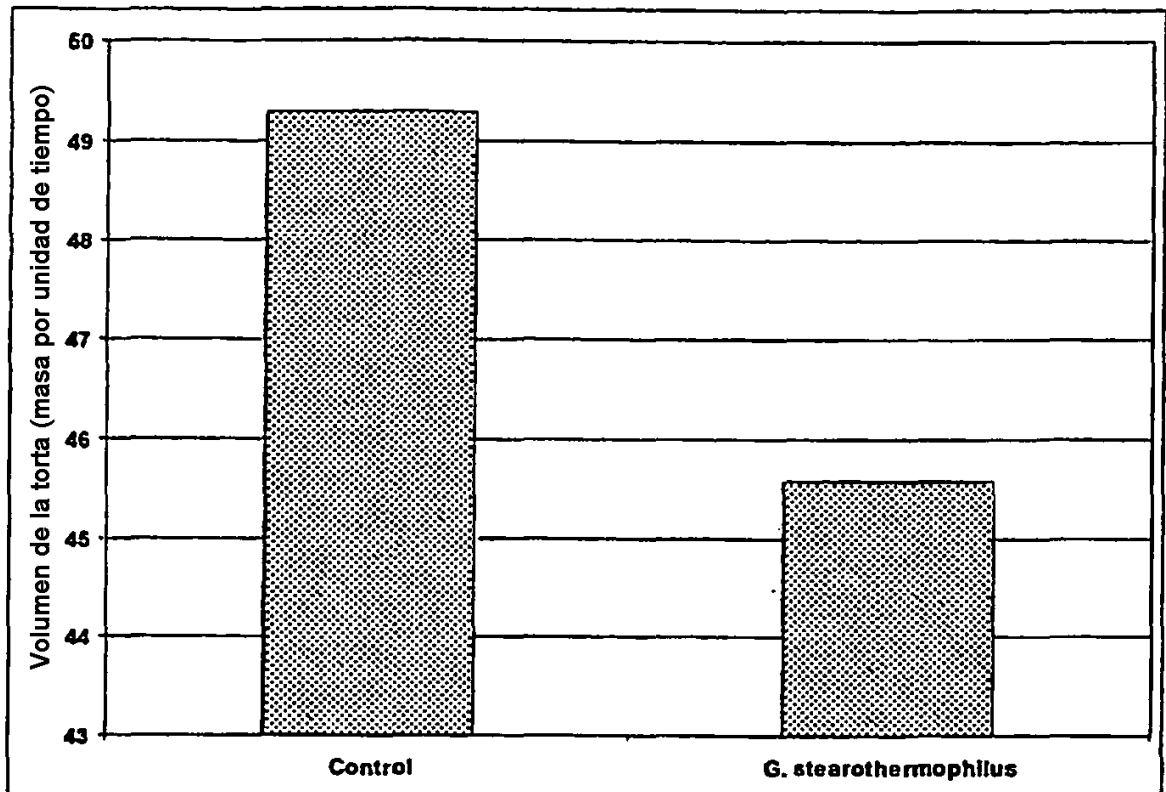


FIG. 5

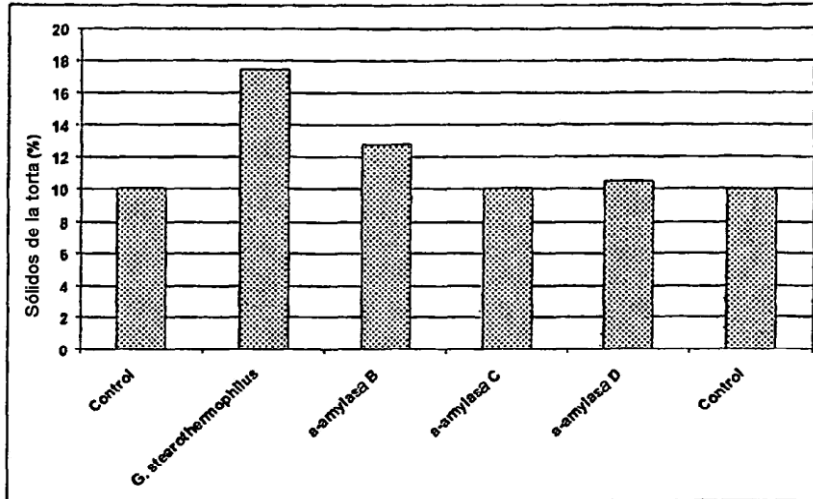




FIG. 6

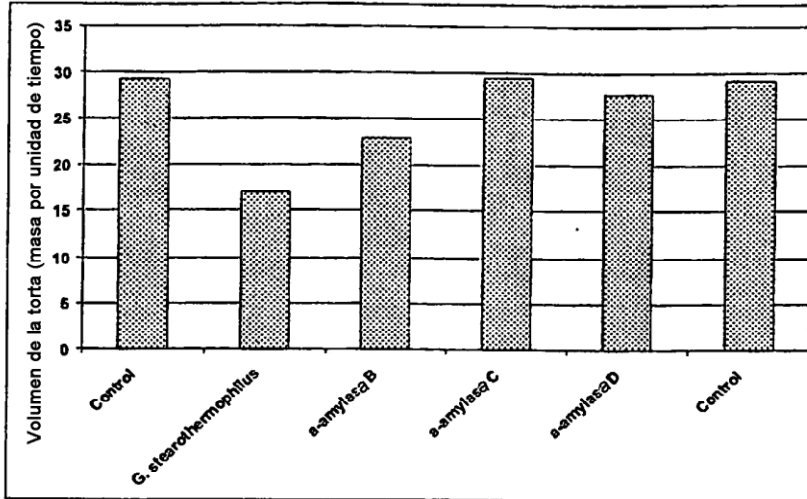


Fig. 7

