

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 111**

21 Número de solicitud: 201531599

51 Int. Cl.:

**C02F 3/00** (2006.01)

**C02F 101/30** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**06.11.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**10.02.2016**

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

**MOLDES DIZ, Yolanda;  
EIBES GONZÁLEZ, Gemma;  
ARCA RAMOS, Adriana;  
VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Carlos;  
FONDADO FONDADO, Alfonso;  
MIRA PÉREZ, Jorge;  
LEMA RODICIO, Juan Manuel;  
FEIJOO COSTA, Gumersindo y  
MOREIRA VILAR, María Teresa**

74 Agente/Representante:

**PARDO SECO, Fernando Rafael**

54 Título: **Procedimiento y sistema para la eliminación de microcontaminantes mediante un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas y unidad de separación interna**

57 Resumen:

Procedimiento y sistema para la eliminación de microcontaminantes mediante un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas y unidad de separación interna. La presente invención se refiere a un procedimiento y un sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes de EDAR o efluentes industriales por enzimas, peroxidasas o lacasas, inmovilizadas sobre nanopartículas magnéticas mediante el uso de reactor enzimático con separación magnética.

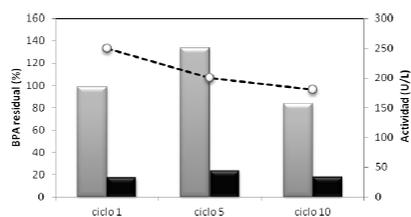


FIGURA 4

## DESCRIPCIÓN

**Procedimiento y sistema para la eliminación de microcontaminantes mediante un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas y unidad de separación interna****5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un procedimiento y sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos, tales como tintes industriales y compuestos disruptores endocrinos que están presentes en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales tras el tratamiento secundario, así como en efluentes industriales.

**10 ESTADO DE LA TÉCNICA**

La descarga al medio acuático de contaminantes orgánicos recalcitrantes afecta significativamente a la viabilidad de reutilización del agua tratada en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) debido a los posibles efectos perjudiciales que estos compuestos tienen sobre los seres vivos, incluso a concentraciones traza ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Destacan los Compuestos Disruptores Endocrinos (CDE), un grupo de sustancias de origen natural o antropogénico con capacidad de alterar las funciones del sistema endocrino y, en consecuencia, pueden causar efectos adversos en un organismo y su progenie. Estos compuestos han sido catalogados como contaminantes emergentes y han recibido especial atención puesto que son eliminados solo parcialmente en los procesos convencionales de las EDAR, liberándose de forma continua al medio ambiente (Liu Z. et al., 2009; *Sci Total Environ* 407: 731-748).

En los efluentes de empresas textiles o papeleras resulta muy característico, incluso tras un sistema de tratamiento convencional, la presencia de microcontaminantes orgánicos en los efluentes como son los tintes sintéticos, de naturaleza recalcitrante (Rani B. et al., 2014; *Braz J Microb* 45: 1055-1063).

En los últimos años se han desarrollado diferentes post-tratamientos para la eliminación de microcontaminantes orgánicos basados en procesos de oxidación avanzada como ozonización, fotodegradación, hipoclorito u óxidos de cloro, fotocatalisis, ultrasonidos, etc. No obstante, por lo general, estos post-tratamientos son caros, tienen poca especificidad (Esplugas S. et al., 2002; *Water Res* 36: 1034-1042) y, en ocasiones, generan subproductos que potencialmente pueden resultar más dañinos que el compuesto original (Shapell N.W. et al., 2008; *Environ Sci Technol* 42: 1296-1300).

Una alternativa para la transformación de estos microcontaminantes en productos menos tóxicos es el tratamiento enzimático, bien porque se favorezca la polimerización y transformación en moléculas sin acción disruptora endocrina o bien porque se transformen en productos más fácilmente degradables (Galliker P. et al., 2010; *J Colloid Interface Sci* 349: 98-105).

Las enzimas oxidoreductasas se han aplicado con éxito en la eliminación de diferentes CDE, tales como el bisfenol A (BPA), nonilfenol, triclosan (Cabana H. et al., 2007; *Eng Life Sci* 7: 429-456) y tintes sintéticos como methyl green (MG), remazol brilliant blue B y reactive black (Kunamneni A. et al., 2008; *Process Biochem* 43: 169-178). Entre las oxidoreductasas se encuentran fundamentalmente dos tipos: peroxidasas, tales como lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa versátil (VP), peroxidasa de rábano (HRP) y manganeso peroxidasa (MnP) u oxidasas, tales como lacasa (Lac).

Las peroxidasas 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 enzima LiP (EC 1.11.1.13) se caracteriza por su alto potencial redox que permite la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos como el alcohol veratrílico (Camarero S. et al., 1999; *J Biol Chem* 274: 10324-10330). En el caso de MnP (EC 1.11.1.14), esta enzima oxida  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$ , el cual actúa como agente difusible oxidando tanto unidades fenólicas como no fenólicas a través de la peroxidación de lípidos (Wariishi H. et al., 1988; *Biochemistry* 27: 5365-5370). La enzima VP (EC 1.11.1.16) es considerada un híbrido entre MnP y LiP, ya que es capaz de oxidar el  $\text{Mn}^{2+}$  y también compuestos no fenólicos de alto potencial redox como el alcohol veratrílico (Wong D., 2009; *Appl Biochem Biotech* 157: 174-209). Finalmente, la enzima HRP (EC 1.11.1.7) permite la oxidación de sustratos como compuestos fenólicos y aminas aromáticas (Ben-Pei W. et al., 2014; *J Mol Catal B-Enzym* 101: 101-107).

En varios estudios se ha demostrado la capacidad de las peroxidasas para degradar microcontaminantes. Como ejemplos se puede destacar que Cheng W. et al., 2012; *Enzyme Microb Tech* 50: 204-208 llevaron a cabo la degradación de fenol, hormonas naturales como la estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3), y hormonas sintéticas como el etinilestradiol (EE2) ) utilizando la enzima HRP. Taboada-Puig R. et al., 2011; *Bioresour Technol* 102: 6593-6599 emplearon VP inmovilizada en CLEAs para eliminar bisfenol A, nonilfenol, triclosan y 17  $\alpha$ -estradiol).

Lacasa (EC 1.10.3.2) es una enzima con actividad fenoloxidasas que contiene átomos de cobre en su centro activo y cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustancias orgánicas, en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua (Kunamneni A. et al., 2008; *Process Biochem* 43: 169-178). La amplia especificidad de sustrato, el empleo de oxígeno como aceptor de electrones, y la generación de agua como único subproducto de la reacción (Bourbonnais R. et al., 1990; *FEBS* 1: 99-102), confieren a la enzima alta aplicabilidad en diversos procesos biotecnológicos. A pesar de que poseen un potencial redox máximo de 0,8 V, inferior al de las peroxidasas ligninolíticas, la presencia de sustratos de bajo peso molecular, denominados mediadores, permite la oxidación indirecta de un amplio rango de compuestos fenólicos y no fenólicos (Cañas A. et al., 2010; *Biotechnol Adv* 28: 694-705).

10 La capacidad de lacasas para eliminar microcontaminantes ha quedado demostrada en un gran número de trabajos. Como ejemplo, se puede señalar que Auriol M. et al., 2008; *Chemosphere* 70: 445-452 emplearon lacasa de *Trametes versicolor* para eliminar la actividad estrogénica asociada a hormonas naturales y sintéticas. Lloret L. et al., 2010; *Bioch Eng Journal* 51: 124-131 usaron lacasa de *Myceliophthora thermophila* para eliminar diversos microcontaminantes del grupo de los antiinflamatorios: naproxeno, diclofenaco y diversas hormonas. Esta misma lacasa también se aplicó con éxito para degradar bisfenol A, nonilfenol y triclosán (Cabana H. et al., 2007; *Chemosphere* 67: 770-778).

20 No obstante, por razones técnicas y económicas, en la mayoría de los procesos catalizados por enzimas es necesario reutilizar o emplear de manera continua el biocatalizador, por lo que el empleo de enzima libre como tratamiento terciario no resulta viable (Katchalski-Katzir E. et al., 2000; *J Mol Catal B-Enzym* 10: 157-176). En este contexto, la inmovilización de enzimas puede ser considerada una alternativa.

La inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos ofrece numerosas ventajas sobre el uso de enzima libre, ya que la separación de la enzima inmovilizada de la mezcla de reacción mediante métodos físicos, tales como filtración o sedimentación (centrifugación) es más sencilla, y pueden ser utilizadas en repetidas ocasiones.

25 Entre los soportes, el empleo de nanopartículas magnéticas proporciona una serie de ventajas tales como elevada área superficial, carga de enzima alta, minimización de problemas de difusión y recuperación fácil y rápida del biocatalizador del medio de reacción aplicando un campo magnético externo. De este modo, las enzimas se someten a una tensión mecánica mucho menor comparándolo con la centrifugación y sedimentación.

30 En varios estudios recientes se ha demostrado que es posible la inmovilización de las enzimas sobre diferentes tipos de nanopartículas magnéticas con resultados satisfactorios. Como ejemplo se puede destacar que Zimmermann Y. et al., 2011; *Appl Microbiol Biot* 92: 169-178 llevaron a cabo la inmovilización de lacasa *Corioloopsis polyzona* sobre nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice. Kalkan N. et al., 2012; *J Appl Polym Sci* 123: 707-716 emplearon nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosano para llevar a cabo la inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor*. También se ha demostrado la inmovilización de HRP sobre nanopartículas magnéticas (Corgié S. et al., 2012; *Adv Funct Mater* 22: 1940-1951).

40 Estos resultados pueden considerarse el punto de partida para el desarrollo de reactores enzimáticos magnéticos. Sin embargo, la bibliografía disponible sobre configuraciones de reactores magnéticos es muy limitada. A continuación, se detallan algunas alternativas.

45 En investigaciones recientes se han empleado reactores enzimáticos magnéticos, como es el caso de Wang F. et al., 2012; *Bioresource Technol* 110: 120-124 que diseñaron un reactor de lecho fluidizado estabilizado magnéticamente, o Duan X. et al., 2014; *ChemPhysChem* 15: 974-980 en el cual el reactor contaba con un sistema de electroimanes donde tenía lugar la reacción, ambos para la degradación de fenol en agua residual. Estos dos reactores presentan la desventaja de que es necesario tenerlos conectados a una fuente de alimentación de corriente eléctrica, con los inconvenientes que esto conlleva (coste eléctrico, temperaturas elevadas...). Ardao I. et al., 2013; *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European Symposium of Water Technology and Management*, Belgium presentaron también una configuración de reactor en continuo para la eliminación de microcontaminantes en el cual el sistema de separación era un imán en la corriente de salida que recoge las nanopartículas y mediante un sistema de válvulas se invierte el flujo devolviendo las nanopartículas al reactor.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

55 En un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes de EDAR o efluentes industriales por enzimas, peroxidasas o lacasas, inmovilizadas sobre nanopartículas magnéticas mediante el uso de reactor enzimático con separación magnética.

El procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales comprende la operación de un reactor discontinuo secuencial de acuerdo a las siguientes etapas:

- 5 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 con soportes magnéticos que inmovilizan la enzima;
- c) reacción del efluente con enzima inmovilizada;
- 10 d) retener la enzima inmovilizada aplicando un campo magnético externo;
- e) descargar al medio acuático la corriente limpia de microcontaminantes;
- f) retirar el campo magnético externo; y
- g) bombear efluente fresco a la vasija de reacción.

15 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. 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 o bien utilizar una membrana de microfiltración para la filtración del efluente antes de introducirlo en el reactor enzimático.

20 En la vasija de reacción se encuentra la enzima inmovilizada covalentemente sobre soportes sólidos. Cuando se utilice una enzima peroxidasa la actividad de la enzima 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), la medida de la actividad MnP o VP se lleva a cabo mediante el ensayo descrito por Taboada-Puig et al. (Taboada-Puig R. et al., 2011; *Biotechnol Prog* 27: 668-676) y la medida de la actividad HRP se realiza de acuerdo al procedimiento descrito por Bindhu et al. (Bindhu L. et al., 2002; *J Appl Polym Sci* 88: 1456-1464). Si se usa lacasa, la actividad enzimática  
25 está comprendida en el rango 100-1500 U/L, de acuerdo al protocolo de medida detallado en la bibliografía (Zimmermann Y. et al., 2011; *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 169-178). La temperatura de operación en el reactor debe estar en el rango 10-40°C, preferentemente a 25°C y el pH debe estar comprendido entre 3-8, preferentemente pH 4,5 en el caso de que la enzima sea de tipo peroxidasa y pH comprendido en el rango 6-7 en el caso de que la enzima sea de tipo lacasa.

30 En una realización particular los soportes empleados para la inmovilización de la enzima son nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice, con un tamaño comprendido entre 4-40 nm, estando la la capa de sílice comprendida en el rango de 0,5-10 nm. Las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético (magnetita o maghemita) de un diámetro preferente comprendido en el rango 3-20 nm y presentan propiedades superparamagnéticas.

35 La etapa de reacción comprende agitar el efluente con la mezcla de enzima inmovilizada, durante un tiempo de reacción prefijado, entre un intervalo de minutos o horas, dependiendo del carácter recalcitrante del compuesto objetivo y en un rango de velocidad de agitación de 100 a 600 rpm.

En otro aspecto de la invención en la etapa de reacción del efluente con la enzima se lleva a cabo una etapa de control de la actividad enzimática que comprende:

- 40 a) medir la actividad enzimática en la vasija de reacción;
- b) si la actividad enzimática en la vasija es menor que un valor mínimo, se procede a la regeneración de las nanopartículas para inmovilizar enzima fresca;

El valor mínimo de actividad enzimática es de 100 U/L cuando la enzima es de tipo lacasa y de 50 U/L cuando la enzima es de tipo peroxidasa.

45 En una realización particular de la invención la regeneración de las nanopartículas para inmovilizar de nuevo enzima fresca se realiza según el procedimiento descrito en Zhao G. et al., 2011; *J Phys chem* 115: 6350-6359 para la posterior inmovilización de las enzimas siguiendo el procedimiento indicado en Zimmermann Y. et al., 2011; *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 169-178.

50 En el caso de utilizar una enzima peroxidasa, deberá adicionarse peróxido de hidrógeno al reactor con velocidad comprendida entre 5-100  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ ; además si la enzima utilizada es MnP o VP se añade en continuo ácido orgánico dicarboxílico a una velocidad comprendida en el rango 1-100  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ . Además, en el caso de utilizar una enzima peroxidasa se introduce en la vasija de reacción el cofactor necesario para completar el ciclo catalítico de la enzima; en el caso de que la enzima sea de tipo LiP el cofactor comprende alcohol veratrílico que se añade con una velocidad comprendida en el rango 0,5-  
55 1000  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ ; en caso de que la enzima sea de tipo MnP o VP el cofactor comprende  $\text{Mn}^{+2}$  que se añade 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 lacasa, se mide la concentración de oxígeno disuelto en el reactor mediante un sensor de oxígeno disuelto.

- 5 En otro aspecto de la invención tras el periodo de reacción la enzima inmovilizada es retenida por un campo magnético externo aplicado en la vasija de reacción (reactor), de forma que sea factible la descarga de la corriente tratada, libre de nanopartículas. Es necesario tomar muestras en dicha corriente para determinar la actividad enzimática (que debe ser nula al quedar retenida en el reactor) así como la concentración de microcontaminantes tras el tratamiento enzimático en el reactor. En el caso de que la concentración de contaminantes a la salida del reactor esté por encima de un valor máximo fijado, se incrementa el tiempo de reacción.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales por enzimas, peroxidasas o lacasa mediante el uso de un reactor discontinuo secuencial basado en un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas con un sistema de separación magnética que se acopla al reactor en la etapa de recuperación de la enzima. El sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos comprende:

- 15 a) un sistema de pretratamiento que reduce la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el efluente a través de un lecho de arena de granulometría inferior a 1 mm o bien a través una membrana de microfiltración;
- 20 b) un primer sistema de bombeo;
- c) una vasija de reacción o reactor que comprende una solución de enzima con soportes magnéticos que inmovilizan la enzima;
- 25 d) un sistema de agitación;
- e) un sistema de control de actividad enzimática de la solución contenida en la vasija de reacción;
- f) un sistema de separación magnética;
- g) un segundo sistema de bombeo; y
- h) un sistema de medida de microcontaminantes en la vasija de reacción enzimática y en la salida del reactor.

- 30 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.

En una realización particular la vasija de reacción o reactor comprende un reactor de tanque agitado. En una realización particular el tanque agitado comprende un sistema de agitación con un agitador de 4 palas, recubierto de Teflón para evitar problemas de adsorción de las nanopartículas y de los compuestos a degradar.

35 En una realización particular los soportes empleados para la inmovilización de la enzima comprenden nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice, con un tamaño comprendido entre 4-40 nm, estando la capa de sílice comprendida en el rango de 0,5-10 nm. Las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético (magnetita o maghemita) de un diámetro preferente comprendido en el rango 3-20 nm y presentan propiedades superparamagnéticas.

El sistema de control de actividad enzimática comprende:

- a) un sensor de actividad enzimática; y
- b) un sistema de regeneración de soportes y posterior inmovilización de enzima.

45 La temperatura de operación del reactor está comprendida en el rango de 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.

50 En el caso de utilizar la enzima peroxidasa, el sistema de eliminación de microcontaminantes además comprende un sistema de adición 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 se añade a 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 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 LiP, a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ , y  $\text{Mn}^{2+}$  si la enzima utilizada es una enzima del tipo MnP o 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 lacasa, la vasija de reacción además comprende un sistema de control de oxígeno disuelto en la mezcla efluente-enzima que comprende un sensor de medida de la concentración de oxígeno disuelto.

5 En una realización particular de la invención el sistema de separación magnética externa comprende una o varias varillas magnéticas formadas por imanes permanentes alineados y montados con polaridad alternada, de manera que los polos del mismo signo de imanes contiguos estén enfrentados. En las proximidades de los polos el campo magnético es no homogéneo y las partículas son atraídas a la región de campo más intenso, que son las más próximas a los polos.

10 En una realización particular el sistema de separación magnética comprende imanes toroidales de neodimio-hierro-boro con forma anular con polarización axial mantenidos juntos por medio de una varilla interior no magnética con topes seguros en los extremos. En una realización particular los imanes toroidales tienen un diámetro interno 6 mm, diámetro externo de 15 mm y 6 mm de alto. Las nanopartículas magnéticas son retenidas en la pared exterior de fundas cilíndricas no magnéticas y de pared suficientemente estrecha insertadas en la vasija y abiertas al exterior, en las cuales se introducen las varillas magnéticas. Al retirar las varillas las nanopartículas quedan libres y son arrastradas por el sistema de agitación.

El segundo sistema de bombeo bombea la corriente limpia de microcontaminantes fuera del reactor.

20 El sistema de medida de microcontaminantes toma muestras del efluente de entrada al reactor y de la corriente de salida 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

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

30 **Figura 1.** Diagrama esquemático del sistema de reactor enzimático secuencial con varilla magnética y su aplicación en microcontaminantes. El influente entra al reactor, con una determinada concentración de microcontaminantes, donde se encuentra la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas en disolución (Etapa I). Se deja reacción durante el tiempo de operación necesario en cada caso (Etapa II). Tras la etapa de reacción se introduce la varilla magnética y se retiene la enzima inmovilizada en las nanopartículas magnéticas por el campo magnético (Etapa III). La corriente de salida del reactor se bombea obteniéndose el efluente, que puede descargarse al ambiente acuático al estar libre de microcontaminantes (Etapa IV). Por último, se quita la varilla magnética y comienza un nuevo ciclo adicionando influente.

35 **Figura 2.** Perfiles de concentración (porcentaje respecto a la concentración en la corriente de entrada) de BPA en los experimentos de degradación (■) y en el control (■) en la corriente de salida del reactor y la actividad de lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas (-) en el reactor enzimático secuencial para el tratamiento de BPA (100 µg/L) por lacasa inmovilizada en 10 ciclos con un tiempo de operación de 6 h.

40 **Figura 3.** Perfiles de concentración (porcentaje respecto a la concentración en la corriente de entrada) de MG en los experimentos de degradación (■) y en el control (■) en la corriente de salida del reactor y la actividad de lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas (-) en el reactor enzimático secuencial para el tratamiento del tinte methyl green (20 mg/mL) por lacasa inmovilizada en 10 ciclos con un tiempo de operación de 24 h.

45 **Figura 4.** Perfiles de concentración (porcentaje respecto a la concentración en la corriente de entrada) de BPA en los experimentos de degradación (■) y en el control (■) en la corriente de salida del reactor y la actividad de lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas (-) en el reactor enzimático secuencial para el tratamiento de BPA (100 µg/mL) por lacasa inmovilizada en 10 ciclos con un tiempo de operación de 6 h.

#### 50 EJEMPLOS

##### Ejemplo 1

El procedimiento anteriormente descrito se aplicó para la degradación del bisfenol A (BPA) para el tratamiento de aguas residuales mediante lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un reactor discontinuo secuencial (SBR) con un volumen útil de 20 mL acoplado a una varilla magnética con

el objetivo de retener la enzima y volver a reutilizarla de acuerdo al esquema recogido en la Figura 1. La concentración media de enzima fue de 1000 U/L y la concentración de BPA en el influente fue de 100 µg/L. Las condiciones de operación se detallan a continuación: temperatura, 25°C; pH 6; agitación, 150 rpm; 10 ciclos de 6 h cada uno.

- 5 La eliminación de BPA se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad de enzima se determinó espectrofotométricamente. Los resultados muestran que el sistema elimina en torno al 90% a lo largo de 10 ciclos. (Figura 2)

### **Ejemplo 2**

- 10 Se aplicó el procedimiento anteriormente descrito para la decoloración de tintes en la degradación del MG mediante lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un reactor discontinuo secuencial (SBR) con un volumen útil de 10 mL (Figura 1). La concentración inicial de enzima fue de 1000 U/L y la del MG fue de 20 mg/L. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura, 25°C; pH 5; agitación, 150 rpm; 7 ciclos con un tiempo de operación de 24 h.
- 15 La decoloración del MG y la actividad de enzima se determinaron espectrofotométricamente. Los resultados muestran que se elimina en torno al 80% tras 10 ciclos (Figura 3).

### **Ejemplo 3**

- 20 El procedimiento anteriormente descrito se aplicó para la degradación del bisfenol A (BPA) para el tratamiento de agua residual real mediante lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un reactor discontinuo secuencial (SBR) con un volumen útil de 500 mL acoplado a una varilla magnética con el objetivo de retener la enzima y volver a reutilizarla de acuerdo al esquema recogido en la Figura 1. Se trata de un ensayo de aumento de escala. La concentración media de enzima fue de 250 U/L y la concentración de BPA en el influente fue de 100 µg/L. Las condiciones de operación se detallan a continuación: temperatura, 25 °C; agua residual real (pH 7.41); agitación, 150 rpm; 10 ciclos de 24 h cada uno.
- 25

La desaparición de BPA se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La actividad de enzima se determinó espectrofotométricamente. Los resultados muestran que el sistema es capaz de eliminar BPA en un alto porcentaje (93%) tras 10 ciclos. (Figura 4).

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras residuales (EDAR) o efluentes industriales que comprende un reactor discontinuo secuencial:
  - a. aplicar un pretratamiento al efluente 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 con soportes magnéticos que inmovilizan la enzima ;
  - c. reacción del efluente con la enzima inmovilizada;
  - d. retener la enzima inmovilizada aplicando un campo magnético externo;
  - e. descargar al medio acuático la corriente limpia de microcontaminantes;
  - f. eliminar el campo magnético externo; y
  - g. bombear efluente fresco a la vasija de reacción
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 por que el pretratamiento comprende la utilización de una membrana de microfiltración o un filtro de arena de granulometría inferior a 1 mm.
4. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima inmovilizada se selecciona entre peroxidasas o lacasas.
5. El procedimiento, según la reivindicación 4, caracterizado porque la actividad de la enzima peroxidasa inmovilizada se encuentre comprendida en el rango 50-1000 UL<sup>-1</sup>.
6. El procedimiento, según la reivindicación 4, caracterizado por que la actividad de la enzima lacasa inmovilizada se encuentra comprendida en el rango 100-1500 U L<sup>-1</sup>.
7. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 6, caracterizado porque la temperatura de operación de la vasija está comprendida en el rango de 10 a 40°C.
8. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 6, caracterizado porque el pH de la mezcla efluente y enzima inmovilizada en la vasija de reacción está comprendido en el rango 3 a 8.
9. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 8, caracterizado porque la etapa de reacción del efluente además comprende las siguientes etapas de control de la actividad enzimática :
  - a. medir la actividad enzimática en la vasija de reacción;
  - b. si la actividad enzimática en la vasija es menor que un valor mínimo, se procederá a regenerar los soportes y volver a inmovilizar enzima para añadir;
10. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, caracterizado porque si la enzima utilizada es una enzima del tipo peroxidasa, se añade en continuo en la vasija de reacción peróxido de hidrógeno.
11. El procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado porque el peróxido de hidrógeno se añade a una velocidad comprendida entre 5 y 1000 µmol/L·min.
12. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 11, caracterizado porque si la enzima utilizada es Manganese Peroxidasa (MnP) o Peroxidasa Versátil (VP) además se añade en continuo ácido orgánico dicarboxílico.
13. El procedimiento, según la reivindicación 12, caracterizado porque el ácido orgánico dicarboxílico se añade con una velocidad comprendida entre 1 y 100 µmol/L·min.
14. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 4 a 11, caracterizado porque además se añade en la vasija de reacción el cofactor necesario para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa.
15. El procedimiento, según la reivindicación 14, caracterizado por que el cofactor comprende alcohol veratrílico en el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa del tipo Lignino Peroxidasa (LiP).

## ES 2 559 111 A1

16. El procedimiento, según la reivindicación 15, caracterizado porque el alcohol veratrílico se introduce a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ .
- 5 17. El procedimiento, según la reivindicación 14, caracterizado porque el cofactor comprende  $\text{Mn}^{2+}$  en el caso de que la enzima utilizada sea peroxidasa del tipo MnP o del tipo VP.
18. El procedimiento, según la reivindicación 17, caracterizado porque el  $\text{Mn}^{2+}$  se introduce a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ .
- 10 19. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque además comprende medir la concentración de oxígeno disuelto en la vasija de reacción cuando la enzima utilizada es de tipo lacasa.
- 15 20. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se mide la concentración de microcontaminantes en la entrada de efluente y en la salida del reactor.
21. El procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque si la concentración de contaminantes en la corriente de salida está por encima de un valor máximo fijado, se incrementa el tiempo de reacción del efluente con la enzima inmovilizada y se recircula la salida a la corriente de entrada para volver a ser tratada.
- 20 22. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, los soportes comprenden nanopartículas magnéticas cubiertas de sílice.
- 25 23. El procedimiento, según la reivindicación 22, caracterizado porque las nanopartículas tienen un tamaño comprendido en el rango de 4-40 nm.
24. El procedimiento, según la reivindicación 22, caracterizado porque la capa de sílice está comprendida en el rango de 0,5-10 nm.
- 30 25. El procedimiento, según las reivindicaciones 22 y 23, caracterizado porque las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético (magnetita o maghemita) de un diámetro preferente comprendido en el rango 3 a 20 nm y presentan propiedades superparamagnéticas.
- 35 26. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la reacción comprende agitar el efluente con la mezcla de enzima inmovilizada y nanopartículas magnéticas.
- 40 27. Un sistema de eliminación de microcontaminantes orgánicos, presentes en efluentes secundario de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales que comprende:
- 45 a. un sistema de pretratamiento que reduce la concentración de sólidos en suspensión y coloides en el efluente;
- b. un primer sistema de bombeo;
- 45 c. una vasija de reacción o reactor que comprende una solución de enzima con soportes magnéticos que inmovilizan la enzima;
- d. un sistema de agitación;
- e. un sistema de control de actividad enzimática de la solución contenida en la vasija de reacción;
- 50 f. un sistema de separación magnética;
- g. un segundo sistema de bombeo;
- h. un sistema de medida de microcontaminantes en la vasija de reacción enzimática y en la salida del reactor.
- 55 28. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque el sistema de pretratamiento comprende un sistema de tratamiento de filtración por membrana de microfiltración.
29. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque el sistema de pretratamiento comprende un filtro de arena de granulometría inferior a 1 mm.
- 60 30. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque el primer sistema de bombeo bombea el efluente desde el sistema de pretratamiento hacia la vasija de reacción.
31. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque la vasija de reacción comprende un reactor de tanque agitado.
- 65

## ES 2 559 111 A1

32. El sistema, según reivindicación 31, caracterizado porque el sistema de agitación comprende un agitador de 4 palas, recubierto de Teflón para evitar problemas de adsorción de las nanopartículas y de los compuestos a degradar.
- 5 33. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque la enzima inmovilizada se selecciona de entre peroxidasa y lacasa.
34. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque el sistema de control de actividad enzimática comprende:
- 10 a. un sensor de actividad enzimática; y  
b. un sistema de regeneración de soportes y posterior inmovilización de enzima
35. El sistema, según las reivindicaciones 27 y 30 a 34, caracterizado porque la temperatura de operación de la vasija está comprendida en el rango de 10 a 40°C.
- 15 36. El sistema, según las reivindicaciones 27 y 30 a 34, caracterizado porque el pH de la mezcla efluente y enzima inmovilizada en la vasija de reacción está comprendida en el rango de 3 a 8.
- 20 37. El sistema, según cualquiera de las reivindicaciones 27 y 30 a 36, caracterizado porque si la enzima utilizada es una enzima del tipo peroxidasa, además comprende un sistema de adición de peróxido de hidrógeno en continuo en la vasija de reacción.
- 25 38. El sistema, según la reivindicación 37, caracterizado porque el sistema de adición de peróxido de hidrógeno añade peróxido de hidrógeno a una velocidad comprendida entre 5 y 1000  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ .
- 30 39. El sistema, según las reivindicación 37, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de adición en continuo de ácido orgánico dicarboxílico cuando la enzima utilizada es MnP o VP.
- 35 40. El sistema, según la reivindicación 39, caracterizado porque el sistema de adición de ácido orgánico dicarboxílico añade ácido orgánico dicarboxílico con una velocidad comprendida en el rango 1 y 100  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ .
41. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque la vasija de reacción además comprende un sistema de adición del cofactor necesario para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa.
- 40 42. El sistema, según la reivindicación 41, caracterizado por que el cofactor comprende alcohol veratrílico si la enzima utilizada es una peroxidasa del tipo LiP.
- 45 43. El sistema, según la reivindicación 42, caracterizado porque el sistema de adición del cofactor añade alcohol veratrílico a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ .
44. El sistema, según la reivindicación 41, caracterizado porque el cofactor comprende  $\text{Mn}^{2+}$  si la enzima utilizada es una peroxidasa del tipo MnP o del tipo VP.
- 50 45. El sistema, según la reivindicación 44, caracterizado porque el sistema de adición del cofactor añade  $\text{Mn}^{2+}$  a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ .
46. El sistema según las reivindicaciones 27 y 30 a 45, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de control de oxígeno disuelto en la mezcla del efluente y enzima en el caso de que la enzima utilizada sea lacasa, que comprende un sensor de medida de la concentración de oxígeno disuelto.
- 55 47. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado por un sistema de separación magnética externa.
- 60 48. El sistema, según la reivindicación 47, caracterizado porque el sistema de separación magnética externa comprende una o varias varillas magnéticas formadas por imanes permanentes alineados y montados con polaridades alternadas, que se introducen durante la fase de retención en fundas no magnéticas colocadas en la vasija de reacción.
- 65 49. El sistema, según la reivindicación 27, caracterizado porque el segundo sistema de bombeo bombea la corriente limpia de microcontaminantes tras el tratamiento enzimático en el reactor.

## ES 2 559 111 A1

50. El sistema según la reivindicación 27, caracterizado porque si la concentración de contaminantes en la corriente de salida está por encima de un valor máximo fijado, el sistema de control de actividad enzimática incrementa el tiempo de reacción del efluente con la enzima inmovilizada y recircula la salida a la corriente de entrada para volver a ser tratada
51. El sistema según la reivindicación 27, caracterizado porque, los soportes comprenden nanopartículas magnéticas cubiertas de sílice.
52. El sistema, según la reivindicación 51, caracterizado porque las nanopartículas tienen un tamaño comprendido en el rango 4-40 nm.
53. El sistema, según la reivindicación 51, caracterizado porque la capa de sílice está comprendida en el rango 0,5-10 nm.
54. El sistema, según las reivindicaciones 51 y 52, caracterizado porque las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético (magnetita o maghemita) de un diámetro preferente comprendido en el rango 3 a 20 nm y presentan propiedades superparamagnéticas.
55. Uso del procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 26, y del sistema, según reivindicaciones, 27 a 54, para la eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o efluentes industriales.

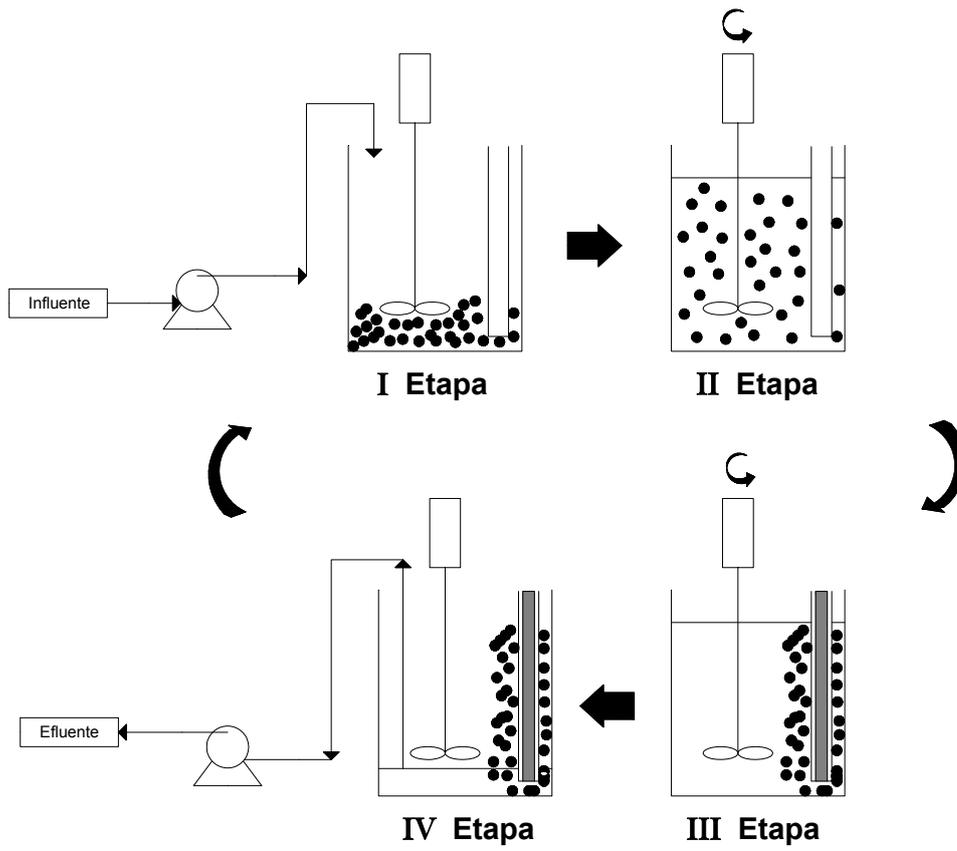


FIGURA 1

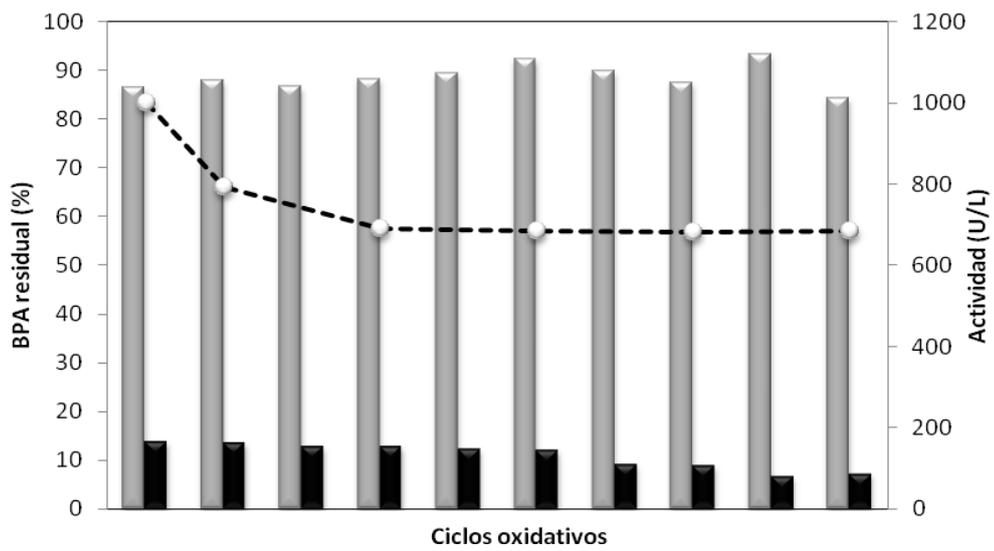


FIGURA 2

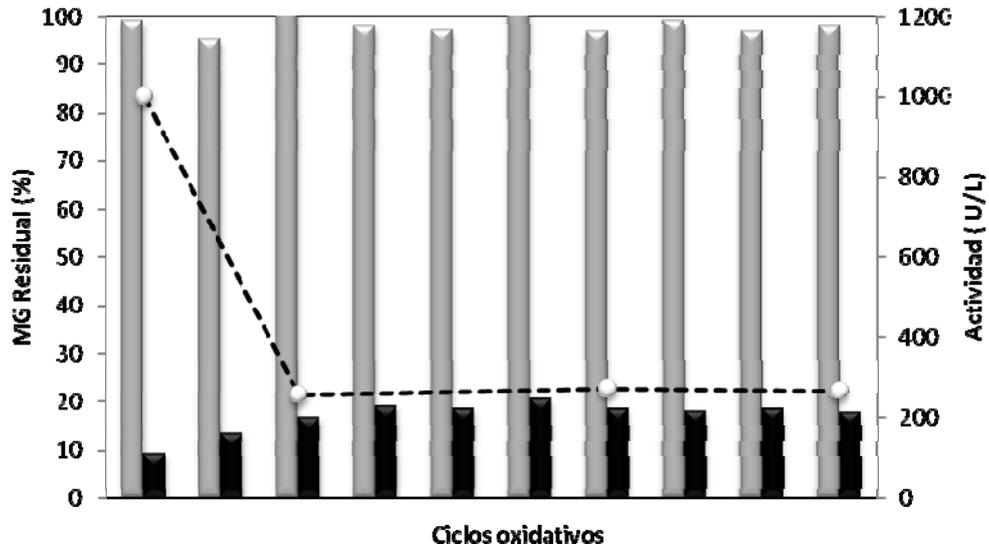


FIGURA 3

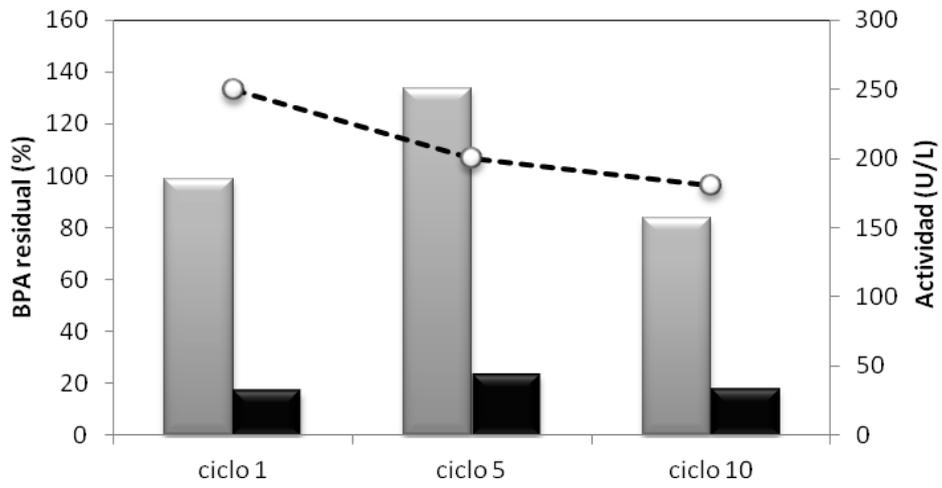


FIGURA 4



- ②① N.º solicitud: 201531599  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.11.2015  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C02F3/00** (2006.01)  
C02F101/30 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WANG FENG et al. "Enhanced phenol degradation in coking wastewater by immobilized laccase on magnetic mesoporous silica nanoparticles in a magnetically stabilized fluidized bed." Bioresource Technology ABR 2012 (04.2012) VOL: 110 Págs: 120-124 ISSN 0960-8524(print) ISSN 1873-2976(electronic) Doi: doi:10.1016/j.biortech.2012.01.184; todo el documento.	1-55
A	JIAN-FU LIU et al. "Reversible immobilization <i>K. fragilis</i> of beta-galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. B, ENZYMATIC, 20120602 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 02.06.2012 VOL: 82 Págs: 64-70 ISSN 1381-1177 Doi: doi:10.1016/j.molcatb.2012.06.001; todo el documento.	1-55
A	BAYRAMOGLU G et al. "Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption." BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, 20080601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01.06.2008 VOL: 40 No: 2 Págs: 262-274 ISSN 1369-703X Doi: doi:10.1016/j.bej.2007.12.013 Chen Wilfred; Bentley William E; todo el documento.	1-55
A	YAVUZ C T et al. "Magnetic separations: From steel plants to biotechnology." CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 20090515 OXFORD, GB 15.05.2009 VOL: 64 No: 10 Págs: 2510-2521 ISSN 0009-2509 Doi: doi:10.1016/j.ces.2008.11.018; todo el documento.	1-55

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  
01.02.2016

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/5

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, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, Compendex/EI, XPESP y Bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-55	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-55	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WANG FENG et al. "Enhanced phenol degradation in coking wastewater by immobilized laccase on magnetic mesoporous silica nanoparticles in a magnetically stabilized fluidized bed." <i>Bioresource Technology</i> ABR 2012 (04.2012) VOL: 110 Págs: 120-124 ISSN 0960-8524(print) ISSN 1873-2976(electronic) Doi: doi:10.1016/j.biortech.2012.01.184.	31.03.2012
D02	JIAN-FU LIU et al. "Reversible immobilization of <i>K. fragilis</i> beta-galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide." <i>JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. B, ENZYMATIC</i> , 20120602 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 02.06.2012 VOL: 82 Págs: 64-70 ISSN 1381-1177 Doi: doi:10.1016/j.molcatb.2012.06.001.	02.06.2012
D03	BAYRAMOGLU G et al. "Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption." <i>BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL</i> , 20080601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01.06.2008 VOL: 40 No: 2 Págs: 262-274 ISSN 1369-703X Doi: doi:10.1016/j.bej.2007.12.013 Chen Wilfred; Bentley William E.	01.06.2008
D04	YAVUZ C T et al. "Magnetic separations: From steel plants to biotechnology." <i>CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE</i> , 20090515 OXFORD, GB 15.05.2009 VOL: 64 No: 10 Págs: 2510-2521 ISSN 0009-2509 Doi: doi:10.1016/j.ces.2008.11.018.	15.05.2009

**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, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-55, es un procedimiento de eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras residuales (EDAR) o efluentes industriales utilizando una enzima inmovilizada en soportes magnéticos (reiv. 1-26), el sistema que comprende un reactor de tanque agitado para la realización del procedimiento de la invención (reiv. 27-54) y el uso tanto del procedimiento como del sistema para la eliminación de microcontaminantes orgánicos presentes en efluentes secundarios de estaciones depuradoras residuales (EDAR) o efluentes industriales (reiv. 55).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga la inmovilización de la enzima lacasa en soportes magnéticos para la degradación de fenoles en aguas residuales. La reacción se realiza en un reactor de lecho fluidizado estabilizado magnéticamente, a un pH de 6 y a una temperatura de 25°C. Tras cada ciclo de reacción la lacasa inmovilizada es separada mediante la aplicación de un campo magnético y se repite el procedimiento con una nueva alícuota de sustrato en las mismas condiciones de reacción. El reactor consiste en una columna de cristal y 4 hilos de cobre conectados a una fuente de alimentación que son los que producen en campo magnético para estabilizar y retener los soportes magnéticos en el reactor. El efluente es bombeado al interior del reactor con un flujo de 350 a 650 mLh-1.

El documento D02 divulga soportes magnéticos para la inmovilización de enzimas, como la beta-galactosidasa de *K. fragilis*, para la síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS). En este documento se describe la actividad de la enzima inmovilizada en soportes magnéticos (nanopartículas de magnetita cubiertas de polietilenimina) dentro de un reactor enzimático discontinuo, donde las condiciones de la reacción son pH6.5 con una temperatura de 30°C. Para comprobar la actividad de la enzima, se realizaron 15 ciclos de reacción consecutivos reutilizando dicha enzima inmovilizada. Para la reutilización de la enzima, se aplica un campo magnético externo para la separación de la enzima inmovilizada y posteriormente se lava antes de quedar lista para el siguiente ciclo de reacción.

El documento D03 divulga la inmovilización de tripsina en pequeñas esferas magnéticas de magnetita (de 75 a 150 µm). La tripsina inmovilizada se introduce en el medio de reacción una vez que el sustrato se ha preincubado. Una vez terminada la reacción, la suspensión se centrifuga y se recoge el sobrenadante que contiene el producto de la reacción. Los soportes magnéticos pueden ser separados mediante un imán permanente convencional.

El documento D04 divulga distintos tipos de materiales magnéticos y distintos métodos de separación magnética utilizados en distintas industrias.

Aunque en el documento D01 se describe un reactor en el cual la enzima, inmovilizada en soportes magnéticos, queda retenida dentro del reactor gracias a la aplicación de un campo magnético externo, éste es aplicado de forma continua ya que la reacción se produce en un reactor de lecho fluidizado.

Por otra parte, aunque en los documentos citados del estado de la técnica D02-D04 se divulgan reactores enzimáticos discontinuos en los que para separar la enzima inmovilizada en los soportes magnéticos de los productos de reacción, se emplean campos magnéticos externos, en ninguno de los documentos se describe un sistema de retención del enzima como el de la invención.

Por lo tanto, ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-55. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-55. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-55 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).