

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 268**

51 Int. Cl.:

**D21H 21/16** (2006.01)

**D21H 17/21** (2006.01)

**D21H 17/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2014 PCT/NL2014/050718**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15057067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2014 E 14790778 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 3058134**

54 Título: **Polímeros extracelulares de lodos granulares como agentes de encolado**

30 Prioridad:

**14.10.2013 NL 2011609**

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

**29.12.2017**

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITEIT DELFT (100.0%)  
Stevinweg 1  
2628 CN Delft, NL**

72 Inventor/es:

**VAN LOOSDRECHT, MARINUS CORNELIS  
MARIA;  
YUEMEI, LIN y  
LOTTI, TOMMASO**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 648 268 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

Polímeros extracelulares de lodos granulares como agentes de encolado

5 **Sector de la invención**

La presente invención está en el sector de la fabricación de papel y se refiere, en particular al encolado de papel.

10 **Antecedentes de la invención**

En el sector de la fabricación de papel, se sabe que la mayoría del papel está hecho de fibras de celulosa y/o hemicelulosa. Estas fibras contienen grupos hidroxilo. La unión de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos hidroxilo de las fibras de celulosa y/o hemicelulosa es energéticamente favorable y, por lo tanto, el agua puede humedecer fácilmente y penetrar el papel. En otras palabras, el papel no es resistente al agua.

15 Un problema que esto plantea es que el papel sea útil en, por ejemplo, aplicaciones de impresión, escritura, embalaje, envoltura y construcción, necesita tener un grado de resistencia al agua.

20 Para superar este problema, el papel generalmente se trata con productos químicos de encolado, ya sea durante la fabricación del papel (encolado interno) o mediante el tratamiento de la superficie del papel (encolado de superficie).

25 El encolado se refiere a un procedimiento para fabricar papel, como mínimo, parcialmente resistente al agua mediante la adición de polímeros. Entre los ejemplos típicos de productos químicos de encolado se incluyen: carbohidratos, tales como almidones, gomas y alginatos; compuestos anfipáticos, tales como colofonia y dímero de alquilcetano; y, anhídrido alqueniilsuccínico.

30 Los procedimientos para el encolado de papel son conocidos a partir de, por ejemplo, el documento CN101864700A, que recita un procedimiento de tratamiento de superficie capaz de mejorar la suavidad de la superficie del papel ligero y reducir la capacidad de absorción de la tinta de impresión. El documento WO2002/012623 A cita un procedimiento para encolar papel que comprende añadir a una suspensión acuosa que contiene fibras celulósicas y cargas opcionales, (i) una dispersión de encolado aniónica o catiónica; y (ii) un promotor de encolado que comprende un polímero orgánico catiónico que tiene uno o más grupos aromáticos, y un polímero aniónico que tiene uno o más grupos aromáticos, siendo el polímero aniónico un polímero de crecimiento escalonado, un polisacárido o un polímero aromático de origen natural, formando y drenando la suspensión obtenida, en la que la dispersión de encolado y el promotor de encolado se añaden por separado a la suspensión acuosa.

40 Los problemas asociados con tales procedimientos son, por ejemplo, que los productos químicos de encolado utilizados normalmente son caros; pueden estar disponibles solo en oferta limitada; se producen utilizando procedimientos que son perjudiciales para el medio ambiente; y cuya producción está lejos de ser neutro en carbono.

Un objetivo de la presente invención es superar una o más de las desventajas de la técnica anterior, sin poner en peligro la funcionalidad y las ventajas.

45 **Características de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere la utilización de sustancias poliméricas extracelulares que pueden obtenerse a partir de lodo granular para encolar papel o cualquier producto similar al papel.

50 En la actualidad, los lodos producidos a partir de procedimientos de tratamiento de aguas residuales, incluido el lodo granular, se consideran un producto de desecho y ya no tienen utilización. Además de ello, los costes de la eliminación de residuos son de 500-600 € por tonelada de lodo en los Países Bajos. Esto representa aproximadamente un tercio de los costes de tratamiento de aguas residuales.

55 Sorprendentemente, se ha descubierto que las sustancias poliméricas extracelulares que se pueden obtener a partir de lodo granular son adecuadas y eficaces para encolar papel. La presente invención, por lo tanto, proporciona una aplicación comercial y ambientalmente muy interesante de este producto de "residuos".

60 Los gránulos que componen el lodo granular son agregados de células microbianas autoinmovilizadas a través de sustancias poliméricas extracelulares en forma esférica sin ninguna participación de material transportador. Un rasgo característico de los gránulos del lodo granular es que no se coagulan significativamente durante la sedimentación (es decir, en un reactor con cizalla hidrodinámica reducida).

65 Las sustancias poliméricas extracelulares constituyen una proporción significativa de la masa total de los gránulos.

Las sustancias poliméricas extracelulares comprenden compuestos de alto peso molecular (típicamente > 5 kDa) secretados por microorganismos a su ambiente. Las sustancias poliméricas extracelulares están compuestas

principalmente por polisacáridos y proteínas, pero incluyen otras macromoléculas, tales como ADN, lípidos y sustancias húmicas.

5 Las sustancias poliméricas extracelulares que se pueden obtener a partir de lodo granular (preferentemente obtenidas a partir de lodo granular) no requieren la utilización de una purificación o tratamiento adicional para el encolado de papel. Cuando las sustancias poliméricas extracelulares se obtienen a partir de lodo granular, las sustancias poliméricas extracelulares se aíslan, preferentemente, de bacterias (células) y/u otras sustancias poliméricas no extracelulares. Un ejemplo de una técnica adecuada para aislar sustancias poliméricas extracelulares a partir de lodo granular se proporciona en la descripción detallada de la presente invención y el ejemplo que la  
10 acompaña.

Ventajosamente, los gránulos de lodo granular se pueden eliminar fácilmente de un reactor mediante, por ejemplo, separación física, sedimentación, centrifugación, separación ciclónica, decantación, filtración o tamizado para proporcionar sustancias poliméricas extracelulares en un volumen pequeño. En comparación con la separación de material de una fase líquida del reactor, esto significa que no se requieren ni grandes volúmenes de disolventes orgánicos ni de otro tipo de disolvente (para extracción), ni grandes cantidades de energía (para evaporar el líquido) para el aislamiento de las sustancias poliméricas extracelulares.  
15

De este modo, la presente invención proporciona una solución a uno o más de los problemas mencionados anteriormente.  
20

Las ventajas de la presente descripción se detallan a lo largo de la descripción.

### **Descripción detallada de la invención**

25 La presente invención se refiere a la utilización de sustancias poliméricas extracelulares que pueden obtenerse a partir de lodo granular para encolar papel o cualquier producto similar al papel.

En un ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares comprenden una porción mayoritaria que consiste en exopolisacáridos, y una porción minoritaria, tal como menos del 30% en p/p, típicamente menos del 10% en p/p, que consiste en lípidos y/u otros componentes más hidrófobos que los exopolisacáridos.  
30

Los porcentajes en peso (p/p) a lo largo de la descripción se basan en un peso total de una composición (seca).

35 Se ha descubierto que las sustancias poliméricas extracelulares obtenidas de lodos granulares que tienen una porción mayoritaria de exopolisacáridos y una porción minoritaria de lípidos proporcionan al papel una resistencia al agua muy eficaz, en particular cuando las sustancias poliméricas extracelulares se utilizan para encolado de superficie, es decir, cuando las sustancias poliméricas extracelulares están en una interfaz con el aire del papel.

40 En un ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares comprenden, como mínimo, el 50% p/p de exopolisacáridos, preferentemente, como mínimo, el 60% p/p de exopolisacáridos, de la forma más preferente, como mínimo, el 75% p/p de exopolisacáridos, tal como, como mínimo, el 90% p/p de exopolisacáridos. Se ha descubierto que las sustancias poliméricas extracelulares obtenidas a partir de lodo granular son agentes de encolado particularmente eficaces cuando tienen un contenido alto de exopolisacáridos. El contenido de exopolisacáridos no es, preferentemente, del 100%, ya que se ha descubierto que un resto contribuye a los presentes efectos de ventajas.  
45

En un ejemplo, el lodo granular es lodo granular aeróbico o lodo granular anammox. Se ha demostrado que las sustancias poliméricas extracelulares obtenidas a partir de lodo granular aeróbico y lodo granular anammox son particularmente eficaces como agentes de encolado. La investigación realizada por los presentes inventores ha demostrado que los exopolisacáridos de las sustancias poliméricas extracelulares obtenidas a partir de lodo granular aeróbico son de tipo alginato en carácter y, de hecho, funcionan incluso mejor que el alginato por sí mismo como un producto químico de encolado. El encolado con alginato por sí mismo se conoce a partir de la técnica anterior.  
50

55 El experto en la materia conoce el lodo granular aeróbico y el lodo granular anammox, y los procedimientos utilizados para obtenerlos. Para los no iniciados, se hace referencia en Water Research, 2007, doi:10.1016/j.watres.2007.03.044 (lodo granular anammox) y en Water Science and Technology, 2007, 55(8-9), 75-81 (lodo granular aeróbico).

60 En un ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares se han obtenido a partir de lodo granular aeróbico o anammox mediante un procedimiento de aislamiento (es decir, separación) que comprende: extracción alcalina del lodo granular formando de este modo sustancias poliméricas extracelulares que contienen agente de extracción; precipitación ácida de las sustancias poliméricas extracelulares del agente de extracción; y recolección del precipitado que contiene la sustancia polimérica extracelular.  
65

Se ha descubierto que este procedimiento es particularmente eficaz para obtener sustancias poliméricas extracelulares a partir de lodo granular, tal como de lodo granular aeróbico y anammox, con un buen rendimiento.

5 En un ejemplo, el lodo granular ha sido producido sustancialmente por bacterias pertenecientes al orden Pseudomonadaceae, tales como bacterias *Pseudomonas* y/o *Azotobacter* (lodo granular aeróbico); o, por bacterias pertenecientes al orden Planctomycetales (lodo granular anammox), tales como *Brocadia anammoxidans*, *Kuenenia stuttgartiensis* o *Brocadia fulgida*; o, combinaciones de las mismas. Las sustancias poliméricas extracelulares del lodo granular producido por estas bacterias son agentes de encolado eficaces, incluso cuando se aplican en una cantidad en el intervalo del 0,1-5% p/p de sustancias poliméricas extracelulares/producto final.

10 En un ejemplo, los exopolisacáridos son copolímeros en bloque que comprenden residuos de ácido urónico (por ejemplo, ácido manurónico y ácido gularónico).

15 En un ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares están en solución acuosa a una concentración en el intervalo del 0,1-30% p/p, preferentemente del 1-10% p/p, de la forma más preferente del 4-10% p/p, tal como del 5-8% p/p. Esto proporciona una solución que tiene características adecuadas para la pulverización. De este modo, se puede proporcionar una capa uniforme de las sustancias poliméricas extracelulares en papel, (en gran parte) después de que se ha producido el papel.

20 En un ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares se agregan a la solución de formación de papel y/o al papel, es decir, que forman parte de un procedimiento de producción de papel.

25 En un ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares se blanquean, tal como mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno. Al blanquear las sustancias poliméricas extracelulares, se pueden utilizar para el encolado de papel blanco y de color sin cambiar el color del papel. Sorprendentemente, el blanqueo con, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno, solo reduce ligeramente el rendimiento de encolado de las sustancias poliméricas extracelulares (la cantidad aplicada se incrementa, preferentemente, en aproximadamente el 20-40% en comparación (con respecto a) las sustancias poliméricas extracelulares no blanqueadas).

30 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para encolar papel que comprende: (i) alimentar un reactor con (a) agua residual, tal como se obtiene de la fabricación de papel, proporcionando de este modo una fuente de carbono, y (b) bacterias formadoras de lodo granular; (ii) accionar el reactor en condiciones adecuadas para generar y cultivar lodo granular; (iii) separar, como mínimo, una proporción de gránulos del lodo granular, tal como mediante separación física, sedimentación, centrifugación, separación ciclónica, decantación, filtración o tamizado; (iv) separar las sustancias poliméricas extracelulares del lodo granular aeróbico recogido; y (v) encolar el papel con las sustancias poliméricas extracelulares.

35 En un ejemplo, las bacterias formadoras de lodo granular pertenecen a los órdenes *Pseudomonas* y *Azotobacter*, y la etapa (ii) anterior comprende: (ii) (a) en una primera etapa, mantener el reactor en condiciones de baja concentración de oxígeno (anaeróbicas) durante un período predeterminado de tiempo a una temperatura predeterminada para acumular carbono en las células de la bacteria; y (ii) (b) en una segunda etapa, mantener el reactor en condiciones de concentración elevada de oxígeno (aeróbicas) durante un período de tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada para cultivar las bacterias en forma granular para formar gránulos. La temperatura está, preferentemente, en un intervalo de 5-30°C, tal como 10-25°C.

40 La concentración de oxígeno en la primera etapa es, preferentemente, tan baja como sea posible, por ejemplo con respecto a la configuración de un reactor. El período de tiempo en la primera etapa es del orden de 0,1-8 horas, preferentemente de 0,25-4 horas, más preferentemente de 0,5-2 horas, tal como 1 hora.

45 La concentración de oxígeno en la segunda etapa puede ser similar o igual a las condiciones ambientales. Se observa que una concentración de oxígeno del 10% de un valor de saturación se considera lo suficientemente alta a este respecto. En un ejemplo, el tiempo de la segunda etapa es de 3-48 horas, preferentemente de 6-24 horas, más preferentemente de 10-18 horas, tal como 12 horas.

50 En un ejemplo, las bacterias formadoras de lodo granular pertenecen al orden Planctomycetales; en el que en la etapa (i) el agua residual comprende además una fuente de amonio; y en el que la etapa (ii) comprende mantener el reactor en condiciones de alta concentración de oxígeno (aeróbicas).

55 En un ejemplo, las bacterias que pertenecen al orden Pseudomonadaceae, tales como *pseudomonas* y/o *Azotobacter*, preferentemente bacterias cultivadas.

60 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a papel encolado que se puede obtener mediante un procedimiento de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

65 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a papel encolado que comprende sustancias poliméricas extracelulares a partir de lodo granular aeróbico y/o lodo granular anammox. En una cantidad de 0,1-5% p/p de sustancias poliméricas extracelulares/producto final.

La presente invención se aclarará adicionalmente más adelante con referencia al ejemplo y a los dibujos que son a

modo de ejemplo y de naturaleza explicativa y no limitan el alcance de la invención. Para el experto en la materia, puede estar claro que pueden concebirse muchas variantes y combinaciones de las mismas, siendo obvias o no, dentro del alcance de la protección, definida por las presentes reivindicaciones.

- 5 **Ejemplo** - Utilización de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) obtenibles a partir de lodo granular aeróbico para aumentar la resistencia al agua de la fibra de papel

Descripción breve de las figuras

10 Figura 1 - Medición del ángulo de contacto. Después de que la gota de agua cayó sobre el papel (b), el ángulo de contacto (el ángulo en el que la interfaz líquido-vapor se encuentra con la interfaz sólido-líquido) de la gota de agua se controló durante 120 segundos (c → d).

15 Figura 2 - Morfología de las sustancias poliméricas extracelulares a partir de lodo granular aeróbico mediante microscopia de fuerza atómica. La estructura de tipo fibra cubre la superficie y forma una película; los glóbulos se distribuyen sobre la película y apuntan al aire.

20 Figura 3 - Diagrama de las sustancias poliméricas extracelulares en la superficie entre el agua y el aire. Las partes hidrofílicas cubren la superficie y las partes hidrofóbicas apuntan al aire.

Figura 4 - Cromatogramas de gas de pirólisis de las sustancias poliméricas extracelulares procedentes de lodo granular aeróbico. Cn y Cn:1 indican la longitud de la cadena de los compuestos saturados e insaturados

25 Figura 5. Perfiles de distribución del encolado de las sustancias poliméricas extracelulares procedentes de lodo granular aeróbico mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Figura 6 - Gotas de agua sobre papel (a): papel en bruto; (b): papel recubierto con el 5% de sustancias poliméricas extracelulares; (c): papel recubierto con un 8% de sustancias poliméricas extracelulares blanqueadas.

30 Figura 7. El ángulo de contacto de agua miliQ con el papel en bruto, el papel recubierto con el producto químico de encolado comercial WRP 50C y con sustancias poliméricas extracelulares blanqueadas y sin blanquear en función del tiempo.

35 Figura 8 - Diagrama del efecto de la resistencia al agua de las sustancias poliméricas extracelulares sobre fibra celulósica. a: las fibras celulósicas son porosas (hay huecos vacíos entre las fibras), el agua se humedece fácilmente y penetra en la red de fibras. b: las sustancias poliméricas extracelulares son material de tipo fibra, pero estas fibras tienen una anchura de 20 nm, que es, como mínimo, 1.000 veces más delgada que la fibra de celulosa. La sustancia polimérica extracelular forma una película sobre fibra de celulosa. Debido a la existencia de la parte hidrofóbica de la sustancia polimérica extracelular, la gota de agua no humedece fácilmente y pasa a través de la fibra.

Procedimientos

Lodo granular aeróbico para investigación

45 El lodo granular aeróbico a partir del cual se obtuvieron las sustancias poliméricas extracelulares del presente ejemplo se recogió de la planta piloto Nereda®, operada por DHV en la planta de tratamiento de aguas residuales Epe, Países Bajos. El reactor fue alimentado con aguas residuales municipales. El afluente consistió en aproximadamente el 25% de las aguas residuales del matadero, que se descargó en el sistema de alcantarillado. 50 Los parámetros promedio del afluente fueron: CODtotal 585 mg/l, sólidos suspendidos 195 mg/l, NH<sub>4</sub>-N 55 mg/l y PO<sub>4</sub>-P 6,3 mg/l. El reactor se operó en modo de alimentación discontinua (SBR) para la eliminación de fosfato y nitrógeno biológicos. Los detalles operativos se describieron en Lin y otros (2010). Después de la puesta en marcha, la concentración de biomasa en el reactor se mantuvo aproximadamente en de 8 a 10 g de TSS/L. El oxígeno en el reactor se controló entre 2 y 3 mg/l durante la aireación. La temperatura y el pH no se controlaron en este sistema y dependían de las aguas residuales entrantes. Durante el funcionamiento estable, se recogió lodo aeróbico granular y se tamizó para dar gránulos con un diámetro >2 mm. 55

A continuación, se secaron los gránulos.

60 Aislamiento de sustancias poliméricas extracelulares

Los gránulos secos (0,5 g) se homogeneizaron durante 5 minutos (homogeneizador de tejidos Labgen, Cole-Parmer, EE. UU.) y se extrajeron en 80 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M a 80°C durante 1 hora. Después de centrifugar a 15.000 rpm durante 20 minutos se desechó el sedimento. El pH del sobrenadante se ajustó a 2 añadiendo HCl 0,1 M. El precipitado se recogió mediante centrifugación (15.000 rpm, 30 min), se lavó con agua desionizada hasta que el pH del efluente alcanzó 7, y se disolvió en NaOH 0,1 M. Las sustancias poliméricas extracelulares en el sobrenadante se precipitaron mediante la adición de etanol absoluto frío hasta una concentración final del 80% (vol/vol). El 65

precipitado se recogió mediante centrifugación (15.000 rpm, 30 min), se lavó tres veces en etanol absoluto y se liofilizó. La mezcla resultante de sustancias poliméricas extracelulares es un ejemplo de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que pueden obtenerse a partir de lodo granular de acuerdo con la presente invención.

- 5 El contenido de cenizas de las SPE se midió de acuerdo con el procedimiento estándar (APHA).

Caracterización de las SPE

10 Antes de la caracterización, las SPE (0,5 g) se disolvieron en 15 ml de una solución de NaOH (0,05 M). A continuación, el pH se ajustó a 7,0 con HCl 0,05 M. Finalmente, la solución se colocó dentro de un tubo de diálisis (3500 MWCO) y se dializó frente a agua desmineralizada durante 48 horas para eliminar los iones débilmente unidos y se liofilizó.

Morfología de las SPE mediante microscopia de fuerza atómica

15 Las imágenes de las SPE se llevaron a cabo al aire a temperatura ambiente y humedad utilizando mica recién escindida pretratada con NiCl<sub>3</sub> 3 mM. Se depositaron alícuotas (2 ul) de sustancias poliméricas extracelulares (5 mg/l) sobre las superficies de mica durante 10 segundos y, a continuación, se eliminaron rápidamente con la pipeta. Esas superficies se secaron al aire (1 h) en un recinto libre de polvo. Las muestras se escanearon con un microscopio de fuerza atómica multimodo de Digital Instruments (Veeco nanoscopy iva dimension 3100, Veeco Inc., Santa Barbara, EE. UU.).

Análisis de la composición de las SPE mediante pirólisis-cromatografía de gases-espectrometría de masas

25 La pirólisis se llevó a cabo en un pirolizador Horizon Instruments Curie-Point. Las sustancias poliméricas extracelulares liofilizadas se calentaron durante 5 segundos a 600°C. La unidad de pirólisis se conectó a un cromatógrafo de gases Carlo Erba GC8060 y los productos se separaron mediante una columna de sílice fundida (Varian, 25 m, 0,25 mm d.i.) revestida con CP-Sil5 (espesor de la película 0,40 µm). Como gas de purga se utilizó helio. El horno se mantuvo inicialmente a 40°C durante 1 minuto, después se calentó a una velocidad de 7°C/min a 30 320°C y se mantuvo a esa temperatura durante 15 minutos. La columna se acopló a un espectrómetro de masas Fisons MD800 (intervalo de masas m/z 45-650, energía de ionización 70 eV, tiempo de ciclo 0,7 s). La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante sus espectros de masas utilizando una biblioteca NIST o mediante la interpretación de los espectros, por sus tiempos de retención y/o por comparación con los datos de la bibliografía.

35 Contenido lipídico de las SPE

Para el análisis de lípidos en las sustancias poliméricas extracelulares, los procedimientos propuestos por Smolders y otros (1994) se utilizaron con modificaciones. Se utilizaron ácidos grasos puros (Sigma-Aldrich) como patrón externo. Las muestras de sustancias poliméricas extracelulares liofilizadas y los patrones de ácidos grasos se pesaron utilizando una balanza analítica y se transfirieron a tubos con tapones de rosca. Se utilizó un miligramo de ácidos grasos de C15 en 1-propanol como patrón interno. Se añadieron a los tubos 1,5 ml de una mezcla de HCl concentrado y 1-propanol (1:4) y 1,5 ml de dicloroetano y se calentaron durante 2 horas a 100°C. Después de enfriar se extrajeron los ácidos libres de la fase orgánica con 3 ml de agua. Se filtró un mililitro de la fase orgánica sobre sulfato de sodio sin agua en viales de GC. Los lípidos en la fase orgánica se analizaron mediante cromatografía de gases (modelo 6890N, Agilent, EE.UU.) equipada con un FID, en una columna HP Innowax.

Análisis del peso molecular de las SPE

50 La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó con una columna Superdex 75 10/300 GL (AKTA Purifier System, GE Healthcare). La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando PBS a un caudal constante de 0,4 ml/min y la detección se controló siguiendo la absorbancia de las moléculas eluidas a 210 nm.

55 La columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) separa moléculas de 1.000 a 150.000 Dalton (Da) con un volumen de exclusión total de 7,9 ml. La medición del volumen de elución de los patrones de dextrano (1.000 Da, 5.000 Da, 12.000 Da, 25.000 Da y 50.000 Da) condujo a la ecuación de calibración:

$$\text{Log (PM)} = 6,212 - 0,1861 \text{ Ve}$$

60 PM: Peso molecular de la molécula en Dalton (Da)

Ve: volumen de elución en ml (analizado en la parte superior del pico)

Los perfiles de cromatograma se registraron con el software UNICORN 5.1 (GE Healthcare). El programa calculó y entregó directamente los tiempos de retención de los picos y las áreas de los picos.

65

Blanqueo de las SPE

Se introdujeron SPE (1 g) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) durante 24 horas, se recogieron en una centrífuga a 4.000 rpm y se liofilizaron.

5

Encolado con SPE y propiedad de resistencia al agua del papel después de encolar con SPE

Se pulverizó 1 ml de SPE tanto sin blanquear (5% p/p) como blanqueadas (8% p/p) de forma uniforme sobre piezas de papel en bruto (10 cm × 10 cm, 96 g/m<sup>2</sup> sin la adición de productos químicos de encolado, suministrado por Kenniscentrum Papier en Karton, Países Bajos) y se secó al aire. Se pulverizó 1 ml de producto químico de encolado comercial (Impermax WRP 50C, suministrado por Kenniscentrum Papier en Karton) sobre el mismo tipo de papel con el mismo tamaño y se secó al aire. Se registró el cambio del ángulo de contacto (el ángulo de contacto es el ángulo en el que la interfaz líquido-vapor se encuentra con la interfaz sólido-líquido) con el tiempo de una gota de agua miliQ sobre estas piezas de papel secadas al aire y se midió mediante KSV CAM200 (figura 1).

10

15

El cambio del ángulo de contacto con el tiempo de una gota de agua miliQ sobre el papel en bruto también se registró y midió como control.

20

Sobre cada hoja de papel, el ángulo de contacto se midió en 5 lugares diferentes al azar; se calcularon el valor promedio y la desviación estándar.

Resultados

Se obtuvieron sustancias poliméricas extracelulares a partir de lodo granular aeróbico como se ha descrito anteriormente. Las sustancias poliméricas extracelulares se caracterizaron y utilizaron en papel de encolado. Finalmente se analizó la eficacia de la capa encolada.

25

Morfología de las sustancias poliméricas extracelulares mediante el microscopio de fuerza atómica

30 Véase la figura 2

El rendimiento de sustancias poliméricas extracelulares fue  $160 \pm 4$  mg/g (relación VSS).

35

Las sustancias poliméricas extracelulares tienen una estructura de tipo fibra. La anchura de la fibra es de aproximadamente 20 nm (figura 2). Las fibras se extienden a lo largo de la superficie y se enredan entre sí, formando una estructura en forma de red que cubre toda la superficie de la mica. Esto demuestra que las sustancias poliméricas extracelulares tienen una propiedad perfecta de formación de película y pueden formar una película continua sobre una superficie. El espesor de la película de sustancia polimérica extracelular es de aproximadamente 4 nm. Además de las fibras, hay algunos glóbulos que se distribuyen en las fibras y apuntan al aire. La altura de los glóbulos puede alcanzar 15 nm, que es 2 veces mayor que el espesor de la película de sustancia polimérica extracelular. Debido a la diferencia significativa en altura, los glóbulos se veían mucho más brillantes que las fibras bajo el microscopio de fuerza atómica. Como la muestra se preparó depositando una solución acuosa de sustancia polimérica extracelular sobre una superficie y se secó al aire, los glóbulos que se extendían fuera de la superficie y apuntan al aire deben tener propiedades hidrófobas.

40

45

Por lo tanto, las sustancias poliméricas extracelulares tienen tanto una parte hidrófila como una parte hidrófoba. Cuando las sustancias poliméricas extracelulares permanecen en la superficie entre el agua y el aire, las partes hidrofílicas se extienden a lo largo de la superficie, formando una película y las partes hidrófobas se distribuyen en la película y apuntan al aire (figura 3).

Análisis de la composición de sustancia polimérica extracelular

La composición de las sustancias poliméricas extracelulares se analizó mediante pirólisis-GC-MS. En el espectro (figura 4), se identificaron productos derivados de polisacáridos, tales como 5-metilfuraldido y levoglucosenona, lo que implica una contribución de las unidades de carbohidratos a la muestra de sustancia polimérica extracelular. También se encontraron lípidos y ésteres de cera compuestos por ácidos grasos C16 y C18 y restos de alcohol de las mismas longitudes de carbono. Por el contrario, todos los productos de la pirólisis de proteínas y otras combinaciones de aminoácidos eran mucho menos prominentes, lo que indica que eran componentes relativamente minoritarios de las sustancias poliméricas extracelulares. Además, existe una denominada mezcla compleja no resuelta que consiste en muchos compuestos similares que coeluyen y que no pueden identificarse por sus espectros de masas en la actualidad. En resumen, el análisis mediante pirólisis-GC-MS muestra que, en comparación con los carbohidratos y los lípidos, las proteínas son una parte minoritaria de las sustancias poliméricas extracelulares.

55

60

El contenido de lípidos en las sustancias poliméricas extracelulares se midió como  $8,2 \pm 0,9$  mg/g de sustancias poliméricas extracelulares.

65

Dado que normalmente los polisacáridos son hidrofílicos y los lípidos son hidrófobos, en comparación con la morfología de la figura 2, se puede suponer que la estructura de tipo fibra que forma la película sobre la superficie

son principalmente polisacáridos y los glóbulos que apuntan hacia el aire son principalmente lípidos.

#### Peso molecular de sustancias poliméricas extracelulares

5 El perfil de distribución de tamaño de las sustancias poliméricas extracelulares mediante cromatografía de exclusión por tamaño se muestra en la figura 5. Hay 5 fracciones con un volumen de elución diferente. La fracción con el volumen de elución más corto, que tiene el mayor peso molecular, se separa bien con otras fracciones. Las tres fracciones con un volumen de elución entre 13 ml y 17 ml coeluyeron. El peso molecular de estas 5 fracciones y sus porcentajes se enumeran en la tabla 1. Se puede ver claramente que la mayoría de las sustancias poliméricas extracelulares aisladas (94%) tiene un peso molecular de más de 5,8 KDa, y aproximadamente 1/3 de las sustancias poliméricas extracelulares tiene un peso molecular superior a 150 KDa. Como los carbohidratos con mayor peso molecular tienden a extenderse sobre la superficie, podría ser una explicación de la propiedad de formación de película perfecta de las sustancias poliméricas extracelulares aisladas.

15 **Tabla 1 Peso molecular de diferentes fracciones en las sustancias poliméricas extracelulares aisladas de lodo granular y su porcentaje.**

Volumen de elución del pico (ml)	Peso molecular (Da)	Porcentaje de la fracción (% área del pico)
7,83	$7 \times 10^4$	29,74
13,48	$1,44 \times 10^4$	18,82
15,57	$5,79 \times 10^3$	45,15
17,58	$2,15 \times 10^3$	4,42
20,13	$6,56 \times 10^2$	1,87

#### Utilización de sustancias poliméricas extracelulares como producto químico de encolado en la fabricación de papel

20 El efecto de las sustancias poliméricas extracelulares blanqueadas y sin blanquear sobre el incremento de la resistencia al agua del papel se muestra en la figura 6. Para el papel sin encolar, una vez que cae una gota de agua sobre la superficie, el papel la absorbe inmediatamente y se propaga rápidamente. Por el contrario, el agua retiene la forma de la gota sobre las sustancias poliméricas extracelulares y las hojas de papel recubiertas con sustancias poliméricas extracelulares blanqueadas.

25 Para evaluar la propiedad de resistencia al agua, el ángulo de contacto entre la gota de agua y la superficie del papel se controló en 120 segundos (figura 7). El agua en contacto con el papel sin encolar se absorbe en menos de 1 segundo. Pero para las hojas de papel encoladas con una solución de sustancias poliméricas extracelulares al 5% y una solución de sustancias poliméricas extracelulares blanqueadas al 8%, su propiedad de resistencia al agua es comparable a la de la hoja de papel encolada con un producto de encolado comercial (10% de anhídrido alquénico succínico). Sus dos ángulos de contacto iniciales son superiores a 100, los cuales cumplen el requisito de un papel adecuadamente encolado. Las sustancias poliméricas extracelulares obtenidas del lodo granular tienen un color marrón, el blanqueo con  $H_2O_2$  da como resultado una sustancia incolora.

35 Se cree que el buen rendimiento de encolado de las sustancias poliméricas extracelulares que puede obtenerse a partir de lodo granular se debe, como mínimo en parte, a que comprende tanto componentes hidrófilos como hidrófobos. Esto también lo distingue de los agentes de encolado utilizados actualmente.

Esto se explica con referencia a la figura 8.

40 La anchura de la fibra celulósica en papel es de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ ; cuando se forma una red de fibra de celulosa, hay una cantidad significativa de huecos vacíos entre las fibras. Sin embargo, el ancho de la fibra de la sustancia polimérica extracelular es, de media, de solo 20 nm. Por lo tanto, se cree que estas nanofibras pueden enredarse entre sí y formar una película similar a una red que cubre tanto la superficie de las fibras celulósicas como los huecos vacíos. Al mismo tiempo, los glóbulos hidrófobos se extienden al aire. Cuando una gota de agua entra en contacto con la superficie de la hoja de papel encolada con sustancias poliméricas extracelulares, la fuerza de repulsión de los glóbulos hidrófobos mantendrá el agua como una gota. Incluso con agua en contacto con las fibras hidrofílicas de la sustancia polimérica extracelular, será absorbida solo lentamente por sustancias poliméricas extracelulares debido a la hinchazón sin mojar la fibra celulósica y propagarse.

50 Las sustancias poliméricas extracelulares de lodo granular proporcionan una alternativa eficaz y ecológica a los agentes de encolado comerciales actuales.

55 La presente invención, aunque se describe en un contexto explicativo detallado, se puede entender mejor junto con los ejemplos y figuras adjuntos.

Debe apreciarse que, para la aplicación comercial, puede ser preferente utilizar una o más variaciones del presente sistema, que serían similares a las divulgadas la presente solicitud y están dentro del espíritu de la invención.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de sustancias poliméricas extracelulares que pueden obtenerse a partir de lodo granular para encolar papel o cualquier producto similar al papel.
2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que las sustancias poliméricas extracelulares comprenden una porción mayoritaria que consiste en exopolisacáridos y una porción minoritaria que consiste en lípidos y/u otros componentes más hidrófobos que los exopolisacáridos.
- 10 3. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que las sustancias poliméricas extracelulares comprenden, como mínimo, el 50% p/p de exopolisacáridos, preferentemente, como mínimo, el 60% p/p de exopolisacáridos, de la forma más preferente, como mínimo, el 75% p/p de exopolisacáridos, tales como, como mínimo, el 90% p/p de exopolisacáridos, más preferentemente en el que un contenido de exopolisacáridos es menor que el 100% y las sustancias poliméricas extracelulares aisladas pueden comprender además lípidos.
- 15 4. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que el lodo granular es uno o más de lodo granular aeróbico y lodo granular anammox.
- 20 5. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que las sustancias poliméricas extracelulares se han obtenido a partir de lodo granular aeróbico o anammox mediante un procedimiento que comprende:
- (i) la extracción alcalina del lodo granular, formando de este modo sustancias poliméricas extracelulares que contienen agente de extracción;
- 25 (ii) la precipitación en ácido de sustancias poliméricas extracelulares del agente de extracción; y
- (iii) la recogida de las sustancias poliméricas extracelulares que contienen precipitado.
- 30 6. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que el lodo granular ha sido producido sustancialmente por bacterias pertenecientes al orden Pseudomonadaceae, tales como bacterias *Pseudomonas* y/o *Acetobacter* (lodo granular aeróbico); o por bacterias pertenecientes al orden Planctomycetales (lodo granular anammox), tales como *Brocadia anammoxidans*, *Kueneria stuttgartiensis* o *Brocadia fulgida*; o, combinaciones de las mismas.
- 35 7. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que los exopolisacáridos son copolímeros de bloques que comprenden residuos de ácido urónico.
- 40 8. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que las sustancias poliméricas extracelulares están en solución acuosa a una concentración en el intervalo del 0,1-30% p/p, preferentemente del 1-10% p/p, de la forma más preferente del 4-10% p/p, tal como del 5-8% p/p.
- 45 9. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que las sustancias poliméricas extracelulares se añaden a la solución formadora de papel y/o al papel.
- 50 10. Utilización, según una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que las sustancias poliméricas extracelulares se blanquean, tal como mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno.
- 55 11. Procedimiento para encolar papel, que comprende:
- (i) alimentar un reactor con (a) agua residual, tal como a partir de la fabricación de papel proporcionando de ese modo una fuente de carbono, y (b) bacterias formadoras de lodo granular;
- (ii) operar el reactor en condiciones adecuadas para generar y cultivar lodo granular;
- (iii) separar, como mínimo, una proporción de gránulos del lodo granular, tal como mediante separación física, sedimentación, centrifugación, separación ciclónica, decantación, filtración o tamizado;
- 60 (iv) obtener sustancias poliméricas extracelulares a partir del lodo granular aeróbico recogido; y
- (v) encolar el papel con las sustancias poliméricas extracelulares obtenidas.
- 65 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que las bacterias formadoras de lodo granular pertenecen al orden Planctomycetales y la etapa (ii) comprende:
- (ii) (a) en una primera etapa, mantener el reactor en condiciones de baja concentración de oxígeno (anaeróbicas) durante un período de tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada para acumular carbono en las

células de las bacterias; y

5 (ii) (b) en una segunda etapa, mantener el reactor en condiciones de alta concentración de oxígeno (aeróbicas) durante un período de tiempo predeterminado a una temperatura predeterminada para cultivar las bacterias en forma granular para formar gránulos.

10 13. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que las bacterias formadoras de lodo granular pertenecen al orden Planctomycetales; en el que en la etapa (i) el agua residual comprende además una fuente de amonio; y en el que la etapa (ii) comprende mantener el reactor en condiciones de alta concentración de oxígeno (aeróbicas).

14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que las bacterias que pertenecen al orden Pseudomonadaceae, tales como *pseudomonas* y/o *Acetobacter*, preferentemente bacterias cultivadas.

15 15. Papel encolado que comprende sustancias poliméricas extracelulares obtenibles a partir de lodo granular aeróbico y/o lodo granular anammox, preferentemente en una cantidad del 0,1-5% p/p de sustancias poliméricas extracelulares/producto final.

Fig. 1

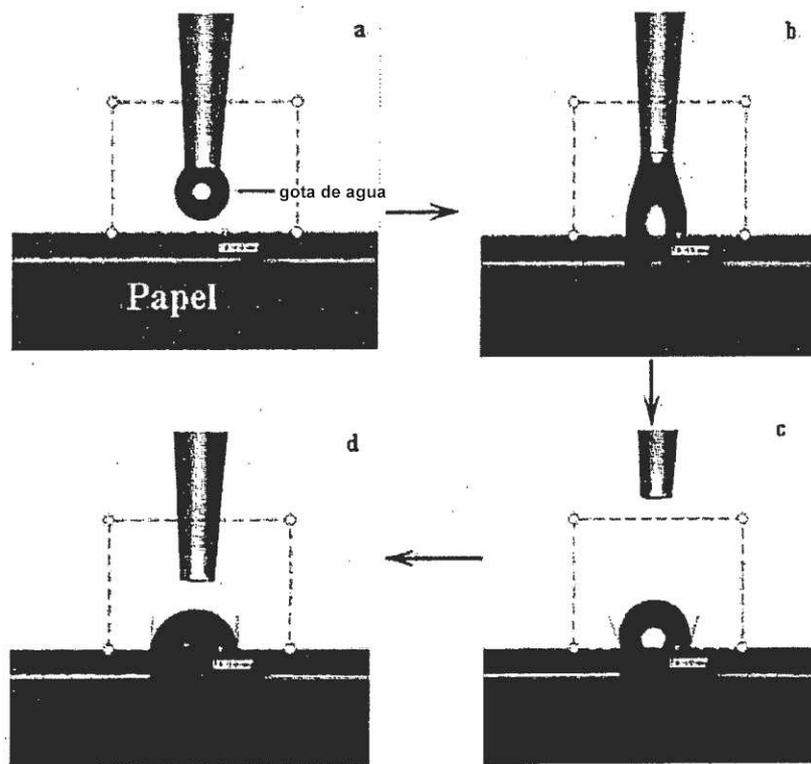


Fig. 2

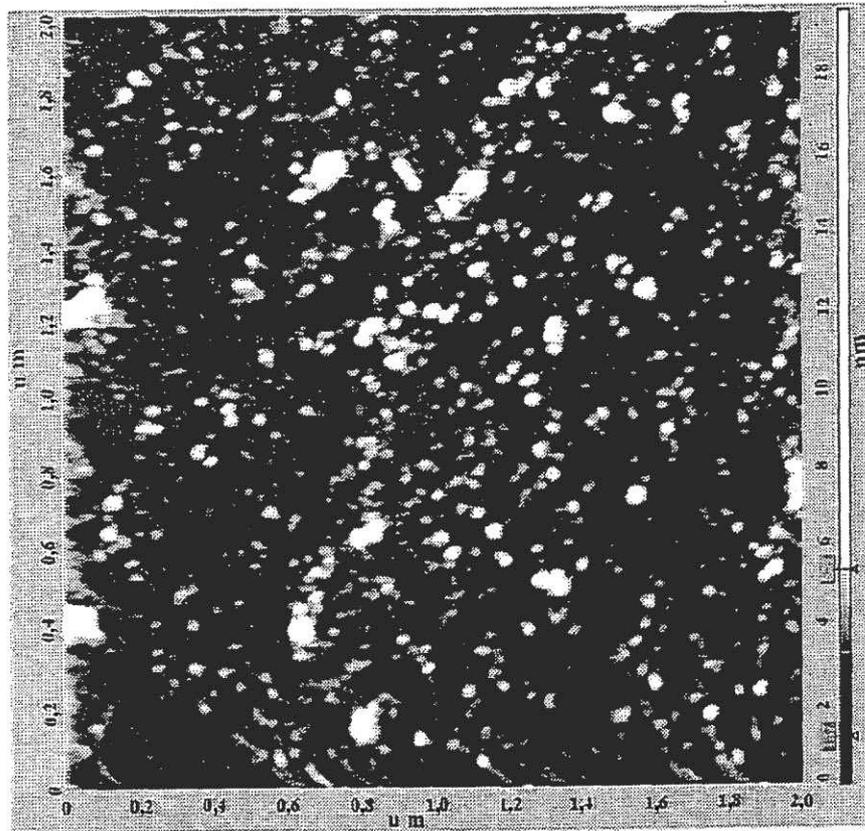


Fig. 3



Fig. 4

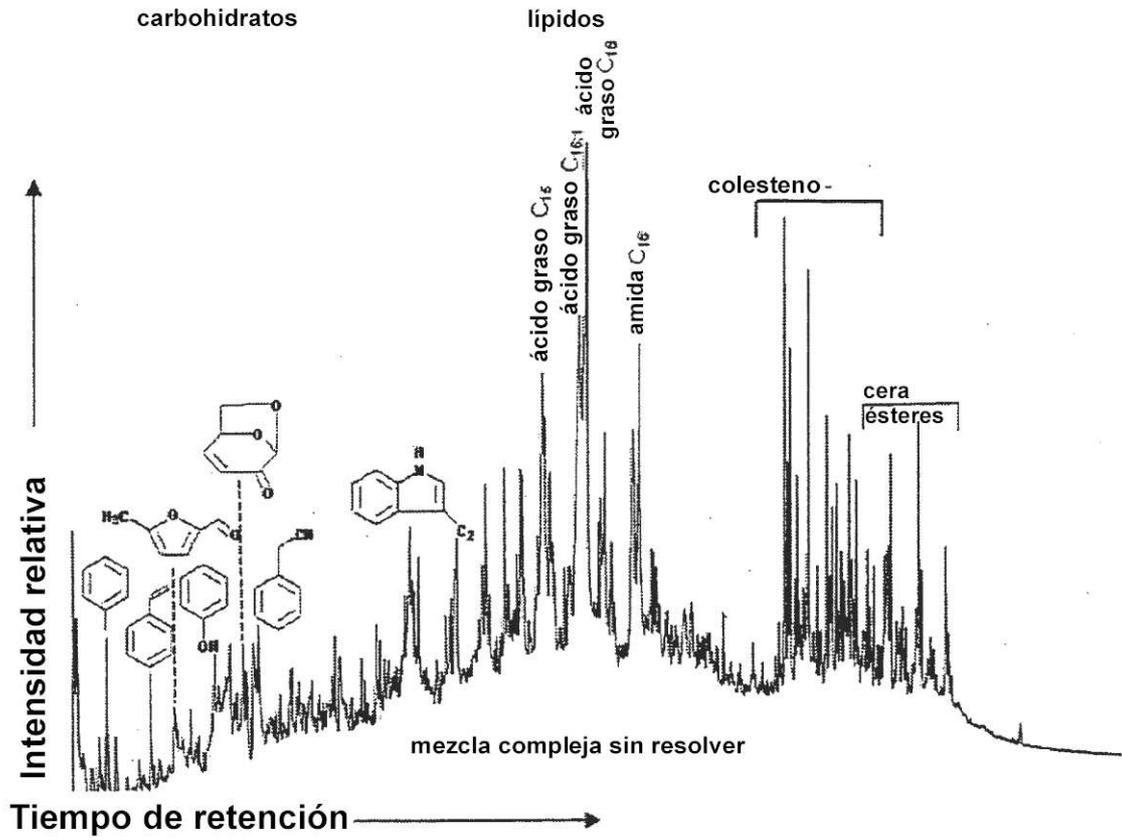


Fig. 5

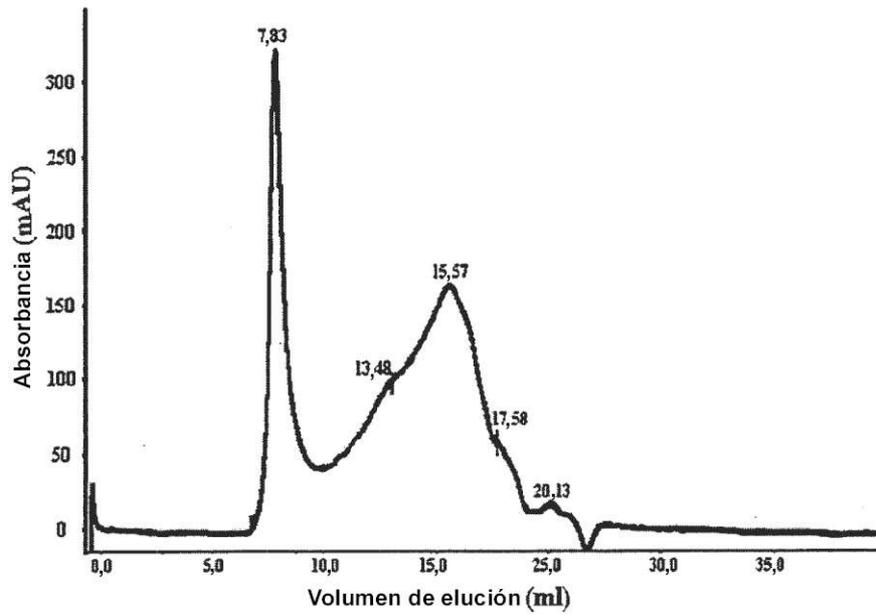


Fig. 6

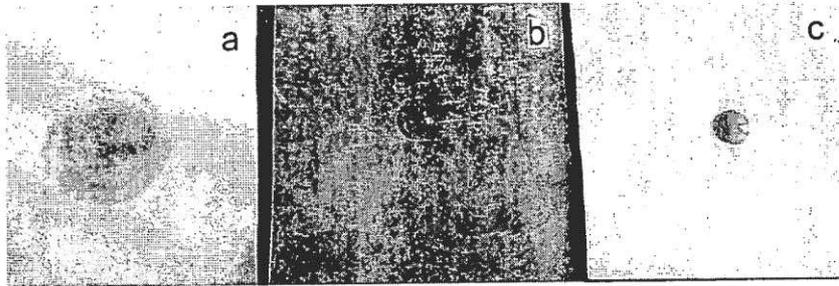


Fig. 7

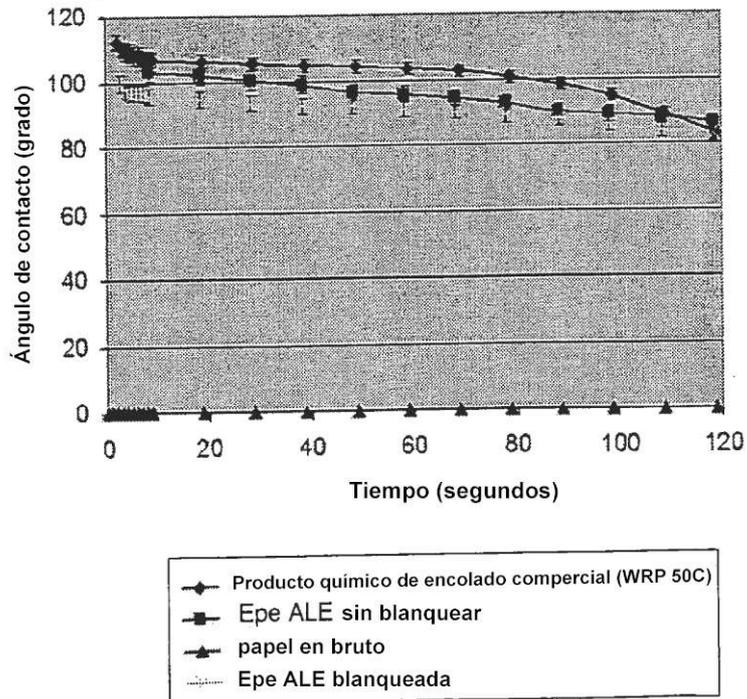


Fig. 8

