



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 418**

51 Int. Cl.:

C02F 1/62 (2006.01)

C07K 14/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05077104 .7**

96 Fecha de presentación : **16.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1764348**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54

Título: **Método para eliminar oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.08.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.08.2009

73

Titular/es: **Technische Universiteit Delft
Julianalaan 134
2628 BL Delft, NL**

72

Inventor/es: **Hasan, Muhammad Nahidul;
Van Loosdrecht, Marinus Cornelis Maria y
Hagen, Wilfred Raymond**

74

Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 324 418 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).

ES 2 324 418 T3

DESCRIPCIÓN

Método para eliminar oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido.

5 La presente invención se refiere a un método para eliminar, como mínimo, uno de los oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido.

10 Eliminar oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido es conocido en la técnica. Por ejemplo, se conocen diversos sistemas de filtración que hacen uso, entre otros, de alúmina activada, hidróxido férrico granular, arena recubierta con dióxido de manganeso o arena recubierta con hierro, ultrafiltración mejorada con polietileno y nanopartículas de óxido de metal de transición. Estos sistemas son ineficientes a baja concentración de contaminantes o añaden nuevos contaminantes, microbios, etc. De hecho, estos sistemas conocidos requieren muchas horas para eliminar las mencionadas impurezas del líquido. Además, estos sistemas conocidos son capaces de eliminar cationes metálicos u oxo-aniones del líquido.

15 P M Matias y otros: "Crystallization and preliminary X-ray characterization of a ferritin from the hyperthermophilic archaeon and anaerobe *Pyrococcus furiosus*" ("Cristalización y caracterización preliminar mediante rayos X de una ferritina de archaeon hipertermofílica y *Pyrococcus furiosus* anaeróbico") ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION F, vol. 61, no. 5, se refiere a la cristalización y caracterización preliminar mediante rayos X de una ferritina de archaeon hipertermofílica y *Pyrococcus furiosus* anaeróbico.

20 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un material que pueda eliminar oxo-aniones y metales catiónicos de un líquido.

25 Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo dar a conocer un material para eliminar oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido que comprende un material que es capaz de eliminar, como mínimo, uno de estos contaminantes.

30 Además, la presente invención tiene como objetivo dar a conocer un material que es capaz de realizar la filtración de un líquido en un tiempo mucho menor que los materiales conocidos.

35 Además, la presente invención tiene como objetivo dar a conocer un material que es capaz de eliminar contaminantes a muy bajas concentraciones, preferentemente a concentraciones mucho más bajas que las posibles con los materiales conocidos.

A fin de lograr, como mínimo, uno de los objetivos antes mencionados, la invención da a conocer un método que se caracteriza porque utiliza ferritina hipertermofílica.

40 El material según la presente invención es capaz de filtrar contaminantes a muy bajas concentraciones de sustrato. Además, es mucho más rápido que los materiales conocidos, requiriendo segundos en lugar de minutos u horas. Además, es capaz de eliminar tanto cationes metálicos como oxo-aniones en una etapa única.

De hecho, el material, según la presente invención, es regenerable y biodegradable.

45 Según la presente invención, se da a conocer un método para eliminar, como mínimo, uno de los oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido, cuyo método se caracteriza porque el material que comprende ferritina hipertermofílica se utiliza como material filtrante. Este método, según la presente invención, proporciona ventajas tal como se indicó anteriormente con respecto al material.

50 Es especialmente preferente que el método se lleve a cabo para filtrar agua. Según este método, pueden obtenerse concentraciones de contaminantes de cationes metálicos y oxo-aniones que corresponden, o son menores, que el actual Nivel Máximo de Contaminantes (MCL) de solutos en el agua potable, sugerido por la Organización Mundial de la Salud, y otros.

55 Según una realización preferente adicional, el método se caracteriza porque dichos oxo-aniones y cationes metálicos se escogen entre cualquiera de los iones de hierro, iones fosfato, arsenato, vanadato, tungstato y molibdato. Estos iones pueden eliminarse de manera eficaz con el método de la presente invención.

60 Es preferente, además, que el método según la presente invención comprenda la etapa de realizar una conversión de hierro ferroso a hierro férrico con la ferritina hipertermofílica. A continuación, el ion hierro se hace insoluble, y de hecho precipitará en la capa proteica de la proteína ferritina.

65 Además, es preferente que dicho método comprenda la etapa de realizar una absorción de un oxo-anión en la capa proteica del material de ferritina. Es especialmente preferente si se realiza una coprecipitación del hierro férrico y de los oxo-aniones en la capa proteica.

Según un aspecto adicional de la presente invención, ésta se refiere a la utilización de una ferritina hipertermofílica para eliminar cationes metálicos y oxo-aniones de un líquido. Es especialmente preferente si esta utilización se refiere

ES 2 324 418 T3

a la eliminación de cationes metálicos y oxo-aniones de agua, a fin de obtener agua potable que cumple los requisitos de la Organización Mundial de la Salud, las Naciones Unidas y otros.

El método conocido para producir ferritina hipertermofílica comprende las etapas de:

- (a) Construcción de una cepa recombinante de *E. Coli* que contiene el gen estructural de ferritina,
- (b) sobreproducción de la proteína recombinante, y
- (c) purificación en etapa única mediante tratamiento por calor.

Una ventaja específica del material según la presente invención es la capacidad de eliminar oxo-aniones a muy bajas concentraciones, de menos de 10 ppb. La concentración que se puede obtener con el material de la presente invención va mucho más allá de la capacidad de las técnicas disponibles en la actualidad.

Además, la capacidad para ser esterilizado de manera repetida es una importante ventaja de la presente invención. Por ejemplo, si el material según la presente invención estuviera contaminado con microbios, etc., puede ser esterilizado, a fin de obtener un material filtrante limpio y seguro.

La esterilización puede llevarse a cabo en una autoclave a 120°C durante 20 minutos. Mediante este método no se produce pérdida de actividad.

El material según la presente invención es biodegradable. La biodegradación se puede obtener mediante enzimas peptidasas.

La ferritina hipertermofílica que se utiliza, según la presente invención, es estable en un amplio intervalo de temperatura. Es especialmente capaz de ser utilizada a una temperatura desde 0°C hasta 100°C.

A diferencia de los materiales conocidos en la técnica, y que son utilizados para eliminar cationes metálicos u oxo-aniones de un líquido, el presente material es capaz de eliminar ambos de estos iones. Esto es completamente nuevo en la técnica.

La ferritina hipertermofílica puede producirse como sigue:

Construcción de la cepa de E. coli recombinante

El supuesto gen de la ferritina de células de *Pyrococcus furiosus* se amplificó mediante el método PCR utilizando oligonucleótidos 5'-CCATATGTTGAGCGAAAGAATGC-3' como el iniciador hacia delante ("forward") y 5'-GTC GACT-TACTCCTCCCTG-3' como el iniciador reverso ("reverse"). A continuación, el gen se clonó en un vector lanzadera pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y se transformó en células de *E. coli* competentes DH5 α para posterior amplificación. A continuación, el vector quimérico se aisló de las células y fue secuenciado para verificar la fidelidad del clon. A continuación, el gen de ferritina se separó mediante la digestión de restricción con *NdeI* y *SaI* (Roche) y se reclonó en el vector de expresión pET24a (+)(Novagen). A continuación, el clon resultante se transformó en las células competentes BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene).

Sobreexpresión de la proteína recombinante

Una colonia única de la cepa de *E. coli* recombinante se inoculó en medio LB (Sambrook y otros, 1989) que contiene cloranfenicol 50 mg ml⁻¹ y kanamicina 20 mg ml⁻¹ y se cultivó durante toda la noche de manera aeróbica a 310 K y 200 rev min⁻¹. Este precultivo se transformó en medio TB (Sambrook y otros, 1989) en una proporción 1:20 y se creció durante 2 horas (hasta que alcanzó el valor de O.D₆₀₀ de 0,5 o superior) y se indujo con IPTG 1 mM. A continuación, las células fueron recogidas mediante centrifugación después de 5 horas adicionales de crecimiento.

Purificación de Ferritina

El precipitado celular se lavó y se redisolvió en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8. Se añadieron ADNasa y ARNasa a la solución para degradar los elementos genéticos y se añadió PMSF 0,5 mM para proteger cualquier degradación proteica por la actividad interna de proteasas. A continuación, la suspensión celular se aplicó a un Disruptor Celular (Constant Systems) para romper las células. El extracto libre de células se sometió a tratamiento de calor (373 K, 30 min) y se clarificó mediante centrifugación. El sobrenadante resultante se concentró mediante Amicon, YM-100, para obtener la preparación final de la proteína.

La presente invención no está limitada a la descripción anterior. Sólo está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 324 418 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Método para eliminar, como mínimo, uno de los oxo-aniones y cationes metálicos de un líquido, **caracterizado** porque un material que comprende ferritina hipertermofílica se utiliza como material filtrante.

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho líquido es agua.

10 3. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichos oxo-aniones y metales catiónicos se escogen entre cualquiera de los iones de hierro, fosfato, arsenato, vanadato, tungstato y molibdato.

4. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho método comprende la etapa de realizar una conversión de hierro ferroso a hierro férrico con la ferritina hipertermofílica.

15 5. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho método comprende la etapa de realizar una adsorción de un oxo-anión en la capa de proteína del material de ferritina.

6. Uso de una ferritina hipertermofílica para eliminar cationes metálicos y oxo-aniones de un líquido.

20 7. Uso, según la reivindicación 6, para eliminar cationes metálicos y oxo-aniones del agua.

25

30

35

40

45

50

55

60

65