

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 324**

21 Número de solicitud: 201200649

51 Int. Cl.:

B01F 17/00 (2006.01) **C02F 103/32** (2006.01)
C02F 1/26 (2006.01)
C09K 3/32 (2006.01)
B09C 1/00 (2006.01)
A23L 1/035 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
C02F 103/26 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

18.06.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.12.2013

Fecha de la concesión:

14.04.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

23.04.2014

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario, s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

VECINO BELLO, Xanel;
DEVESA REY, Rosa;
CRUZ FREIRE, José Manuel y
MOLDES MENDUIÑA, Ana Belén

54 Título: **Procedimiento de separación de los surfactantes presentes de licores de lavado de maíz y usos**

57 Resumen:

La presente invención describe un procedimiento para la separación de los surfactantes presentes en los licores de lavado de maíz basados en la extracción con disolventes orgánicos. Además, una vez extraídos los biosurfactantes de los licores de lavado de maíz, se ha evaluado la capacidad nutricional de estos licores de lavado de maíz, utilizando bacterias lácticas, observándose que su capacidad nutricional se mantiene.

ES 2 435 324 B2

DESCRIPCIÓN**Procedimiento de separación de los surfactantes presentes en los licores de lavado de maíz y usos****Sector de la técnica**

5 Los surfactantes son compuestos que debido a la presencia de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos se pueden situar en las interfases de fluidos con diferentes grados de polaridad (agua/aceite y aceite/agua), formando una película y reduciendo la tensión superficial del medio. Una sustancia o producto se considera que tiene capacidad surfactante cuando este es capaz de reducir la tensión superficial del agua en 8 unidades (Busscher H., (1994). *Appl. Microbiol. Biot.* 41, 4-7), aunque un buen surfactante es aquel producto o compuesto que reduce la tensión superficial del agua en más de 20 unidades (Mulligan C., Gibbs B., (1993). *Biosurfactants: production Properties and Applications*. Marcel Dekker, New York, 329-371.). Las propiedades de los surfactantes, entre las que destacan la detergencia, poder emulgente, lubricación, capacidad espumante y solubilización y dispersión de fases proporcionan a los surfactantes un gran número de aplicaciones industriales.

20 Muchos de estos compuestos surfactantes son producidos por organismos vivos tales como plantas, microorganismos, o el propio organismo humano, siendo considerados como surfactantes naturales frente a los surfactantes sintéticos obtenidos por vía química, denominándose de este modo, biosurfactantes, que pueden llegar a ser más efectivos que los surfactantes convencionales. Entre las ventajas de los biosurfactantes obtenidos de forma natural se puede destacar: a) Se necesita menor concentración de biosurfactante para reducir la tensión superficial. b) Toleran mejor los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica pudiendo ser utilizados en un mayor rango de condiciones. c) Son biodegradables por lo que no causan problemas medio ambientales. d) Presentan una toxicidad muy baja, por lo que pueden utilizarse con toda seguridad en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Desai, J.D., Banat, I.M., (1997). *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61 (1), 47-64.).

30 Los biosurfactantes presentan numerosas aplicaciones (Banat, I.M., (2000). *Water Studies.* 8, 177-185.), de las que se destaca su empleo en: **La industria alimentaria** los biosurfactantes se utilizan para mejorar la reología de los productos facilitando la formación de emulsiones. Otro campo, aunque incluido en el sector de la alimentación, en el que los biosurfactantes podrían desempeñar un papel importante es en la elaboración de envases activos que impidiesen la adhesión de microorganismos patógenos a su superficie aumentando, de este modo, la vida útil de los alimentos. Existen trabajos que ponen de manifiesto dicha propiedad. (Gudiña, E. J., (2010). *Lett. Appl. Microbiol.* 50 (4), 419-424).

40 **Productos de higiene y cosméticos.** Debido a su compatibilidad con la piel, los biosurfactantes pueden emplearse en todo tipo de productos de higiene y cosméticos. La obtención de biosurfactantes por acción enzimática (principalmente lipasas) sobre moléculas hidrofóbicas promovió un nuevo direccionamiento de estos compuestos, fundamentalmente para su utilización en productos de este tipo, es decir, de higiene y cosméticos.

Aplicaciones terapéuticas. La industria farmacéutica es otra de sus aplicaciones más importantes (Rodrigues, L., (2004). *Appl. Microbiol. Biot.* 66 (3), 306-311). La surfactina, uno de los biosurfactantes más conocido, posee varias aplicaciones médico-farmacéuticas muy interesantes como la inhibición de la formación de coágulos, formación de canales iónicos en membrana, actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral.

Biosurfactantes en la agricultura. Los biosurfactantes son empleados en agricultura especialmente en formulaciones de herbicidas y pesticidas. Los compuestos activos de estas formulaciones generalmente son hidrofóbicos, siendo necesarios agentes emulgentes para dispersarlos en soluciones acuosas.

Biocorrección. Los biosurfactantes permiten reducir el impacto ambiental causado por diversos residuos liberados al medio ambiente como por ejemplo los hidrocarburos (Moldes, A. B., (2011). *J. Agr. Food Chem.* 59 (17), 9443-9447). Existen numerosos microorganismos que son capaces de degradar hidrocarburos de cadena larga como el petróleo, aunque para ello estos hidrocarburos deben de estar biodisponibles. La mayoría de los hidrocarburos causantes de contaminación son altamente insolubles en agua generando muchas veces uniones hidrofóbicas a determinadas superficies, como las rocas, por lo que se hace muy difícil su eliminación. Esto es debido a que los microorganismos que pueden degradarlos no son capaces de acceder a ellos por no estar biodisponibles. Los biosurfactantes actúan produciendo emulsiones o solubilizando los hidrocarburos o compuestos insolubles en agua, contribuyendo así a su biodisponibilidad. Es por esto que en el campo de la biocorrección se está intentando encontrar microorganismos productores de sustancias biosurfactantes que favorezcan la biodisponibilidad de estos hidrocarburos. Los biosurfactantes también son útiles en la biocorrección de ambientes contaminados con metales pesados tóxicos como el uranio, cadmio o plomo.

Por otra parte, los licores de lavado de maíz ("corn steep liquid") se obtienen mediante lavado de los granos de maíz con agua caliente, con el fin de hincharlos y extraer el almidón (US Patent, 4,980,282). Estos licores tienen bajo contenido en azúcares reductores, así como bajo contenido en lisina libre, histidina, arginina, ácido aspártico y tirosina. Por otra parte tienen elevado contenido en ácido láctico (US Patent 4,980,282). En los últimos años ha que dado ampliamente demostrada la aplicación de los licores de lavado de maíz como suplemento nutricional en procesos fermentativos, durante la producción de productos como alcoholes, lipasas, ácido láctico o ácido málico, entre otros, sustituyendo a nutrientes tan costosos como el extracto de levadura o la peptona (Rivas B., (2004). *Int. J. Food Microbiol.* 97 (1), 93-98). Este hecho ha repercutido en la obtención de productos biotecnológicos a un menor coste.

Estado de la Técnica

Las ventas anuales de surfactantes están en torno a unos 23,9 millones de dólares (Market Report, (2008). *World Surfactant Market: markets, products, applications, innovations, chances & risks, competition, prospects to 2015, Germany: Active Market Intelligence.*) con una producción global de cerca de 13 millones de

toneladas (Rust D., (2008). Surfactants: a market opportunity study update, Midland, MI: OmniTech International Ltd; Levison M. I., (2009). Surfactant production: present realities and future perspectives. In: U. Zoller (ed) Handbook of detergents part F: production, Boca Raton, FL: 142, 1-38.), pero la mayoría de
5 estos surfactantes no son biodegradables y pueden generar problemas medioambientales cuando son utilizados para determinados fines como el tratamiento de suelos o aguas contaminadas. Por esta razón es de interés la obtención de biosurfactantes que sean biodegradables y no degraden el medio ambiente. Algunos microorganismos son capaces de producir biosurfactantes,
10 aunque de momento su producción industrial no ha sido del todo desarrollada debido a que los procesos de producción y purificación resultan bastante costosos (WO2006136178 (A1), JP2003320367 (A)).

15 En este sentido nadie ha evaluado hasta el momento la capacidad tensoactiva de los licores de lavado de maíz, ni existen trabajos en los que se hayan extraído estos biosurfactantes de dicha corriente residual.

Se propone la extracción de los biosurfactantes contenidos en los licores de lavado de maíz, también denominado "corn steep liquid", para su utilización como agente
20 tenso-activo, surfactante o detergente en diferentes campos (industria alimentaria; industria cosmética; industria farmacéutica; en la biocorrección de aguas y suelos contaminados; así como en la agricultura y en aplicaciones terapéuticas). Además los licores de lavado de maíz exentos de los biosurfactantes mantienen sus propiedades nutricionales y puede ser utilizado como suplemento nutricional en
25 medios fermentativos.

Explicación de la invención

30 El protocolo seguido se presenta esquematizado en la **Figura I**.

Extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz

Inicialmente, se prepararon disoluciones seriadas de licores de lavado de maíz (SIGMA ALDRICH, con 50% en sólidos) hasta 20 g/L, con el fin de calcular la
35 concentración micelar crítica (CMC) del licor de lavado de maíz. La CMC de un detergente o de un biosurfactante se define como aquella concentración de detergente a partir de la cual la tensión superficial del agua no se ve disminuida.

Tras la disolución de los licores de lavado de maíz estos se sometieron a distintas extracciones con diferentes extractantes (isoamyl alcohol; cloroformo; acetato de
40 etilo; tributil fosfato (TBP); metil butil éter (MTBE); tricloroetileno (TCE); diclorometano; xileno; hexano; heptano); Una vez realizada la extracción se separaron las dos fases, la fase orgánica y la fase acuosa. Posteriormente la fase orgánica que contiene los biosurfactantes se sometió a un proceso de destilación quedando los biosurfactantes extraídos de los licores de lavado de maíz. Para
45 calcular el rendimiento de la extracción se redisolvió los biosurfactantes en

agua, hasta alcanzar el volumen total de partida de los licores de lavado de maíz. El rendimiento se calcula en función del aumento de la tensión superficial de esta disolución respecto a la tensión superficial de partida presente en la disolución de licores de lavado de maíz (36 ± 2 mN/m). El máximo valor de tensión superficial que se puede alcanzar tras la extracción y redisolución de los biosurfactantes en agua es de 72 mN/m, en este caso no habría extracción de biosurfactantes, mientras que el mínimo valor de tensión superficial que se puede obtener es de 36 ± 2 mN/m, en este caso se extraería el 100 % de los biosurfactantes.

10 Evaluación de la capacidad tenso-activa del biosurfactante extraído

Los biosurfactantes extraídos de los licores de lavado de maíz, se redisolviéron en agua y se midió la TS utilizando un tensiómetro KRUSS K6, equipado con un anillo de platino (1.9 cm Du Noüy). La tensión superficial de la disolución así preparada disminuye alrededor de 36 unidades respecto de la del agua.

Evaluación de los licores de lavado de maíz exentos de biosurfactantes como suplemento nutricional en procesos fermentativos

20 Se comprobó que los licores de lavado de maíz exentos de biosurfactantes pueden ser utilizados como suplemento nutricional en procesos fermentativos llevados a cabo con bacterias lácticas u otros microorganismos similares.

25 Las bacterias lácticas son unos microorganismos con unos elevados requerimientos nutricionales, por lo que el medio nutritivo puede alcanzar hasta el 30 % del coste total de obtención de ácido láctico. Es por ello que en la producción biotecnológica de ciertos subproductos se utilizan nutrientes de bajo coste como los licores de lavado de maíz que abaratan el coste de producción

30 En la **Tabla I** se recogen los datos obtenidos tras fermentación de una fuente de carbono consistente en glucosa con bacterias del género *Lactobacillus*, utilizando como suplemento nutricional diferentes nutrientes consistentes en: 1) 10 g/L de licores de lavado de maíz y 10 g/L de extracto de levadura; 2) 10 g/L de licores de lavado de maíz exento de biosurfactantes y 10 g/L de extracto de levadura

35 Como se puede observar en la **Tabla I**, las productividades alcanzadas durante la producción de ácido láctico con bacterias lácticas, en presencia de licores de lavado de maíz exento o no de biosurfactantes, son similares, lo que demuestra que los licores de lavado de maíz exentos de biosurfactantes mantienen sus propiedades nutritivas.

Ejemplo de realización de la invención

40

Extracción del biosurfactante con metil butil éter o cloroformo

45 Se parte de licores de lavado de maíz en disolución acuosa, los cuales se someten a una extracción con metil butil éter o cloroformo utilizando una relación fase acuosa/fase orgánica 5:10; durante un tiempo de hasta 4 horas y a una velocidad

de agitación de 150 rpm a temperatura ambiente. Tras el proceso de extracción la fase orgánica y la fase acuosa se separan; para posteriormente someter a la fase orgánica a una destilación con una temperatura superior a la temperatura de ebullición del metil butil éter o del cloroformo y así recuperar el disolvente orgánico y obtener el biosurfactante puro de forma separada. El rendimiento de extracción alcanzado en ambos casos tanto con el metil butil éter o con el cloroformo fue del 100%.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de separación de los surfactantes presentes en los licores de lavado de maíz ("corn steep liquid") caracterizado por comprender las siguientes etapas; a) dilución de los licores de lavado de maíz con agua, b) extracción de la los licores con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos, c) separación de las fases, d) destilación de los componentes volátiles de la fase orgánica.
- 10 2. Procedimiento de separación de los surfactantes presentes en los licores de lavado de maíz, según reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de la disolución de los licores de lavado de maíz en agua de la etapa a) está comprendida entre 5 gr /L a 25 gr/L.
- 15 3. Procedimiento de separación de los surfactantes presentes en los licores de lavado de maíz, según reivindicación 1, caracterizado porque el disolvente orgánico utilizado en la extracción de la etapa b) es isoamyl alcohol, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetato de etilo, tetrahidrofurano, tributil fosfato, metil butil éter; dietileter, tricloroetano, hexano, heptano, xileno o diclorometano o cualquier mezcla de estos.
- 20 4. La utilización o uso del material obtenido utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como agente tenso-activo, detergente o surfactante.
- 25 5. La utilización o uso del material obtenido utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como agente tenso-activo, detergente o surfactante para el tratamiento de aguas y suelos contaminados con sustancias hidrofóbicas.
- 30 6. La utilización o uso del material obtenido utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como agente tenso-activo, detergente o surfactante para para mejorar la reología de productos alimenticios.
- 35 7. La utilización o uso del material obtenido utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como agente tenso-activo, detergente o surfactante en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos.
- 40 8. La utilización o uso del material obtenido utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como agente tenso-activo, detergente o surfactante con fines terapéuticos.
- 45 9. La utilización o uso del material obtenido utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como agente tenso-activo, detergente o surfactante en formulaciones de herbicidas y pesticidas.

10. La utilización o uso del material de la fase acuosa que se obtiene utilizando el procedimiento según las reivindicaciones 1-3, como medio nutricional para fermentaciones.

5

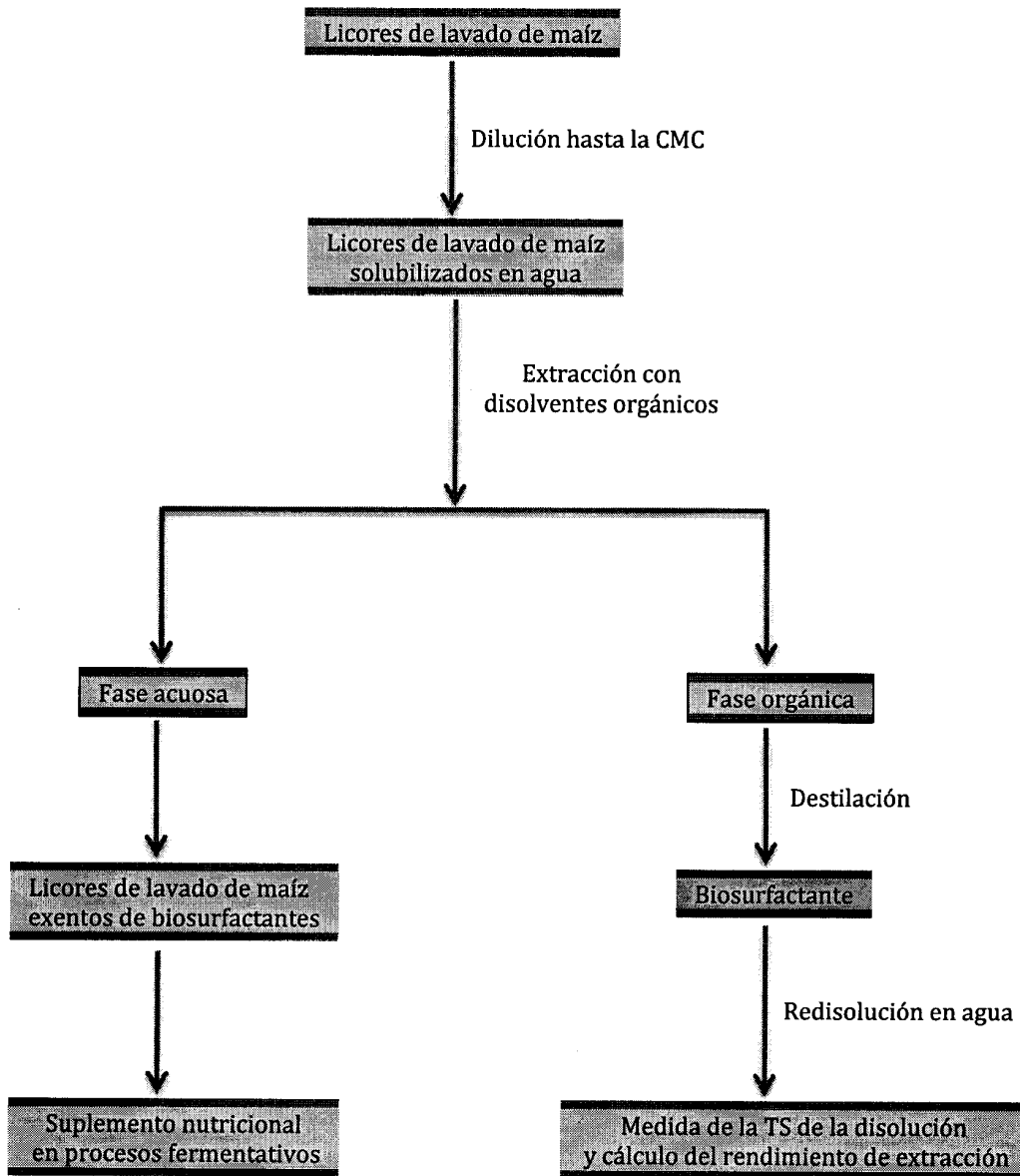


FIGURA I

TABLA I

| Tiempo (h) | Productividad ácido láctico (g/Lh) |
|------------|------------------------------------|
| 2.5 | 0.43 |
| 6.6 | 0.90 |
| 8.6 | 0.77 |
| 18.3 | 0.41 |
| 2.5 | 0.39 |
| 6.6 | 0.92 |
| 8.6 | 0.81 |
| 18.3 | 0.42 |



- ②① N.º solicitud: 201200649
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.06.2012
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | SAHARAN BS. et al. A review on surfactants: fermentation, current developments and perspectives. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2011, vol: GEBJ-29. [en línea] Recuperado de Internet [recuperado el 17.06.2013] http://astonjournals.com/manuscripts/Accepted/GEBJ-29acc7-11-11.pdf | 1,3-10 |
| A | THROCKMORTON, P. et al. Biodegradable surfactants derived from corn starch. Journal of the American Oil Chemist' Society, 1974, vol. 51 (11) páginas 486-494. | 1 |
| A | US 2477763 A (WENDELL W. MOYER et al.) 02. 08.1949, todo el documento. | 1 |
| A | US 2444176 A (MCCALIP J. THOMAS et al.) 29.06.1948, todo el documento | 1 |
| A | US 2712516 A (EARL R. KOOI) 05. 07.1955, todo el documento | 1 |
| A | HEIMBUCH, A.H. et al. Some characteristics of a growth stimulant in corn steep liquor for <i>Lactobacillus casei</i> . J. Bacteriol., 1956 vol. 72 (4) páginas 543-547. | 1 |

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 18.06.2013 | Examinador A. I. Polo Díez | Página 1/4 |
|---|--------------------------------------|----------------------|

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B01F17/00 (2006.01)
C02F1/26 (2006.01)
C09K3/32 (2006.01)
B09C1/00 (2006.01)
A23L1/035 (2006.01)
A61K8/97 (2006.01)
A61K36/899 (2006.01)
C02F103/26 (2006.01)
C02F103/32 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B01F, C02F, C09K, B09C, A23L, A61K

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, FSTA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.06.2013

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-10 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-10 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

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 | SAHARAN BS. et al. | 2011 |
| D02 | THROCKMORTON, P. et al. | 1974 |
| D03 | US 2477763 A (WENDELL W. MOYER et al.) | 02.08.1949 |
| D04 | US 2444176 A (MCCALIP J. THOMAS et al.) | 29.06.1948 |
| D05 | US 2712516 A (EARL R. KOOI) | 05.07.1955 |
| D06 | HEIMBUCH, A.H. | 1956 |

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

La invención, según la primera reivindicación, se refiere a un procedimiento de tratamiento de los licores de lavado de maíz para separar los surfactantes presentes en ellos que comprende las etapas de:

- a) Dilución de los licores en agua
- b) Extracción con disolventes orgánicos
- c) Separación de fases
- d) Destilación de los componentes volátiles de la fase orgánica

Las reivindicaciones dependientes 2 y 3 concretan la proporción de dilución de la etapa a) y los disolventes empleados en la etapa b).

También es objeto de la invención la utilización del producto obtenido en el procedimiento anterior como tensioactivo, surfactante o detergente en el tratamiento de aguas y suelos contaminados, en la composición de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, en herbicidas, etc. (reivindicaciones 4-9)

Por último, la reivindicación 10 trata sobre el uso de la fase acuosa obtenida en el procedimiento anterior como medio nutricional para las fermentaciones.

Los documentos citados en el informe muestran el estado de la técnica.

El documento D1 es una revisión sobre los tipos de biosurfactantes, su producción y sus usos.

El documento D2 se refiere a un método para obtener un surfactante biodegradable a partir de almidón de maíz.

Los documentos D3 y D4 divulgan tratamientos del licor de lavado del maíz para utilizarlo como medio nutricional para fermentaciones.

Los documentos D5 y D6 muestran procedimientos para recuperar diversas sustancias de los licores de maíz: ácido fítico y láctico, un factor de crecimiento.

Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la L.P.)

Los licores de lavado de maíz son composiciones complejas con gran cantidad de ingredientes. Se han utilizado desde los años 40 como fuente de nutrientes en el cultivo de microorganismos (documentos D3 y D4). También han servido para recuperar productos contenidos en dichos licores utilizando extracciones con disolventes orgánicos, precipitaciones, etc. (documentos D5 y D6).

Por otra parte, se conocen varios surfactantes biodegradables o naturales producidos por medio de microorganismo. Para llevar a cabo el cultivo de estos microorganismos se han utilizado diversos subproductos de la industria agrícola, entre los que se citan los licores de lavado de maíz (documento D1)

Sin embargo, ningún documento describe un procedimiento de tratamiento de los licores del lavado de maíz como el de la primera reivindicación de la solicitud, ni sugiere la posibilidad de obtener un producto con propiedades surfactantes a partir de dichos licores. Los surfactantes conocidos cuyo origen es el maíz son polioglucosidos obtenidos haciendo reaccionar el almidón de maíz con etilenglicol o glicerol (documento D2) y no por el procedimiento descrito en la solicitud.

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1 a 3 referentes al procedimiento de tratamiento de los licores de lavado de maíz son nuevas y tienen actividad inventiva. De la misma manera, las reivindicaciones 4 a 10 referentes a los usos de los productos obtenidos en el procedimiento también cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva.