



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 329 643**

⑫ Número de solicitud: 200801020

⑬ Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C02F 103/32 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **10.04.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2009**

Fecha de la concesión: **07.09.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **22.09.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
22.09.2010

⑲ Titular/es: **Fundación Universitaria San Pablo-CEU
Isaac Peral, 58
28040 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Jiménez Gómez, Pedro Antonio;
Llinarel Pinell, Francisco y
García de los Ríos, José Esteban**

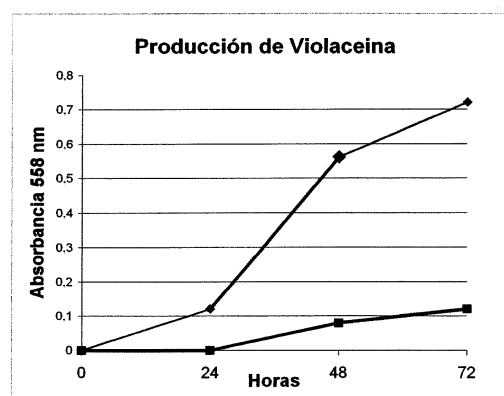
㉑ Agente: **Fuentes Palancar, José Julián**

㉒ Título: ***Pseudomonas sp. Pme 707* (CECT 7314) degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, y procedimiento para su aplicación.**

㉓ Resumen:

Pseudomonas sp Pme 707 (CECT 7314) degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, y procedimiento para su aplicación.

Cepa bacteriana *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314), caracterizada por su capacidad degradadora de la fracción acuosa-oleosa de los residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, debido a su capacidad estimulante de la actividad microbiana por quorum sensing y del crecimiento vegetal para formación de compost, y a su capacidad de biotransformación de las grasas por sus actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa y lipasa. Esta cepa ha sido aislada y caracterizada para ser utilizada en el tratamiento biológico de los efluentes oleosos componentes de dichos residuos, clasificados de tóxicos o peligrosos, generados durante el proceso de elaboración del aceite de oliva y otros aceites vegetales, así como tras su posterior consumo, según un procedimiento, que para el caso particular de las emulsiones de aceites comestibles usados, consiste en un tratamiento físico-químico previo del residuo y la posterior inoculación del microorganismo para la biotransformación.



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Pseudomonas sp Pme 707 (CECT 7314) degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelera, y procedimiento para su aplicación.

La invención que a continuación se presenta tiene por objeto la cepa bacteria *Pseudomonas sp*, de código de laboratorio Pme 707, aislada y caracterizada a los efectos de ser utilizada en la biodegradación de los residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelera, como es el caso de la fabricación y consumo al mayor de aceite de oliva, debido a la capacidad que tiene dicho microorganismo de favorecer el crecimiento microbiano mediado por quorum sensing y el crecimiento vegetal por producción de auxinas en la fracción acuosa-oleosa de dichos residuos, clasificados de tóxicos o peligrosos, así como por su capacidad de transformación de las grasas allí existentes por sus actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa y lipasa.

Esta cepa ha sido depositada con fines de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con fecha 16 de octubre de 2007, donde se le ha asignado el número 7314. La CECT tiene su sede en el edificio de investigación de la Universidad de Valencia, sito en el campus de Burjassot (DP 46100 - Valencia, España).

También es objeto de la presente invención el procedimiento por el cual el microorganismo es aplicado al tratamiento de aquellos residuos oleosos procedentes del consumo en hostelería de aceite vegetal, principalmente aceite de oliva, con el fin de que el proceso degradativo de las emulsiones aceitosas pueda realmente llevarse a cabo.

La invención se encuadra en el campo de la biotecnología, y dentro de éste, en el del tratamiento biológico de los efluentes y aguas oleosas componentes de los residuos de aceites tóxico o peligrosos, tanto de la industria alimentaria, generados durante el proceso de fabricación (los conocidos alpechines y alpeorujos en el caso del aceite de oliva), como el producido tras su consumo en hostelería (emulsiones de aceites comestibles usados).

Por ser un método de tratamiento biológico de residuos, es en sí mismo un método respetuoso con el medio ambiente y económico, en comparación con los tradicionales de eliminación o de tratamientos físico-químicos de los residuos oleosos, siendo además en este caso especialmente interesante en cuanto favorece la transformación de dichos residuos en compost, debido a la capacidad del microorganismo de producir auxinas que favorecen el crecimiento vegetal.

Estado de la técnica

Se define residuo como cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga intención u obligación de desprenderse (Ley 10/1998 de residuos). De acuerdo con la legislación vigente, son residuos peligrosos aquellos que reúnen, al menos, una de las siguientes características: explosividad, comburente, inflamable, irritante, nocivo, tóxico, cancerígeno, corrosivo, infeccioso, teratígeno, mutagénico, inestable, fuente de compuestos secundarios o ecotóxico. Como ejemplo podemos decir que un residuo es corrosivo si presenta cualquiera de las siguientes propiedades: ser acuoso y tener un pH inferior a 2 o superior a 12.5, y/o ser líquido y corroer el acero a una tasa superior de 6,35 mm/año a una temperatura de 55°C. Y un residuo sería tóxico cuando tiene el potencial de causar la muerte, lesiones graves, o efectos perjudiciales para la salud del ser humano si se ingiere, inhala o entra en contacto con la piel.

Como resultado de determinadas actividades industriales relacionadas con los aceites vegetales, como la fabricación de aceite de oliva, el sector hostelero, o la producción de porcino, se generan unos efluentes oleosos que incluyen sustancias tóxicas para la salud y nocivas para el medio ambiente, por lo que son considerados residuos tóxicos o peligrosos.

En la industria alimentaria y hostelera dichas sustancias existentes como resultado de multitud de procesos industriales relacionados con el aceite vegetal, como es el caso del aceite de oliva. En los efluentes de la producción del aceite de oliva, tanto en las aguas oleosas o alpechines (método de extracción continua en tres fases), como en los pastos alpeorujos (método de extracción en dos fases), existe una alta concentración de materia orgánica y distintos compuestos inorgánicos, como es el caso de polifenoles, polialcoholes, sustancias nitrogenadas, etc., todos de naturaleza muy tóxica y a su vez muy diversa. En el caso particular de los polifenoles, la mayoría se consideran extremadamente tóxicos para las células animales y contaminantes para el medio ambiente, además producen una acción eutrofizadora muy acusada de las aguas, lo que justifica el enorme efecto contaminante de los residuos.

Por tanto, la última fracción de los residuos de la producción y consumo de los aceites vegetales, formada por las aguas oleosas o alpechines, sobre los que actúa esta propuesta de patente están considerados como residuos peligrosos, tanto por la referida legislación estatal (Ley 10/98 de Residuos), como por la comunitaria (Directiva del Consejo 91/156). En la directiva de la UE de residuos peligrosos 91/689/CEE en sus anexos I, II y III, clasifica en categorías o tipos genéricos de residuos peligrosos relacionados según su naturaleza o la actividad que los generó. Así, tenemos en el anexo I.A. n° 9.- aceite/agua, mezclas de hidrocarburo/agua, emulsiones; o en el anexo I.B. n° 19.- jabones, grasas y ceras animales o vegetales; n° 38.- aceites vegetales. También podemos comprobar esta clasificación en el Catálogo Europeo de Residuos (CER), incluido en el capítulo 20 de la lista, correspondiente a residuos municipales (residuos domésticos y asimilables procedentes de los comercios, industrias e instituciones), incluidas las fracciones recogidas selectivamente en el punto 20 01 25 y 20 01 26.

Es por ello, por lo que la Ley de residuos obliga a los productores a eliminar (o transformar) los residuos oleosos, bien a través de un gestor autorizado, bien a través de un tratamiento, como por ejemplo una EDAR en el caso de producción de porcino. Su eliminación resulta un verdadero problema para determinadas empresas, sobre todo si están incluidas en el anexo 1 de la IPPC, ya que están obligadas a obtener la Autorización Ambiental Integrada.

Los métodos tradicionales para la eliminación o tratamiento de los efluentes de la producción de aceites vegetales, especialmente en lo relativo a las aguas oleosas ricas en polifenoles, han sido la eliminación directa, a través de depuradoras, fertilizantes, piensos o vertidos controlados, la evaporación, natural en balsas o acelerada por tratamiento térmico, y los tratamientos físico-químicos (filtración, incineración, destilación-evaporación, etc.). Estos métodos son generalmente perjudiciales para el medio ambiente, y también bastante costosos. Por eso, desde hace unos años atrás, han interrumpido con fuerza los métodos de tratamiento biológico, como la generación de biogás, el compostaje o la fermentación, que es en el campo donde se encuadra la invención que más abajo se presenta.

La legislación y la tecnología orientadas a la limpieza del ambiente y la prevención de su deterioro han sido dos de los mayores avances del final del siglo XX y han propiciado el nacimiento de tecnologías basadas en el uso de microorganismos con amplias capacidades biodegradadoras.

Una de dichas técnicas basadas en el uso de microorganismos es la biorremediación, que emplea microorganismos vivos para la eliminación de contaminantes ambientales (Atlas y Pramer, 1990; Atlas y Bartha 2002). Esta es una de las tecnologías aplicables al fin perseguido con la presente invención, incluso a sabiendas de que en el caso de los efluentes oleosos, los componentes tóxicos o peligrosos mantienen, en general, una baja tasa de degradación, además de que sólo la realizan unas pocas especies de microorganismos, de ahí que sean más difíciles de eliminar naturalmente y persisten por más tiempo afectando al medio ambiente.

Sin embargo, en el área mediterránea, la actividad degradadora de emulsiones oleosas puede resultar especialmente interesante. Esta actividad no es desarrollada en general por bacterias Gram negativas, pero la proliferación de estas puede facilitar la producción de un biocompost a partir de un residuo.

Lo que ha conseguido en este caso es aislar una cepa bacteriana con capacidad de estimular el crecimiento microbiano de otros grupos de bacterias degradadoras de los componentes tóxicos y peligrosos de los efluentes oleosos de origen en la industria alimentaria y hostelera, y de producir sustancias que favorecen la germinación vegetal, favoreciendo la transformación de los residuos en biocompost. Además, el nuevo microorganismo presenta unas actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa y lipasa que le permite degradar directamente las grasas de dichos efluentes.

Pero dicho microorganismo potencialmente degradador de residuos oleosos no pueden añadirse directamente al residuo, sino que precisa de un tratamiento físico-químico previo del mismo para su utilización, lo cual también es el objeto de esta invención.

No existiendo en la actualidad ningún trabajo sobre la valorización de la última fracción acuoso-oleoso en aceites tóxicos de origen industrial u hostelero para obtener compost, publicado en documentos de patente o a través de literatura no patente, se entiende oportuno proponer la presente alternativa de eliminación o reutilización más respetuosas para el medio ambiente que las empleadas hasta el momento.

La invención

El referido microorganismo potencialmente degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelera, y que se reivindica de propia invención, es *Pseudomonas sp* Pme 707, con número de depósito 7314 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) a los fines de patente.

Se trata de un microorganismo con capacidad de producir sustancias que estimulan la actividad microbiana mediada por quorum sensing de diferentes bacterias que ayudan a la degradación de los distintos componentes residuales de las aguas y efluentes oleosos generados durante el proceso de producción de los aceites vegetales, y que también están presentes en las emulsiones de los aceites usados provenientes del consumo a gran escala, así como por la capacidad metabólica que tiene para la biotransformación de las grasas existentes en dicha fracción acuosa-oleosa de residuo tóxico con origen en la industria y la hostelería.

Más concretamente, el poder degradador de aguas residuales y efluentes oleosos de *Pseudomonas sp* Pme 707 por estímulo de la actividad microbiana es debido a la capacidad que tiene este microorganismo de producir moléculas con función señalizadora, que difunden al interior de la materia orgánica de los componentes de dichos residuos, de modo que al alcanzar una concentración suficiente o densidad crítica, se provoca por el aludido fenómeno de quórum sensing, traducido como “percepción del medio” o “autoinducción”, que diferentes tipos de bacterias existentes en el medio reconozcan dicha concentración de materia orgánica, modulando parte de su expresión génica y acentuando su actividad microbiana frente a dichos componentes residuales, produciendo su degradación.

El microorganismo en cuestión presenta también una importante capacidad de producción de auxinas que favorecen la germinación y el crecimiento vegetal, lo que facilita la biotransformación del residuo en compost.

ES 2 329 643 B1

Una vez aislado y caracterizado, se ha constatado como la cepa Pme 707 es especialmente interesante para la biotransformación de residuos oleosos ricos en sustancias tóxicas con origen en la industria alimentaria y hostelera. Entre sus características destacan las siguientes:

5 Es un microorganismo mesófilo, por lo que la temperatura ideal de incubación debe situarse ente los 28 a 40 grados centígrados.

Mantiene un metabolismo aerobio.

10 Se comporta como neutrófila y mantiene una tasa de biotransformación óptima en pH de 5,5 a 7,5.

Tiene una capacidad degradadora de las grasas mediante actividades esterasa, esterasa lipasa y lipasa.

15 En los casos donde el residuo oleoso de carácter tóxico o peligroso lo componen emulsiones de aceite vegetal usado (agua oleosa con carga iónica disuelta), procedente en su mayor volumen del consumo en hostelería, se ha desarrollado un procedimiento de aplicación de la cepa bacteriana de invención para posibilitar su acción biodegradadora de los polifenoles y demás componentes tóxicos una vez en contacto con el residuo.

20 Este procedimiento, que también se reivindica como de propia invención, consiste en un tratamiento físico-químico previo del residuo y la posterior inoculación del microorganismo para la biotransformación, según estas tres operaciones básicas que más abajo se describen más en detalle:

1) Emulsión del aceite residual en decantador y separación de la fase acuosa-oleosa de la orgánica mediante flotación con vapor de agua, realizada por inyección de vapor de agua desde el fondo del decantador.

25 2) Corrección del pH de la fase acuosa-oleosa hasta un valor comprendido entre 5 y 7,5.

3) Inoculación del microorganismo en la fase acuosa-oleosa para provocar su biotransformación.

30 La ventaja de esta invención es disponer de una cepa bacteria potencialmente degradadora de los componentes tóxicos o peligrosos presentes en las aguas y efluentes oleosos generados durante la producción y consumo de los aceites vegetales, como el aceite de oliva, en cuanto estimula la actividad microbiana de diversas bacterias que llevan a cabo dicha degradación y actúa directamente sobre diferentes tipos de grasas existentes en los mismos, siendo además una cepa especialmente beneficiosa para el medio ambiente, en cuanto facilita la biotransformación del residuo en compost, debido a su capacidad de producción de auxinas que favorecen la germinación y el crecimiento vegetal.

40 En el caso del tratamiento de los residuos de aceites vegetales usados, que son un problema en el sector de la hostelería, también se dispone del procedimiento de aplicación de la cepa en cuestión a la fase acuosa-oleosa de las emulsiones aceitosas, lo que hace que la invención pueda ser directamente utilizable en la industria.

45 El gráfico de la Figura 1 refleja la capacidad estimulante de la actividad microbiana mediada por quorum sensing de la cepa de *Pseudomonas*, valorando la producción de violaceína por parte de la cepa mutante de *Chromobacterium violaceum* CV026 tras un periodo de incubación de 24-48 horas en cultivo con extracto de subproductos microbianos de *Pseudomonas sp* Pme 707.

Modo de aplicación

50 La metodología de aplicación de la cepa *Pseudomonas sp* Pme 707 a residuos oleosos de carácter tóxico o peligroso ya ha sido arriba esbozada para un caso donde ese residuo se compone de emulsiones de aceite vegetal usado (agua oleosa con carga iónica disuelta) provenientes fundamentalmente del consumo en la industria hostelera.

55 Como se ha señalado, lo primero es la preparación del residuo por tratamiento físico-químico, según un proceso en el que las citadas emulsiones se someten a una etapa de flotación con vapor de agua en orden a separar la fase orgánica de la fase acuosa-oleosa, seguido de la corrección del pH de esta segunda.

La operación de flotación se realiza en un decantador en el que se introduce el vapor a través de conductos con numerosas boquillas inyectoras de 0,5 mm de diámetro.

60 La inyección de vapor de agua desde el fondo del decantador produce tres efectos: El primero el calentamiento de la emulsión, con lo que se separa mejor la fase orgánica de la acuosa al aumentar la flotabilidad del aceite respecto al agua, el segundo es el arrastre por flotación del aceite hacia la superficie, producido por las pequeñas burbujas ascendentes de vapor, y por último, se aumenta la capacidad de solubilización de los ácidos orgánicos, cetonas y aldehídos en la fase acuosa.

65 La fase orgánica puede emplearse para otros fines como producción de biodiesel, no siendo objeto de ensayo para la presente invención. Sin embargo, la fase acuosa-oleosa no presenta esta utilidad, siendo interesante biotratarla con la intención de destoxificarla y poder valorizarla como compost u otros usos.

ES 2 329 643 B1

El pH de la fase acuosa-oleosa del residuo debe corregirse hasta acercarlo a la neutralidad antes del inoculación del microorganismo para su biotransformación. Para que el proceso sea óptimo el pH debe mantenerse entre 5 a 7,5.

Para la corrección del pH se propone emplear NaOH (hidróxido sódico) en concentración y volumen según la cantidad y composición del residuo.

Una vez preparado el residuo, el inóculo de la cepa bacteriana puede prepararse a partir de cualquier medio general completo y complejo. El volumen y concentración de la bacteria debe adecuarse al volumen del residuo a biotransformar, así como al biorreactor a emplear.

El tratamiento con este microorganismo se ve favorecido si se produce la oxigenación periódica del sustrato a biotransformar. De este modo mejora la tasa de germinación vegetal.

La inoculación del microorganismo en la fase acuosa-oleosa se realiza a partir de un cultivo previo en medio líquido LB a 37°C durante 24 h, hasta alcanzar una concentración superior a 5×10^{11} ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro), verificada por el método de recuento en placa, e inoculado a razón de 500 ml de cultivo por metro cúbico de residuo.

Ejemplos

A continuación se muestran los resultados de algunos de las pruebas y experimentos realizados que justifican la eficacia de la invención.

Capacidad estimulante de la actividad microbiana mediada por quorum sensing

Se llevó a cabo una detección de actividad productora de moléculas activadoras de quorum-sensing mediante el ensayo biológico en modelo de *Chromobacterium violaceum* (McLean RJ *et al*, 2004). El ensayo consiste en detectar la producción de violaceína por parte de la cepa mutante de *Chromobacterium violaceum* CV026 tras un periodo de incubación de 24-48 horas. Se siguieron los siguientes pasos:

1. Se cultivó la cepa de *Pseudomonas sp* en un medio completo durante 24, 48 y 72 horas.
2. Se filtró el extracto de crecimiento por un filtro de 0,22 μ m quedando como eluido un extracto del medio sin presencia de bacterias.
3. Se inoculó la cepa mutante de *Chromobacterium violaceum* CV026 en el extracto y se incubó durante 24, 48 y 72 horas.
4. Se valoró como positiva la actividad reguladora de quorum-sensing si se detectó la producción de violaceína.
5. Se midió la absorbancia de los extracto a 558 nm para cuantificar al producción de violaceína por la cepa de *Chromobacterium violaceum* CV026 en cultivo con extracto de subproductos microbianos de *Pseudomonas sp* Pme 707 CECT 7314 en diferentes condiciones.

La Tabla I muestra la valoración de la producción de violaceína por la cepa de *Chromobacterium violaceum* CV026 en cultivo con extracto de subproductos microbianos de *Pseudomonas sp* Pme 707 CECT 7314 a las 0, 24 y 48 horas, siendo A la absorbancia de la producción de violaceína en cultivo completo y B la absorbancia en cultivo con extracto de subproductos microbianos de *Pseudomonas sp* Pme 707. El gráfico de la Figura 1 refleja el resultado de esta valoración.

TABLA I

T (horas)	A	B
0	0	0
24	0	0,12
48	0,08	0,56
72	0,12	0,72

Capacidad de biotransformación de grasas

La Tabla II muestra la valoración de la actividad microbiana esterasa, esterasa-lipasa y lipasa a las 24 horas según el método API ZYM BioMérieux.

TABLA II

Cepas	Actividad Esterasa	Actividad Esterasa-Lipasa	Actividad Lipasa
<i>Pseudomonas sp</i> Pme 707 CECT : 7314	40 nm/ μ l	60 nm/ μ l	60 nm/ μ l

Capacidad de producción de auxinas

El Ácido Indolacético (AIA) es una auxina, es decir, una hormona vegetal que favorece el crecimiento de las plantas. La producción de AIA fue estimado mediante el método de valoración colorimétrica de Gordon y Weber, (1951).

Tras la valoración colorimétrica se utilizó la técnica descrita por García de los Ríos, 1989 y tras su metodología se comprobó que el valor máximo detectado para la cepa de *Pseudomonas sp*. Pme 707 CECT 7314 propuesta para patente fue de 2.7 μ g/mL a las 120 h.

Preparación de las alícuotas y ensayo de germinación

Homogeneizados 100 mL del aceite y 900 mL de agua en un Erlenmeyer de 1L seguimos dos rutas:

Sacamos 100 mL de ese medio preparado, le añadimos 1,5 g de agar noble, corregimos el pH hasta 7, esterilizamos en autoclave (120°C, 20 minutos), y por ultimo lo dispensamos en una placa de Petri, obteniendo la placa A.

Los restantes 900 mL de aceite y agua son esterilizados en autoclave (120°C, 20 minutos), luego se le añade al total 13,5 g de agar noble, 18 g agua de triptona y la bacteria control correspondiente para cada placa. Una vez esterilizado (120°C, 20 minutos) se dispensa sobre una placa de Petri y se numera.

La Tabla III muestra la valoración de la capacidad germinativa de *Arabidopsis thaliana* (Co10) sobre diferentes sustratos

TABLA III

Placa	Medio de cultivo	Porcentaje de germinación
A	Aceite residual	0 %
B	Suelo libre completo	80 %
C	<i>Pseudomona sp</i> Pme 707 CECT : 7314	90 %
D	<i>Pseudomona sp</i> Pme 707 CECT 7314 + Aceite residual	70 %
E	Suelo libre completo + Aceite residual	10 %

Para el ensayo de germinación se colocaron 10 semillas de la especie *Arabidopsis thaliana* (Co10) sobre cada placa y se dejaron reposar durante 4 días en las condiciones óptimas de temperatura (aprox. 24°C) y humedad para su crecimiento.

ES 2 329 643 B1

Una reutilización última de estos residuos (valorización) podría ser el biocompost siendo esta cepa una buena candidata para esta biotransformación por estar presentes de manera normal en suelo libre. Estos microorganismos, pueden favorecer el desarrollo y protección de especies de cultivo.

5 La cepa propuesta para patente muestra una marcada actividad esterasa y esterasa-lipasa. De este modo el fraccionamiento de las grasas puede facilitar la disolución del oxígeno atmosférico de la microbiota aerobia. Esta podría ser una de las claves que regulen la eficacia de la biotransformación en este proceso.

10 Generalmente los estudios dirigidos hacia la biodegradación se han realizado bajo condiciones de anaerobiosis en procesos destinados a la biorremediación (Bouallagui *et al.*, 2004), como la biodegradación de aceites vegetales y sus intermedios metabólicos en sedimentos de agua dulce enriquecidos con aceite (Li *et al.*, 2005), pero no exclusivamente. De acuerdo con Eusebio *et al.*, (2005), nuestro estudio se ha realizado en condiciones aerobias lo que puede generar alternativas a los diferentes métodos de biodegradación, en especial los empleados con efluentes tratados de la industria agroalimentaria.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314), microorganismo **caracterizado** por su capacidad degradadora de la fracción acuosa-oleosa de los residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelera, debido 1) a su capacidad de producir sustancias que estimulan la actividad microbiana mediada por quorum sensing de diferentes bacterias que ayudan a la degradación de los componentes residuales de las aguas y efluentes oleosos, al producirse la modulación de parte de su expresión génica en el momento de reconocer una concentración crítica (el “quorum sensing” o “percepción del quorum”) de las moléculas de dichas sustancias difundidas en la materia orgánica de los componentes residuales, 2) a su capacidad de producir auxinas que favorecen la germinación y el crecimiento vegetal, y 3) a su capacidad de biotransformación de las grasas existentes en dicha fracción acuosa-oleosa.

15 2. Uso de *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314), según reivindicaciones 1, en la biodegradación de la fracción acuosa-oleosa de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelera.

3. Uso de *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314), según reivindicación 2, en la eliminación de grasas mediante su actividad enzimática esterasa, esterasa lipasa y lipasa de las aguas oleosas de la industria alimentaria y hostelera.

20 4. Procedimiento para la aplicación del microorganismo *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314) a residuos tóxicos o peligrosos de aceites vegetales usados, a los fines de las reivindicaciones anteriores, consistente en las siguientes operaciones: 1) emulsión del aceite en decantador y separación de la fase acuosa-oleosa de la orgánica mediante flotación con vapor de agua, realizada por inyección de vapor de agua desde el fondo del decantador, 2) corrección del pH de la fase acuosa-oleosa hasta un valor comprendido entre 5 y 7,5, y 3) inoculación del microorganismo para biotransformación del residuo.

25 5. Procedimiento para la aplicación del microorganismo *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314) a residuos tóxicos o peligrosos de aceites vegetales usados, según reivindicación 5, **caracterizado** porque la corrección del pH de la fase acuosa-oleosa se realiza mediante adición de hidróxido sódico (NaOH), en concentración y volumen variable en función de la cantidad y composición del residuo.

30 6. Procedimiento para la aplicación del microorganismo *Pseudomonas sp* Pme 707 (CECT 7314) a residuos tóxicos o peligrosos de aceites vegetales usados, según reivindicación 5, **caracterizado** porque la inoculación del microorganismo en la fase acuosa-oleosa se realiza a partir de un cultivo previo en medio líquido LB a 37°C durante 24 h, hasta alcanzar una concentración superior a 5×10^{11} ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro), verificada por el método de recuento en placa, e inoculado a razón de 500 ml de cultivo por metro cúbico de residuo.

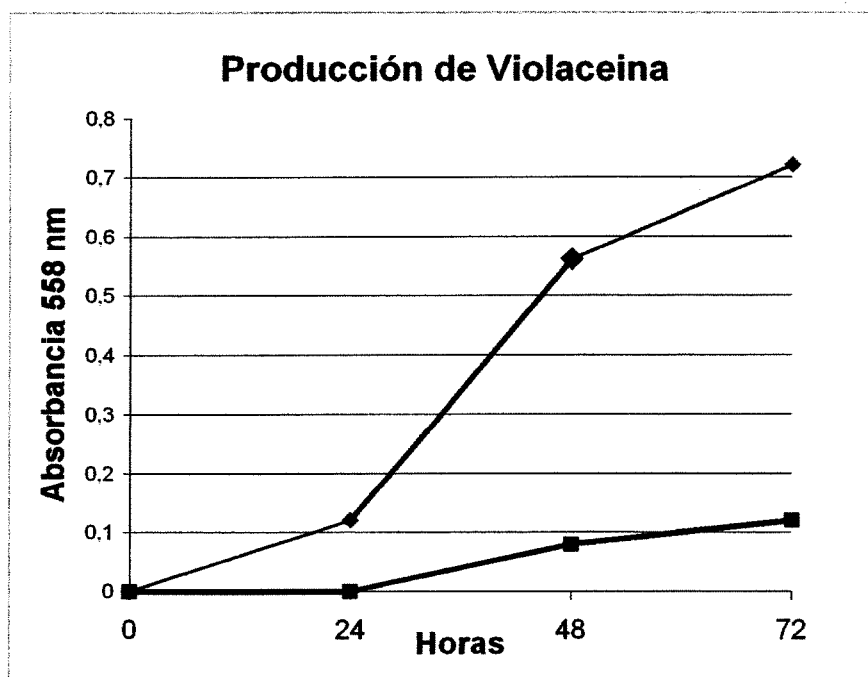


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 329 643

⑫ Nº de solicitud: 200801020

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **10.04.2008**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5980747 A (VANDENBERGH, P.A. et al.) 09.11.1999, todo el documento; ver reivindicaciones.	1-6
A	GB 2387852 A (ASAHI INDUSTRIAL CO. LTD.) 29.10.2003, todo el documento.	1-6
A	US 6057147 A (OVERLAND, B.A. et al.) 02.05.2000, todo el documento.	1-6
A	DE 4009806 C1 (GRÜNBECK WASSERAUFBEREITUNG GMBH) 14.11.1991, todo el documento.	1-6
A	WO 02055441 A1 (WASTEWATER BIOLOGICAL SOLUTIONS CORP.) 18.07.2002, todo el documento.	1-6
A	JP 2003116526 A (KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN et al.) 22.04.2003, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 16.11.2009]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200373, Nº DE ACCESO 2003-771267.	1-6

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

17.11.2009

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C02F 3/34 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C02F 103/32 (2006.01)