

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 321 269**

21 Número de solicitud: 200900177

51 Int. Cl.:

**C07C 59/08** (2006.01)

**C12P 7/56** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

**A23C 21/02** (2006.01)

**B01D 61/02** (2006.01)

**B01D 61/14** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **16.01.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**03.06.2009**

71 Solicitante/s: **Universidad de Cantabria  
Pabellón de Gobierno  
Avda. de los Castros, s/n  
39005 Santander, Cantabria, ES**

72 Inventor/es: **Otero Hermida, José Antonio;  
Lena López, Gumersindo y  
Olav Mazarrasa, Mowinckel**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento biotecnológico de obtención de ácido láctico natural.**

57 Resumen:

Procedimiento biotecnológico de obtención de ácido láctico natural que, a partir de la recuperación del suero de quesería o lactosuero, comprende las etapas de: fermentación del suero de quesería sin tener que hacer un ajuste de pH, en la que se obtiene ácido láctico, separación directa del ácido láctico obtenido, procedente del caldo de fermentación, mediante una primera nanofiltración (NF), para obtener ácido láctico permeado (nanofiltrado) y, a continuación, concentración del ácido láctico permeado mediante una segunda nanofiltración (NF), a fin de lograr un ácido láctico más puro, con mayor valor añadido.

ES 2 321 269 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento biotecnológico de obtención de ácido láctico natural.

### 5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento biotecnológico de obtención de ácido láctico natural, el cual se incluye dentro del campo de la industria alimentaria, especialmente, la del sector lácteo.

### 10 Antecedentes de la invención

Un imperativo actual para cualquier industria, especialmente las del campo alimentario, es el tratamiento de las aguas residuales procedentes de los procesos que en ellas existen así como también la disminución de la cantidad vertida de tales aguas en ríos o emplazamientos naturales utilizados inadecuadamente como vertederos, con el fin de contaminar lo menos posible el medio ambiente y reducir el impacto negativo sobre éste.

La industria quesera tiene entre sus principales objetivos la reducción progresiva de ese impacto negativo como consecuencia del vertido de aguas residuales con alta carga contaminante. Si se tiene en cuenta que, durante la fabricación de quesos, se producen aproximadamente 9 Kg de lactosuero/Kg de queso, en el cual la lactosa, con un porcentaje de 4-4,5%, es el componente mayoritario, se podrá entender que se necesitan procedimientos para aprovechar dicho lactosuero y no verterlo. La lactosa, a su vez, es la responsable de las altas demandas química (DQO) y biológica (DBO) en los efluentes de los procesos de fabricación de quesos.

Igualmente, dado el contenido apreciable de proteínas y sales minerales en el lactosuero, son necesarios unos procedimientos que recuperen esas proteínas y sales minerales y lo transformen biológicamente en hidrolizados de lactosa y ácido láctico, entre otros componentes.

El lactosuero o suero de quesería, fracción líquida de la leche separada de la cuajada en la fabricación de quesos, es uno de los sustratos más utilizados para la obtención biológica de ácido láctico. Por ello, la transformación del suero de quesería o lactosuero en ácido láctico permitirá lograr dos objetivos: eliminar o reducir el impacto medioambiental, debido a la elevada demanda química de oxígeno (DQO) y, al mismo tiempo, obtener un producto de elevado valor añadido.

El ácido láctico presenta dos isómeros ópticamente activos (enantiómeros): D(-) levorrotatorio y L(+) dextrorrotatorio, siendo éste último conocido también como ácido láctico natural o fisiológico, el cual sólo puede obtenerse según dos rutas metabólicas idénticas a las existentes en la naturaleza. Hay determinados microorganismos, tales como, *Lactobacillus casei* o *Lb. Delbrueckii*, que pueden sintetizar uno de tales isómeros a partir de sustratos, tales como, azúcares, hidrolizados de materias amiláceas, almidones procedentes de maíz y patata, biomasa forestal hidrolizada, hasta glucosa y sueros lácteos.

No obstante, el ácido láctico también se puede producir mediante síntesis química, en la cual se producen mezclas racémicas de las formas L(+) y D(-). Según esta vía, se parte de combustibles fósiles a fin de obtener acetaldehído como producto intermedio.

La producción de ácido láctico, a nivel mundial, se sitúa en torno a 90 000 Tm/año, representando la vía fermentativa un 70%. Es sabido que el ácido láctico es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como acidulante, conservante, acondicionador de piensos para animales, en la industria farmacéutica, en preparados cosméticos, etc.

En la práctica, la obtención de ácido láctico por vía fermentativa se realiza habitualmente mediante una fermentación con ajuste de pH. Para la metabolización de la lactosa por parte de las bacterias acidolácticas, es necesaria la existencia de un pH óptimo. De ahí que, en el procedimiento de fermentación con ajuste de pH se realiza una neutralización del medio en el que van a actuar las bacterias lácticas mediante la adición de bases, lo cual implica un coste añadido.

Además, la neutralización del pH a lo largo de la fermentación genera sales, tales como, lactatos, lo cual implica la realización de un paso adicional para generar ácido láctico, con el consecuente encarecimiento del coste de producción. Es decir, se tendría que ajustar y acondicionar previamente el pH entre 5-6, para que funcionen óptimamente los microorganismos citados y, luego, continuar neutralizando el pH a lo largo de la fermentación.

### 60 Descripción de la invención

A la vista de lo anterior, es necesario un procedimiento biotecnológico que aproveche el lactosuero procedente de la fabricación de quesos, a fin de no verterlo al medio ambiente o minimizar la carga contaminante en el efluente y que, al mismo tiempo, se realice sin tener que ajustar el valor de pH durante la fermentación del lactosuero.

Según un primer y único aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de ácido láctico natural que, partiendo de la recuperación del suero de quesería o lactosuero y previa inoculación de un cultivo de bacterias lácticas, comprende las siguientes etapas:

## ES 2 321 269 A1

- fermentación del suero de quesería sin ajuste de pH, a fin de obtener ácido láctico,

- separación directa del ácido láctico que se va obteniendo en la fermentación, mediante una primera membrana de nanofiltración o nanomembrana con un tamaño de poro mayor, para obtener ácido láctico permeado (nanofiltrado), y

- concentración del ácido láctico permeado mediante el paso de éste a través de una segunda membrana de nanofiltración con un tamaño de poro menor, para lograr un ácido láctico concentrado, de mayor pureza y con más valor añadido.

Por tanto, a lo largo de la fermentación queda excluido el ajuste del pH del caldo fermentativo con la adición de bases, evitándose la generación de sales en forma de lactatos y las operaciones posteriores para regenerar el ácido láctico. Esto último se traduce en un aumento significativo del coste de producción.

Otra ventaja es que, con dicha separación directa y selectiva del ácido láctico producido y presente en el caldo de fermentación, se impide la inhibición del proceso fermentativo por acumulación de dicho ácido y, consecuentemente, un descenso no deseable del pH.

La separación directa del ácido láctico del caldo fermentativo se inicia cuando se alcanza un valor de pH igual a 5 en ese caldo fermentativo.

En la separación directa del ácido láctico natural se emplea una primera membrana de nanofiltración o nanomembrana que presenta una superficie más uniforme y un tamaño de poro mayor. Dicha nanomembrana es apta para separar por filtración aquellas moléculas de bajo peso molecular, tal como, ácido láctico, del caldo fermentativo.

A continuación, para concentrar/purificar el ácido láctico que ha permeado la primera nanomembrana, se emplea una segunda membrana de nanofiltración o nanomembrana con una superficie menos uniforme y un tamaño de poro menor.

Opcionalmente, tras la etapa de concentración/purificación a través de la segunda nanomembrana, se somete al ácido láctico concentrado de mayor pureza a una etapa de ósmosis inversa.

Con el presente procedimiento se aportan dos soluciones prácticas y económicas: separación directa del ácido láctico obtenido sin ajuste de pH, a partir de la fermentación del suero de quesería, y la concentración posterior de dicho ácido láctico para obtener un producto más concentrado, de elevado interés comercial, mediante un proceso de nanofiltración.

### Ejemplo de realización de la invención

Se parte de un volumen de 1000 litros de suero de quesería que se sometió previamente a una microfiltración a temperatura ambiente y, luego, a un tratamiento térmico de pasteurización, durante 30 min, para eliminar la carga microbiana. A continuación, se realiza una suplementación del suero con extracto de levadura (0,25 g/l). Dicho volumen se introdujo en el tanque de fermentación.

Previamente, se selecciona una cepa de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, u otras cepas productoras de ácido láctico natural, para preparar un cultivo, que posteriormente se inocula en el tanque de fermentación.

El método seleccionado para determinar el crecimiento bacteriano en el suero durante el transcurso de la fermentación, una vez inoculado el cultivo (4% v/v), es la medición de la densidad óptica (480 nm) a través de un espectrofotómetro. El proceso de fermentación alcanza un pH de 5 en torno a las 5 horas de iniciar la incubación.

El ácido láctico se va produciendo en el tanque de fermentación y, cuando el pH del caldo fermentativo alcanza el valor de 5, comienza la extracción de dicho ácido a través una primera membrana de nanofiltración o nanomembrana. Esta última tiene un menor rechazo nominal al ácido láctico y, al mismo tiempo, una elevada retención para los otros productos contenidos en el tanque de fermentación que actúan como sustrato fermentativo.

En este caso se hace pasar un flujo de caldo fermentativo a través de una membrana ultrafiltración (UF), volviendo el concentrado al tanque de fermentación, y el ultrafiltrado (permeado) se hace pasar a través de la primera nanomembrana (NF), según una presión y un caudal de trabajo determinados.

Se trabaja con presiones máximas de 60 atm (6079 KPa), a una temperatura máxima de 50°C, preferiblemente, por debajo de 50 atm (5066 KPa).

El ácido láctico que permea la primera nanomembrana se somete posteriormente a una concentración/purificación a través de una segunda nanomembrana (NF) que presenta un tamaño de poro menor (0,40 nm). Se utiliza una nanomembrana comercial que tiene mayor rechazo nominal para el ácido láctico y al mismo tiempo una baja retención para las sales minerales. De esta manera, se logra un ácido láctico de elevada pureza.

## ES 2 321 269 A1

Las membranas de nanofiltración (NF) que aquí se emplean están formadas por una película activa de poliamida sobre un soporte poroso de polisulfona.

5 A través de este ejemplo, no limitativo del alcance de la invención, se puede ver cómo se lleva a cabo el procedimiento de la invención, en donde se obtiene un ácido láctico más puro, con mayor valor añadido y, por otro lado, se consigue una disminución significativa de la carga contaminante presente en los efluentes que proceden de la fabricación de quesos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento biotecnológico de obtención de ácido láctico natural a partir de suero de quesería, con introducción preliminar de un inóculo a base de bacterias lácticas, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- fermentación del suero sin ajuste de pH, en la que se obtiene ácido láctico,

10 - separación directa del ácido láctico del caldo de fermentación, a través de una primera membrana de nanofiltración para obtener ácido láctico como permeado (nanofiltrado), y

- concentración posterior del ácido láctico obtenido como permeado en la etapa anterior, mediante el paso de éste a través de una segunda membrana de nanofiltración para obtener un ácido láctico concentrado, de mayor pureza.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la separación directa del ácido láctico del caldo fermentativo se inicia cuando se alcanza un valor de pH igual a 5 en dicho caldo.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque tras el paso a través de la segunda membrana se somete al ácido láctico concentrado a una etapa de ósmosis inversa.

20 4. Procedimiento según las reivindicación 1, **caracterizado** porque el tamaño de poro de la primera membrana de nanofiltración es de 0,43 nm y el de la segunda es de 0,40 nm.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 321 269

② Nº de solicitud: 200900177

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.01.2009

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20080254165 A (RASHID PATEL, MATTHEW SANDRY, RICHARD SEGUIN) 16.10.2008, todo el documento.	1-4
A	WO 9641021 A1 (CHRONOPOL, INC.) 19.12.1996, todo el documento.	1-4
A	LI Y., SHAHBAZI A., WILLIAMS K., WAN C. "Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes" Applied Biochemistry and Biotechnology (marzo 2008) Vol. 174, Nº. 1-3, páginas 1-9; ISSN 0273-2289; DOI 10.1007/s12010-007-8047-5. Todo el documento.	1-4

#### 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

18.05.2009

Examinador

A. García Coca

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C 59/08** (2006.01)

**C12P 7/56** (2006.01)

**B01D 61/00** (2006.01)

**A23C 21/02** (2006.01)

*B01D 61/02* (2006.01)

*B01D 61/14* (2006.01)

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

C07C, C12P, B01D, A23C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.05.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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



**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	US 2008/0254165 A	16-10-2008
D02	WO 96/41021 A1	19-12-1996
D03	LI Y., SHAHBAZI A., WILLIAMS K., WAN C.	01-03-2008

**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, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-4 de la solicitud, es un procedimiento para la obtención de ácido láctico natural a partir de suero de quesería, que consta de las siguientes etapas: (1) introducción de un inóculo a base de bacterias lácticas, (2) fermentación del suero sin ajuste de pH, (3) separación del ácido láctico mediante nanofiltración (tamaño del poro de la membrana de 0.43 nm), (4) concentración del ácido láctico mediante nanofiltración (tamaño del poro de la membrana de 0.40 nm), y una posterior etapa de ósmosis inversa.

El documento D01 divulga un procedimiento para obtener ácido láctico como permeado, a partir de suero de quesería. El ácido láctico es separado y purificado mediante una combinación de ultrafiltración/microfiltración y nanofiltración. El ácido láctico es posteriormente concentrado mediante evaporación, destilación u ósmosis inversa (ver abstract, párrafos [0009]-[0012] y ejemplo 2).

El documento D02 divulga un método de recuperación y purificación de ácidos orgánicos producidos en procesos de fermentación. El caldo de fermentación es microfiltrado para formar un primer permeado, que es posteriormente sometido a nanofiltración (tamaño del poro de la membrana de 1 a 1.5 nm), para obtener un segundo permeado. El ácido orgánico contenido en este segundo permeado es concentrado mediante ósmosis inversa (ver página 6 línea 8-página 7 línea 4 y reivindicaciones 1-32).

El documento D03 divulga un proceso de separación y purificación de ácido láctico, a partir de suero de quesería, usando una combinación de nanofiltración y ósmosis inversa (ver abstract y figura 1).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-4. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-4. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-4 es, con referencia a los documentos D01-D03, nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).