

Int Cl.⁴ G02F 3/34



2

472168

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA
RECHERCHE (ANVAR)

entidad francesa, domiciliada en 13, rue
Madeleine Michelis, 92200 Neuilly S.Seine,
Francia, relativa a:

"PROCEDIMIENTO DE DEPURACION MICROBIOLÓGICA
DE LAS AGUAS RESIDUALES DE INDUSTRIAS LECHERAS"

=====

Inventores: Agnès Ullmann y Maxime Schwartz

Cl. 6022

24 ABO 1933



MEMORIA DESCRIPTIVA

5. La presente invención, realizada en el Institut Pasteur de Francia, se refiere a un procedimiento que permite la depuración de las aguas residuales de las industrias lecheras. - - - - -

10. Las aguas residuales de estas industrias están constituidas en su mayor parte por suero o lactosuero que es una fase líquida obtenida después de precipitación, a partir de la leche, (por adición de cuajo o de ácido) de la caseína que sirve para la fabricación del queso. - - - - -

Este lactosuero posee una composición media de:

15.	Agua	93,5%
	Lactosa	4,5%
	Materias nitrogenadas . .	0,9%
	Materias grasas	0,3%
	Materias minerales . . .	0,6%
	Acido láctico	0,2%

20. Uno de los constituyentes principales de las materias nitrogenadas es una proteína: la lactalbumina. - - - - -

El destino lógico de estas aguas residuales de la industria lechera es tradicionalmente la corriente de agua más próxima. Este método simplista origina la modificación de



la composición química y microbiológica de la corriente de agua y favorece el desarrollo de microorganismos que liberan productos ácidos o tóxicos, los cuales conducen a perturbaciones en el sistema ecológico (eliminación de los peces y modificación de la flora) que son difícilmente admisibles. -

5.

Un procedimiento que permite eliminar el lactosuero consiste en utilizarlo, ya sea directamente ya sea después de concentración o de desecación, para la alimentación del ganado. La utilización directa del lactosuero necesita la creación de un establecimiento de cría de ganado (de cerda) cerca de la industria lechera. Por otra parte, la concentración o la desecación del lactosuero no son rentables más que en el caso en que la cantidad de lactosuero a tratar sobrepase aproximadamente un millón de litros por día. De hecho, la mayor parte de las industrias lecheras no producen cantidades de lactosuero suficientes (30.000 litros por día para una industria media) para que sea rentable implantar instalaciones de tratamiento y no pueden, por razones diversas, proveerse de un establecimiento de cría de cerdos. - - - - -

10.

15.

20.

Otro procedimiento consiste en utilizar el lactosuero como materia de regado. - - - - -

Sin embargo la solución más económica, aunque la más peligrosa para el ambiente, sigue siendo el desecho directo. - - - - -

25.

Era pues muy de desear un procedimiento de depuración antes del desecho y, en particular, una depuración microbiológica que parece adecuada teniendo en cuenta la naturaleza



del lactosuero. - - - - -

5. La depuración microbiológica de las aguas residuales de la industria lechera ha chocado siempre con dos problemas cuyas soluciones no eran hasta el presente económicamente rentables. El primer problema se refiere a la gran concentración de lactosa en el suero. - - - - -

10. En efecto, se sabe que es imposible airear suficientemente los medios de cultivo para permitir el crecimiento rápido de las bacterias cuando la concentración de éstas sobrepasa 3 g en peso seco por litro. Sin embargo, con una concentración de lactosa de 45 g por litro, se podrían obtener teóricamente por lo menos 10 g en peso seco por litro de materias bacterianas. La necesidad de diluir el lactosuero implicaría un aumento concomitante de las dimensiones y del precio de coste de la instalación de depuración. - - - - -

15.

20. El segundo problema se refiere al desarrollo de los microorganismos, que necesita la adición en el lactosuero de cantidades frecuentemente importantes de compuestos orgánicos o minerales por ejemplo nitratos, lo que aumenta aún el precio de coste de la depuración. Por ello las consideraciones económicas han hecho que hasta el presente se desechara la depuración microbiológica del lactosuero. - - - - -

25. Ahora bien: el solicitante ha descubierto que algunas cepas de bacterias se desarrollan en el lactosuero no diluido, sin adición de compuestos orgánicos o minerales, eliminando a veces más del 80% de la materia seca del lactosuero,



24 AOU

siendo consumida ésta por las bacterias o degradada en CO₂ y H₂O. Las bacterias a utilizar en el procedimiento de depuración según la invención son cepas aerobias no patógenas que poseen por lo menos un enzima proteolítico y una beta-galactosidasa o lactosa-oxidasa. - - - - -

5.

En particular las cepas proteolíticas del género Enterobacter y del género Serratia de la familia de las Enterobacteriaceae dan excelentes resultados: este es el caso de las cepas Enterobacter liquefaciens cepa BCL y 67I, y Serratia atípica 3470 (las cepas citadas forman parte de la colección del Institut Pasteur). Las cepas BCL y 67I han sido depositadas en la colección del Institut Pasteur bajo los números 1003 y 1002. Por otra parte, las cepas de las bacterias citadas en la solicitud han sido objeto de un depósito internacional en Holanda, en el Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn, con los números: CBS 544.73 Enterobacter liquefaciens cepa 1002, CBS 545.73 Enterobacter liquefaciens cepa 1003 y CBS 546.73 Serratia especie atípica cepa 3470. -

10.

15.

Estas cepas son particularmente interesantes puesto que poseen un metabolismo suficientemente rápido para efectuar la operación en plazos razonables, no producen compuestos tóxicos para la fauna de las corrientes de agua y están suficientemente bien adaptadas al crecimiento en lactosuero para evitar la contaminación por otras especies bacterianas eventualmente tóxicas. - - - - -

20.

25.

El aerobismo de estas bacterias evita además la acidulación demasiado importante del lactosuero. - - - - -



5. La depuración del lactosuero se realiza en dispositivos de fermentación que son, en sí mismos, conocidos: depósitos, fermentadores o similares. Se realiza una inoculación masiva de bacterias en el lactosuero y se mantiene una buena aireación y una temperatura comprendida entre 20 y 37°C, preferentemente una temperatura próxima a 30°C durante 48 horas. En ciertos casos es necesario controlar el pH y eventualmente llevarlo a entre 6 y 7 por adición de una base a fin de mantener la actividad de las bacterias. - - - - -

10. En estas condiciones, después de centrifugación para eliminar la materia bacteriana, se obtiene un sobrenadante que tiene un contenido muy débil de materia seca, frecuentemente inferior a 20% del contenido inicial. - - - - -

15. La materia bacteriana recuperada, rica en proteína, puede utilizarse para la alimentación animal lo que hace bajar adicionalmente el precio de coste de la depuración. - - - - -

Una parte del cultivo debe conservarse (aproximadamente 10%) como inóculo para el siguiente ciclo de depuración. - - - - -

20. Para una industria lechera media es necesario prever un recipiente de una capacidad de fermentación de 60 m³ aproximadamente, lo que corresponde al almacenaje del lactosuero producido durante 48 horas y no representa una instalación muy importante. - - - - -

25. Los ejemplos siguientes se dan a fin de ilustrar la invención, y no la limitan, evidentemente, en forma alguna. - - - - -



Ejemplo 1

Depuración con la ayuda de la cepa BCL Enterobacter
liquefaciens.

5. El medio de cultivo está constituido por un lacto-
suero estéril obtenido de la forma siguiente: - - - - -

10. Leche pasteurizada del comercio (LACTEL), incubada
a 37°C, ha recibido una adición de cuajo comercial (3 ml por
litro), se ha incubado durante una hora a 37°C y luego se ha
filtrado sobre gasa hidrófila. El filtrado se centrifuga (a
9000 revoluciones/minuto durante 15 minutos). El sobrenadante
se filtra de nuevo en Buchner en presencia de "Hyflo super-
cell". La esterilización se obtiene por filtración sobre fil-
tro de nitrocelulosa (Millipore). - - - - -

15. La concentración bacteriana de los cultivos se de-
termina por medida de la densidad óptica a 600 nanómetros, ha-
biéndose determinado experimentalmente la correlación entre
densidad óptica y peso seco. - - - - -

20. El contenido de extracto seco del lactosuero y de
los sobrenadantes bacterianos se mide por desecación a 120°C
de 1 a 5 ml de los fluidos hasta peso constante en una copela
de platino. - - - - -

25. El contenido de azúcar reductor se dosifica por el
método de Nelson (Nelson, Journal of Biological Chemistry to-
mo 152, p. 377 (1944)). Por medio de este método se dosifica
la lactosa y al mismo tiempo cualquier otro azúcar reductor



eventualmente presente, como la glucosa y la galactosa que podrían producirse debido a una hidrólisis de la lactosa por las bacterias (la lactosa es, en efecto, un disacárido compuesto por glucosa y galactosa). - - - - -

5. La determinación directa del contenido de proteínas en el lactosuero no es posible por el método del biuret a causa de la presencia de materias que forman un precipitado con los reactivos. El ácido tricloroacético precipita de 1 a 5 ml del lactosuero. El precipitado se lava una vez por medio del ácido tricloroacético al 5% y se dosifica por el método del biuret. - - - - -
- 10.

15. Se inoculan 10 ml de lactosuero con una colonia de Enterobacter liquefaciens cepa BCL. El cultivo se coloca en un erlenmeyer estéril de 100 ml y se agita a 30°C. Se sacan muestras. Se determina la concentración de materia bacteriana, luego se eliminan las bacterias por centrifugación y se efectúan los análisis en los sobrenadantes. - - - - -

Duración de crecimiento	Peso seco bacteriano mg/ml	Porcentaje de azúcar reductor desaparecido
5 h	1,73	-
8 h	3,15	-
24 h	6,6	48%
48 h	4,7	80%

Ejemplo 2

Este Ejemplo muestra la utilización del azúcar re-



ductor por cuatro cepas bacterianas diferentes. Las condiciones de cultivo son las del Ejemplo 1 y las medidas se han efectuado después de 42 horas. - - - - -

Cepas	Porcentaje de azúcar reductor desaparecido	Extracto seco del sobrenadante
<u>Enterobacter liquefaciens</u> (cepa BCL)	76%	-
<u>Enterobacter liquefaciens</u> (cepa 67I)	86%	1,3 g/100 ml
<u>Enterobacter cloacae</u>	57%	-
<u>Serratia atípica</u> 3470	69%	-

5. Este lactosuero tenía un contenido particularmente elevado de lactosa (5,4 g/100 ml). El extracto seco de lactosuero era de 6,1 g/100 ml. - - - - -

Ejemplo 3

Este Ejemplo y el siguiente presentan resultados obtenidos con la cepa 67I de Enterobacter liquefaciens. - - -

10. 30 ml de lactosuero no diluido estéril se han inoculado con 2 ml de un cultivo saturado de la cepa 67I en lactosuero. El cultivo se ha incubado con agitación en erlenmeyer a 30°C: - - - - -



Duración de crecimiento	Peso seco bacteriano mg/ml	Porcentaje de la proteína desaparecida	Porcentaje de azúcar reductor desaparecido	Extracto seco del sobrenadante g/100 ml
24 h	7	48%	61%	3,3
46 h	7,5	70%	86%	1,5

El lactosuero utilizado tenía un extracto seco de 5,8 g/100 ml y contenía 0,36 g/100 ml de proteína y 5,2 g/100 ml de lactosa. -----

Ejemplo 4

5. En este Ejemplo, el lactosuero utilizado es lactosuero bruto obtenido por simple filtración sobre gasa hidrófila de la leche tratada con cuajo. Seis litros de este lactosuero se han inoculado con 600 ml de cultivo saturado de la cepa 67I. El cultivo se ha efectuado a 30°C en un fermentador New Brunswick de 10 litros con una agitación de 400 revoluciones/minuto y una buena aireación. Se ha añadido antiespumante de silicona durante el cultivo. -----

Duración de crecimiento	Peso seco bacteriano	Porcentaje de azúcar reductor desaparecido
10 h	6,9	14%
20 h	9	27%
26 h	9,5	52%
30 h	11	57%
43 h	12	88%



En este cultivo, la acidulación ha sido negligible:
el pH final era de 6,2. - - - - -

Los ejemplos anteriores se refieren a la depuración de lactosuero neutro obtenido por acción del cuajo pero la presente invención se refiere igualmente a la depuración de lactosuero ácido obtenido por acción de los fermentos lácticos (por ejemplo procedentes de la fabricación de quesos de pasta blanda). En este caso, la neutralización del lactosuero se realiza antes de la inoculación y, preferentemente, por adición de amoníaco. - - - - -

El ejemplo siguiente se refiere a la purificación de un lactosuero ácido. - - - - -

Ejemplo 5

10 litros de lactosuero ácido inicialmente a pH 5, se llevan a pH 7 por adición de 70 ml de amoníaco a 14 M. - -

Este lactosuero se inocula con 1 litro de un cultivo saturado de Enterobacter liquefaciens cepa 67I. El cultivo se efectúa como en el Ejemplo 4 anterior. Después de 12 horas de incubación, el cultivo contiene 13 g/l de peso seco bacteriano, habiéndose consumido 92% del azúcar reductor. - - -

Debido a que se ha añadido amoníaco, que sirve de fuente de nitrógeno, 90% de las proteínas del lactosuero se hallan aún presentes al final del cultivo. - - - - -

En este caso, debe observarse que la depuración es



24 HORAS

mucho más rápida: del orden de 12 horas. - - - - -

5. Como es posible comprender de los Ejemplos 1 a 4, al cabo de 48 horas la mayor parte de la lactosa y de la lactalbumina ha desaparecido. Sin embargo, debe observarse que el crecimiento bacteriano se detiene en general al cabo de 24 horas cuando sólo se ha consumido el 50% de la lactosa y que la descomposición de la lactosa y de la lactalbumina prosigue, sin embargo, fenómeno que permite la descomposición del lactosuero sin dilución previa. - - - - -

10. La invención permite así una depuración muy satisfactoria del lactosuero con la ayuda de un dispositivo simple y de volumen reducido, siendo muy pequeño el precio de coste de la operación puesto que el subproducto obtenido (materia bacteriana) puede comercializarse para la utilización en la alimentación animal. - - - - -

A título indicativo, la masa bacteriana obtenida en el Ejemplo 5 comprende aproximadamente 50% de proteína cuya composición de ácido aminado es la siguiente: - - - - -

	<u>Acido aminado</u>	<u>Porcentaje</u>
20.	Lisina	7,3
	Histidina	1,4
	Arginina	4,5
	Cisteína	1,31
	Acido aspártico + aspargina	11,92
25.	Treonina	5,57
	Serina	5,3



24 JUN 1951

	<u>Acido aminado</u>	<u>Porcentaje</u>
	Acido glutámico + glutamina	12,6
	Prolina	5,51
	Glicina	6,69
5.	Alanina	9,53
	Valina	5,69
	Metionina	3,05
	Isoleucina	3,95
	Leucina	9,48
10.	Tirosina	2,19
	Fenilalanina	2,68

Esta Tabla da el porcentaje de las moléculas de cada uno de los ácidos aminados en el hidrolizado de materia bacteriana. - - - - -

15. Se han concentrado muestras de un cultivo procedente de la inoculación de lactosuero ácido del Ejemplo 5, bajo vacío, aproximadamente 5 veces, y se han calentado al baño maría a 100°C durante 20 mn. La suspensión obtenida se ha administrado por vía oral a ratas y ratones sin que se observe
20. ninguna manifestación de toxicidad aguda. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

25. 1.- Procedimiento de depuración microbiológica de las aguas residuales de industrias lecheras, caracterizado por





que se hacen fermentar estas aguas con la ayuda de por lo me
nos una cepa bacteriana proteolítica aerobia no patógena que
posee por lo menos una beta-galactosidasa o una lactosa-oxi
dasa en un recipiente, a una temperatura comprendida entre
5. aproximadamente 20 y 37°C y luego se separa la materia bacte-
riana de las aguas de fermentación. - - - - -

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-
terizado porque se hacen fermentar las aguas residuales sin
prácticamente dilución previa. - - - - -

10. 3.- Procedimiento según una de las reivindicacio-
nes 1 y 2, caracterizado porque la cepa utilizada cuando es
inoculada en un lactosuero no diluido hace aumentar la densi-
dad óptica medida a 600 nm de este último durante por lo me-
nos 24 horas. - - - - -

15. 4.- Procedimiento según una de las reivindicacio-
nes 1 a 3, caracterizado porque la cepa utilizada es de la
familia de las Enterobacteriaceae. - - - - -

20. 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, carac-
terizado porque la cepa utilizada pertenece al género Enterobacter. - - - - -

6.- Procedimiento según la reivindicación 4, carac-
terizado porque la cepa utilizada pertenece al género Serratia. - - - - -

25. 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones
5 y 6, caracterizado porque la cepa utilizada se elige entre:
Enterobacter liquefaciens cepa BCL, Enterobacter liquefaciens





24 AGO

cepa 67I, Enterobacter cloacae y Serratia atípica 3470. - - -

8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se mantiene durante la fermentación el pH de la solución entre 6 y 7 añadiendo una base. - -

5. 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la temperatura se mantiene entre 25 y 30°C. - - - - -

10. 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el lactosuero tratado es un lactosuero ácido que se neutraliza por adición de amoníaco antes de la fermentación. - - - - -

11.- "PROCEDIMIENTO DE DEPURACION MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS RESIDUALES DE INDUSTRIAS LECHERAS". - - - - -

15. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de quince hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

24 AGO. 1973

SECRETARÍA DE ECONOMÍA

Man. Landa

 MTS.