



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 315 205**

⑫ Número de solicitud: 200800450

⑬ Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12S 3/00 (2006.01)

C12S 3/18 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **19.02.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2009

⑰ Solicitante/s:
Fundación Universitaria San Pablo-CEU
Isaac Peral, 58
28040 Madrid, ES

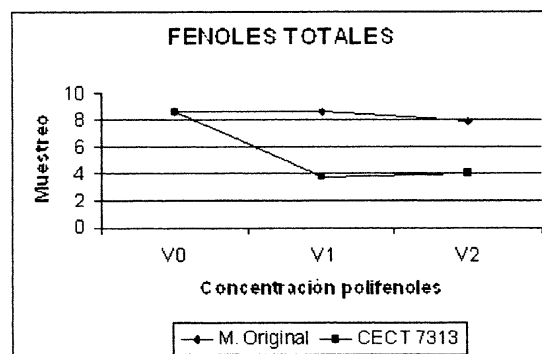
⑱ Inventor/es: **Jiménez Gómez, Pedro Antonio;**
Llinares Pinell, Francisco;
Díaz Martín, Ricardo y
Redondo, Pablo

⑳ Agente: **Fuentes Palancar, José Julián**

② Título: ***Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313) degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, y procedimiento para su aplicación.**

③ Resumen:

Bacillus amyloliquefaciens Bam 2507 (CECT 7313) degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, y procedimiento para su aplicación. Cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313), caracterizada por su capacidad degradadora de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, debido a su capacidad de crecimiento en las aguas oleosas ricas en polifenoles y a su capacidad de biotransformación de los propios polifenoles y de las grasas mediante 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.



ES 2 315 205 A1

DESCRIPCIÓN

Bacillus amyloliquefaciens Bam 2507 (CECT 7313) degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, y procedimiento para su aplicación.

El objeto de la presente invención es la cepa bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, de código de laboratorio Bam 2507, aislada y caracterizada a los efectos de ser utilizada en la biodegradación de los residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, como es el caso de la fabricación y consumo al mayor de aceite de oliva, debido a la capacidad que tiene dicho microorganismo de desarrollarse en las aguas y efluentes oleosos ricos en polifenoles componentes de dichos residuos, clasificados de tóxicos o peligrosos, y de degradar los propios polifenoles y las grasas existentes en los mismos.

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 7313. 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.

Por tanto, la invención se encuadra en el amplio 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, pero además en este caso, por ir dirigido a transformar polifenoles y otras sustancias especialmente tóxicas de las aguas y efluentes generados en la producción y consumo de los aceites vegetales, resulta un método de realmente eficaz.

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 incluye sustancias tóxicas para la salud y nocivas para el medio ambiente, por lo que son considerados residuos tóxicos o peligrosos. Entre tales sustancias cabe destacar a los polifenoles.

En la industria alimentaria y hostelería los polifenoles 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 continúa en tres fases), como en los pastosos alpeorujos (método de extracción en dos fases), existe una alta concentración de polifenoles, además de otros componentes orgánicos y compuestos inorgánicos, todos de naturaleza muy tóxica y a su vez muy diversa (Moreno *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 2000). 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, los residuos oleosos 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. nº 9.- aceite/agua, mezclas de hidrocarburo/agua, emulsiones; o en el anexo I.B. nº 19.- jabones, grasas y ceras animales o vegetales; nº 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 en general perjudiciales para el medio ambiente, y también bastante costosos. Por eso desde hace unos años atrás, a 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. En el caso particular de la industria de producción del aceite de oliva existen antecedentes que ponen de manifiesto el interés de tratar biológicamente residuos oleosos ricos en polifenoles para la producción de compost (FAIR CT96 1420. Anexo A2/Annex A2. FINAL REPORT. PROJECT IMPROLIVE. Improvements of Treatments and Validation of the Liquid-Solid Waste from the Two-Phase Olive Oil Extraction. February 2000).

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.

Para que la biorremediación sea eficaz los contaminantes deben ser susceptibles de ataque microbiano (transformación metabólica), los productos metabólicos deben ser inocuos y el proceso no debe tener efectos secundarios adversos en los ecosistemas. Las condiciones ambientales deben permitir el crecimiento *in situ* de los agentes microbianos que llevan a cabo la biorremediación o la extracción del contaminante de manera que pueda biodegradarse *ex situ* en biorreactores.

Son muchas las cepas de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* sp. que han sido utilizados en multitud de procesos de biodegradación. A pesar de que se conocen algunas de las rutas de biotransformación de polifenoles por parte de especies del género *Bacillus*, debemos considerar que las especies microbianas presentan una tasa de degradación óptima en condiciones particulares, y en el caso de los aceites tóxicos o peligrosos todavía no se emplean técnicas de biotransformación con la intención expresa de reducir la concentración de polifenoles. Un dato que avala esta conclusión es la inexistencia de patentes o solicitudes de patentes publicadas por la OEPM en relación procesos de biodegradación de residuos oleosos de la industria alimentaria.

No existiendo en la actualidad ningún trabajo sobre biotransformación en aceites tóxicos de origen industrial u hostelero publicado en documentos de patente o a través de literatura no patente, se entiende oportuno proponer alternativas de eliminación o reutilización más respetuosas para el medio ambiente que las empleadas hasta el momento.

Los polifenoles que se encuentran en los residuos acuosos generados en la producción y utilización del aceite vegetal, y que son parte fundamental de la fracción oleosa que se destina al consumo (Ortalli, 2004), mantienen, en general, una baja tasa de degradación. Además, ésta sólo la realizan unas pocas especies de microorganismos. Por eso son más difíciles de eliminar de forma natural y persisten por más tiempo afectando al medio ambiente. Entre estos polifenoles se han detectado tirosol, ácido vanílico, ácido protocatequico y ácido caféico, y como más tóxicos, el catecol y metil-catecol.

Lo que ha conseguido el equipo inventor es aislar una cepa bacteriana del género *Bacillus* con capacidad degradadora de parte de dichos componentes tóxicos, y que es especialmente novedosa respecto a cepas del mismo género ya conocidas por su capacidad degradadora de polifenoles, debido a la capacidad de la nueva cepa de crecer en un residuo oleoso con alta concentración de estas sustancias y ser capaz de degradarlas en una elevada tasa. Además, el nuevo microorganismo presenta una actividad enzimática esterasa, esterasa lipasa y lipasa que le permite degradar las grasas de los residuos oleosos de origen en la industria alimentaria y hostelera.

Pero este microorganismo 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.

La invención

El referido microorganismo potencialmente degradador de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelera, y que se reivindica de propia invención, es el *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507, con número de depósito 7313 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) a los fines de patente.

ES 2 315 205 A1

Se trata de un microorganismo de la especie *B. amyloliquefaciens*, género *Bacillus*, con una importante capacidad de crecimiento en las aguas oleosas ricas en polifenoles que se generan durante el proceso de producción de los aceites vegetales, y que también están presentes en las emulsiones de los aceites usados provenientes del consumo doméstico y la hostelería, así como por la capacidad que tiene dicho microorganismo para la biotransformación de los propios polifenoles y de las grasas mediante sus actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa y lipasa existentes en dichos residuos.

Los polifenoles de las aguas oleosas en el que se desarrolla y actúa el microorganismo en cuestión son tirosol, ácido vanílico, ácido protocatequico, ácido caféico, catecol y metil-catecol, entre otros.

Una vez aislado y caracterizado, se ha constatado que *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 presenta una actividad bioquímica especialmente interesante para el fin a que se destina. Entre sus características destacan las siguientes:

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

Asimismo, la fase esporulada del microorganismo es termorresistente, de manera que soporta temperaturas por debajo de 80°C durante largos periodos de tiempo.

Mantiene un metabolismo aerobio-anaerobio facultativo y es capaz de biotransformar los polifenoles en ambas condiciones.

Se comporta como ácido tolerante pero mantiene una tasa de biotransformación óptima en pH de 5,5 a 7.

Tiene una actividad degradadora de las grasas mediante sus actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa y lipasa.

Por tanto, *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 puede ser utilizado para su aplicación en la eliminación de polifenoles y grasas de las aguas oleosas de la industria alimentaria y hostelera, y en la biodegradación de los residuos oleosos de origen en esta industria.

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.

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.

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.

La ventaja de esta invención ha quedado clara de todo lo arriba expuesto; el disponer de una cepa bacteriana con la capacidad de degradar los polifenoles y grasas presentes en las aguas y efluentes oleosos generados durante la producción y consumo de los aceites vegetales, como el aceite de oliva, siendo la base para un nuevo tratamiento biológico de estos componentes residuales, un tratamiento que resulta limpio y económico, en cuanto se basa en procesos de biorremediación, y especialmente eficaz como descontaminante, al actuar sobre unos componentes de alto grado de toxicidad, en referencia a los polifenoles, y sobre diferentes tipos de grasas muy presentes en los residuos.

Además, 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.

El gráfico de la Figura 1 refleja la eficacia de la invención como descontaminante, al compararse la evolución fenólica de dos medios oleosos, uno original, y otro inoculado con *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507, donde puede comprobarse que mientras la valoración de polifenoles se mantiene prácticamente constante en el tiempo (V_0 , V_1 , V_2) en el medio original, en el inoculado con la bacteria disminuye notablemente, como más abajo se explica.

Modo de aplicación

La metodología de aplicación de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 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.

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.

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.

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.

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.

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.

La tabla I muestra los resultados de valoración fenólica de un medio oleoso inoculado con la cepa *Bacillus amylo-liquefaciens* Bam 2507 en comparación un medio original, donde V1 es la valoración de polifenoles a t1 (mg/ml), V2 la valoración de polifenoles a t2 (mg/ml), "Media" es la media estadística del par de valores correspondiente (mg/ml), y "D. estándar", la desviación estándar.

TABLA I

Medio	V1	V2	Media	D. standar	Probabilidad
					t-Student
Medio original	8,64	7,85	8,245	0,559	----
Bam 2507 (CECT 7313)	3,74	4,02	3,88	0,198	0,009

La evolución fenólica de los dos medios comparados, el original u el inoculado con Bam 2507, es reflejada en el gráfico de la Figura 1. En este gráfico, V0 es la valoración de polifenoles a t0 (mg/ml), V1 la valoración de polifenoles a t1 (mg/ml), siendo t1 un tiempo de incubación de 7 días, V2 la valoración de polifenoles a t2 (mg/ml), siendo t2 un tiempo de incubación de 14 días.

La Tabla II muestra la valoración de la actividad microbiana esterasa, esterasa-lipasa y lipasa a las 24 horas de *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507, según el método API ZYM BioMérieux.

TABLA II

Cepa	Actividad Esterasa	Actividad Esterasa-Lipasa	Actividad Lipasa
Bam 2507 (CECT 7313)	40 nm/ μ l	60 nm/ μ l	60 nm/ μ l

Los resultados confirman que 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.

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.

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.

Para Shuichi *et al.* (2001), el compostaje es un proceso anaerobio de la materia orgánica. El papel de las bacterias en el compost depende de la variedad de enzimas secretadas por dichos microorganismos. La aplicación de técnicas de DNA recombinante para la transformación puede incrementar el repertorio de enzimas digestivas de estas bacterias y requerirá información de sus sistemas genéticos. En este sentido el biocompost en condiciones de anaerobiosis ha sido empleado para la generación de metano como fuente de energía (Bouallagui *et al.*, 2004). Estas emisiones pueden producir también daños en las instalaciones y alteraciones en el medio ambiente. Sin embargo, este problema se minimiza en condiciones de aerobiosis como es nuestro caso. A su vez la eficacia de biotransformación *Bacillus* es mayor en condiciones de aerobiosis, motivo por el cual fijamos estas condiciones para nuestro ensayo.

REIVINDICACIONES

1. *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313), microorganismo, género *Bacillus*, **caracterizado** por su capacidad degradadora de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería, debida a su capacidad de crecimiento en las aguas oleosas ricas en polifenoles y a su capacidad de biotransformación de los propios polifenoles y de las grasas mediante sus actividades enzimáticas esterasa, esterasa lipasa y lipasa.

2. *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313), según reivindicación 1, donde los polifenoles de las aguas oleosas en el que se desarrolla y actúa este microorganismo son tirosol, ácido vanílico, ácido protocatequico, ácido caféico, catecol y metil-catecol.

3. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313), según reivindicaciones 1 y 2, en la biodegradación de residuos oleosos de la industria alimentaria y hostelería.

4. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313), según reivindicación 3, en la eliminación de polifenoles y grasas de las aguas oleosas de la industria alimentaria y hostelería.

5. Procedimiento para la aplicación del microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507 (CECT 7313) 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.

6. Procedimiento para la aplicación del microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507(CECT 7313) 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.

7. Procedimiento para la aplicación del microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* Bam 2507(CECT 7313) 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.

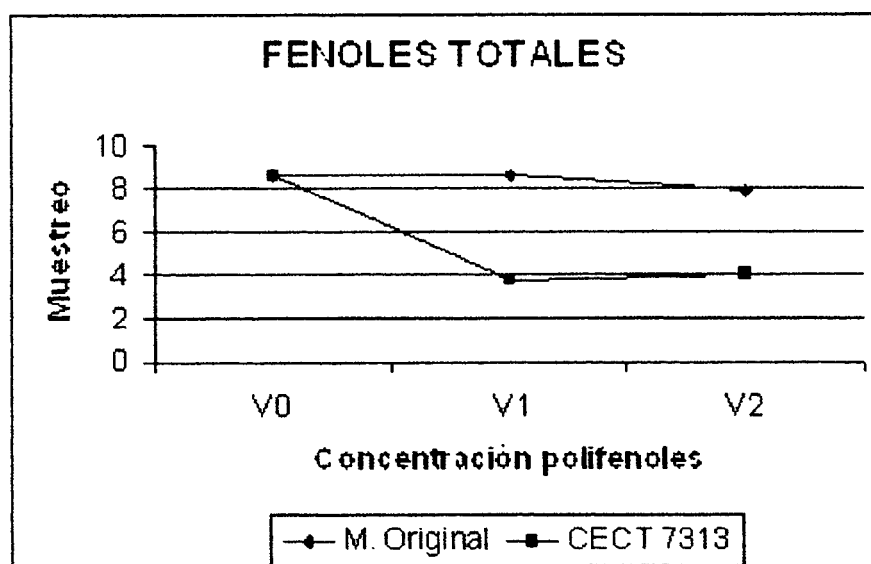


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 315 205

⑫ Nº de solicitud: 200800450

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 19.02.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6171847 B1 (LAWLER et al.) 09.01.2001, todo el documento.	1-7
A	US 6171848 B1 (LAWLER et al.) 09.01.2001, todo el documento.	1-7
A	JONES, C.E. et al. Diversity and osmolregularity responses of bacteria isolated from two-phase olive oil extraction waste products. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, vol. 16, páginas 555-561.	1-7
A	ABDELKAFI, S. et al. Isolation and characterization of a novel Bacillus sp. strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. FEMS Microbiology Letters, 2005, vol. 252, páginas 79-84.	1-7
A	OKUDA, S. et al. Treatment of lipid-containing wastewater using bacteria which assimilate lipids. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991, vol. 71 (6), páginas 424-429.	1-7

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

23.02.2009

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12S 3/00 (2006.01)

C12S 3/18 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)