

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 088**

21 Número de solicitud: 202100059

51 Int. Cl.:

**B01D 61/24** (2006.01)

**C11D 7/44** (2006.01)

**C09K 23/00** (2012.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**16.06.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.12.2022**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**02.03.2023**

Fecha de concesión:

**15.03.2024**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**22.03.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (70.0%)  
Campus Universitario de Vigo s/n  
36310 Vigo (Pontevedra) ES y  
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
(30.0%)**

72 Inventor/es:

**VECINO BELLO, Xanel;  
MOLDES MENDUIÑA, Ana Belén;  
CRUZ FREIRE, José Manuel;  
MARTÍNEZ ARCOS, Andrea;  
REIG I AMAT, Mónica y  
CORTINA PALLAS, José Luis**

54 Título: **Obtención de un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación física**

57 Resumen:

En esta invención se describe un proceso para la obtención de biosurfactantes a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación física que comprenden centrifugación y diálisis. El extracto biosurfactante obtenido es capaz de reducir la tensión superficial del medio en más de 16 unidades y posee una concentración micelar crítica (CMC) menor de 0,13 g/L. Esta es la primera vez que se demuestra que es posible obtener un extracto biosurfactante a partir de la fracción acuosa de los licores de lavado de maíz, mediante procesos de separación física, eliminando el uso de procesos de extracción líquido-líquido y sólido-líquido.

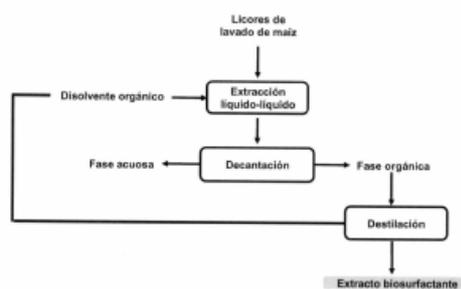


FIGURA 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 931 088 B2

## DESCRIPCIÓN

Obtención de un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación física

5

### Sector de la técnica

La presente invención pertenece a la obtención de detergentes de origen natural en el que se aplican además tecnologías limpias para la obtención de los mismos.

10

El objetivo principal de esta invención es la obtención de un extracto biosurfactante a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación física, sin el uso de disolvente orgánicos ni disoluciones tampón.

### Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que a partir de los licores de lavado de maíz se pueden obtener extractos biosurfactantes con numerosas aplicaciones en distintos campos industriales. Los extractos obtenidos y evaluados hasta el año 2020 se obtuvieron mediante extracción líquido-líquido utilizando diferentes disolventes orgánicos. La extracción y usos, así como la composición de estos extractos están protegidos bajo las siguientes patentes: ES-2424399\_B2, ES-2435324\_B2, WO2014044876A1, ES-2527366\_B1.

20

Por otra parte, recientemente se ha publicado una nueva patente (ES-2795574\_A1) donde se muestra que es posible extraer un extracto biosurfactante a partir de la fracción sólida de los licores de lavado de maíz, que suelen contener un 50% en sólidos, tras extracción sólido-líquido con diferentes disoluciones acuosas que comprenden disoluciones tampón fosfato en presencia (PBS por sus siglas en inglés phosphate- buffered saline) o ausencia de NaCl, seguido de un proceso de diálisis.

25

30

Este extracto tiene una composición diferente al extracto obtenido a partir de los licores de lavado de maíz utilizando disolventes orgánicos, posiblemente debido a que contiene compuestos biosurfactantes extraídos a partir de la membrana plasmática de los microorganismos que componen la fracción sólida de los licores de lavado de maíz. En la Figura 1 y Figura 2 se recoge el esquema para la producción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz siguiendo la tecnología recogida en las patentes ES-2435324\_B2 y WO2014044876A1 (Figura 1) y en la patente ES-2795574 A1 (Figura 2).

35

Si se realiza un estudio cronológico, la primera publicación sobre la capacidad surfactante de los licores de lavado de maíz fue en el Journal of Agricultural and Food Chemistry en 2014 (Vecino y col. 2014) a la cual siguieron varias publicaciones donde se obtuvo un extracto biosurfactante obtenido mediante extracción líquido-líquido con cloroformo (Vecino y col. 2015, Bioprocess and Biosystems Engineering) aplicándose en la formulación de bioadsorbentes (Pérez Ameneiro y col. 2015, Carbohydrate Polymers); a la descontaminación de lodos y suelos (Vecino y col. 2015, Journal of Agricultural and Food Chemistry; Bustos y col. 2018, Agrociencia); a formulaciones de nanopartículas (Gómez-Graña y col. 2017, Nanomaterials); a formulaciones cosméticas y de cuidado personal (Rincón-Fontán y col. 2016, RSC Advances; Rincón-Fontán y col. 2017, RSC Advances; Rincón-Fontán y col. 2018, Powder Technology; Rincón-Fontán y col. 2019, Journal of Colloid and Interface Science; Rincón-Fontán y col. 2020, ACS Omega; Rincón-Fontán y col. 2020, Sustainable Chemistry and Pharmacy); así como a formulaciones farmacéuticas (Rodríguez-López y col. 2019, Journal of Pharmaceutical Sciences; Rodríguez-López y col. 2020, Journal of Dermatological Treatment). Por otra parte, el extracto biosurfactante obtenido a partir

40

45

50

de los licores de lavado de maíz utilizando acetato de etilo ha sido evaluado para su uso en la industria alimentaria demostrando que favorece el crecimiento de microorganismos probióticos (López-Prieto y col. 2019, *Journal of the Science of Food and Agriculture*); que tiene poder antimicrobiano (López-Prieto y col. 2019, *Foods*; López-Prieto y col. 2020, *Foods*) y que favorece la extracción de compuestos coloreados durante los procesos de vinificación en la etapa de maceración del vino tinto (Scalzini y col. 2020, *Foods*).

También se ha demostrado que uno de los microorganismos responsables de la aparición de estos biosurfactantes en los licores de lavado de maíz es la cepa de *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (López-Prieto y col. 2019, *CYTA Journal of Food*; López-Prieto y col. 2021, *Microbiological Research*). Esta cepa es una bacteria capaz de formar esporas que resisten las condiciones del proceso de maceración que tiene lugar durante el fraccionamiento del maíz por vía húmeda, capaz de producir 2 tipos de extractos diferentes con distintas propiedades, un extracto biosurfactante extracelular y un extracto biosurfactante ligado a la célula adherido a su membrana plasmática.

Respecto a los trabajos existentes sobre la separación y/o purificación de surfactantes y/o biosurfactantes utilizando membranas decir que los datos bibliográficos existentes son referidos a surfactantes sintetizados químicamente o a biosurfactantes producidos en fermentaciones controladas y de una naturaleza diferente a los obtenidos a partir de los licores de lavado de maíz. Kertész y col. (2008) utilizaron una membrana de nanofiltración para la separación de un surfactante aniónico CL80 (en concentraciones entre 0,5 a 5g / L). con rendimientos del 94%. Kaya y col. (2006) también utilizaron membranas de ultrafiltración para la separación de surfactantes no iónicos sintetizados por vía química. Fernández y col. (2005) publicaron que es posible eliminar el 70% de dodecilsulfato de sodio con la membrana de ultrafiltración de cerámica Membralox. Klimonda y Kowalska (2019) estudiaron la eliminación de tensioactivos catiónicos (bromuro de cetrimonio, cloruro de benzalconio y Tequat LC90i) mediante el uso de membranas poliméricas en procesos de ultrafiltración y nanofiltración (en concentraciones entre 50 y 3000mg / L). Estos autores, observaron que la eficacia del proceso se ve afectada por la concentración de tensioactivo, el tipo de polímero de membrana y el tamaño de sus poros. La separación de bromuro de cetrimonio superó el 90% con ambos tipos de procesos, siendo el 70% la retención máxima para el cloruro de benzalconio con membranas nanofiltración, mientras que la separación de Tequat LC90i fue muy alta y alcanzó hasta el 100% con el uso de membranas de ultrafiltración. En cuanto a los estudios con membranas aplicados a biosurfactantes, Mulligan y Gibbs (1990) fueron los primeros en utilizar membranas de ultrafiltración para la separación biosurfactantes, producidos en fermentaciones controladas, entre los que se incluyen la surfactina y rhamnolípidos. Posteriormente, Witek-Krowiak y col. (2011) propusieron un proceso de ultrafiltración de dos etapas para separar y purificar rhamnolípidos de medios de cultivo. Este método de ultrafiltración de dos etapas consistió en una primera etapa donde se utiliza membranas de un corte de alto peso molecular para aislar las micelas contenidas en el concentrado, el cual posteriormente es diluido con alcohol (para romper las micelas) y la solución obtenida se vuelve a someter a ultrafiltración usando una membrana de corte de bajo peso molecular para separar el biosurfactante de cualquier componente del medio ocluido por la estructura micelar. Como resultado, el retenido contenía proteínas y otras macromoléculas, mientras que el permeado contenía una solución pura de biosurfactante. Además, Isa y col. (2007) propusieron el mismo proceso de ultrafiltración en dos etapas para el proceso de purificación de surfactina. Además, Coutte y col. (2013) propusieron recuperar la surfactina de los medios de cultivo después de aplicar los procesos de microfiltración y ultrafiltración, obteniendo un extracto biosurfactante con una pureza de hasta 95%. La ultrafiltración de un solo paso debe llevarse a cabo a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica de los biosurfactantes de lo contrario las micelas (y por lo tanto la mayor parte del biosurfactante) se eliminarían debido a su mayor tamaño. Sin embargo, la formación de micelas se ha utilizado como una ventaja en un método de ultrafiltración de dos pasos ligeramente más complejo (Isa y

col. 2007; Baker & Chen, 2010). En relación con la utilización de procesos de diálisis para la separación de biosurfactantes a partir de medios acuosos fermentados Ciandrini y col. (2016) han obtenido un extracto biosurfactante después de fermentar los medios comerciales Man Rogosa and Shape agar (MRS) (Oxoid, UK) a 37 °C durante 24 - 48 h bajo condiciones microaerobias (5% O<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; 85% N<sub>2</sub>), mediante la utilización de diferentes bacterias lácticas. En estos estudios, el medio una vez fermentado, se centrifugó a 17000 rpm durante 15 min a 4 °C y se filtró con un filtro Millipore de 0,22 µm para finalmente dializarlo con una membrana Spectra/Por® de 1 y 6 kDa. Los biosurfactantes obtenidos a partir de bacterias lácticas están catalogados como glicolípidos o glycolipopéptidos (Sharma y col. 2016, Springer Briefs in Microbiology) con una naturaleza diferente a los biosurfactantes contenidos en los licores de lavado de maíz consistentes principalmente en lipopéptidos y fosfolípidos (Rodríguez-López y col. 2020, Separation and Purification Technology). Por otra parte, Chandran y Das (2012) han separado biosurfactantes producidos por *Candida tropicalis* a partir de un medio fermentado en condiciones controladas mediante extracción sólido-líquido utilizando una columna de gel de sílica seguido de diálisis.

Los biosurfactantes presentes en este extracto tienen una naturaleza diferente de los biosurfactantes contenidos en los licores de lavado de maíz. Hasta ahora los procesos de diálisis han sido aplicados de forma rutinaria, en la recuperación de biosurfactantes, al extracto acuoso obtenido tras someter a la biomasa microbiana, principalmente bacterias lácticas, a un proceso de extracción con tampón fosfato (Gudiña y col., 2010, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Gudiña y col., 2015, RSC Advances; Ferreira y col. 2017, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vecino y col. 2017, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Satpute y col. 2019, BMC Microbiology). Hay que destacar que estos procesos son totalmente diferentes a la tecnología que se recoge en la presente invención, ya que en la presente invención el proceso de diálisis se aplica directamente a un medio fermentado y no al extracto acuoso obtenido tras lavar y someter a la biomasa a un proceso de extracción con tampón fosfato. Por otra parte, destacar que todos los procesos descritos con anterioridad y que contemplan el uso de membranas han sido aplicados a medios fermentados en condiciones controladas con un microorganismo específico y que en ningún caso se contempló la utilización de un proceso de diálisis para recuperar y/o separar biosurfactantes a partir de una corriente industrial secundaria como son los licores de lavado de maíz. En este sentido la publicación que tiene una mayor cercanía con la tecnología propuesta es la patente (ES- 2795574\_A1), pero cabe resaltar que el proceso de diálisis, en este caso, se aplica a una matriz totalmente distinta. En la presente invención el proceso de diálisis se aplica a la fase acuosa de los licores de lavado de maíz directamente tras eliminar los sólidos, mientras que en la patente (ES-2795574\_A1), ya publicada, el proceso de diálisis se aplica a una disolución tampón que contiene los biosurfactantes extraídos de la fracción sólida presente en los licores de lavado de maíz.

#### 40 **Explicación de la invención**

Se propone un proceso para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz, generados durante el fraccionamiento del maíz por vía húmeda, utilizando únicamente procesos de separación física. El extracto biosurfactante obtenido tiene unas propiedades parecidas al extracto obtenido de la fracción sólida de los licores de lavado de maíz, mediante extracción sólido-líquido, en base a los análisis por espectrofotometría de masas se puede corroborar que su composición es diferente.

#### 50 **Explicación detallada de la invención**

Se tomaron los licores de lavado de maíz y se sometieron a un pretratamiento consistente en varias etapas de centrifugación (50-5000 rpm, 4-40°C) y/o filtración, utilizando papel de resma

(gramaje hasta 60 g/m<sup>2</sup>) y filtros de tamaño hasta 0.45 µm. Posteriormente la fracción acuosa, de los licores de lavado de maíz, se les ajusto el pH a diferentes valores entre 2 y 6 se sometieron a varios procesos de diálisis a diferentes temperaturas (4-25°C) y con diferentes membranas, de entre 8 kDa y 1 kDa, con el fin de optimizar las condiciones de operación y seleccionar aquel extracto con las mejores propiedades biosurfactantes.

En la Figura 3 se recoge, a modo de ejemplo, el esquema de uno de los procesos propuesto para conseguir un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz aplicando procesos de separación física. Este esquema comprende un proceso que implica 3 etapas de separación: centrifugación, filtración y diálisis. Aunque el extracto obtenido de los licores de lavado de maíz, mediante 2 procesos (centrifugación o filtración, seguido de diálisis) tiene unas propiedades parecidas al obtenido mediante la aplicación secuencial de procesos de centrifugación, filtración y diálisis, se selecciona esta última secuencia de procesos como óptima con el fin de obtener un extracto biosurfactante exento de biomasa microbiana y lo más higienizado posible.

Tras finalizar el proceso de diálisis la fracción acuosa rica en biosurfactantes es liofilizada para su conservación. Los análisis de caracterización del extracto biosurfactante se realizaron una vez este fue liofilizado.

### Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción realizada y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de esquemas en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

**Figura 1.** Esquema del proceso propuesto para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz utilizando disolventes orgánicos. El proceso de extracción se aplica a las dos fracciones que componen los licores de lavado de maíz líquida y sólida. Con esta metodología se obtiene un extracto biosurfactante con un aspecto oleoso.

**Figura 2.** Esquema propuesto para la obtención de biosurfactantes a partir de la fracción sólida de los licores de lavado de maíz. El proceso incluye centrifugación de los licores de lavado de maíz, lavado de la fracción sólida y extracción sólido-líquido de la fracción sólida lavada con diferentes disoluciones tampón. De esta forma se consiguen obtener los compuestos biosurfactantes que están adheridos a la membrana plasmática de la biomasa microbiana que componen los licores de lavado de maíz. El extracto biosurfactante obtenido tras su liofilización tiene un aspecto de polvo blanco y presenta capacidad de formar espuma.

**Figura 3.** Esquema propuesto en esta invención para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación física. Se parte de los licores de lavado de maíz que son centrifugados y filtrados para eliminar la fracción sólida que compone los licores de lavado de maíz, incluida la biomasa microbiana, y posteriormente la fracción acuosa se somete a un proceso de diálisis con el fin de obtener un extracto concentrado en biosurfactantes, producidos de forma extracelular por los microorganismos que crecen en los licores de lavado de maíz de forma natural. Tras la liofilización de este extracto su aspecto es en forma de polvo amarillo-blanquecino, con una capacidad limitada de formar espuma, pero con unas buenas propiedades tensioactivas.

**Realización preferente de la invención**

Se realizaron extracciones a licores de lavado de maíz suministrados por FeedStimulants (Utrecht, Países Bajos). El extracto objeto de esta invención se obtuvo de los licores de lavado de maíz, tras aplicar de forma secuencial diferentes procesos de separación física que comprenden centrifugación, filtración y diálisis. El proceso seleccionado no incluye ningún ajuste de pH, aunque también se ensayaron procesos de separación a diferentes pH, recogidos en la **Tabla 1**. Como alternativa también se propone la aplicación secuencial de centrifugación y diálisis, pero de esta forma se obtiene un extracto biosurfactante más impuro. Además, entre los procesos alternativos para la obtención de este extracto biosurfactante se contempla un pretratamiento de ajuste de pH entre 2-6, aunque las propiedades tensioactivas del biosurfactante obtenido no se mejoran en gran medida respecto al proceso preferente seleccionado donde no se alteró el pH de los licores de lavado de maíz (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Etapas empleadas durante el proceso de obtención del extracto biosurfactante mediante procesos de separación física.

Nº procesos separación	Centrifugación	Filtración	Diálisis	Ajuste de PH
3	Si	Si	SI	No
3	Si	Si	SI	Acidificación
3	Si	Si	SI	Basificación
2	Si	No	SI	No
2	Si	No	SI	Acidificación
2	Si	No	SI	Basificación
2	No	Si	SI	No
2	No	Si	SI	Acidificación
2	No	Si	SI	basificación

Tras liofilizar la fracción acuosa obtenida de los licores de lavado de maíz sometida a los procesos de separación física incluidos en la **Tabla 3** se obtiene un extracto biosurfactante capaz de reducir la tensión superficial del medio en más de 16 unidades (considerando como control la tensión superficial del agua de 72 mN/m) y con una concentración micelar crítica menor de 0,13 g/L. En cuanto a los pesos moleculares de los compuestos que conforman estos extractos se observa la presencia de biomarcadores de entre 210 y 1422 m/z, así como proteínas de elevado peso molecular detectadas estas últimas mediante electroforesis. En cuanto al análisis elemental de los extractos biosurfactantes obtenidos estos presentan un contenido en carbono de entre 34-36% y un contenido en nitrógeno de 8-9%, observándose un enriquecimiento en nitrógeno. En comparación con los extractos biosurfactantes obtenidos a partir de los licores de lavado de maíz por otros métodos recogidos en la bibliografía, los extractos biosurfactantes obtenidos en la

presente invención reducen la tensión superficial del agua en menor medida que el extracto biosurfactante obtenido mediante procesos de extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos (reducciones de tensión superficial entre 28-33 unidades) con una menor CMC (0,12 a 0,31 g/L) (Rincón-Fontán y col. 2016, RSC Advances; López-Rodríguez y col. 2018, Tenside Surfactants and Detergents; Rincón-Fontán y col. 2018, Powder Technology; López-Rodríguez y col. 2019, Journal of Pharmaceutical Sciences; Rincón-Fontán y col. 2020, ACS Omega; López-Rodríguez y col. 2020, Journal of Dermatological Treatment; López-Prieto y col. 2019, Foods; López-Prieto y col. 2020, Foods). Por otra parte, el extracto biosurfactante de la presente invención presenta una capacidad de reducir la tensión superficial del agua similar al extracto biosurfactante obtenido de los sólidos contenidos en los licores de lavado de maíz, mediante extracción sólido-líquido con disoluciones tampón (entre 16-20 unidades), pero este último presenta con una CMC mayor (0,42 g/L) (patente ES- 2795574\_A1). De los 2 procesos contemplados con anterioridad para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz destacar, por orden cronológico, que en el primero de ellos (**Figura 1**) se obtienen dichos biosurfactantes a partir de la fracción conjunta sólida y líquida de los licores de lavado de maíz a aplicando un proceso de separación mediante extracción líquida-líquida con disolventes orgánicos que no se solapa con el proceso propuesto en la presente invención, donde se concentran biosurfactantes a partir de la fracción líquida de dichos licores (exenta de sólidos) mediante la diálisis de la fracción acuosa, obteniéndose de esta forma un extracto biosurfactante con unas propiedades muy diferentes al obtenido aplicando los procesos de extracción líquido-líquido comprendido en las patentes (ES-2435324\_B2 y WO2014044876A1). Respecto al segundo proceso contemplado (**Figura 2**) resaltar que los biosurfactantes, referido a la patente (ES-2795574\_A1), se obtienen a partir de la fracción sólida contenida en los licores de lavado de maíz, lo que supone un elemento diferenciador respecto a la presente invención, donde los biosurfactantes son obtenidos a partir de la fracción acuosa de los licores de lavado de maíz. Además el proceso propuesto para obtener los biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz según la patente ES-2795574\_A1, comprende un proceso de extracción sólido-líquido con diferentes tampones, dando lugar a una disolución tampón rica en biosurfactantes que estaban adheridos a la biomasa microbiana de los licores de lavado de maíz, que no se solapa con el proceso propuesto en la presente invención basados únicamente en procesos de separación física para separar y/o concentrar los biosurfactantes producidos de forma extracelular por los microorganismos que crecen de forma natural en los licores de lavado de maíz.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz caracterizado porque comprende las etapas de separación de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación física que comprenden centrifugación y/o filtración seguido de diálisis de dicha fracción líquida.
- 10 2. El procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un ajuste del pH a un valor de entre 2-6 antes de la diálisis.
- 15 3. Uso o aplicación de los biosurfactantes obtenidos a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz, tras someter a los mismos a los procesos de separación, según la reivindicación 1 o 2, como agente surfactante y/o emulsionante en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, agroquímica o medioambiental.
- 20 4. Uso o aplicación de los biosurfactantes obtenidos a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz, tras someter a los mismos a los procesos de separación, según la reivindicación 1 o 2, como agente surfactante y/o emulsionante en la limpieza de superficies
- 25 5. Uso o aplicación de los biosurfactantes obtenidos a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz, tras someter a los mismos a los procesos de separación, según la reivindicación 1 o 2, para mejorar la permeabilidad de aquellas fórmulas, que contengan principios activos, a través de las membranas celulares, destinadas a usos cosméticos, farmacéuticos y agroquímicos.

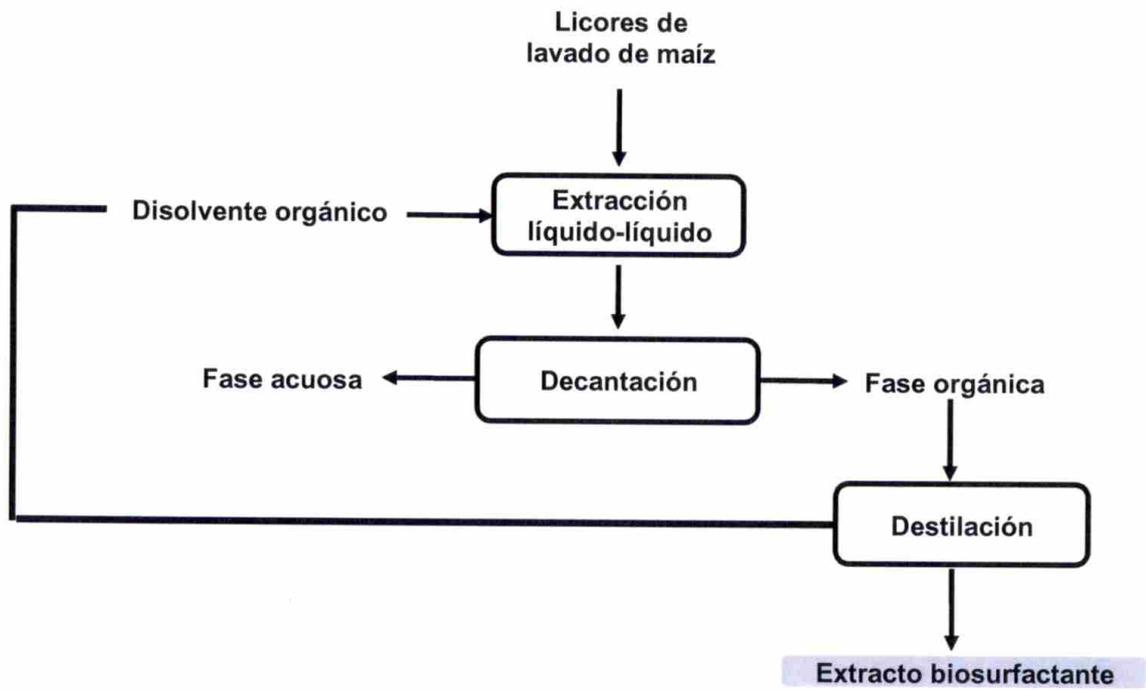


FIGURA 1

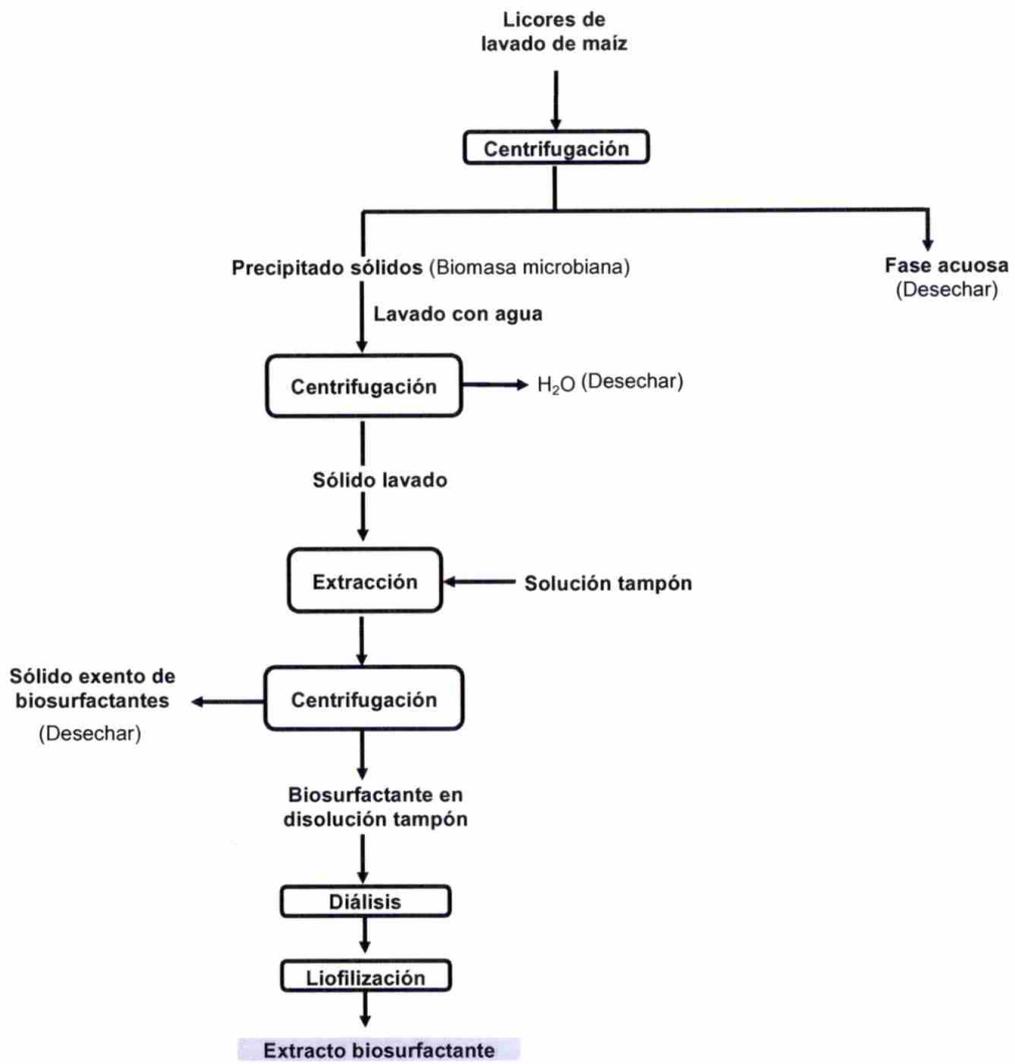


FIGURA 2

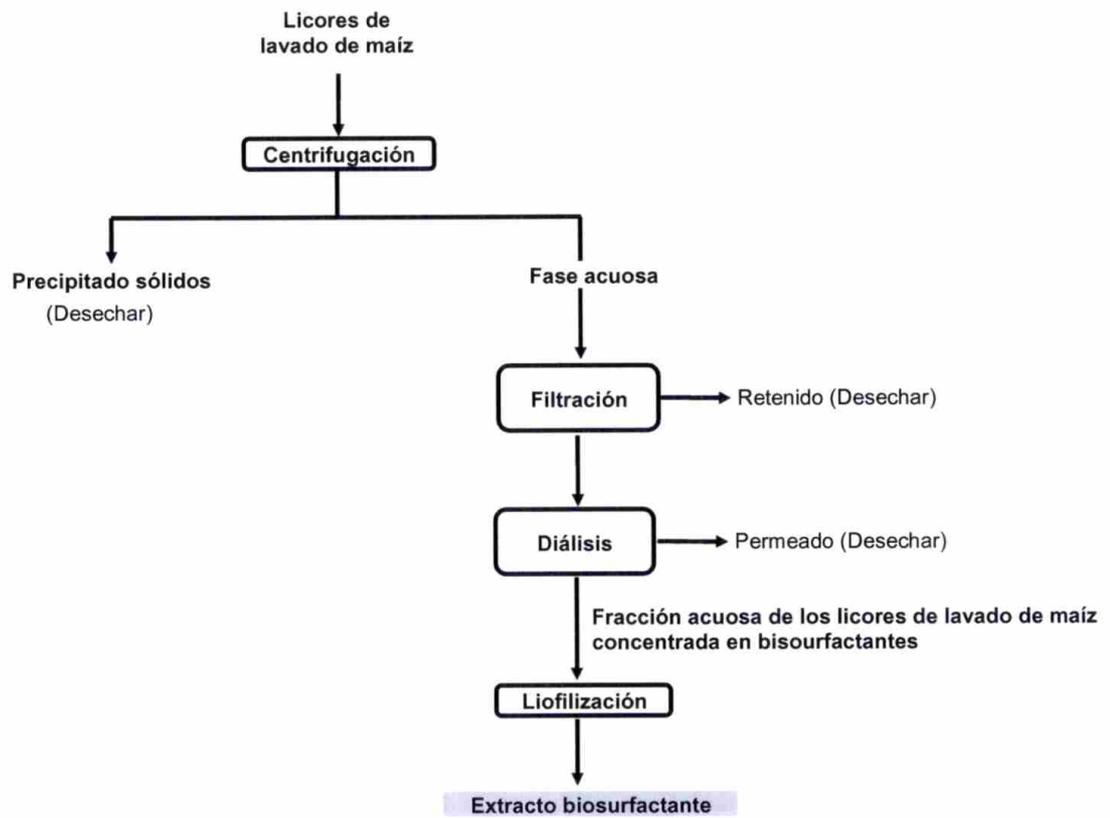


FIGURA 3