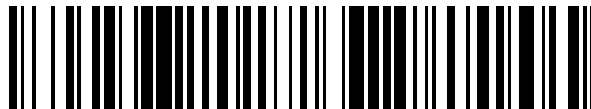


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 765**

21 Número de solicitud: 201300039

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/07** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**02.01.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.10.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)**  
**OTRI - Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias**  
**s/n**  
**41012 Sevilla ES y**  
**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MELLADO DURAN , Encarnación ;**  
**ESCOBAR NIÑO , Almudena ;**  
**CÁNOVAS LÓPEZ , David y**  
**LUNA MARTÍNEZ, Diego**

54 Título: **Cepa microbiana Terribacillus SP-AE2B 122 con capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación y usos de la misma**

57 Resumen:

Cepa Microbiana Terribacillus SP. AE2B 122 con capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación y usos de la misma.

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana del género Terribacillus, denominada Terribacillus SP. AE2B 122 con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación y el uso de la misma, o del sobrenadante obtenido a partir de su cultivo, en la producción de biodiesel. Esta cepa ha demostrado tener una alta capacidad para la producción de biodiesel, que se refleja en los altos valores de conversión de aceites a diglicéridos y ésteres de ácido grasos, los cuales alcanzan el 100%. Es destacable también el hecho de que el sobrenadante obtenido a partir del cultivo de dicha cepa bacteriana es estable tras varios ciclos de transesterificación. Asimismo, la invención también se refiere a un método para seleccionar una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación.

ES 2 510 765 A1

## **DESCRIPCIÓN**

### **CEPA MICROBIANA TERRIBACILLUS SP. AE2B 122 CON CAPACIDAD PARA LLEVAR A CABO REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN Y USOS DE LA MISMA**

5 La presente invención se refiere a una cepa microbiana del género *Terribacillus* denominada *Terribacillus* sp. AE2B 122 con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación y el uso de la misma en la producción de biodiesel. Asimismo, la invención también se refiere a un método para obtener una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de  
10 transesterificación. Por lo tanto, la invención es de utilidad en el campo de la microbiología industrial, más en particular, en el sector de la producción de biocombustibles.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

La búsqueda de nuevas fuentes de energías alternativas, sostenibles y renovables está adquiriendo una gran importancia en los últimos años como nueva rama de investigación debido, entre otras razones, al incremento del precio del barril de petróleo y al previsto desabastecimiento en las próximas décadas. El  
20 biodiesel se presenta como una alternativa prometedora al gasóleo, dentro del campo de los biocarburantes debido a sus ventajas con respecto al diesel derivado del petróleo. Es renovable, puede ser utilizado en cualquier motor diesel con un rendimiento energético similar sin que sea necesario ningún tipo de modificación de la infraestructura ya existente y, además, protege el medio  
25 ambiente debido a su alto contenido en oxígeno, ausencia de hidrocarburos aromáticos, y reducida cantidad de monóxido de carbono y dióxido de sulfuro en sus emisiones por combustión.

Están descritos diversos métodos de producción de biodiesel a partir de aceites  
30 vegetales, aceites residuales de la industria alimentaria y de grasas animales, usándose por separado o mezclados, por microemulsión, pirolisis y transesterificación. La producción de biodiesel, a nivel industrial, se realiza

mediante un proceso químico consistente en una metanólisis de aceites utilizando catalizadores químicos alcalinos (KOH y NaOH).

La metanólisis química a nivel industrial es un proceso económico que ofrece  
5 elevada conversión de producto con reducido tiempo de reacción, sin embargo conlleva varios inconvenientes:

- (1) el elevado consumo de energía;
- (2) la glicerina, producto secundario de la reacción, está contaminando al catalizador;
- 10 (3) tanto la utilización de álcalis como inductores implica que el alcohol y los glicéridos deben ser anhidros para evitar reacciones de saponificación.
- (4) Además debe evitarse que se produzcan reacciones de neutralización de ácidos grasos libres.

15 Debido a estos inconvenientes, el desarrollo de nuevas tecnologías alternativas para la producción de biodiesel, innovadoras, competitivas y respetuosas con el medio ambiente es una línea de investigación fundamental en nuestro tiempo. La principal línea consiste en el desarrollo de procesos biocatalíticos, que permitan que la "biotecnología enzimática blanca" se introduzca en el sector industrial  
20 energético.

Usando procesos biocatalíticos, la producción de biodiesel podría abarataarse, ya que se podrían utilizar aceites usados, los cuales contienen mayor cantidad de agua y son más baratos. Además, podría permitir reducir el consumo de energía  
25 necesario para el proceso, contribuyendo así no solo a reducir los costes sino también contribuyendo a que sea un proceso más sostenible.

Hoy en día, la catálisis usada a partir del proceso de transesterificación es química, debido a su alta eficiencia de conversión con bajo coste, pero implica  
30 complejas operaciones como tratamiento de agua contaminada y recuperación de ésteres de biodiesel. Recientemente, la aplicación de técnicas de transesterificación biocatalítica usando lipasas se presenta como un método más

ecológico y que requiere menor gasto energético, con rangos de conversión que exceden el 90%.

5 El biocombustible producido por la actividad de microorganismos está relacionado con levaduras, hongos, bacterias y microalgas. Su producción presenta ventajas tales como que el cultivo de microorganismos es de corta duración, requiere poco mantenimiento, no se ve afectado por el clima ni las estaciones y su crecimiento se puede incrementar con facilidad.

10 Las lipasas procedentes de bacterias y hongos son las más usadas comúnmente para la transesterificación, y los parámetros óptimos para su uso específico dependen de su origen y formulación.

15 Por tanto, la transesterificación en la producción de biodiesel está siendo estudiada en distintas condiciones y a partir de diversos microorganismos. Por ejemplo, *Candida antarctica* es eficiente para la transesterificación con alcoholes secundarios (61% - 83 % de conversión) como iso-propanol y 2-butanol, mientras que *Mucor miehei* lo es con alcoholes primarios de cadena corta (95% conversión) como metanol, etanol, propanol y butanol en presencia de hexano  
20 como solvente. Sin embargo, en ausencia de solvente, ambos alcoholes bajan su conversión, siendo el metanol el menos eficiente, disminuyendo hasta un 19,4%, lo que se atribuye a la inhibición de la enzima por el metanol. Existen conversiones del aceite de soja del 67% y el 65%, con metanol y etanol respectivamente, usando *Pseudomonas fluorescens*. Con esta misma bacteria,  
25 utilizando otro tipo de aceites vegetales se han obtenido rendimientos más elevados, como es el caso del aceite de *Jatropha* con un resultado del 72% de conversión. *Pseudomonas cepacia* con metanol en este aceite presenta una conversión de hasta el 98%.

30 La transesterificación con etanol se ha llevado a cabo usando *M. miehi*, *C. antarctica* y *P. cepacia*, respectivamente, obteniendo conversiones por encima del 80%. El iso-propanol también ha sido propuesto como aceptor acilo en la transesterificación de distintos aceites obteniendo conversiones mayores al 91%.

Otra estrategia es el uso de aceptores acilos no alcohólicos, los cuales aumentan la eficiencia de transesterificación. Ejemplo de esto son el uso de metil acetato, el cual ni en proporciones 12:1 de metil acetato:aceite produce inhibición de la enzima, mientras que el metanol ya en proporción 1:1 causa inhibición. El efecto  
5 inhibidor se debe, en parte, al glicerol, que es un producto secundario de la reacción. Por eso, se ha recomendado la eliminación *in situ* de éste mediante diálisis, además de la adición progresiva del metanol. La eliminación del glicerol por costosos procedimientos es también posible usando un proceso de adición progresiva de iso-propanol.

10

La glicerina se genera en grandes cantidades como co-producto del proceso de obtención de biodiesel. Actualmente, una de las preocupaciones más importantes es como dar salida a este subproducto que está causando un gran impacto a nivel económico y medioambiental en la refinería industrial. (Thompson, J C y He, B B,  
15 2006, *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 22(2): 261-265).

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un nuevo procedimiento de obtener biodiesel, no contaminante, con altos valores de conversión de aceite a biodiesel, aumentando el rendimiento y bajando el coste  
20 de producción.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han identificado una cepa microbiana, en particular, la cepa bacteriana *Terribacillus* sp. AE2B 122, depositada en la  
25 Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro 8231 (con fecha de depósito 20.11.2012), que tiene la capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación a partir de aceites, lo que permite, entre otros usos, la producción de biodiesel.

30

Esta cepa microbiana fue aislada a partir de muestras de suelo de una almazara (Ejemplo 1), y su empleo en la producción de biodiesel se comprobó midiendo la conversión del aceite de girasol a ésteres de ácidos grasos por el sobrenadante

obtenido a partir del cultivo de la misma (Ejemplos 3 y 4). Los resultados mostraron una conversión del 100% y una selectividad de hasta el 96,5%.

Así, en base a la capacidad de esta bacteria de llevar a cabo reacciones de transesterificación, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán explicados en detalle a continuación.

*Método de obtención de la cepa bacteriana de la invención*

En un aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación, de aquí en adelante, método de selección de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar cepas microbianas en un medio de cultivo sólido suplementado con un sustrato lipídico,
- b) seleccionar aquellas cepas microbianas que produzcan la hidrólisis del sustrato lipídico,
- c) cultivar las cepas microbianas seleccionadas de la etapa (b) en un medio de cultivo líquido y extraer el sobrenadante,
- d) incubar el sobrenadante extraído en la etapa (c) en una solución que comprende como sustrato un derivado de la serie de los *para*-nitrofenoles, en las condiciones adecuadas para llevar a cabo dicha reacción de transesterificación, y
- e) detectar la presencia de *para*-nitrofenol.

En una primera etapa [etapa (a)], el método de selección de la invención comprende cultivar cepas microbianas en un medio de cultivo sólido suplementado con un sustrato lipídico. Las cepas microbianas cultivadas en la etapa (a) pueden proceder de cualquier muestra ambiental obtenida de un lugar en que haya trazas de, o haya estado en contacto con, aceites o grasas, como por ejemplo, una muestra de suelo procedente de una almazara o de una industria conservera de carne o de pescado, o una muestra de los desechos procedentes de dichas industrias. La obtención de la muestra ambiental puede

llevarse a cabo por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica, siendo práctica de rutina para el experto en la materia.

Una vez obtenida la muestra ambiental, ésta se puede diluir en solución salina, y  
5 la solución resultante se deposita en una placa petri conteniendo un medio de cultivo sólido (generalmente, un medio de cultivo de crecimiento general, como por ejemplo, medio LB (medio Luria Bertani)) suplementado con un sustrato lipídico.

10 Se entiende como "sustrato" a la molécula sobre la que actúan las enzimas de la cepa microbiana que se desarrolla en el medio de cultivo, catalizando las reacciones químicas que involucran al mismo sustrato. El "sustrato lipídico" se refiere a un compuesto de naturaleza lipídica, sobre el cual actuarán las lipasas de las cepas microbianas. Ejemplos de sustratos lipídicos incluyen, sin limitar a,  
15 tributirina, Tween 80, Tween 20 y aceites vegetales (tales como oliva y girasol). En una realización particular, el sustrato lipídico es tributirina. La concentración del sustrato lipídico en el medio de cultivo puede ser variable, pudiendo emplear concentraciones desde el 1 al 4% e incluso mayores. Preferiblemente, la concentración del sustrato lipídico en el medio es de alrededor del 2%.

20

A continuación, el medio de cultivo conteniendo la cepa microbiana y el sustrato lipídico es cultivado durante el tiempo y temperatura adecuadas para que haya crecimiento microbiano. Preferiblemente, las condiciones de incubación comprenden una temperatura que oscila entre 20 y 37°C durante 4-7 días. Una  
25 vez que ha habido crecimiento microbiano, se procede a llevar a cabo la etapa (b) del método de selección de la invención.

Así, en una segunda etapa [etapa (b)], el método de selección de la invención comprende seleccionar aquellas cepas microbianas que produzcan la hidrólisis  
30 del sustrato lipídico.

En la presente invención, se considera que una cepa microbiana ha producido la hidrólisis del sustrato lipídico cuando aparece un halo de hidrólisis alrededor de la

cepa microbiana. Generalmente, dicho halo será transparente (debido a que le medio de cultivo es opaco) y redondeado, aunque el tamaño y la forma del halo dependerá del microorganismo en cuestión (como sabe el experto en la materia, la cepa microbiana estará formando parte de una colonia, es decir, de un conjunto  
5 de células microbianas procedentes de una única bacteria por multiplicación de la misma). Cuando una cepa microbiana ha producido la hidrólisis del sustrato lipídico, se dice que tiene “capacidad hidrolítica”, es decir, es capaz de producir lipasas que degradan los lípidos en compuestos de bajo peso molecular. La formación del halo de hidrólisis sirve como método de identificación de aquellas  
10 cepas que presentan esta capacidad.

En una tercera etapa [etapa (c)], el método de selección de la invención comprende cultivar la cepa microbiana seleccionada en la etapa (b) en un medio de cultivo líquido y extraer el sobrenadante. Opcionalmente, el cultivo líquido se  
15 puede suplementar con un sustrato lipídico para incrementar la secreción de lipasas extracelulares por parte de la cepa microbiana seleccionada en la etapa (b). Así, en una realización particular, el medio de cultivo de la etapa (c) está suplementado con un sustrato lipídico que, en otra realización todavía más particular, dicho sustrato lipídico es tributirina. El cultivo se realiza a temperatura  
20 de entre 22°C y 37°C, en agitación. Transcurridos varios días se extrae el sobrenadante (que contendrá las lipasas).

En una cuarta etapa [etapa (d)], el método de selección de la invención comprende incubar el sobrenadante extraído en la etapa (c) en una solución que  
25 comprende como sustrato un derivado de la serie de los *para*-nitrofenoles (*pNP*), en las condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de transesterificación.

En la presente invención, se entiende por “un derivado de la serie de los *para*-  
30 nitrofenoles” a aquellos compuestos fenólicos que presentan un grupo nítrico y un grupo hidroxilo en posición *para* en el anillo de benceno. Ejemplos de sustratos derivados de la serie de los *para*-nitrofenoles incluyen, sin limitar a, *para*-nitrofenolesterárico, *para*-nitrofenol oleico, *para*-nitrofenollaúrico y *para*-nitrofenol



palmitato. En una realización particular, el sustrato derivado de la serie de los parinitrofenoles es *para*-nitrofenolpalmitato (*p*NPP).

5 El cultivo de la cepa microbiana en la etapa (d) del método de selección de la invención tiene que realizarse en las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo la reacción de transesterificación.

En la presente invención se entiende por “transesterificación” a la reacción química en la que un éster reacciona con un alcohol reemplazando su grupo  
10 alcoxi por el alcohol correspondiente. Las reacciones de transesterificación son ampliamente conocidas en el estado de la técnica así como las condiciones adecuadas para llevar a cabo las mismas.

Como sabe el experto en la materia, una reacción de transesterificación tiene que  
15 llevarse a cabo en presencia de un inductor y un grupo alcohol. Por lo tanto, en la presente invención, se entiende por “condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de transesterificación” a aquellas condiciones que permiten que un éster reaccione con un alcohol reemplazando su grupo alcoxi por el alcohol correspondiente. Dichas condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción  
20 de transesterificación comprenden un alcohol y un inductor.

En la presente invención se entiende por “alcohol” a aquellos compuestos químicos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo (-OH) en sustitución de un átomo de hidrógeno enlazado de forma covalente a un átomo de carbono.  
25 Ejemplos de alcoholes incluyen, sin limitar a, metanol, etanol, propanol, *iso*-propanol y butanol. En una realización particular, el alcohol es un etanol.

En la presente invención se entiende por “inductor” a aquella sustancia o compuesto que establece las condiciones físico-químicas adecuadas para  
30 acelerar, inducir o propiciar dicha reacción sin intervenir en la misma. El inductor puede ser básico o ácido. Ejemplos de inductores incluyen, sin limitar a, inductores ácidos homogéneos ( $H_2SO_4$ , HCl,  $H_3PO_4$ ,  $RSO_3$ ), inductores ácidos heterogéneos (Zeolitas, Resinas Sulfónicas,  $SO_4/ZrO_2$ ,  $WO_3/ZrO_2$ ), inductores

básicos heterogéneos (MgO, CaO, Na/NaOH/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y inductores básicos homogéneos (KOH, NaOH); de todos ellos, los inductores que se suelen utilizar a escala comercial son los inductores homogéneos básicos ya que actúan mucho más rápido y además permiten operar en condiciones moderadas. En una  
5 realización particular, el inductor empleado en la reacción de transesterificación es NaOH.

Asimismo, el cultivo del sobrenadante extraído en la etapa c) en presencia de un sustrato derivado de la serie de los *para*-nitrofenoles, puede llevarse a cabo en  
10 medio sólido o en medio líquido, a una temperatura de entre 20 y 40°C durante un tiempo de entre 12 horas y 5 días, preferiblemente, entre 16 y 24 horas. Una vez pasado el tiempo de incubación, se procederá a detectar la presencia de *para*-nitrofenol en el medio [etapa e) del método de selección de la invención], que será indicativo de que la cepa microbiana es capaz de llevar a cabo reacciones de  
15 transesterificación. La detección de *para*-nitrofenol puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas que existen en el estado de técnica para identificar compuestos, tales como técnicas colorimétricas, cromatografía, espectrometría de masas, etc. Un ejemplo de ensayo colorimétrico para detectar la presencia de *para*-nitrofenol está descrito en el artículo de Teng, Y y Xu, Y,  
20 2007, *A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent*, Anal.Biochem. 363, 297-299.

En el estado de la técnica existen gran variedad de métodos colorimétricos que pueden emplearse para detectar *para*-nitrofenol. No obstante, en la presente invención, el método colorimétrico elegido comprende extraer el *para*-nitrofenol  
25 con NaOH 0,05M, que actúa como fase acuosa alcalina, y medir la absorbancia a 410 nm. Como experto en la materia, será necesario preparar un tubo control de la absorbancia y, todas aquellos sobrenadantes en los que se obtenga un valor de absorbancia mayor que el valor de absorbancia del tubo control, contendrán *para*-nitrofenol, lo que será indicativo de que la cepa  
30 microbiana de la que procede el sobrenadante analizado es capaz de llevar a cabo reacciones de transesterificación.

Por otro lado, la cromatografía de gases es una técnica ampliamente conocida por el experto en la materia, en donde la muestra, en la presente invención el sobrenadante, es volatilizada e inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica. Existen dos tipos de cromatografía de gases y cualquiera de ellas puede emplearse en la presente invención: la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC). Información sobre estas técnicas cromatográficas puede encontrarse en *Verdugo C, y col. 2010, A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuel integrating glycerol into their composition, BioresourceTechnology, 101: 6657–6662.*

10

En una realización particular del método de selección de la invención, el sobrenadante obtenido en la etapa (c) es liofilizado, para evitar la reacción de hidrólisis, concentrar y conservar la enzima de la cepa microbiana, y también para poder ser almacenado. La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. La técnica de liofilización es ampliamente conocida en el estado de la técnica y su aplicación es práctica de rutina para el experto en la materia.

20

#### *Cepa microbiana de la invención y sus usos*

Como resultado de la puesta en práctica del método de selección de la invención, se ha identificado una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación.

25

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una cepa microbiana, de aquí en adelante, cepa microbiana de la invención, obtenida mediante el método de selección de la invención. La cepa microbiana obtenida fue sometida a un análisis filogenético mediante el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr, siendo *Terribacillus goriensis* strain Km2 (número de acceso a GeneBank: JF411250,1) la cepa con la que mayor valor de identidad presentaba la cepa microbiana de la invención.

30

Por lo tanto, en una realización particular, la cepa microbiana de la invención pertenece al género *Terribacillus*, en particular a la especie *T. goriensis* que, en otra realización todavía más particular, es la cepa microbiana denominada *Terribacillus* sp. cepa AE2B 122 (CECT8231).

5

La cepa microbiana de la invención fue depositada bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) [Parc Científic Universitat de València, calle Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia)] el 20 de Noviembre de 2012, asignándole el número de registro 8231 CECT.

10

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación depositada en la CECT con el nº de registro 8231.

15 Como entiende el experto en la materia, la cepa microbiana de la invención puede ser cultivada en un medio de cultivo líquido para obtener un sobrenadante que, al igual que la bacteria de la invención, puede usarse para llevar a cabo reacciones de transesterificación, siendo útil en la producción de biodiesel.

20 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un sobrenadante obtenido a partir del cultivo de una cepa microbiana de la invención, de aquí en adelante sobrenadante de la invención que, por proceder de dicha cepa microbiana, es capaz de llevar a cabo reacciones de transesterificación. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, se cree que esto se debe a que las enzimas  
25 necesarias para llevar a cabo reacciones transesterificación son secretadas por la bacteria al medio de cultivo.

El sobrenadante obtenido mediante el cultivo de la bacteria de la invención puede contener no sólo las enzimas necesarias para llevar a cabo reacciones de  
30 transesterificación, sino que también puede contener otro tipo de compuestos que pueden interaccionar con dichas enzimas, disminuyendo la eficacia de conversión del sustrato a los productos resultantes de la transesterificación como el biodiesel. Por lo tanto, puede ser conveniente someter al sobrenadante a un proceso de

concentración y de diálisis para eliminar aquellas partículas o compuestos no deseables.

En la presente invención se entiende por concentración y/o "diálisis" al proceso de  
5 separar las moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión  
a través de una membrana semipermeable. Típicamente una solución de varios  
tipos de moléculas es puesta en una bolsa semipermeable de diálisis, como por  
ejemplo, en una membrana de la celulosa con poros, y la bolsa es sellada. La  
bolsa de diálisis sellada se coloca en un envase con una solución diferente, o  
10 agua pura. Las moléculas lo suficientemente pequeñas como para pasar a través  
de los poros (a menudo agua, sales y otras moléculas pequeñas) tienden a  
moverse hacia adentro o hacia afuera de la bolsa de diálisis en la dirección de la  
concentración más baja. La técnica de diálisis es ampliamente conocida en el  
estado de la técnica y su puesta en práctica es rutina para el experto en la  
15 materia. En la puesta en práctica de la presente invención, el sobrenadante de la  
invención se virtió en una bolsa de diálisis de 12 KDa y tras ser concentrado con  
polietilenglicol 8 KDa, se dializó con tampón fosfato potásico.

Por lo tanto, en una realización particular, el sobrenadante de la invención está  
20 concentrado y/o dializado.

Adicionalmente, tanto si el sobrenadante de la invención está concentrado y/o  
liofilizado o no, éste puede ser sometido a un proceso de liofilización. La técnica  
de liofilización ha sido previamente descrita en la presente descripción. Por lo  
25 tanto, en otra realización particular, el sobrenadante de la invención está  
liofilizado.

Una vez obtenidos tanto la cepa microbiana de la invención como el sobrenadante  
producido a partir del cultivo de ella, y probado que son capaces de llevar a cabo  
30 reacciones de transesterificación, el experto en la materia entiende que tanto la  
cepa microbiana como el sobrenadante de la invención pueden emplearse para  
producir biodiesel.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una cepa microbiana o un sobrenadante según la invención para la producción de biodiesel que, en una realización particular, dicha producción de biodiesel se realiza a partir de grasas o aceites, preferiblemente, a partir de aceites vegetales, más preferiblemente, a partir de aceite de girasol. Más detalles sobre la producción de biodiesel mediante el empleo de la cepa microbiana o el sobrenadante de la invención puede encontrarse en el apartado donde se describe el método de producción de biodiesel.

10 *Métodos de obtención de biodiesel*

Como se ha explicado en apartados anteriores, los inventores han descubierto una nueva cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación, por lo que tanto la cepa microbiana (cepa microbiana de la invención) como el sobrenadante obtenido a partir del cultivo de la misma (sobrenadante de la invención) pueden emplearse en la obtención de biodiesel.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener biodiesel, de aquí en adelante método de obtención de biodiesel de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- a) obtener el sobrenadante resultante de cultivar la cepa microbiana de la invención en presencia de un sustrato lipídico,
- b) poner el sobrenadante obtenido en la etapa (a) en contacto con aceites o grasas, en condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de transesterificación y, opcionalmente
- c) extraer el biodiesel obtenido en la etapa (b).

En la presente invención se entiende por "biodiesel" a las moléculas lineales de éster resultante de una reacción de transesterificación formadas por un éster del ácido graso y un alcohol.

En una primera etapa del método de obtención de biodiesel de la invención [etapa a)], la cepa microbiana de la invención es cultivada en presencia de un sustrato

lipídico con el objetivo de obtener un sobrenadante que contendrá las enzimas y compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción de transesterificación que es necesaria para obtener biodiesel. Las condiciones del cultivo y los tipos de sustrato lipídico han sido explicados previamente en el método de selección de la invención y los mismos son aplicables al presente aspecto inventivo.

El sobrenadante resultante del cultivo puede aislarse por técnicas de rutina para el experto en la materia. Por ejemplo, una vez transcurrido el periodo de incubación, el cultivo puede dejarse reposar para que las células decanten o puede someterse a centrifugación, consiguiendo de ambas formas separar las células del medio de cultivo líquido. Posteriormente, puede obtenerse el sobrenadante, por ejemplo por aspiración con una pipeta.

Una vez obtenido el sobrenadante, éste se pone en contacto con aceites o grasas en las condiciones adecuadas para que tenga lugar la reacción de transesterificación (etapa (b)]. Las condiciones adecuadas para llevar a cabo la transesterificación han sido explicadas previamente en la presente descripción.

En otra realización particular, las condiciones de transesterificación del método de obtención de biodiesel de la invención comprenden:

- una temperatura de entre 20°- 45°C ,
- durante 1-72 horas,
- a 100-350 rpm,
- con 4-8 mL de aceite,
- 1,5-2 mL de etanol absoluto y
- 0,005-0,075 mL de disolución acuosa de NaOH o KOH como inductor.

En otra realización todavía más particular, las condiciones de la reacción de transesterificación comprenden:

- Una temperatura de 37°,
- durante 24 horas,
- a 300 rpm,
- con 6 mL de aceite,

- 1,75 mL de etanol absoluto y
- 0,05 mL de disolución acuosa de NaOH 10N como inductor.

Tal como se ha explicado previamente para otros aspectos inventivos de la presente invención, el sobrenadante obtenido en la etapa a) puede concentrarse y/o dializarse o usarse tal cual. Por lo tanto, en una realización particular, el método de obtención de biodiesel de la invención comprende entre las etapas (a) y (b), la concentración y/o dialización del sobrenadante. Las técnicas de concentración, dialización y liofilización han sido descritas previamente en la presente descripción.

La reacción de transesterificación para obtener biodiesel se puede hacer a partir de cualquier aceite o grasa.

En la presente invención se entiende por "aceite" a cualquier composición lipídica insoluble en agua que se mantiene líquida a temperatura ambiente. Los aceites, dependiendo de su procedencia, pueden ser vegetales, animales o minerales.

En una realización particular, el aceite empleado en el método de obtención de biodiesel de la invención es aceite vegetal. Ejemplos de aceites vegetales incluyen, sin limitar a, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de coco, aceite de palma, aceite de colza, aceite de cáñamo, aceite de lino, aceite de jatropha, aceite de maíz y aceite de ricino. No obstante, en otra realización todavía más particular, el aceite vegetal es aceite de girasol. Ejemplos de aceites animales susceptibles de ser empleados en el método de obtención de biodiesel de la presente invención, incluyen, sin limitar a, aceite de ballena, aceite de foca, aceite de pescado, aceite de bacalao y aceite de marsopa.

En la presente invención se entiende por "grasa" a cualquier composición lipídica insoluble en agua que se mantiene sólida a temperatura ambiente. Ejemplos de grasas susceptibles de ser empleadas en la presente invención incluyen, sin limitar a, grasa de cerdo (manteca) y grasa de ballena.



Una vez llevada a cabo la reacción de transesterificación [etapa (b)], se obtiene una composición que comprende biodiesel el cual, si se desea, puede ser extraído de dicha composición [etapa c)]. Métodos para extraer el biodiesel son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y cualquiera de ellos puede  
5 emplearse en la presente invención (Verdugo C, y col, 2012. Citado *ad supra*)

La detección y cuantificación del biodiesel se puede realizar por cualquiera de los métodos existentes en el estado de la técnica, por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de espectrofotometría de masas y cromatografía, como cromatografía de  
10 gases o HPLC (high performance liquid chromatography). Todas estas técnicas son ampliamente conocidas por el experto en la materia y su empleo es práctica de rutina.

#### *Kit de la invención y sus usos*

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante, kit de la invención, que comprende la cepa microbiana de la invención o el sobrenadante de la invención.

20 Realizaciones particulares del kit de la invención incluyen, sin limitar a:

- El kit comprende, además, un aceite, un alcohol y/o un inductor.
- El aceite es aceite vegetal, preferiblemente, aceite de girasol.
- El alcohol es etanol.
- 25 - El inductor es una disolución acuosa de NaOH o KOH.

Todas estas realizaciones particulares han sido explicadas previamente en aspectos inventivos anteriores y son aplicables al kit de la invención.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para la producción de biodiesel.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Reacción de transesterificación e hidrólisis del paranitrofenol palmitato (pNPP).

Figura 2. Viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske (ProtonRoutineViscometer 5 33200, size 150)

Figura 3. Relación filogenética de la cepa *Terribacillus* AE2B 122 con otras bacterias. Para su realización se ha utilizado el método de *Neighbor-Joining*. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de réplicas de los árboles que 10 presentan esos taxones juntos en un mismo agrupamiento en el test estadístico *bootstrap* (1.000 replicas). Las distancias evolutivas se han calculado con el método *Maximum Composite Likelihood*, y se expresa en unidades del número de sustituciones de bases por sitio. En los datos finales había un total de 1.434 posiciones. Para los análisis filogenéticos se ha usado el programa MEGA4.

15

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo ilustrativo, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

### **Ejemplo 1: Selección de microorganismos con capacidad para hidrolizar tributirina.**

El aislamiento de estos microorganismos se llevó a cabo a partir de muestras tomadas en una almazara de Écija. De la almazara se recogieron muestras de 25 cuatro zonas, AE1B, AE2B, AEDH y AEA, cuya composición se resume en la Tabla 1.

| <b>MUESTRA</b>     | <b>AE1B</b> | <b>AE2B</b> | <b>AEA</b> | <b>AEDH</b> |
|--------------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| <b>C total (%)</b> | 16,24       | 22,490      | 66,410     | 22,970      |
| <b>N total (%)</b> | 0,894       | 0,616       | 1,169      | 0,819       |
| <b>S Total (%)</b> | 0,05594     | N.D         | 0,100      | 0,052       |
| <b>K (%)</b>       | 0,144       | 0,110       | 0,456      | 0,269       |

|                                   |         |         |         |         |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Na (mg/Kg)</b>                 | 61,234  | 130,597 | 168,019 | 235,668 |
| <b>Mg (%)</b>                     | 0,018   | 0,030   | 0,022   | 0,059   |
| <b>Ca (%)</b>                     | 1,602   | 1,500   | 0,074   | 1,861   |
| <b>P (mg/Kg)</b>                  | 36,755  | 43,541  | 280,390 | 168,848 |
| <b>Mn (mg/Kg)</b>                 | 63,528  | 95,033  | 12,015  | 125,528 |
| <b>Fe (mg/Kg)</b>                 | 599,663 | 651,608 | 139,812 | 151,260 |
| <b>Cu (mg/Kg)</b>                 | 73,277  | 49,632  | 27,195  | 140,325 |
| <b>Zn (mg/Kg)</b>                 | 19,163  | 14,253  | 29,750  | 11,955  |
| <b>pH (1/5)</b>                   | 6,837   | 6,55    | 4,68    | 6,27    |
| <b>C.E. 1/5<br/>(mS/cm)</b>       | 1,68    | 2,62    | 3,89    | 2,14    |
| <b>Humedad<br/>(%)</b>            | 5,460   | 4,690   | 5,819   | 5,179   |
| <b>M.O. (%)</b>                   | 30,709  | 40,186  | 95,801  | 40,782  |
| <b>CaCO<sub>3</sub> total (%)</b> | 9,499   | 8,808   | 1,262   | 6,314   |

N.D: no detectable

Tabla 1. Composición de las distintas zonas de muestreo (AE1B, AE2B, AEDH y AEA).

- 5 A 1 gramo de muestra depositada en un tubo de ensayo se añadieron 3 mL de solución salina (CINa 0,85%), esta disolución se diluyó 100 veces más, sembrando 0,1 mL en placas conteniendo LB, PDB (Potato Dextrose Broth), Agar, K9 A, K9 G o K9 Gamp (Silverman and Lundgren, 1959), y 0,5 % de tributirina. Las placas se incubaron a 30°C durante 4 – 7 días.

10

Mediante este procedimiento se obtuvieron 1.024 colonias (hongos, levaduras y bacterias) de las cuales se seleccionaron las 299 bacterias productoras de halo en medio LB con tributirina (Tabla 2).

| <b>Muestra</b> | <b>Bacterias</b> | <b>Levaduras</b> | <b>Hongos</b> | <b>Total</b> |
|----------------|------------------|------------------|---------------|--------------|
| <b>E1B</b>     | 61               | 21               | 174           | 256          |
| <b>AE2B</b>    | 174              | 208              | 10            | 392          |

|              |     |     |     |             |
|--------------|-----|-----|-----|-------------|
| <b>AEDH</b>  | 57  | 190 | 1   | 248         |
| <b>AEA</b>   | 7   | 70  | 51  | 128         |
| <b>Total</b> | 299 | 489 | 236 | <b>1024</b> |

Tabla 2. Microorganismos aislados de las muestras de suelos de la almazara en el ensayo en placa (con capacidad para hidrolizar tributirina).

5

**Ejemplo 2: Selección de microorganismos hidrolíticos capaces de llevar a cabo reacción de transesterificación.**

Se probó si algunas de las bacterias aisladas con capacidad para hidrolizar tributirina también tenían la capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación mediante un método colorimétrico en medio líquido, desarrollado por los inventores. Para la realización de este ensayo se preparó un liofilizado que actuó como catalizador biológico de la reacción. Este liofilizado se preparó creciendo las cepas hidrolíticas positivas en LB con tributirina a temperaturas entre 22°C y 37°C y agitación. Transcurridos los tres días se recogieron los sobrenadantes, recuperando un total de 1,8 mL de sobrenadante, que se congelaron a -80°C y se sometieron a liofilización. Este liofilizado se mezcló con 1 mL de *p*NPP (*para*-nitrofenol palmitato) y 60 µl de etanol absoluto y se dejó a 37°C durante toda la noche en agitación. También se preparó una disolución que solo contenía *p*NPP y etanol, como muestra blanco, y una que contenía solo liofilizado (de sobrenadantes elegidos al azar de entre las muestras a analizar) y *p*NPP, como control de hidrólisis. Terminada la reacción se dejaron decantando los tubos y se recogieron 25 µL del sobrenadante que se mezclaron con 1mL de NaOH 0,05 M. A continuación se midió la absorbancia a 410 nm. El NaOH crea una fase acuosa alcalina donde se extrae el *para*-nitrofenol (*p*NP) liberado del *p*NPP durante la reacción de transesterificación (Figura 1). Ya que al adicionar NaOH 0,05 M se estaba añadiendo agua y en la reacción de hidrólisis (Figura 1) también se puede liberar *p*NP, se realizaron controles de hidrólisis. Se eligió el valor máximo (0,8) en este experimento, de los valores de control de

hidrólisis , como valor de corte para considerar nuestros sobrenadantes positivos en la reacción de transesterificación.

Las bacterias, se agruparon según sus valores de absorbancia (Tabla 3). Se consideraron positivas todas aquellas muestras con valores de absorbancia mayores al valor máximo de hidrólisis, pero sólo se seleccionaron para el análisis mediante cromatografía de gases del producto de la reacción de la transesterificación, las de absorbancia mayor a 1, entre las que se encuentra la cepa seleccionada AE2B 122.

10

| Abs. 410nm  | Nº cepas | Positivo/Negativo |
|---|----------|-------------------|
| > 1   | 38       | Positivo          |
| 1 - 0,8   | 28       | Positivo          |
| < 0,8   | 233      | Negativo          |
| <b>0,8 → Valor máximo de hidrólisis obtenido (control negativo)</b> |          |                   |

Tabla 3. Selección de microorganismos capaces de llevar a cabo reacción de transesterificación, según la absorbancia a 410 nm.

15 **Ejemplo 3: Preparación del sobrenadante de la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122**

Para la preparación del sobrenadante, se creció un pre-inóculo de *Terribacillus* sp. AE2B 122 en medio LB durante una noche. Al día siguiente, se utilizó dicho cultivo para inocular medio LB con tributirina. Tras crecer el cultivo en medio LB con tributirina, se recogió el sobrenadante y se vertió en una bolsa de diálisis de 20 12 KDa (SIGMA, D-9527). La bolsa de diálisis se dejó toda la noche a 4 °C cubierta en polietilenglicol de 8 KDa y cuando la bolsa de diálisis estaba completamente seca, se limpió el exterior con agua destilada y se dializó con tampón fosfato potásico 0,05M pH 7,8, a 4°C y agitación magnética. Estos 25 dializados se congelaron a -80°C y se liofilizaron.

**Ejemplo 4: Producción de Biodiesel. Reacción de transesterificación y análisis del producto mediante cromatografía de gases**

Se escogió la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122 para probar si era capaz de producir biodiesel. Para ello, dicha cepa fue sometida a un análisis, mediante cromatografía de gases, en el que se analizó el producto de una reacción de transesterificación de aceite de girasol. Esta reacción se llevó a cabo mezclando 6 mL de aceite, 1,75 mL etanol absoluto y 0,05 mL de disolución acuosa NaOH 10N, con el liofilizado preparado. La determinación de ésteres etílicos y glicéridos del producto de la transesterificación se llevó a cabo mediante un método descrito por C. Verdugo y col. (2010), que consiste básicamente en una modificación e integración de dos métodos oficiales, UNE EN ISO 14103 (ésteres) y UNE EN ISO 14105 (glicéridos), usando como patrón interno octadecano (cetano) para cuantificar el contenido de glicerol, ésteres etílicos y glicéridos (mono-, di- y triglicéridos), respectivamente. Se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II, conectado a una columna capilar HT5 (25 m x 0,32 mm I.D x 0,1 µm, SGE, Supelco) con un detector de Ionización por llama (FID) e inyección splitless. La preparación de las muestras para el análisis consistió en la toma de 0,0125 mL del biocombustible, obtenido en la reacción anterior, que se introducen en un vial con 4 mL de una mezcla 1:1 en volumen, de etanol/diclorometano, que a su vez contiene 0,1 g de patrón interno (cetano). Una vez preparada la muestra, se inyectaron 0,5 µL para su análisis cromatográfico. Las condiciones cromatográficas empleadas se resumen en la Tabla 4.

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>Gas portador</b>         | Helio, flujo 1,5 mL/minutos   |
| <b>Modo inyección</b>       | <i>Splitless</i>  |
| <b>Temperatura inyector</b> | 350 °C  |
| <b>Temperatura detector</b> | 400 °C  |
| <b>Programa térmico</b>     | Desde 90 °C hasta 200 °C a una velocidad de 7°C/minutos, seguido de otra rampa desde 200 °C hasta 360 °C a una velocidad de 15 °C/minutos, manteniendo los 360 °C durante 10 minutos. |

Tabla 4: Condiciones cromatográficas empleadas en la determinación de ésteres  
etílicos y glicéridos en las muestras de biodiesel.

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-  
5 Fenske (Proton Routine Viscometer 33200, size 150), determinando el tiempo  
necesario para que un cierto volumen de líquido pase entre dos puntos marcados  
en el instrumento, colocado en posición vertical (Figura 2). Esto constituye una  
medida de la amortiguación que sufre el flujo del líquido, como consecuencia del  
frotamiento interno de sus moléculas, en función de sus viscosidades, siempre  
10 que se mantengan constantes las variables que influyen en el proceso,  
principalmente la temperatura. A partir del tiempo de flujo ( $t$ ), expresado en  
segundos, se obtiene la viscosidad cinemática expresada en centistokes,  $u = C \cdot t$ .  
 $C$  es la constante de calibración del sistema de medida en  $\text{mm}^2/\text{s}^2$ , que viene  
dada por el fabricante del aparato ( $0,04058 \text{ mm}^2/\text{s}^2$  a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , en este caso). Para  
15 las medidas de viscosidad se siguió el procedimiento descrito en la Norma  
Española UNE 55-105-73. La muestra, previamente centrifugada a 3.500 rpm  
durante 10 minutos y filtrada a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , se sumergió en un baño termostatzado a  $40$   
 $^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, asegurándose de que la temperatura era estable.  
Posteriormente se introdujo la muestra en el viscosímetro y éste, a su vez, en el  
20 baño termostático, cuidando que estuviera situado en posición rigurosamente  
vertical, con el extremo inferior a una distancia mínima de 2 centímetros del fondo  
del baño. Se esperó el tiempo necesario para que se estableciera el equilibrio  
térmico, y una vez alcanzado, mediante un tubito de goma se succionó haciendo  
subir el nivel de la muestra hasta alcanzar unos 5 milímetros por encima de la  
25 primera marca del viscosímetro. Se interrumpió la succión, dejando que el líquido  
descendiera libremente en el instrumento, poniendo en marcha el cronómetro en  
el momento en que el menisco superior pasó por la marca entre los dos bulbos, y  
parando el cronómetro en el momento que el menisco alcanzó la segunda marca.  
Se anotó el tiempo de flujo, expresado en segundos. Se repitió esta operación dos  
30 veces. Los resultados (Tabla 5) muestran una conversión de hasta el 100 % y una  
selectividad de hasta el 96,5%, lo que demuestra que la cepa AE2B 122 produce  
biodiesel.

| <b>Muestra</b>           | <b>Viscosidad</b>   | <b>FAE</b> | <b>DG</b>  | <b>TG</b>  | <b>Conv.</b> | <b>Sel.</b> |
|--------------------------|---------------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|
|                          | <b>40 °C, (cSt)</b> | <b>(%)</b> | <b>(%)</b> | <b>(%)</b> | <b>(%)</b>   | <b>(%)</b>  |
| <b>Aceite de Girasol</b> | 34,5                | 3,4        | 29,9       | 66,7       | 33,3         | 3,4         |
| <b>Control negativo</b>  | 9,4                 | 13,8       | 41,9       | 44,3       | 55,7         | 13,8        |
| <b>AE2B 122</b>          | 13,3                | 32,2       | 28,8       | 39         | 61           | 32,2        |
| <b>AE2B 122 D</b>        | 15,26               | 96,5       | 3,5        | 0          | 100          | 96,5        |

Tabla 5: Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática y análisis cromatográfico. Se muestra la viscosidad, los FAEs (Esteres de ácidos grasos), DG (diglicéridos), TG (triglicéridos), Conv. (conversión de triglicéridos a diglicéridos y FAEs) y Sel. (selectividad→porcentaje de FAEs). AE2B 122 (sobrenadante sin concentrar, ni dializar), AE2B122 D (sobrenadante concentrado y dializado).

#### **Ejemplo 5: Optimización de la reacción de transesterificación del sobrenadante de la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122 para la producción de Biodiesel**

Como la cepa AE2B 122 es capaz de producir de biodiesel, se procedió a optimizar este proceso. Para ello, se utilizaron dos tipos de sobrenadantes. Un tipo fue el descrito en el Ejemplo 3, con el que se obtuvieron los mejores resultados (Tabla 5), el otro tipo de sobrenadante se consiguió mediante las mismas condiciones de cultivo, pero el sobrenadante no fue concentrado ni dializado, sino que se congeló, a -80°C, y se liofilizó directamente tras su recogida.

20

Se realizaron además ensayos de reutilización (Tabla 6) bajo las mismas condiciones de operación descritas en el Ejemplo 4. Para estos ensayos se utilizaron 2 mL de la fase inferior, tras centrifugación, de la reacción de transesterificación anterior a cada ciclo de reutilización. Se observa que el sobrenadante es estable y retiene la capacidad de producir biodiesel durante varios ciclos.

25

| <b>Nº Ciclos</b> | <b>Viscosidad</b> | <b>FAE</b> | <b>DG</b> | <b>TG</b> | <b>Conv.</b> | <b>Sel.</b> |
|------------------|-------------------|------------|-----------|-----------|--------------|-------------|
|------------------|-------------------|------------|-----------|-----------|--------------|-------------|



|           | 40 °C, (cSt) | (%)   | (%)   | (%)   | (%)   | (%)   |
|-----------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>1</b>  | <b>15,26</b> | 96,5  | 3,5   | 0     | 100   | 96,5  |
| <b>2</b>  | <b>19,23</b> | 67,77 | 32,22 | 0     | 100   | 67,77 |
| <b>3</b>  | -----        | 29,16 | 0,65  | 70,29 | 29,81 | 29,16 |
| <b>4</b>  | <b>12,98</b> | 43,90 | 3,5   | 52,6  | 47,4  | 43,90 |
| <b>5</b>  | <b>12,5</b>  | 45,70 | 9,52  | 44,76 | 55,23 | 45,70 |
| <b>6</b>  | <b>13,72</b> | 40,39 | 59,61 | 0     | 100   | 40,39 |
| <b>7</b>  | <b>15,14</b> | 64,31 | 4,08  | 31,61 | 68,39 | 64,31 |
| <b>8</b>  | <b>15,12</b> | 60,44 | 37,86 | 1,68  | 98,31 | 60,44 |
| <b>9</b>  | <b>12,09</b> | 46,06 | 1,12  | 52,82 | 47,18 | 46,06 |
| <b>10</b> | <b>13,06</b> | 54,13 | 0,55  | 45,32 | 54,68 | 54,13 |

Tabla 6. Reutilización de la fracción extracelular liofilizada de *Terribacillus* sp. AE2B 122 D en la reacción de transesterificación y análisis cromatográfico. Se muestra la viscosidad, los FAEs (Esteres de ácidos grasos), DG (diglicéridos), TG (triglicéridos), Conv. (conversión de triglicéridos a diglicéridos y FAEs) y Sel. (selectividad → porcentaje de FAEs).

#### Ejemplo 6: Análisis filogenético de la cepa *Terribacillus* sp. AE2B 122

El estudio filogenético se llevó a cabo mediante análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. Para ello se amplificó el gen del ARNr 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 16F27, cuya secuencia es 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 1), y 16R1488, con la secuencia 5'-CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC-3' (SEQ ID NO: 2) (Moreno M.L., Garcia, M.T., Ventosa, A., Mellado, E. 2009. *Characterization of Salicola sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile*. FEMS Microbiol Ecol, 68, 59-71.). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: un ciclo de 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C durante 1 minutos, 50°C durante 1 minutos y 72°C durante 2 minutos, y luego un paso de extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN amplificado es secuenciado mediante el método Sanger. Se utilizan 1.450 pb para la búsqueda de secuencias similares entre las secuencias

depositadas en GenBank, usando el algoritmo BlastN, resultando ser *Terribacillus goriensis* strain km2 (Número de acceso: JF411250.1) el que mayor valor de identidad mostraba con nuestra secuencia. Por lo tanto, se asignó al género *Terribacillus* como *Terribacillus* sp. AE2B 122.

5

Para la realización del árbol filogenético se utilizó el paquete de programas MEGA4. Primero se realizó un alineamiento múltiple, usando ClustalW, de la secuencia de 1.450 pb (correspondiente al fragmento entre las posiciones 39 a la 1.489 del ARNr 16S de *Escherichia coli*) de AE2B 122 y las 16 secuencias de mayor identidad obtenidas con BlastN. Finalmente el árbol se construyó utilizando 10 varios métodos, obteniendo resultados similares, aquí sólo mostramos el árbol construido mediante el método *Neighbor-joining* (Figura 3).

## REIVINDICACIONES

1. Método para seleccionar una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo una reacción de transesterificación que comprende las siguientes etapas:
  - a) cultivar cepas microbianas en un medio de cultivo sólido suplementado con un sustrato lipídico,
  - b) seleccionar aquellas cepas microbianas que produzcan la hidrólisis del sustrato lipídico,
  - 10 c) cultivar las cepas microbianas seleccionadas de la etapa (b) en un medio de cultivo líquido y extraer el sobrenadante,
  - d) incubar el sobrenadante extraído en la etapa (c) en una solución que comprende como sustrato un derivado de la serie de los *para*-nitrofenoles, en las condiciones adecuadas para llevar a cabo dicha reacción de transesterificación, y
  - 15 e) detectar la presencia de *para*-nitrofenol.
  
2. Método según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo líquido de la etapa (c) está suplementado con un sustrato lipídico.
  
- 20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el sustrato lipídico es tributirina.
  
4. Método según la reivindicación 1 a 3, en el que el derivado de la serie de los *para*-nitrofenoles es *para*-nitrofenolpalmitato.
  
- 25 5. Cepa microbiana identificada mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
  
- 30 6. Cepa según la reivindicación 5, caracterizada porque pertenece al género *Terribacillus*.

7. Cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el nº de registro 8231.
- 5 8. Un sobrenadante obtenido a partir del cultivo de una cepa microbiana según la reivindicación 5 ó 6, o de una cepa microbiana según la reivindicación 7.
9. Sobrenadante según la reivindicación 8, en el que el sobrenadante está concentrado y/o dializado.
- 10 10. Sobrenadante según la reivindicación 8 ó 9, en el que el sobrenadante está liofilizado.
11. Uso de una cepa bacteriana según la reivindicación 5 ó 6, de una cepa  
15 microbiana según la reivindicación 6, o del sobrenadante según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para la producción de biodiesel.
12. Uso según la reivindicación 11, en la que la producción de biodiesel se realiza a partir de aceites o grasas.
- 20 13. Uso según la reivindicación 12, en el que el aceite es aceite vegetal.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que el aceite vegetal es aceite de girasol.
- 25 15. Método para obtener biodiesel que comprende las siguientes etapas:
- a) obtener el sobrenadante resultante de cultivar una cepa microbiana según la reivindicación 5 ó 6, o una cepa microbiana según la reivindicación 7 en presencia de un sustrato lipídico,
  - 30 b) poner el sobrenadante obtenido en la etapa a) en contacto con aceites o grasas, en condiciones adecuadas para llevar a cabo una reacción de transesterificación y, opcionalmente
  - c) extraer el biodiesel obtenido en la etapa (b).

16. Método según la reivindicación 15, que comprende entre las etapas (a) y (b), la concentración, dialización y/o liofilización del sobrenadante.

5 17. Método según la reivindicación 16, en el que las condiciones de la reacción de transesterificación comprenden:

- entre 20°- 45°C ,
- durante 1-72 horas,
- a 100-350 rpm,
- 10 - con 4-8 mL de aceite,
- 1,5-2 mL de etanol absoluto y
- 0,005-0,075 mL de disolución acuosa de NaOH o KOH como inductor.

15 18. Método según la reivindicación 17, en el que las condiciones de la reacción de transesterificación son:

- a 37°,
- durante 24 horas,
- a 300 rpm,
- con 6 mL de aceite,
- 20 - 1,75 mL de etanol absoluto y
- 0,05 mL de disolución acuosa de NaOH 10N como inductor.

19. Método de obtención de biodiesel según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en la que el aceite es aceite vegetal.

25

20. Método de obtención de biodiesel según la reivindicación 19, en la que el aceite vegetal es aceite de girasol.

30

21. Kit que comprende una cepa microbiana según la reivindicación 5 ó 6, una cepa microbiana según la reivindicación 7, o un sobrenadante según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

22. Kit según la reivindicación 21 que comprende, además, un aceite, un alcohol y/o un inductor.
23. Kit según la reivindicación 22, en el que el aceite es aceite vegetal,  
5 preferentemente, aceite de girasol.
24. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, en el que el alcohol es etanol.
- 10 25. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que es inductor es una disolución acuosa de NaOH o KOH 10N.
26. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25 para la producción de biodiesel.

FIG. 1

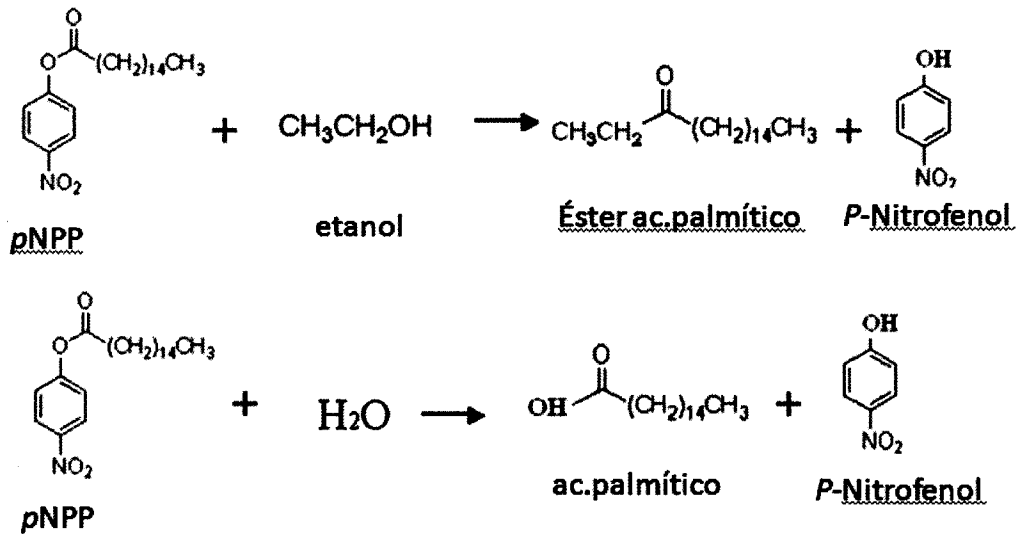


FIG. 2

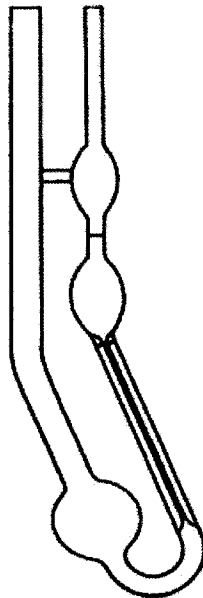
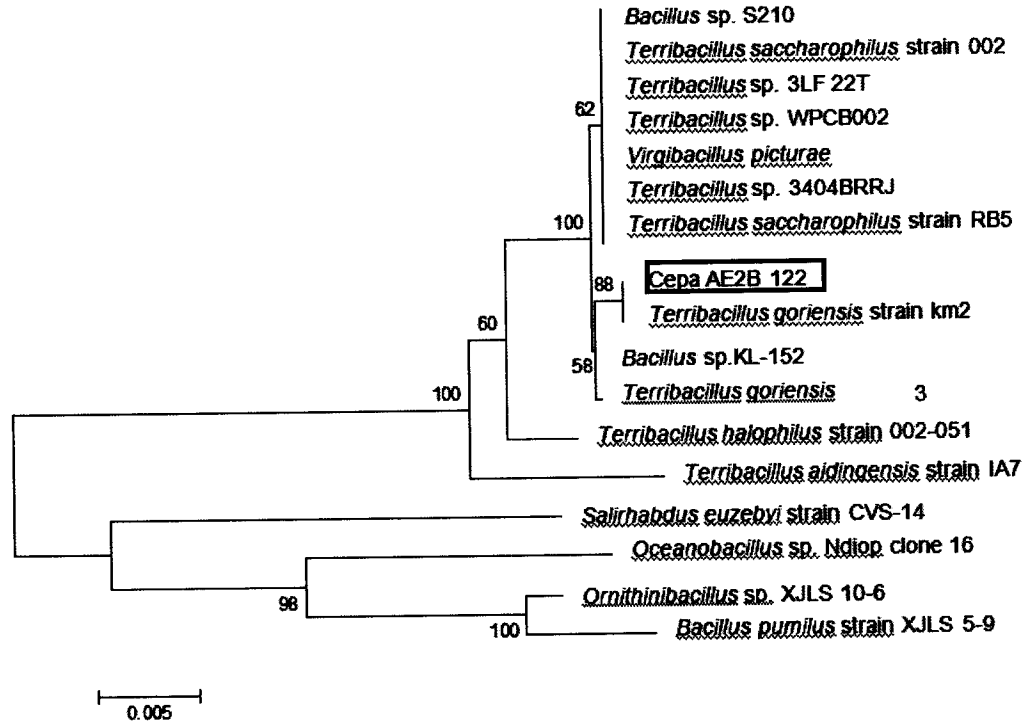


FIG. 3





ES 2 510 765 A1

ES1650.25 Listado de secuencias\_ST25.txt  
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Sevilla  
Universidad de Córdoba

<120> CEPA MICROBIANA TERRIBACILLUS SP.AE2B 122 CON CAPACIDAD PARA LLEVAR A CABO REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN Y USOS DE LA MISMA

<130> ES1650.25

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> secuencia de nucleótidos del cebador 16F27

<400> 1  
agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> secuencia de nucleótidos del cebador 16R1488

<400> 2  
cggttacctt gttaggactt cacc 24



②① N.º solicitud: 201300039

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.01.2013

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)  
C12R1/07 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X         | SRIMHAN, P. et al., 'Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterificatio.', ENZYME MICROB. TECHNOL., 2011, Vol. 48, No. 3, páginas 293-298, ISSN: 0141-0229, materiales y Métodos.                          | 1-5,8-26                   |
| X         | TAKAÇ, S. et al. 'Extracellular lipolytic enzyme activity of a newly isolated Debaryomyces hansenii.', PREP. BIOCHEM. BIOTECHNOL., 2010, Vol. 40, No. 1, páginas: 28-37, ISSN: 1082-6068, 'Experimental'.  | 1-5,8-26                   |
| X         | KANTAK, J.B. et al., 'Isolation, identification and optimization of a new extracellular lipase producing strain of Rhizopus sp.', APPL. BIOCHEM. BIOTECHNOL., 2011, Vol. 164, No. 7, páginas 969-978, ISSN: 1559-0291 (Electronic), Materialers y Métodos.                               | 1-5,8-26                   |
| X         | HAIDER, M.A. et al., 'Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statistically designed experiments', APPL. BIOCHEM. BIOTECHNOL., 2007, Vol. 141, Nos. 2-3, páginas 377-390, ISSN: 0273-2289, Materiales y Métodos. | 1-5,8-26                   |
| A         | BISEN, P.S. et al., 'Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification.', BIOTECHNOL. LETT., 2010, Vol. 32, No. 8, páginas 1019-1030, ISSN: 0141-5492, todo el documento.   | 1-26                       |
| A         | AZÓCAR, L. et al., 'Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils.', APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 2010, Vol. 88, No. 3, páginas 621-636, ISSN: 0175-7598(print), ISSN: 1432-0614(electronic), todo el documento.   | 1-26                       |

#### 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  
10.07.2013

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/4

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

C12N, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.07.2013

**Declaración**

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 6, 7, (8-26) (en parte) | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-5, (8-26) (en parte)  | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 6, 7, (8-26) (en parte) | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-5, (8-26) (en parte)  | <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 se publica.

**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       | SRIMHAN, P. et al., <i>Enzyme Microb. Technol.</i> , (2011), 48(3): 293-8.         | 2011              |
| D02       | TAKAÇ, S. et al., <i>Prep. Biochem. Biotechnol.</i> , (2010), 40(1): 28-37.        | 2010              |
| D03       | KANTAK, J.B. et al., <i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i> , (2011), 164(7): 969-78.   | 2011              |
| D04       | HAIDER, M.A. et al., <i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i> , (2007), 141(2-3): 377-90. | 2007              |
| D05       | BISEN, P.S. et al., <i>Biotechnol. Lett.</i> , (2010), 32(8):1019-30.              | 2010              |
| D06       | AZÓCAR, L. et al., <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , (2010), 88(3): 621-36.    | 2010              |

En D1-D4 se describen diferentes procedimientos para seleccionar microorganismos capaces de llevar a cabo una reacción de transesterificación.

En D5-D6 se revisan métodos biotecnológicos para la producción de biodiesel.

**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**

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicaciones independientes 1, 11 y 15.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un procedimiento para seleccionar una cepa microbiana con capacidad de llevar a cabo una reacción de transesterificación que consiste básicamente en cultivar cepas microbianas en un medio sólido suplementado con un sustrato lipídico, seleccionar y cultivar en un medio líquido aquéllas que hidrolizan el sustrato lipídico, extraer el sobrenadante del cultivo líquido e incubarlo con una solución que comprende un compuesto derivado de para-nitrofenol y, finalmente, verificar la reacción de transesterificación mediante la detección de para-nitrofenol. El objeto de la reivindicaciones 11 y 15 consiste respectivamente en el uso de las cepas microbianas obtenidas por el procedimiento de la reivindicación 1 para producir biodiesel y en un método para obtener biodiesel caracterizado por incubar el sobrenadante procedente de cultivos de las cepas obtenidas por el procedimiento de la reivindicación 1 con aceites o grasas en condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción de transesterificación.

1.1.2. En los documentos D1-D4 se describen diferentes procedimientos para seleccionar microorganismos productores de lipasas, actividad enzimática que cataliza diferentes reacciones entre las que se incluye la de transesterificación. Dichos procedimientos comparten las mismas características que las del procedimiento reivindicado en la solicitud, en concreto, la identificación y selección de las cepas microbianas productoras de lipasas se lleva a cabo en medios de cultivo que contienen un sustrato lipídico, y la determinación de la actividad lipasa (transesterificación) de las cepas seleccionadas se realiza mediante la incubación del sobrenadante de cultivos líquidos con compuestos derivados de para-nitrofenol, y la posterior detección del para-nitrofenol. Además, en D1 se describe la utilización de las cepas seleccionadas en la obtención de biodiesel (cf. D1: materiales y Métodos, apartados 2.2, 2.3. y 2.4.2; Resultados y Discusión. D2: 'Strain Isolation', 'Culture Media and Conditions' y 'Enzyme Assay'. D3: Materiales y Métodos. D4: Materiales y Métodos). Por consiguiente, se considera que el objeto de protección de la reivindicaciones independientes 1, (11 y 15) (en parte), y el de las dependientes 2-5, (8-10, 12-14, 16-26) (en parte) no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D4.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de la reivindicación 1-5, (8-26) (en parte) no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.