

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 377**

21 Número de solicitud: 201531498

51 Int. Cl.:

C12P 17/12 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

19.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.03.2016

Fecha de la concesión:

01.06.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.06.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA-Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA TORREIRO, María;
LÓPEZ ABELAIRAS, María;
LÚ CHAU, Thelmo Alejandro y
LEMA RODICIO, Juan Manuel**

74 Agente/Representante:

PARDO SECO, Fernando Rafael

54 Título: **Procedimiento para la producción de polihidroxialcanoatos y de ectoína mediante sacarificación y fermentación simultánea a partir de hidrolizados de grano de cereal**

57 Resumen:

Procedimiento para la producción de polihidroxialcanoatos y de ectoína mediante sacarificación y fermentación simultánea a partir de hidrolizados de grano de cereal. La invención se refiere a un procedimiento de aprovechamiento de grano de cereal licuefactado que permite obtener polihidroxialcanoatos (PHA) y ectoína, mediante un proceso de fermentación y sacarificación simultáneas (SSF) utilizando una bacteria halófila. El procedimiento permite flexibilizar la operación de una biorrefinería de etanol derivando una fracción de la materia prima a producir PHA y/o ectoína, en función del precio de mercado de los combustibles.

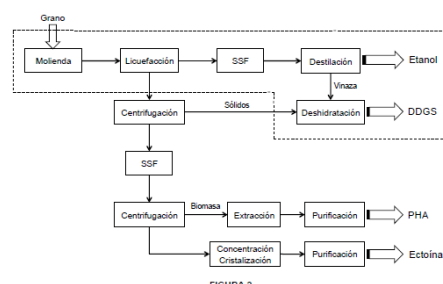


FIGURA 2

ES 2 562 377 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de polihidroxialcanoatos y de ectoína mediante sacarificación y fermentación simultánea a partir de hidrolizados de grano de cereal

5 **SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de polihidroxialcanoatos (PHA) y ectoína a partir de hidrolizados de grano de cereal. El procedimiento, objeto de la presente invención se puede integrar en una instalación de producción de bioetanol en la que parte del cereal se derivaría, una vez pretratado, hacia la producción de bioplásticos y ectoína. Esta invención se basa en la adaptación del proceso de fermentación y sacarificación simultáneas (SSF), usado en la producción de etanol, para la producción de PHA y ectoína.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La producción mundial de plásticos en el año 2012 alcanzó los 288 millones de toneladas. Se estima que tan solo el 6% de los residuos plásticos llegan a reciclarse. Un estudio reciente estima que se encuentran flotando a la deriva en los océanos unas 270,000 toneladas de residuos plásticos (Eriksen M. et al., 2014; Plos ONE 9: e111913. doi:10.1371/journal.pone.0111913). A pesar de ser un material fabricado para resistir y durar en el tiempo, a menudo también se diseña para aplicaciones de un solo uso. Los bioplásticos o plásticos biodegradables podrían sustituir en muchas de sus aplicaciones a los plásticos de origen fósil. La capacidad de ser degradados fácilmente supondría una ventaja medioambiental importante con respecto a los plásticos de origen fósil.

Existen diferentes tipos de microorganismos capaces de producir y acumular diferentes tipos de PHA, aunque los que se obtienen con mayor frecuencia son los polihidroxibutiratos (PHB) y polihidroxivaleriatos (PHV). De forma general, se clasifican como poliésteres termoplásticos. Estos materiales son acumulados por diversos microorganismos en su interior como material de reserva. En función del mecanismo o cinética de acumulación empleado, los microorganismos se pueden clasificar en tres categorías (Lopar M. et al., 2013; Biochem Eng J 79: 57-70):

- i) Especies que presentan una estricta separación entre la fase de crecimiento y la de producción de PHA bajo una limitación de nitrógeno o fósforo (p. ej. *Methylomonas extorquens*).
- ii) Especies que acumulan PHA bajo condiciones equilibradas de nutrientes, pero alcanzan la máxima producción bajo limitación de nutrientes como nitrógeno o fósforo (p. ej. *Cupriavidus necator*).
- iii) Especies que alcanzan altos ratios de acumulación incluso sin ninguna limitación de nutrientes esenciales (p. ej. *Azahydromonas lata*).

Halomonas boliviensis pertenece al primer tipo de especies, por lo que para que se produzca el cambio de metabolismo hacia la acumulación de PHA es necesario aplicar una limitación en algún nutriente esencial como nitrógeno o fósforo. En estudios previos, se ha indicado que esta halobacteria es capaz de acumular PHA en una proporción de hasta el 80% de su peso, usando glucosa como sustrato en una operación fed-batch (Quillaguamán J. et al., 2008; Appl Microbiol Biotechnol 78: 227-232). Además, debido a su carácter halotolerante, se obtiene ectoína como subproducto extracelular, un soluto compatible con propiedades interesantes para productos de cosmética, como estabilizador de proteínas y otras estructuras celulares frente a radiaciones UV y sequedad (Pastor J.M. et al., 2010; Biotechnol Adv 28:782-801).

La producción de bioplásticos todavía no puede competir en términos de costes de producción con los plásticos derivados del petróleo. Los costes actuales de producción de PHA (4-6 €/kg) son significativamente mayores que los de los plásticos sintéticos obtenidos mediante procesos químicos (1-2 €/kg). Los factores que mas influyen en este coste son el precio del sustrato y la etapa de recuperación del bioplástico, pudiendo representar el coste del sustrato hasta el 50% del coste total de producción. Este porcentaje se redujo hasta un 30% cuando se realizó la producción integrada de PHA y etanol utilizando caña de azúcar como materia prima (Nonato R.V. et al., 2001; Appl Microbiol 57: 1-5). Cuando se utilizan cultivos puros en la producción de bioplásticos, el mantenimiento de condiciones estériles en el biorreactor representa un coste adicional a tener en cuenta.

La sacarificación y fermentación simultánea es un proceso frecuentemente utilizado en la producción de etanol a partir de cereal. Algunas de sus ventajas frente al uso de un proceso de sacarificación y fermentación en dos etapas (SHF) son: i) reducción del riesgo de contaminación microbiana; ii) menor estrés osmótico debido a la reducción de la concentración de glucosa y iii) mayor eficiencia energética (Bothast R.J. y Schlicher M.A., 2005; Appl Microbiol Biotech 67: 19-25). Algunas patentes previas han empleado una forma modificada de este proceso para producir etanol utilizando una levadura termotolerante (Otto E. y Escovar-Kousen J., 2005. US

2005/0026261 A1), en la producción de butanol mediante el proceso ABE (Davidov E.R. et al., 2011. WO 2010087737 A3) y en la producción de glutamato monosódico, ácido láctico y succínico (Bergsma M.H. et al., 2012. WO 2012019159 A1). Previamente se ha estudiado la producción de PHA a partir de hidrolizados de trigo utilizando la bacteria *Cupriavidus necator* siguiendo un esquema de hidrólisis y fermentación en dos etapas (Koutinas A.A. et al., 2007; *Enz Microb Technol* 40: 1035-1044), pero no existen reportes previos de su producción aplicando un proceso SSF.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de PHA y ectoína adaptando el proceso de obtención de bioetanol a partir de grano de cereal, en un esquema integrado de biorrefinería. De este modo, a partir de una única corriente de entrada, se pueden obtener diversos productos (etanol, PHA, ectoína).

La invención permite reducir los costes de producción de PHA mediante la integración en una biorrefinería de etanol, usando un sustrato de bajo coste, la utilización de una bacteria halófila, que no requiere un proceso de esterilización previo a la fermentación, y la obtención de un co-producto de alto valor comercial como la ectoína. La integración en una biorrefinería de la producción de etanol y PHA ayuda a reducir los costes asociados a la materia prima (cereal) y reactivos (enzimas). Además permite flexibilizar la operación de la planta para la producción de proporciones variables de etanol, PHA y ectoína, en función del precio de mercado de los combustibles.

La invención se refiere a un procedimiento de aprovechamiento de grano de cereal licuefactado, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) centrifugar el grano de cereal licuefactado;
- b) someter el sobrenadante obtenido, mosto de cereal, a un proceso de fermentación y sacarificación simultáneas (SSF) en un reactor;
- c) centrifugar el mosto fermentado en la etapa anterior y separar la biomasa bacteriana, que contiene el PHA, del sobrenadante que contiene la ectoína;
- d) someter la biomasa bacteriana a un procedimiento de extracción y purificación del PHA; y
- e) concentrar el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del mosto fermentado utilizando evaporación a presión reducida y purificar la ectoína.

Teniendo en cuenta las características del proceso, resulta imprescindible la centrifugación de la corriente de alimentación para eliminar, al menos, los sólidos de mayor tamaño. Ya que los polímeros se acumulan intracelularmente, la separación previa de los sólidos de la alimentación facilitará el proceso de extracción del producto. Se comprobó que a pesar de efectuar la separación sólido-líquido tras la licuefacción, el rendimiento en azúcares de la sacarificación se mantiene.

En una realización preferente el volumen inicial del medio de fermentación, formado por los compuestos indicados en la Tabla 2, es del 35% con respecto al volumen final de trabajo. Además, en una realización particular el medio de fermentación se somete a un proceso de esterilización a una temperatura preferente de 115°C durante unos 20 minutos.

El proceso de sacarificación y fermentación simultánea del mosto de cereal comprende:

- a) llenado progresivo del reactor; y
- b) operación del reactor en modo discontinuo, también denominado modo batch.

El llenado progresivo del reactor en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) comprende las siguientes etapas:

- a) adición de enzima glucoamilasa, desde el inicio del llenado del reactor hasta alcanzar su llenado completo de tal forma que su concentración final esté comprendida en el rango 0,15 a 1,5 g/L;
- b) adición del inóculo; y
- c) adición del medio de fermentación, que comprende el mosto de cereal, sales y glutamato sódico.

El medio de propagación utilizado para la preparación del inóculo está compuesto por un 50% (v/v) de mosto de cereal y 50% (v/v) de agua con las sales, NaCl, MgSO₄·H₂O, K₂HPO₄, NH₄Cl, FeSO₄·7H₂O, Tris, glutamato

sódico y la enzima glucoamilasa. El inóculo se añade al reactor en forma de pulso, en una proporción del 10% con respecto al volumen final del reactor. Dicho inóculo está caracterizado por tener una densidad óptica comprendida en el rango 2,8 a 3. La adición del inóculo se produce entre las dos horas y media y las tres horas y media de inicio de operación del reactor, preferentemente a las tres horas de operación del reactor.

- 5 Durante el llenado progresivo del reactor se suministra aire al reactor, que en una realización preferente se lleva a cabo a través de un filtro estéril. El caudal del aire suministrado al reactor está en el rango de 0,5 a 2,5 L aire/(L medio·min). El pH se mantiene durante todo el proceso de SSF a un valor preferente de 7,5 mediante la adición de NaOH 5 M, mientras que la temperatura se mantiene preferentemente a 30°C.

- 10 La adición del medio de fermentación se realiza entre las cuatro horas y media y las cinco horas y media de operación del reactor, preferentemente en la quinta hora de operación del reactor. Las sales introducidas en el proceso de llenado comprenden NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NH_4Cl y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

El proceso de adición de la enzima y del medio de fermentación finaliza entre las trece horas y media y las catorce horas y media de operación del reactor, preferentemente a las catorce horas de operación del reactor. El reactor opera en modo batch hasta la hora 72 aproximadamente.

- 15 En un modo de realización el procedimiento de extracción y purificación del PHA es el procedimiento ácido descrito en López López-Abelairas et al., 2015; Biochemical Engineering Journal 93: 250-259. La etapa de extracción y purificación del PHA comprende:

- a) separar por centrifugación la biomasa bacteriana;
- b) liofilizar la biomasa resultante de la centrifugación;
- 20 c) homogenizar el sólido resultante de la etapa anterior mediante agitación mecánica;
- d) someter la suspensión homogénea de biomasa con una carga de sólidos determinada a un proceso de digestión ácida usando una solución de H_2SO_4 ;
- e) ajustar el pH del producto de la digestión a 10, con una disolución de NaOH 0,5 N;
- f) lavar el sólido con agua; y
- 25 g) aplicar una etapa de blanqueo con hipoclorito sódico, para eliminar la proteína residual.

- En un aspecto de la invención la solución de H_2SO_4 utilizada en la etapa de suspensión homogénea tiene una concentración del 3,5%. La etapa de digestión ácida se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el rango 70°C a 90°C, preferentemente a 80°C; con una duración de entre 5 a 7 horas, preferentemente 6 horas; y con una carga de sólido preferente de 5% (p/v). En otro aspecto de la invención el hipoclorito sódico utilizado en la
- 30 etapa de blanqueo tiene una concentración del 3% (p/v).

El procedimiento para purificar la ectoína comprende las siguientes etapas (Onraedt et al, 2005; Biotechnology Progress 21: 1206-1212):

- a) concentrar el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del mosto fermentado utilizando evaporación a presión reducida y 60°C;
- 35 b) eliminar las sales y el glutamato mediante lavado con etanol;
- c) cristalizar el líquido concentrado resultante de la etapa anterior;
- d) separar los cristales de ectoína por filtración;
- e) lavar con etanol los cristales de ectoína formados; y
- f) cristalizar el líquido resultante para obtener ectoína purificada.

- 40 En otro aspecto la invención se refiere a una biorrefinería que incorpora el procedimiento objeto de la presente invención para la producción de polihidroxialcanoatos y ectoína.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades detalladas en las figuras se ilustran a modo de ejemplo y no a modo de limitación:

La Figura 1 muestra un esquema del proceso clásico de producción de bioetanol de primera generación.

La Figura 2 muestra un esquema del proceso integrado de biorrefinería, con la producción de bioetanol, PHA y ectoína. El proceso convencional de producción de etanol se muestra dentro del área marcada.

La Figura 3 muestra el esquema del proceso de llenado del reactor SSF para la producción de PHA y ectoína.

La Figura 4 muestra la evolución del crecimiento y la acumulación de *H. boliviensis* durante un proceso SSF con mosto de cereal. Siendo DCW (Dry Cell Weight), el peso total de la biomasa y RCM (Residual Cell Mass), el peso de la biomasa, sin tener en cuenta el PHA.

10 EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

El procedimiento anteriormente descrito se aplicó a la producción de PHA y ectoína utilizando como sustrato mosto de maíz obtenido tras una etapa de licuefacción. La primera etapa de llenado del reactor duró 14 horas, durante la cual se realizó el llenado progresivo del mismo mientras que se llevaba a cabo parte de la sacarificación y la fermentación. Tras las 14 horas de llenado, continuó la fermentación hasta el agotamiento del sustrato. El proceso de llenado consta de las siguientes etapas, recogidas en la Figura 3:

- a) Esterilización (115°C durante 20 min) del reactor con las sondas correspondientes de pH, pO₂ y temperatura con un volumen de medio de fermentación, ver Tabla 1, del 35% con respecto al volumen final de trabajo.
- b) Hora 0: El proceso se inició con la adición de la enzima glucoamilasa, durante las primeras 14 horas del proceso. Se adicionó enzima diluida en agua destilada de forma que la concentración final de enzima en el reactor fue de 1,5 g/L.
- c) Hora 3: adición del inóculo con un ratio del 10% (v/v). Preparado en el medio de propagación descrito en la Tabla 2. La densidad óptica del inóculo utilizado estuvo comprendida en el rango 2,8 a 3.
- d) Hora 5: comenzó la adición del resto del medio de fermentación hasta la hora 14, junto con el enzima restante.
- e) Hora 14: finalizó la entrada de nutrientes y enzima. Debido a la sacarificación continua de glucosa, este sustrato siempre se mantuvo en exceso. El nutriente limitante fue el nitrógeno, de forma que, de acuerdo a las características de crecimiento de *H. boliviensis*, se observó crecimiento bacteriano hasta que la falta de nitrógeno provocó un cambio de metabolismo hacia la acumulación de PHA. La duración total del proceso fue de 72 horas.

Tabla 1. Medio de fermentación.

Compuesto	Concentración
Mosto licuefactado y centrifugado	100% v/v
NaCl	45 g/l
MgSO ₄ ·H ₂ O	2,8 g/L
K ₂ HPO ₄	2,2 g/L
NH ₄ Cl	4 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g/L
Glutamato sódico	20 g/L

Tabla 2. Medio de propagación

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración</i>
Mosto licuefactado y centrifugado	50% v/v
Agua	50% v/v
NaCl	45 g/L
MgSO ₄ ·H ₂ O	1,4 g/L
K ₂ HPO ₄	0,55 g/L
NH ₄ Cl	2,3 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g/L
Glutamato sódico	3 g/L
Tris	15 g/L
Glucoamilasa	146 mg/L

Los medios utilizados tanto en el caso de la propagación como en el reactor SSF son una adaptación para mosto de cereal del medio usado por Quillaguamán J. et al., 2008; Appl Microbiol Biotechnol 78: 227-232.

- 5 El proceso SSF se llevó a cabo en un biorreactor a escala de laboratorio de 2 L de volumen que contaba con monitorización on-line y control automático de temperatura, agitación, pH y caudal de aire, y monitorización del % de oxígeno disuelto y % CO₂ en la corriente de salida de gas.

El pH se mantuvo durante todo el proceso en 7,5 mediante la adición de NaOH 5 M, mientras que la temperatura se mantuvo en 30°C.

- 10 En estudios previos se estudió el comportamiento del enzima en estas condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria, en cuanto a concentración de sal, temperatura y pH, y se comprobó que incluso en estas condiciones, la disminución de la actividad glucoamilasa no era relevante para la continuidad del proceso.

- 15 A diferencia de la producción de etanol, este proceso es aerobio, por lo que se suministró aire al reactor a través de un filtro estéril. El caudal de aire suministrado varió desde 1 L/L·min hasta 5 L/L·min, el cual se incrementó progresivamente para mantener una concentración adecuada de oxígeno disuelto (pO₂) en el reactor.

- 20 En la Figura 4 se representa la evolución del proceso SSF con el tiempo. Se mantuvo un exceso de concentración de glucosa (20 - 60 g/L) durante el proceso, así como la concentración de P-PO₄⁻³ (0,1 – 0,2 g/L). Hasta la hora 32 se observó un gran crecimiento bacteriano (RCM), llegando a alcanzar una concentración de 22 g/L. A partir de la hora 32 se observa como el crecimiento bacteriano se detiene, pero el contenido en PHA comienza a incrementarse exponencialmente, coincidiendo con la desaparición del nitrógeno amoniacal en el medio. A través de la cuantificación de PHA por cromatografía de gases se comprobó que el tipo de polímero acumulado está formado por unidades de PHA. Aunque la fermentación se siguió hasta la hora 77, en la hora 72 se alcanzó el máximo de acumulación, 50% (en peso) de PHA con respecto a la biomasa seca (Dry cell weight, DCW) además de 4 g/L de ectoína en el medio líquido.

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de aprovechamiento de grano de cereal licuefactado para la obtención de ectoína y polihidroxialcanoatos (PHA), caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a. centrifugar el grano de cereal licuefactado;
 - 5 b. someter el sobrenadante obtenido, mosto de cereal, a un proceso de fermentación y sacarificación simultáneas en un reactor;
 - c. centrifugar el mosto fermentado en la etapa anterior y separar la biomasa bacteriana, que contiene el PHA, del sobrenadante que contiene la ectoína;
 - d. someter la biomasa bacteriana a un procedimiento de extracción y purificación del PHA; y
 - 10 e. concentrar el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del mosto fermentado utilizando evaporación a presión reducida y purificar la ectoína.
2. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque el proceso de sacarificación y fermentación simultánea del mosto de cereal comprende:
 - a. llenado progresivo del reactor; y
 - 15 b. operación del reactor en modo discontinuo, también denominado modo batch.
3. El procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque el llenado progresivo del reactor comprende las etapas de:
 - a. adición de enzima glucoamilasa, desde el inicio del llenado del reactor hasta alcanzar su llenado completo;
 - 20 b. adición del inóculo; y
 - c. adición del medio de fermentación en continuo, que comprende el mosto de cereal, sales y glutamato sódico.
4. El procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque las sales del medio de fermentación comprenden NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NH_4Cl y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- 25 5. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de fermentación del proceso de sacarificación y fermentación simultánea es realizada utilizando una bacteria halófila.
6. El procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque el mosto de cereal se somete a un proceso de esterilización.
- 30 7. El procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la esterilización del mosto se lleva a cabo dentro del reactor a una temperatura preferente de 115°C.
8. El procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la esterilización del mosto tiene una duración preferente de 20 minutos.
9. El procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque el proceso de sacarificación y fermentación simultánea se lleva a cabo a un pH preferente de 7,5.
- 35 10. El procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque se suministra aire al reactor.
11. El procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado porque el suministro de aire se produce a través de un filtro estéril.
12. El procedimiento según las reivindicaciones 10 y 11, caracterizado porque el caudal de aire suministrado está en el rango de 0,5 a 2,5 L aire/(L medio·min).
- 40 13. El procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la enzima glucoamilasa se añade en continuo en el reactor manteniendo su concentración final en el rango 0,15 – 1,5 g/L.

14. El procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque el inóculo se prepara en un medio de propagación compuesto por 50% (v/v) de mosto de cereal y 50% (v/v) de agua con las sales, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NH_4Cl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Tris, glutamato sódico y la enzima glucoamilasa.
- 5 15. El procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el inóculo se añade en una proporción del 10% (v/v) con respecto al volumen final del reactor.
16. El procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque el inóculo tiene una densidad óptica comprendida en el rango 2,8 a 3.
17. El procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque la adición del inóculo se realiza en las dos horas y media y las tres horas y media de operación del reactor.
- 10 18. El procedimiento, según la reivindicación 17, caracterizado porque la adición del inóculo se realiza preferentemente en la tercera hora de operación del reactor.
19. El procedimiento, según la reivindicación 3 caracterizado porque la adición del resto del medio de fermentación se realiza en las cuatro horas y media y las cinco horas y media de operación del reactor.
- 15 20. El procedimiento, según la reivindicación 19 caracterizado porque la adición del resto del medio de fermentación se realiza preferentemente en la quinta hora de operación del reactor.
21. El procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque la adición de la enzima, del inóculo y del medio de fermentación finaliza entre las 13 horas y media y las 14 horas y media de operación del reactor.
- 20 22. El procedimiento, según la reivindicación 21, caracterizado porque la adición de la enzima, del inóculo y del resto del medio de fermentación finaliza preferentemente a las 14 horas de operación del reactor.
23. El procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque el reactor opera en modo discontinuo hasta la hora 72 de operación del reactor.
24. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de extracción y purificación del PHA comprende:
 - 25 a. separar por centrifugación la biomasa bacteriana;
 - b. liofilizar la biomasa resultante de la centrifugación;
 - c. homogenizar el sólido resultante de la etapa anterior mediante agitación mecánica;
 - d. someter la suspensión homogéneas de biomasa con una carga de sólidos a un proceso de digestión ácida usando una solución de H_2SO_4 ;
 - 30 e. ajustar el pH de la solución obtenida en la etapa anterior a 10 utilizando una solución de NaOH 0,5N;
 - f. lavar el sólido con agua; y
 - g. aplicar un blanqueo con hipoclorito sódico para remover la proteína residual y obtener el PHA.
- 35 25. El procedimiento, según la reivindicación 24, caracterizado porque la disolución de H_2SO_4 utilizada en la etapa de suspensión homogénea tiene una concentración del 3.5%.
26. El procedimiento, según la reivindicación 24, caracterizado porque la etapa de digestión ácida se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el rango 70°C a 90°C, preferentemente a 80°C.
27. El procedimiento, según la reivindicación 24, caracterizado porque el proceso de digestión ácida tiene una duración comprendida en el rango 5 a 7 horas, con una duración preferente de 6 horas.
- 40 28. El procedimiento, según la reivindicación 24, caracterizado porque el proceso de digestión ácida se lleva a cabo con una carga de sólido de 5% (p/v).
29. El procedimiento, según la reivindicación 24, caracterizado porque el hipoclorito sódico utilizado en la etapa de blanqueo tiene una concentración del 3% p/v.

30. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de recuperación y purificación de ectoína comprende:
- a. concentrar el sobrenadante obtenido tras la centrifugación del mosto fermentado utilizando evaporación a presión reducida;
 - 5 b. eliminar las sales y el glutamato mediante lavado con etanol;
 - c. cristalizar el líquido concentrado resultante de la etapa anterior;
 - d. separar los cristales de ectoína por filtración;
 - e. lavar con etanol los cristales de ectoína formados; y
 - f. cristalizar el líquido resultante para obtener ectoína purificada
- 10 31. Polihidroxicanoatos, PHA, obtenidos mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 29.
32. Ectoína obtenida mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 30.
33. Biorrefinería que incorpora el procedimiento según las reivindicaciones a 1 a 30.

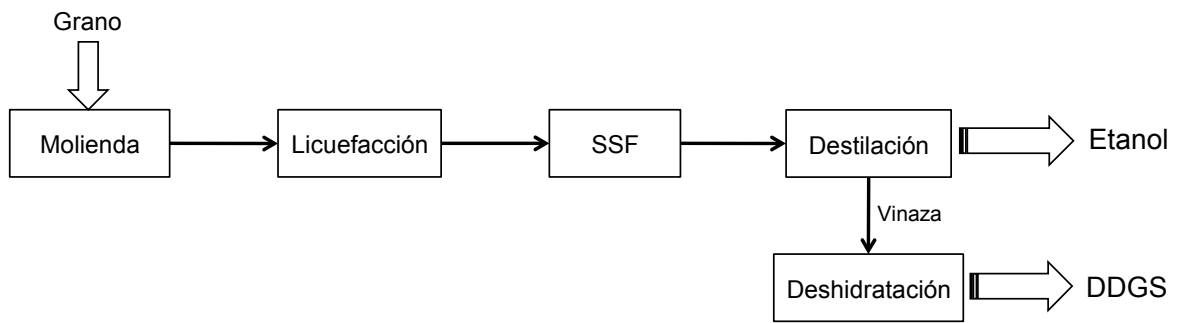


FIGURA 1

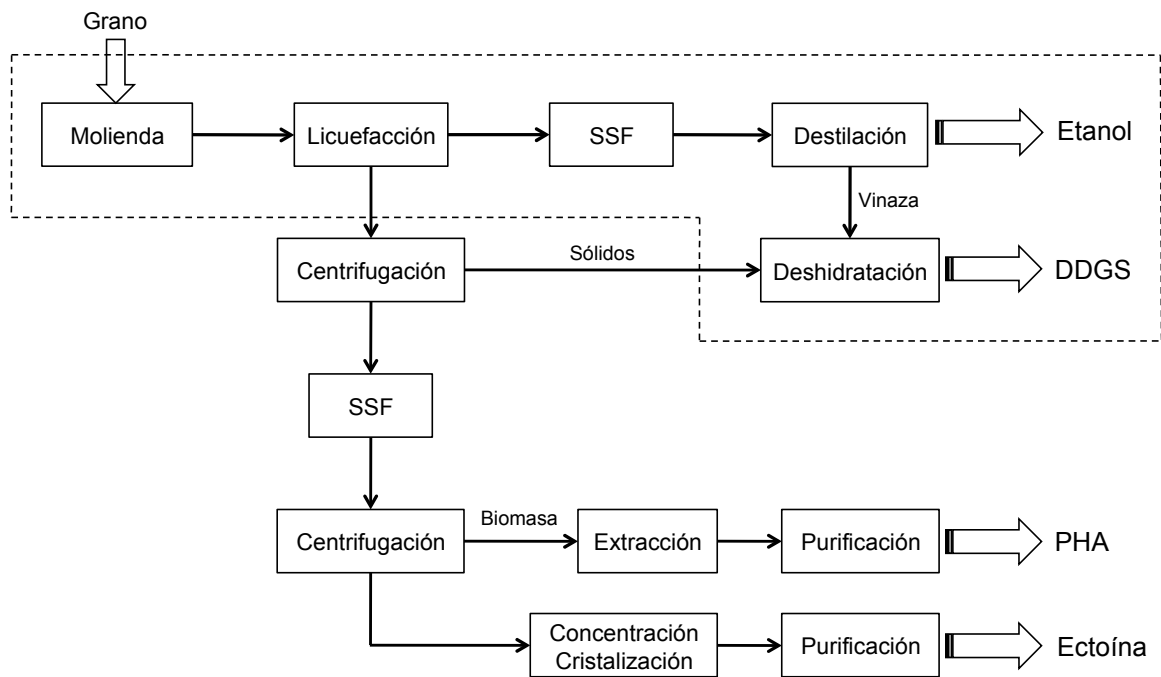


FIGURA 2

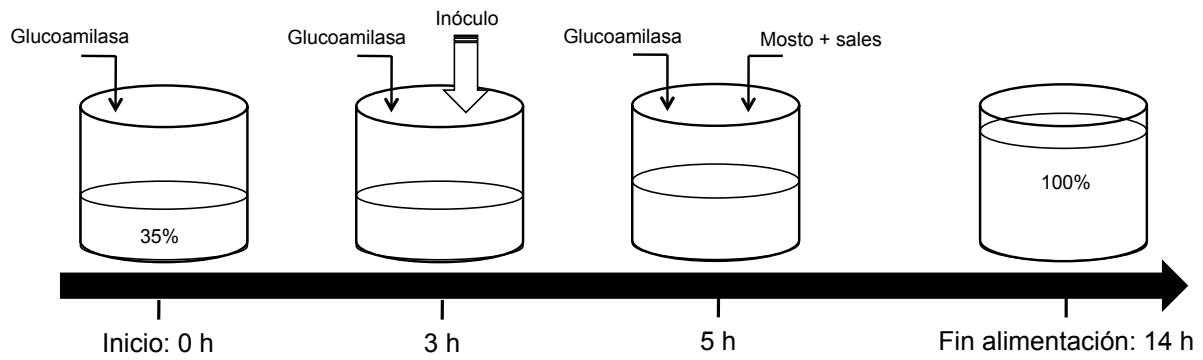


FIGURA 3

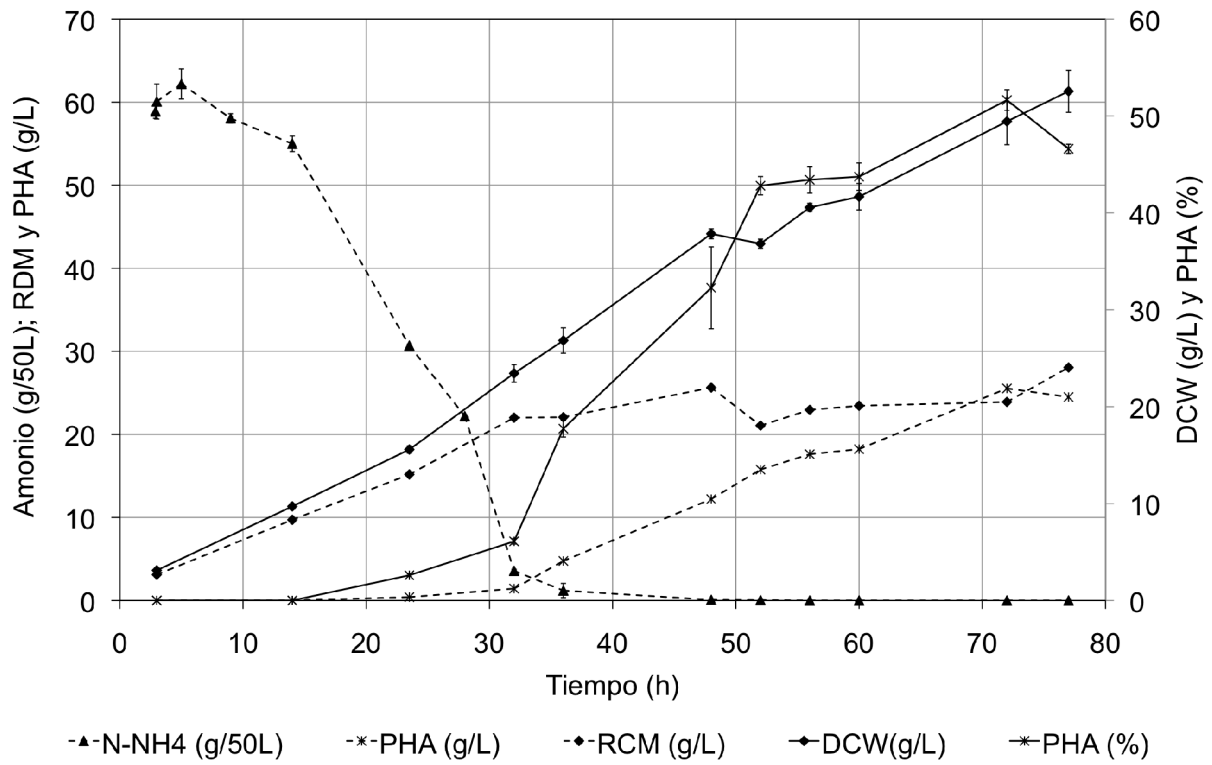


FIGURA 4



- ②① N.º solicitud: 201531498
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2015
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOAN VAN T: "Production of poly(3-hydroxybutyrate) and ectoines using a halophilic bacterium" (Doctoral Thesis 2009) en Lund University Publications [online] (17.11.2009). [Recuperado el 22.02.2016]. Recuperado de Internet: https://lup.lub.lu.se/search/publication/1503880	1-33
A	MOTHES G et al.: "Biotechnological Coproduction of Compatible Solutes and Polyhydroxyalkanoates using the Genus <i>Halomonas</i> ". Engineering in Life Sciences DIC 2008 (12.2008) VOL: 8 No: 6 Págs: 658-662 ISSN 1618-0240(print) ISSN 1618-2863(electronic) Doi: doi:10.1002/elsc.200800097.	1-33
A	RIVERA-TERCEROS P et al: "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by <i>Halomonas boliviensis</i> in an air-lift reactor", Journal of Biological Research-Thessaloniki (03.08.2015), vol. 22 (8), DOI 10.1186/s40709-015-0031-6.	1-33
A	YIN JIN et al.: "Halophiles, coming stars for industrial Biotechnology". Biotechnology Advances NOV 15 2015 (11.2015) VOL: 33 No: 7, Sp. Iss. SI Págs: 1433-1442 ISSN 0734-9750(print) ISSN 1873-1899(electronic) Doi: doi:10.1016/j.biotechadv.2014.10.008.	1-33
A	DOAN VAN T "High productivity of ectoines by <i>Halomonas boliviensis</i> using a combined two-step fed-batch culture and milking process", Journal of Biotechnology (2010), Vol. 147, pp.: 46-51, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.03.003.	1-33
A	WO 2004046333 A2 (NOVOZYMES NORTH AMERICA INC) 03.06.2004, todo el documento.	1-33
A	DE 102008045237 A1 (HELMHOLTZ ZENT UMWELTFORSCHUNG) 04.03.2010, todo el documento.	1-33

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
24.02.2016

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P17/12 (2006.01)**C12P7/62** (2006.01)**C12P7/10** (2006.01)

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

C12P

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO

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	DOAN VAN T: "Production of poly(3-hydroxybutyrate) and ectoines using a halophilic bacterium" (Doctoral Thesis 2009) en Lund University Publications [online] (17.11.2009). [Recuperado el 22.02.2016]. Recuperado de Internet: https://lup.lub.lu.se/search/publication/1503880	
D02	MOTHES G et al. Biotechnological Coproduction of Compatible Solutes and Polyhydroxyalkanoates using the Genus <i>Halomonas</i> . Engineering in Life Sciences DIC 2008 (12.2008) VOL: 8 No: 6 Págs: 658-662 ISSN 1618-0240(print) ISSN 1618-2863(electronic) Doi: doi:10.1002/elsc.200800097.	30.11.2008
D03	RIVERA-TERCEROS P et al: "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by <i>Halomonas boliviensis</i> in an air-lift reactor", Journal of Biological Research-Thessaloniki (03.08.2015), vol. 22 (8), DOI 10.1186/s40709-015-0031-6.	
D04	YIN JIN et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. Biotechnology Advances NOV 15 2015 00.11.2015 VOL: 33 No: 7, Sp. Iss. SI Págs: 1433-1442 ISSN 0734-9750(print) ISSN 1873-1899 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.biotechadv.2014.10.008	31.10.2015
D05	DOAN VAN T "High productivity of ectoines by <i>Halomonas boliviensis</i> using a combined two-step fed-batch culture and milking process", Journal of Biotechnology (2010), Vol. 147, pp.: 46-51, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.03.003	
D06	WO 2004046333 A2 (NOVOZYMES NORTH AMERICA INC)	03.06.2004
D07	DE 102008045237 A1 (HELMHOLTZ ZENT UMWELTFORSCHUNG)	04.03.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento para la obtención de ectoína y polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de grano de cereal licuefactado. Aunque en la descripción se explica que este procedimiento estaría integrado dentro de un proceso de obtención de bioetanol, lo que permitiría reducir costes, sorprendentemente esta característica no se reivindica en la solicitud.

La solicitud reivindica, además de este procedimiento, los productos obtenidos (ectoína y PHA) mediante la realización del mismo, así como una biorrefinería que incorpore dicho procedimiento.

Los PHA tienen una gran importancia económica en la fabricación de plásticos. La ectoína, por otro lado, es una molécula con importancia en el campo de la cosmética, como estabilizadora de proteínas y otros componentes celulares frente a radiaciones UV y sequedad.

La clave del procedimiento está en la sacarificación (hidrólisis de los azúcares) y la fermentación simultáneas del sustrato (SSF). La sacarificación se lleva a cabo mediante la adición de una glucoamilasa. La halobacteria que se utiliza para llevar a cabo la fermentación y posterior producción de ectoína y PHA no puede alimentarse bien de los azúcares no hidrolizados del grano de cereal. Requiere su previa hidrólisis (sacarificación). A medida que la glucoamilasa va degradando los azúcares complejos en otros más sencillos, la halobacteria va llevando a cabo la fermentación de forma simultánea.

Una vez finalizada esta etapa simultánea, los medios de cultivo se someten a centrifugación y se extraen posteriormente PHA y ectoína del sedimento y del sobrenadante respectivamente.

D01-D07 representan el estado de la técnica anterior. De dicho estado de la técnica se conoce la obtención de PHA a partir de fuentes de carbono utilizando halobacterias (D03 y D04), la de ectoína (D04 y D05), o la de ambos productos (D01, D02 y D07). Tal y como se describe en D01 y D02, también se conoce la posibilidad de utilizar residuos agrícolas como fuente de alimentación para las halobacterias en la producción de ectoína y PHA de forma que se puedan reducir los costes del procedimiento.

Por otro lado, también son conocidos los procedimientos en los que se lleva a cabo una fermentación de forma simultánea a una sacarificación (D06).

Sin embargo no se ha encontrado documento alguno que muestre la existencia de una etapa de fermentación simultánea a un proceso de sacarificación en un procedimiento de obtención de ectoína y PHA como el reivindicado en la solicitud. Además, se considera que un experto en la materia no llegaría de forma obvia a idear esta etapa a partir de lo ya conocido del estado de la técnica anterior.

Por todo ello, se estima que las reivindicaciones 1-33 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986, y de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.