

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 224**

21 Número de solicitud: 201600182

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.03.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.09.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)

Campus Universitario s/n

36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

PÉREZ RODRIGUEZ , Noelia ;

DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, José Manuel y

TORRADO AGRASAR , Ana María

54 Título: **Procedimiento para la producción biotecnológica de enzimas empleando podas de vid como sustrato**

57 Resumen:

Se refiere a un procedimiento para la producción biotecnológica de un extracto de enzimas fúngicas lignocelulolíticas empleando podas de vid como sustrato microbiano. Inicialmente, las podas de vid son sometidas a una etapa de acondicionamiento y pretratamiento del sustrato (podas de vid). El acondicionamiento comprende a su vez, una etapa inicial de secado hasta alcanzar un porcentaje de materia seca comprendido en el rango 85-95% y, una etapa posterior de molienda para reducir el tamaño de partícula a un rango comprendido entre 2 mm-1 cm; mientras que la etapa de pretratamiento consiste en humectar el sustrato empleando una disolución de nutrientes y sales, y posterior esterilización por vapor. Posteriormente, se inicia la fermentación en estado sólido para la obtención de enzimas mediante la inoculación del sustrato en condiciones de esterilidad con una cepa del genero *Aspergillus*. Finalmente, se procede a la obtención del extracto enzimático mediante una extracción sólido-líquido.

ES 2 632 224 A1

DESCRIPCIÓN**PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ENZIMAS
EMPLEANDO PODAS DE VID COMO SUSTRATO**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción biotecnológica de un extracto de enzimas fúngicas lignocelulolíticas empleando podas de vid como sustrato microbiano. Esta invención encuentra aplicación en el ámbito de la biotecnología blanca valorizando las podas de vid, un subproducto del sector vitivinícola, y obteniendo enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas, feruloil esterases o celobiasas) con implicación en procesos relacionados con la alimentación humana y animal, con la producción de bioenergía y con las industrias papelera, textil o farmacéutica entre otras.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En medio de las crecientes preocupaciones ambientales, que se han convertido en prioridad dentro de la agenda política internacional, la biomasa residual ha recibido una atención considerable como sustrato para la producción de enzimas (Iqbal et al., 2013). Las enzimas siempre han jugado un papel sustancial en la producción de una gran variedad de productos comerciales, estimándose el mercado mundial de enzimas industriales en 3,3 mil millones de dólares en 2010 (Liguori, R. et al., 2013, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 6129–6147). Entre ellas, las enzimas lignocelulolíticas con actividad hidrolasa como feruloil esterases, celulasas, xilanasas o celobiasas se han aplicado con éxito en diversos sectores industriales siendo incorporadas a multitud de procesos. Así, por ejemplo, en la industria energética las enzimas lignocelulósicas son esenciales para la producción de bioetanol (Girio, F.M., et al., 2010, *Bioresour. Technol.* 101: 4775–4800), en la industria textil para el ablandamiento de algodón, el acabado denim o dotar de brillo a los colores de las telas (Polaina, J., et al., 2007, *Industrial enzymes: Structure, Function and Applications*, Springer, Dordrecht, The Netherlands; Thomas, L., et al., 2013, *Biochem. Eng. J.* 81, 146–161), en la industria papelera se emplean durante el blanqueamiento y pulido de la pasta de papel (Juturu, V. et al., 2012,

Biotechnol. Adv. 30: 1219–1227; Topakas, E. et al., 2007, *Process Biochem.* 42: 497–509) y mejoran la eficacia de detergentes (Thomas, L. et al., 2013, *Biochem. Eng. J.* 81: 146–161). En la industria alimentaria estas enzimas encuentran cabida en diversos procesos como la obtención de azúcares, xilooligosacáridos, almidón, se emplean en la elaboración de la masa de panadería y pastelería, en la eliminación de glúten, en la extracción, clarificación y estabilización de zumos, aceites, cerveza o vino y en la extracción de compuestos aromáticos o precursores de aromas (Harris, A.D. et al., 2010, *J. Exp. Sci.* 1: 1–11; Topakas, E. et al., 2007, *Process Biochem.* 42: 497–509). Además, dentro de la alimentación animal han demostrado su validez al incrementar la digestibilidad y aprovechamiento energético del forraje (Harris, A.D. et al., 2010, *Exp. Sci.* 1: 1–11; Topakas, E. et al., 2007, *Process Biochem.* 42: 497–509).

No obstante, el coste enzimático es el principal problema para hacer rentables ciertos procesos industriales en los que las enzimas tienen o podrían tener una presencia significativa. La evaluación de medios económicos de producción de enzimas supondría hacer más asequible el empleo industrial de las mismas. Para la consecución de este propósito, la utilización de subproductos generados en algún punto de la cadena de procesado agroalimentario como fuente de nutrientes para el desarrollo de microorganismos productores de enzimas supone una buena opción, al tiempo que se transforma un residuo en un recurso, es decir, se convierte en nueva materia prima.

Un espectro diverso de microorganismos productores de enzimas lignocelulolíticas, principalmente hongos (Robl, D. et al., 2013, *BMC Biotechnol.* 13(94)) o bacterias (Woo, H.L. et al., 2014, *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 60–67) han sido explotados durante los últimos años para la obtención biotecnológica de enzimas. Los hongos presentan aptitudes adquiridas evolutivamente para ser eficaces degradadores de los materiales lignocelulósicos destacando los miembros de la especie *Aspergillus* empleados en fermentaciones en estado sólido (Bansal, N. et al., 2014, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172: 141–156; Buenrostro-Figueroa, J. et al., 2013, *Food Bioprod. Process.* 1–7; Facchini, F.D.A. et al., 2011, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34: 347–355; Kumar, C.G. et al., 2013, *Biotechnol. Prog.* 29: 5130–5133; Moreira, L.R.D.S. et al., 2013, *Fungal Genet. Biol.* 60, 46–52). La técnica de fermentación en estado sólido (FES) que implica el empleo de sólidos sin o prácticamente en ausencia de agua libre, es una tecnología consolidada empleada desde la antigüedad (Lonsane, B.K., et al., 1985, *Enzyme Microb. Technol.* 7: 258–265) que ha demostrado poseer ciertas características propicias para

la producción de enzimas fúngicas (Viniegra-González, G. et al., 2003, *Biochem. Eng. J.* 13: 157–167). La FES permite un contacto más próximo entre la matriz del residuo agroindustrial y los microorganismos y, en especial, favorece los procesos de intercambio gaseoso, lo cual supone una ventaja para el desarrollo de hongos aerobios y crecimiento miceliar (Barrios-González, J., 2012, *Process Biochem.* 47: 175–185). Se caracteriza por un bajo consumo de energía, una alta productividad volumétrica, una menor generación de residuos, y una baja represión catabólica (Pandey, A., 2003, *Biochem. Eng. J.* 13: 81–84). Todo ello hace de la FES una técnica especialmente apta para ser aplicada en la obtención de enzimas fúngicas a partir de los residuos agroalimentarios lignocelulósicos.

Dentro del amplio abanico de industrias agroalimentarias, el sector vitivinícola tiene un peso considerable en España abarcando en torno a un millón de hectáreas de cultivo y ocupando el cuarto puesto del ranking mundial de productores. La poda es una práctica esencial en el cultivo de la vid y, consecuentemente, las podas de vid constituyen un recurso natural cercano, abundante, barato y renovable. Además, la utilización de las podas de vid, presenta la ventaja en comparación con otros residuos agrícolas, de no suponer un dilema ético ya que no existe competencia entre la biomasa para la producción de alimentos y para fines no alimentarios. Sin embargo, en la actualidad no se realiza una óptima utilización ni se saca el potencial que presenta este material puesto que la mayor parte se quema en la propia explotación tras ser retirado del campo y, en mucha menor proporción, se utiliza como biomasa para combustión.

La bioproducción de enzimas ha sido ampliamente estudiada incluso empleando como sustrato diversos materiales lignocelulósicos procedentes de cultivos agrícolas (Howard, R.L. et al., 2003, *African J. Biotechnol.* 2: 602–619) pero nunca antes habían sido evaluadas las podas de vid con este propósito. El empleo de las podas de vid en la obtención de productos con valor añadido, como las enzimas, mediante tecnologías verdes conlleva una buena alternativa económica y medioambiental para este residuo y la inmersión de la industria vitivinícola en la economía circular mediante la aplicación del principio de “cero residuos”.

Por todo lo expuesto, la producción de enzimas con actividad lignocelulósica a partir de la fermentación de las podas de vid, se postula como una alternativa novedosa y limpia de valorización de este subproducto agrícola.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento que implica la producción biotecnológica de enzimas fúngicas mediante el empleo de las podas de vid como sustrato para el crecimiento de hongos productores de proteínas con actividad hidrolasa (feruloil esterases, xilanasas, celulasas, celobiasas) entre otras posibles, dando lugar a extractos enzimáticos naturales con potencial aplicabilidad en la hidrólisis enzimática de materiales de naturaleza lignocelulósica para la obtención de disoluciones, de hidratos de carbono, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, o para aplicaciones tecnológicas.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción biotecnológica de enzimas empleando como sustrato para el desarrollo de hongos productores las podas de vid que comprende las siguientes etapas:

- a) Acondicionamiento del sustrato (podas de vid) que comprende una etapa inicial de secado para homogeneizar el grado de humedad del sustrato y etapa posterior de molienda y tamizado para reducir el tamaño de partícula;
- b) Pretratamiento del sustrato mediante humectación empleando una disolución de nutrientes y sales, y posterior esterilización por vapor del sustrato humedecido;
- c) Inoculación del sustrato en condiciones de esterilidad con cepas del género *Aspergillus* previamente crecidas en condiciones adecuadas para la esporulación;
- d) Producción de enzimas mediante fermentación en estado sólido;
- e) Obtención de un extracto enzimático mediante extracción sólido-líquido.

El acondicionamiento permite reducir el tamaño de partícula de las podas de vid e incrementar así la superficie específica del sólido con la finalidad de facilitar la accesibilidad del hongo al sustrato, la disponibilidad de los nutrientes aportados por las podas de vid, la disminución de la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa mejorando la digestibilidad de las podas de vid, y, consecuentemente, aumentando la síntesis enzimática. En una realización preferida la etapa de acondicionamiento comprende una etapa de secado y molienda. En una realización particular las podas de vid deben ser desecadas a temperatura ambiente hasta alcanzar un porcentaje de materia seca estable comprendido entre el 85-95 %. A continuación de la etapa de secado, las podas de vid se pretratan físicamente mediante molienda con la finalidad de

conseguir la reducción de partícula a un tamaño comprendido entre 2 mm-1 cm con el fin de aumentar la superficie de contacto entre microorganismo y las podas de vid sin los inconvenientes debidos a la aglomeración del sustrato. Las podas de vid no demuestran una gran resistencia al corte lo que facilita el molido y la obtención de un
 5 producto con un grado elevado de homogeneidad.

En otra realización preferida la etapa de pretratamiento, el sustrato se humedece con una disolución acuosa de nutrientes y sales con el fin de proporcionar el nivel de humedad y los nutrientes no presentes en las podas de vid necesarios para un buen
 10 desarrollo del microorganismo. Se adicionará a las podas de vid un volumen no inferior a 2,6 mL de disolución acuosa de nutrientes y sales por gramo de sustrato seco.

Los componentes de la disolución podrán variarse en función del microorganismo empleado pero en cualquier caso deberán contener siempre una fuente orgánica de
 15 nitrógeno fácilmente asimilable como extracto de levadura en una concentración no inferior a 3 g/L, y una combinación de sales inorgánicas conteniendo N nítrico y amónico en una proporción relativa comprendida entre 3:1 y 1:1 (expresada como N-NO₃:N-NH₄) y en un intervalo de concentración de N inorgánico total comprendido entre 0,9-1,2 g/L con el fin de amortiguar la acidificación del sistema.

20 El sustrato molido y humedecido se somete a un tratamiento de esterilización por vapor en autoclave a 100 °C durante 60 minutos. A continuación, el sustrato se enfría por debajo de 35 °C.

25 En otra realización preferente la etapa de producción de enzimas mediante fermentación en estado sólido, el sustrato se inocula con las esporas fúngicas de alguna especie del género *Aspergillus* capaz de desarrollarse sobre sustratos de naturaleza lignocelulósica. En una realización más preferida se utilizan esporas de *Aspergillus terreus* CECT 2808, *Aspergillus niger* CECT 2700, *Aspergillus niger* CECT 2088 y *Aspergillus niger* CECT
 30 2915.

El sustrato se inocula en condiciones de esterilidad con 1 mL por gramo de sustrato seco de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL, preparada en la disolución de humectación.

35

La incubación del cultivo se lleva a cabo en biorreactores para cultivo en estado sólido. Los cultivos se incuban a temperaturas comprendido en el rango 25-35°C en atmósfera saturada de humedad durante un tiempo comprendido en el rango 3-12 días.

- 5 En el caso de una evaporación excesiva que conlleve un grado de humedad del sustrato inferior al 65%, se repondrá la cantidad necesaria de agua destilada estéril necesaria para alcanzar un porcentaje de humedad comprendido en el rango 65-75 %.

- 10 En otra realización particular la obtención de un extracto enzimático mediante extracción sólido-líquido comprende una primera etapa una extracción en agua destilada que consiste en añadir agua destilada (10 mL/g sustrato seco) al cultivo y la mezcla se incuba durante 1 hora a una temperatura comprendida en el rango 20-30 °C con una agitación comprendida en el rango 100-250 rpm. A continuación, el contenido se filtra a vacío y a continuación se centrifuga el permeado a una temperatura inferior a 15 °C y se recoge
15 el sobrenadante que se corresponde con el extracto enzimático que podrá ser aplicado directamente para la hidrólisis enzimática de las propias podas de vid o en sustratos de naturaleza análoga. Por último, los extractos enzimáticos crudos se concentrarán hasta un volumen no superior a 1/5 su volumen inicial mediante operaciones de ultrafiltración, liofilización y/o diálisis (Deutscher, 1988) de manera que se mantenga su carácter
20 "verde".

- El preparado enzimático producido a partir de podas de vid según se ha descrito, y caracterizado por un perfil particular de enzimas con actividades de feruloil esterasa, xilanasas, celulasas y celobiasas con utilidad en diversos procesos de hidrólisis de
25 sustratos de naturaleza lignocelulósica podría presentar potenciales ventajas frente a preparados enzimáticos obtenidos a partir de otros sustratos lignocelulósicos derivadas de una mayor adecuación del conjunto del perfil de enzimas que lo componen a la composición y estructura del sustrato lignocelulósico a hidrolizar.

- 30 La obtención de enzimas de este modo es medioambientalmente respetuosa, económica al no requerir de procesos de separación ni purificación de enzimas, se saca provecho de las posibles sinergias existentes entre las diferentes enzimas lignocelulolíticas producidas y presenta la ventaja comercial de poder designar a los extractos enzimáticos con el calificativo de natural.

35

Tras haber sintetizado las enzimas a partir de las podas de vid tal y como se ha descrito, resta sustrato sólido que no presenta tóxicos, pudiendo continuar su valorización sin necesidad de ningún proceso de detoxificación.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para facilitar la comprensión de la invención, se anexan las siguientes figuras representativas:

10 **Figura 1.** Influencia de la aireación del medio de fermentación (poda de vid) sobre la producción por parte de *Aspergillus terreus* CECT 2808 de enzimas con actividades xilanasa.

15 **Figura 2.** Influencia de la aireación del medio de fermentación (poda de vid) sobre la producción por parte de *Aspergillus terreus* CECT 2808 de enzimas con actividades feruloil esterasa.

20 **Figura 3.** Azúcares reductores liberados de la matriz lignocelulósica de las podas de vid (---) o del carozo de maíz (—) como consecuencia de la acción de las enzimas presentes en el extracto enzimático obtenido a partir de podas de vid (•), del producido sobre carozo de maíz (♦) o del cóctel enzimático comercial Ultraflo® L (*).

25 **Figura 4.** Ácido ferúlico liberado durante la hidrólisis enzimática de podas de vid (sarmiento) (---) y de carozo de maíz (—) por acción de extracto enzimático obtenido por fermentación de podas de vid (•), de carozo de maíz (♦) o actuación de la preparación comercial Ultraflo® L (*).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

30 A continuación se expone de manera detallada mediante dos ejemplos (Ejemplo 1 y Ejemplo 2) dos modos posibles de realización del procedimiento descrito para la producción biotecnológica de enzimas empleando podas de vid.

35 Finalmente, se indica a través de un tercer ejemplo (Ejemplo 3) en el que la mezcla de

enzimas producida por el procedimiento descrito es susceptible de aplicación en la hidrólisis de diferentes materiales lignocelulósicos.

Ejemplo 1: Producción de extractos enzimáticos en matraz Erlenmeyer

- 5 En este primer ejemplo se muestra el resultado de la producción biotecnológica de enzimas en matraz Erlenmeyer empleando como sustrato de la fermentación en estado sólido podas de vid sometidas a un proceso de secado hasta alcanzar un porcentaje de materia seca comprendido en un rango 85-95 % y sometidas a molienda hasta alcanzar un tamaño de partícula comprendido en un rango 2 mm-1 cm, cuya composición se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de las fracciones lignocelulósicas de las podas de vid empleadas como sustrato.

	Composición
Celulosa (%)	46,22 ± 2,04
Hemicelulosa (%)	20,51 ± 2,12
Lignina (%)	16,21 ± 0,23
Compuestos solubles (%)	17,06 ± 0,15

15

- Se introdujeron 5 g de podas de vid acondicionadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se humectaron en una proporción 1:3,6 (p/v) con una disolución de nutrientes y sales consistente en 1,3 g/L (NH₄)₂SO₄; 5 g/L NaNO₃; 4,5 g/L KH₂PO₄ y 3 g/L extracto de levadura.

20

- Se seleccionaron cuatro cepas fúngicas recogidas en la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) para ser empleadas en el presente ejemplo: *Aspergillus terreus* CECT 2808, *Aspergillus niger* CECT 2700, *Aspergillus niger* CECT 2088 y *Aspergillus niger* CECT 2915.

25

- Tras la esterilización en autoclave (100 °C-60 min), las podas de vid se inocularon con 1 mL por gramo de sustrato seco de una suspensión de 1×10⁶ esporas/mL, preparadas en la disolución de humectación, con las diferentes cepas de estudio. Las fermentaciones se desarrollaron a 30 °C, en atmósfera saturada de humedad y en estático durante 7 días. Los resultados de tal proceder se muestran en la Tabla 2:

30

Tabla 2. Actividades de las enzimas hidrolasas presentes en los extractos producidos por las cepas *Aspergillus terreus* CECT 2808 (AT 2808), *Aspergillus niger* CECT 2700 (AN 2700), *Aspergillus niger* CECT 2088 (AN 2088) y *Aspergillus niger* CECT 2915 (AN 2915).

	AT 2808	AN 2700	AN 2088	AN 2915
Xilanasa (U/g)	95,42 ± 2,17	332,74 ± 6,96	123,68 ± 2,29	137,95 ± 2,13
Celobiasa (U/g)	51,78 ± 0,69	67,58 ± 2,21	68,15 ± 1,25	66,74 ± 1,23
Celulasa (U/g)	0,46 ± 0,07	0,53 ± 0,07	0,55 ± 0,01	0,89 ± 0,06
Feruloil esterasa (U/g)	0,31 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,01 ± 0,00

Las actividades enzimáticas determinadas en cada uno de los extractos obtenidos tras la fermentación de las podas de vid por las cuatro cepas fúngicas reflejan la aptitud de las podas de vid como fuente principal de nutrientes y soporte para el desarrollo de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas (xilanasas, celobiasas, celulasas o feruloil esterasas).

Ejemplo 2: Producción de extractos enzimáticos en biorreactor tubular horizontal aireado

Las podas de vid sometidas a un proceso de secado hasta alcanzar un porcentaje de materia seca comprendido en un rango 85-95 % y sometidas a molienda hasta alcanzar un tamaño de partícula comprendido en un rango 2 mm-1 cm fueron depositadas (20 g) en el interior de un biorreactor tubular horizontal de vidrio (29 cm longitud y 3 cm diámetro) de tal forma que cubrió la mitad del volumen interno de la columna, aumentando así el área superficial en contacto con el aire. El sustrato fue humedecido con una solución basal (1,3 g/L (NH₄)₂SO₄; 5g/L NaNO₃; 4,5 g/L KH₂PO₄; 3 g/L extracto de levadura) empleando una relación inicial de 1:3,6 (p/v).

El sustrato humectado fue esterilizado en el interior del biorreactor tubular horizontal a 100°C durante 1h en autoclave. Tras su enfriamiento hasta alcanzar temperatura ambiente, las podas de vid estéril fueron inoculadas con 1 mL de una suspensión de esporas de *Aspergillus terreus* CECT 2808 preparada en una concentración suficiente como para proveer 1x10⁶ esporas/g de sustrato seco.

Las fermentaciones se llevaron a cabo manteniendo una temperatura estable de 30 °C mediante la termostatización del biorreactor por circulación de agua caliente a través de su camisa. Las fermentaciones fueron desarrolladas suministrando aireación al medio.

Los diferentes flujos de aireación estudiados fueron de 0; 0,4; 0,55; 0,7; 0,85 y 1 L/min. El aire introducido en el biorreactor se saturó de humedad mediante el burbujeo del mismo en agua estéril y fue conducido al interior haciéndose pasar a través de filtros de 0,2 μm de poro. La salida de aire del biorreactor fue conectada a una botella con 5N NaOH, evitando la contaminación del medio por reflujo.

Los resultados de la influencia de la aireación en las actividades enzimáticas determinadas en el extracto producido se muestran en la Figura 1.

La aireación del sustrato en el biorreactor supuso una clara mejora en la producción de enzimas con actividad xilanasa puesto que se incrementó desde 3,54 U/g en el medio sin entrada de flujo de aire a 53,80 U/g con un flujo de aire de 0,85 L/min, es decir, unas quince veces mayor. No obstante, en relación con la actividad xilanásica presente en el extracto obtenido en el Ejemplo 1 en matraz, la aireación supuso un detrimento en la producción.

Respecto a la actividad feruloil esterasa fue fomentada al airearse el biorreactor pasando de obtenerse resultados de 0,01 U/g en el medio sin airear a un máximo de 0,44 U/g con un flujo de 0,7 L/min. Contrariamente a lo acontecido con la actividad xilanasa y anteriormente comentado, en comparación con los ensayos en matraz del Ejemplo 1, el medio aireado con un flujo de 0,7 L/min también supuso un aumento en la actividad feruloil esterasa de 0,31 U/g a 0,44 U/g.

Ejemplo 3: Hidrólisis enzimática por extractos enzimáticos obtenidos por FES a partir de podas de vid

Para probar la efectividad del extracto enzimático producido por *Aspergillus terreus* CECT 2808 sobre las podas de vid obtenido en los ejemplos anteriores, éste fue aplicado para hidrolizar las podas de vid (sarmiento) y otro sustrato lignocelulósico, el carozo de maíz. Además se comparó con otro extracto enzimático, producido de igual manera salvo que en lugar de podas de vid se empleó carozo de maíz como sustrato de FES, y con un preparado enzimático comercial denominado Ultraflo® L de Novozymes (Dinamarca). En la Tabla 3 se comparan las actividades más destacadas (feruloil esterasa y xilanasa) con el extracto enzimático igualmente producido pero sobre carozo de maíz y con un preparado comercial Ultraflo® L. Se observa la influencia del empleo de las podas de vid en la composición del extracto enzimático poseyendo un

perfil enzimático característico.

Tabla 3. Valores de actividad enzimática feruloil esterasa (FAE) y xilanasa obtenidas en los extractos enzimáticos de *Aspergillus terreus* CECT 2808 mediante fermentación en estado sólido de podas de vid, carozo de maíz o en el preparado comercial Ultraflo® L expresado en unidades enzimáticas por mililitro de extracto (U/mL) y en unidades por gramo de sustrato sólido (U/g).

	FAE (U/mL)	Xilanasa (U/mL)	FAE (U/g)	Xilanasa (U/g)
Sarmiento	0.022 ± 0.00	6.97 ± 0.16	0.31 ± 0.01	95.42 ± 2.17
Carozo de maíz	0.070 ± 0.01	10.25 ± 0.55	0.97 ± 0.10	140.32 ± 7.61
Ultraflo® L	0.061 ± 0.00	1013.64 ± 14.95		

- El extracto enzimático producido en cada sustrato se aplicó sobre el mismo sustrato y sobre el otro sustrato, es decir, por ejemplo el extracto enzimático obtenido a partir de podas de vid se utilizó para la hidrólisis de podas de vid y de carozo de maíz y viceversa.

Los sustratos fueron introducidos en botellas de pírex de 250 mL con tapa roscada y autoclavados en tampón de fosfato de sodio pH 6,0 a 100 °C durante una hora. La hidrólisis enzimática se inició mediante la adición de 0,044 U de feruloil esterasa por gramo de sustrato seco, y se llevó a cabo teniendo en cuenta una relación final sólido: líquido de 1:10 (p:p), en agitación a 100 rpm, a 40 °C y en oscuridad durante 24 h. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Después de la hidrólisis enzimática, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recogido y hervido (100°C durante 10 min) para la inactivación térmica de las enzimas. Luego, se centrifugó de nuevo a 6000 rpm durante 15 min. Finalmente, el sobrenadante fue sometido a diferentes análisis, destacando la cuantificación del ácido ferúlico liberado, que se realizó con cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) como se explicó con anterioridad, y la presencia de azúcares reductores en los hidrolizados se evaluó empleando el método del ácido dinitrosalicílico descrito por Miller, G.L., 1959. *Anal. Biochem.* 31, 426–428.

Como se puede observar en los resultados mostrados en las Figura 2 y Figura 3, el extracto enzimático producido sobre las podas de vid demostró ser capaz de llevar a cabo la hidrólisis tanto del carozo de maíz como de las podas de vid. Por tanto este

material puede ser efectivamente valorizado como sustrato para la síntesis enzimática.

El extracto enzimático proveniente de la FES de podas de vid tras la hidrólisis de los sustratos ha dado lugar a disoluciones con concentraciones de azúcares reductores de entre 6-8,6 g/L y, por tanto, próximas a presentadas por los hidrolizados resultantes de la acción del extracto de carozo de maíz (5-10 g/L) y ligeramente menores a las disoluciones obtenidas como consecuencia de la aplicación de Ultraflo® L (10-16 g/L) con 100 veces mayor actividad xilanásica.

- 10 Por otro lado, el extracto de podas de vid ha sido el más efectivo en la liberación de ácido ferúlico presente en la matriz de ambos sustratos lignocelulósicos. Por consiguiente, a este respecto, la producción de enzimas empleando podas de vid da lugar a un extracto con una capacidad hidrolítica superior al que presenta el extracto obtenido a partir de carozo de maíz o al comercial Ultraflo® L.

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de extractos enzimáticos a partir de podas de vid que se caracteriza por comprender las siguientes etapas:
 - 5 f) Acondicionamiento del sustrato (podas de vid) que comprende una etapa inicial de secado para homogeneizar el grado de humedad del sustrato hasta alcanzar un porcentaje de materia seca comprendido en el rango 85-95 % y etapa posterior de molienda y tamizado para reducir el tamaño de partícula a un rango comprendido entre 2 mm-1 cm.
 - 10 g) Pretratamiento del sustrato mediante humectación empleando una disolución de nutrientes y sales, y posterior esterilización por vapor del sustrato humedecido
 - h) Inoculación del sustrato en condiciones de esterilidad con cepas del género *Aspergillus* previamente crecidas en condiciones adecuadas para la esporulación.
 - 15 i) Producción de proteínas con actividad enzimática mediante fermentación en estado sólido
 - j) Obtención de un extracto enzimático mediante extracción sólido-líquido
- 20 2. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado porque la disolución de nutrientes y sales empleada para la humectación del sustrato según la etapa b) es al menos una fuente orgánica de nitrógeno fácilmente asimilable como extracto de levadura en una concentración no inferior a 3 g/L, y una combinación
 - 25 de sales inorgánicas conteniendo N nítrico y amónico en una proporción relativa comprendida entre 3:1 y 1:1 (expresada como $N-NO_3:N-NH_4$) y en un intervalo de concentración de N inorgánico total comprendido en un rango 0,9-1,2 g/L con el fin de amortiguar la acidificación del sistema.
- 30 3. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado porque la esterilización según la etapa b) se realiza por vapor en autoclave a 100 °C durante 1 hora.
4. Procedimiento, según reivindicación 1, en el que el microorganismo productor de enzimas utilizado en la etapa c) se selecciona entre las especies *Aspergillus terreus* o *Aspergillus niger*.
- 35

5. Procedimiento, según reivindicación 4, en el que el microorganismo seleccionado se inocula en condiciones de esterilidad con 1 mL por gramo de sustrato seco de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL, preparada en la disolución de humectación.
6. Procedimiento, según reivindicaciones 1 y 4 a 5, en el que la etapa de producción según etapa d) está caracterizado por emplear biorreactores para cultivo en estado sólido.
7. Procedimiento, según reivindicaciones 1 y 4 a 6, en el que la fermentación en estado sólido según etapa d) caracterizado porque la temperatura de fermentación está comprendida en el rango 25-35 °C durante un tiempo comprendido en el rango 3-12 días.
8. Procedimiento, según reivindicaciones 4 a 7, caracterizado porque en el caso de que evaporación excesiva del sustrato alcance un grado de humedad inferior a 65% se adicionará agua destilada estéril en una cantidad necesaria para que el sustrato mantenga una humedad en el rango 65-75 %.
9. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado porque la etapa e) de obtención de un extracto enzimático mediante extracción sólido-líquido comprende las siguientes etapas:
 - a) una extracción en agua destilada (10 mL/ g sustrato seco),
 - b) la incubación de la mezcla obtenida en agitación en el rango 100- 250 rpm a temperatura en el rango 20-30 °C durante 1 h,
 - c) la mezcla obtenida se filtra a vacío,
 - d) el permeado obtenido en la etapa anterior se centrifuga a 15 °C,
 - e) el sobrenadante obtenido se concentra mediante ultrafiltración, liofilización y/o diálisis hasta un volumen no superior a 1/5 del volumen inicial.

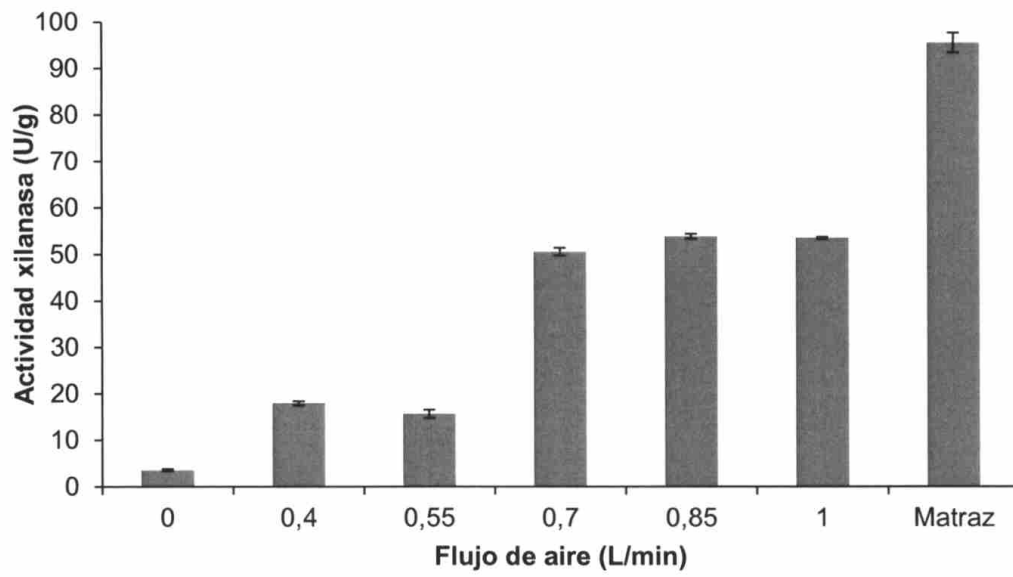


Figura 1

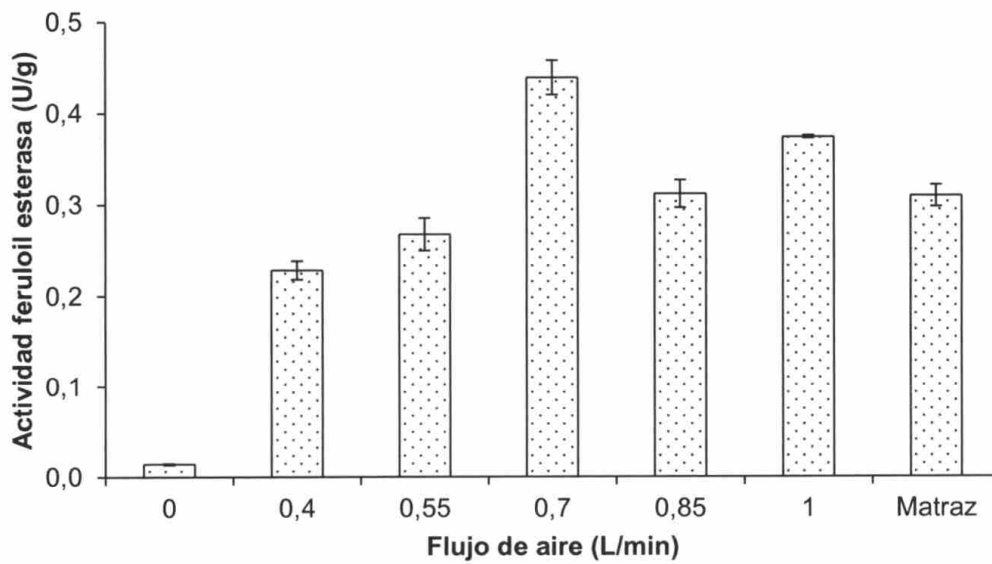


Figura 2

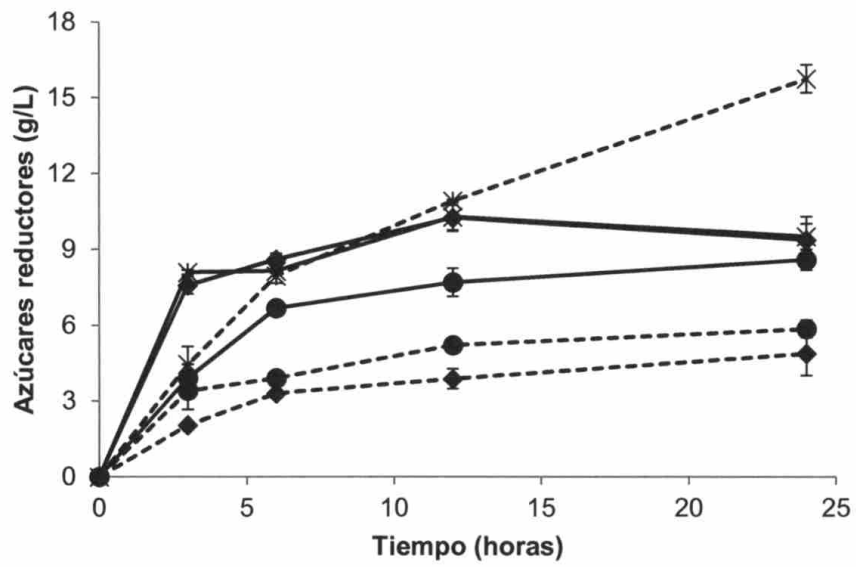


Figura 3

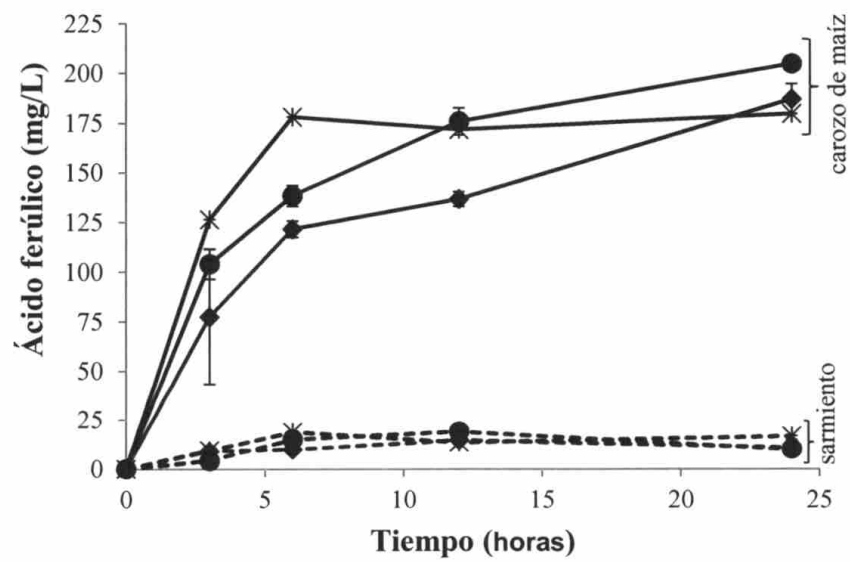


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201600182
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/14** (2006.01)
C12R1/66 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	Pérez-Rodríguez et al. Production of feruloyl esterase from vine trimming shoot and corncob.2014. In 13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering (13MCCE). http://www.ub.edu/congmedit/13MCCEabstracts.pdf	1-9
Y	Pérez-Rodríguez et al. Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor. 2014. Applied biochemistry and biotechnology, 173(3), 803-825.	1-9
A	Pérez-Rodríguez et al. Enzymatic release of ferulic acid from vine trimming shoots and corncob. 2014. In 13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering (13MCCE). http://www.ub.edu/congmedit/13MCCEabstracts.pdf	1-9

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
24.02.2017

Examinador
I. Rueda Molíns

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, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.02.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	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	Pérez-Rodríguez et al. Production of feruloyl esterase from vine trimming shoot and corncob. In 13 th Mediterranean Congress of Chemical Engineering (13MCCE).	2014
D02	Pérez-Rodríguez et al. Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor. Applied biochemistry and biotechnology, 173(3), 803-825.	2014

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**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 LP 11/86)**

Se considera que los documentos D01 y D02 son los documentos del estado de la técnica más próximos al objeto de la solicitud. Estos documentos afectan a la patentabilidad de las reivindicaciones tal y como se expondrá a continuación.

Reivindicaciones 1-9:

En el documento D01 se divulga como *Aspergillus terreus* CECT 2808 es un hongo capaz de producir proteínas con actividad enzimática a partir de podas de vid o de mazorcas de maíz, mediante fermentación en estado sólido. El documento D01 no detalla todas las etapas del procedimiento.

Sin embargo, las etapas del procedimiento para la producción de extractos enzimáticos si que se detallan en el documento D02. Aunque en este caso, únicamente se emplean las mazorcas de maíz como sustrato. En este documento también se emplea el microorganismo *Aspergillus terreus* CECT 2808. Se parte de un sustrato molido y humedecido con una concentración de sales, extracto de levadura y glucosa. Posteriormente se procede a la esterilización del material (se realiza por vapor de autoclave a 100°C durante 1 hora), a continuación se realiza la inoculación del sustrato y finalmente se procede al cultivo del mismo, a 30°C que producirá proteínas con actividad enzimática mediante fermentación en estado sólido. Para la obtención del extracto enzimático, se indica en el documento D02, un método que comprende las siguientes etapas: adición de agua destilada; incubación de la mezcla en agitación durante 1 hora a 200 rpm y 30°C; centrifugado y filtrado.

Teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02, resultaría evidente para un experto en la materia, el procedimiento para la producción de extractos enzimáticos objeto de la invención. Por lo que, las reivindicaciones 1-9 de la solicitud de patente presentan novedad pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 LP11/86.

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02 las reivindicaciones 1-9 no satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 de la LP11/86.