

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 316**

21 Número de solicitud: 201990040

51 Int. Cl.:

**C12P 5/02** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**28.12.2016**

30 Prioridad:

**28.12.2016 WO PCT/TR2016/050550**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.02.2020**

Fecha de concesión:

**03.02.2021**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**10.02.2021**

73 Titular/es:

**ISTANBUL TEKNİK UNIVERSITESI (100.0%)  
ITU Rektörlük Binası, ITU Ayazaga Kampusu  
34469 Maslak, Istanbul TR**

72 Inventor/es:

**INCE, Orhan;  
INCE, Bahar;  
AYDIN, Sevcan y  
YILDIRIM, Elif**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia**

54 Título: **Procedimiento para producir biogás en las digestiones anaeróbicas con hongos del rumen**

57 Resumen:

Se describe un procedimiento para la producción de biogás que utiliza una mezcla específica de hongos del rumen. El procedimiento mejorará la producción de biometano y biogás de la digestión anaeróbica. Se seleccionaron cuatro especies de hongos anaeróbicos aislados del rumen, particularmente, *Orpinomyces* sp., *Piromyces* sp. y *Anaeromyces* sp., *Neocallimastix frontalis*, y estas especies se mezclaron. A continuación, se añadió la mezcla de hongos del rumen que contenía cuatro especies en los digestores anaeróbicos alimentados con estiércol animal en diferentes proporciones de inoculación: 5% (R1), 15% (R2), 20% (R3) (v/v).

ES 2 743 316 B1

## DESCRIPCIÓN

### 5 **Procedimiento para producir biogás en las digestiones anaeróbicas con hongos del rumen**

#### **Campo de la invención**

10

La presente invención se refiere a la producción de biogás en digestores anaeróbicos.

La invención está particularmente relacionada con un procedimiento, que incluye una mezcla que comprende hongos del rumen y mejora la producción de biometano y biogás en digestores anaeróbicos.

15

#### **Antecedentes de la invención**

20

Los beneficios por la producción de energía amigable con el medio ambiente y de bajo costo son de gran importancia en el uso diario debido a la sobrepoblación y al rápido crecimiento de las industrias en todo el mundo.

25

Dado que el objetivo principal de la energía renovable es reducir la pobreza y permitir un desarrollo sostenible, en los últimos años muchos países han comenzado a utilizar energía renovable. Otra razón por la que la energía renovable se ha vuelto prominente es que reduce las reservas de recursos energéticos no renovables que se sabe causan el cambio climático.

30

De este modo, las fuentes alternativas de energía, como por ejemplo la energía solar, la geotérmica, la olamotriz, la biomasa y la hidráulica, se consideran posibles fuentes de energía renovable. La biomasa es una de las alternativas más importantes en las fuentes de energía renovables, que se describe como una materia orgánica que se origina en la captura fotosintética de la energía solar y se almacena como energía química.

35

Por tanto, la biomasa es un material biológico eficiente que se puede utilizar como combustible proporcionando energía en términos de energía renovable y sostenible. Si bien existen muchas fuentes de biomasa, incluidos los desechos y residuos de cultivos agrícolas, residuos sólidos municipales, aguas residuales, cultivos y residuos forestales, y residuos industriales y animales, el estiércol animal se define como una fuente primaria de biomasa, ya que generalmente se deposita en la tierra.

Ya existen algunos avances presentes y conocidos en el estado de la técnica que se han proporcionado a la bioenergía a partir de la biomasa de estiércol y de los lodos de las depuradoras.

Por ejemplo, en el documento de patente rusa con el número RU2419594C1 dentro del estado conocido de la técnica, la invención hace referencia a la producción agrícola, en particular, para completar el tratamiento y recuperación de desechos de estructuras de animales para producir energía eléctrica y térmica, para agua circulante y fertilizantes. La fase líquida de la sobrefermentación se evapora para secar el fertilizante concentrado. Hay que tener en cuenta que el vapor se convierte en agua para que sea utilizado en según se necesite en el proceso. Una parte de la masa homogénea se quema para limpiar el biogás obtenido al pasar a través del agua para producir biometano para proveer al consumidor. El agua se satura con sustancias orgánicas que se van a utilizar como fertilizante líquido. El aire procedente de las instalaciones de producción se recoge para facilitar la combustión de la masa homogénea con mayor emisión de calor. El residuo de la combustión se utiliza como fertilizante mineral. Los gases de escape se limpian de los aditivos volátiles sólidos pasándolos a través del agua y saturándolos con sustancias minerales para su uso como fertilizantes minerales. El gas de escape purificado se utiliza para generar energía eléctrica para alimentar invernaderos.

En el documento de patente internacional con el número W09325671A1 conocido dentro del estado de la técnica, se describe un método para clonar los clones de xilanasa a partir de un hongo de rumen anaeróbico que incluye las etapas de: (I) cultivar un hongo de rumen anaeróbico; (II) aislar la totalidad del ARN del cultivo en la etapa (III); (III) aislar el poli A <+> ARNm de la totalidad del ARN mencionado en la etapa (II); (IV) construir una biblioteca de expresión de cDNA; (V) ligar el cDNA a un vector de expresión bacteriófago seleccionado de lambda ZAP, lambda ZAPII o vectores de propiedades similares; (VI)

seleccionar clones recombinantes positivos de xilanasa en un medio de cultivo que incorpora xilano mediante detección de hidrólisis de xilano; y (VII) purificar clones recombinantes positivos de xilanasa. También se proporcionan clones recombinantes positivos para xilanasa producidos por el método mencionado anteriormente, así como  
5 clones recombinantes positivos para xilanasa que tienen las siguientes propiedades: (I) producción de zonas de eliminación de xilano en un cultivo que contiene ADNc de xilanasa derivado de *N. patriciarum*; (II) que tiene actividad en la hidrólisis de xilano pero que no tiene actividad en relación con la hidrólisis de CMC o celulosa cristalina. También se proporcionan diversas moléculas de ADNc que pueden utilizarse en el método  
10 mencionado anteriormente.

En el documento de patente de los Estados Unidos de América, número US6458580B1 dentro del estado conocido de la técnica, se describe un procedimiento para promover el crecimiento de al menos un hongo anaeróbico en el rumen de un animal rumiante, el  
15 procedimiento comprende la etapa de administrar al rumen una cantidad eficaz de una fuente de azufre resistente a la degradación.

A pesar del hecho de que es ventajoso depurar el estiércol de animal como fertilizante para los suelos y para la obtención de nutrientes para los cultivos alimentarios, estudios  
20 recientes muestran que la limitación de tierras para la eliminación de grandes cantidades de desechos [vertederos] y los procesos de alimentación limitados se han convertido en un problema en los últimos tiempos. Además, la salud pública y el medio ambiente se ven amenazados porque el estiércol animal es la principal fuente de mal olor, patógenos dañinos y gases nocivos, que son tóxicos y dañinos para los organismos vivos. Por lo  
25 tanto, el uso de estiércol animal como una fuente de biocombustible se ha vuelto crucial para evitar la acumulación de residuos y daños ambientales.

Es por eso que se utiliza la bioaumentación, que es un procedimiento para el enriquecimiento de microorganismos específicos que se utiliza en los digestores  
30 anaeróbicos para mejorar los rendimientos de la hidrólisis, la recuperación de nutrientes y la producción de biogás, aunque algunos estudios han evaluado la bioaumentación de los procesos de digestión anaeróbica con fluido ruminal y bacterias ruminales anaeróbicas.

35 Tal y como se puede comprender a partir de los documentos mencionados anteriormente,

ya se utilizan diferentes métodos a fin de mejorar la composición y aumentar la producción de biogás en los digestores anaeróbicos.

5 **Breve descripción de la invención y sus objetivos**

El objetivo de esta invención es la producción de biogás en digestores anaeróbicos mediante el uso de hongos del rumen.

10

Otro objetivo de esta invención es obtener una mejora en la producción de biometano a partir del estiércol animal mediante bioaumentación utilizando hongos anaeróbicos en el rumen.

15

En este procedimiento, se puede observar que los efectos de la bioaumentación de hongos del rumen anaeróbicos en varias proporciones de inóculos sobre la producción de biogás de digestores anaeróbicos alimentados con estiércol animal. La mayor producción de biogás se observó en el digestor R2 (15%) con una tasa de 5500 mL/d, casi el 60% del biogás total, debido a la adición de hongos del rumen anaeróbicos.

20

En términos de la mayor producción de biogás, los hongos anaeróbicos del rumen parecen ser una alternativa prometedora para mejorar la producción de biogás a partir de diferentes tipos de compuestos lignocelulósicos debido a su sistema enzimático ligninolítico extracelular no específico.

25

**Descripción detallada de la invención**

30

En la presente invención, todas las muestras de rumen que comprenden líquidos y sólidos se tomaron por medio de fístulas de rumen de animales lecheros (peso vivo 400-450 kg) utilizando procedimientos secretos realizados por veterinarios. Un bovino tenía más de dos años de edad y estaba alimentado con forraje para animales, apenas hierba, hortalizas, ensilaje y proteína de soja durante los períodos de verano e invierno.

35

Las muestras de rumen se recogieron a las 6 h después de la alimentación desde la parte focal del rumen. Todas las muestras de líquido ruminal se lavaron con nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) para proporcionar condiciones anaeróbicas como consecuencia del apilamiento y la fijación.

5

Una parte de las muestras de líquido del rumen se guardó a -20°C para extraer su ADN para el examen metagenómico del líquido del rumen. A partir de ese fluido del rumen, se analizaron hongos del rumen aislados y cultivados mediante el uso de técnicas de análisis de la cepa y análisis filogenético para identificar especies de hongos anaeróbicos del rumen.

10

Se seleccionaron cuatro especies aisladas de hongos anaeróbicos del rumen (*Orpinomyces sp.*, *Piromyces sp.* y *Anaeromyces sp.*, *Neocallimastix frontalis*) y estas especies se mezclaron en una proporción de 30% de *Orpinomyces sp.*, 25% de *Piromyces sp.*, y 25% de *Anaeromyces sp.*, y 20% de *Neocallimastix frontalis*. A continuación, se añadió una mezcla de hongos del rumen que contenía cuatro especies en diferentes proporciones de inóculo: 5% (R1), 15% (R2), 20% (R3) (v/v).

15

Para comprender el efecto de los hongos del rumen anaeróbicos en la producción de biogás, uno de los digestores no se bioaumentó con hongos del rumen anaeróbicos para tenerlo como un digestor de control: 0% (R0).

20

Los digestores anaeróbicos alimentados con estiércol animal se prepararon y se pusieron a funcionar con volúmenes de 900 ml durante 40 días a 40°C para comprender el efecto de los hongos anaeróbicos del rumen en la producción de biogás. La producción de biogás y biometano se midió para evaluar el rendimiento de los digestores anaeróbicos. El efecto de inhibición de los digestores se controló con la medición de los ácidos grasos volátiles (AGV o VFA por sus siglas en inglés de "*volatile fatty acids*").

25

Finalmente, se utilizó Illumina Miseq para identificar la dinámica de la comunidad microbiana y se utilizó qPCR para determinar el número de células activas de los hongos anaeróbicos del rumen. Posteriormente, los datos metagenómicos obtenidos a partir de la totalidad de ADN purificado se analizaron detalladamente para determinar la clasificación de los hongos del rumen y la función del gen.

30

35

En primer lugar, las muestras de ADN calificadas se nebulizaron en fragmentos más pequeños. Luego, se utilizaron la ADN polimerasa T4, la polinucleótido quinasa T4 y el fragmento Klenow para convertir los salientes en extremos romos. Los adaptadores se ligaron a cada fragmento de ADN tras la adición de adenina al extremo 3' de los extremos romos fosforilados. Se usaron perlas de ampure para deshacerse de los fragmentos cortos.

Posteriormente, se evaluó la calificación y la cuantificación de las bibliotecas de muestras con Agilent 2100 Bioanalyzer y ABI StepOnePlus Real-Time PCR System. Las bibliotecas se secuenciaron utilizando la plataforma Illumina HiSeq™. Las lecturas de secuenciación calificadas inicialmente producidas por la plataforma Illumina se refinaron y se sometieron a un montaje de novo a través de SOAPdenovo2 y Rabbit.

Se utilizaron contigios [del inglés "contig" o "contiguous"] ensamblados para predecir genes a través de MetaGeneMark a fin de construir un catálogo de genes específico del proyecto.

Después de mapear las lecturas preprocesadas en la base de datos IGC, se obtuvieron los genes y se agregaron al catálogo de genes. La redundancia fue eliminada usando CD-Hit. Finalmente, el análisis BLAST del catálogo de genes con algunas bases de datos se realizó con el propósito de la anotación funcional y taxonómica.

Los hongos del rumen anaeróbicos se cultivaron en medios complejos mediante el uso de protocolos descritos previamente. Solución de sal contenida (g/L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,0; (H)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,0; NaCl, 6,0; MgSO<sub>4</sub>, 0,6; CaCl<sub>2</sub>, 0,6 se prepararon para su uso en medios. Solución salina, 150 ml; centrifugada con líquido ruminal, 200 ml; Bactocasitona (Difco), 10 g; extracto de levadura (Oxoid), 2,5 g; NaHCO<sub>3</sub>, 6 g; L-cisteína, HC1, 1 g; fructosa, 2 g; xilosa, 2 g; celobiosa, 2 g; solución de resazurina (0-1%, p/v), 8 g; solución de oligoelementos, 10 ml; se añadieron a los medios una solución de haemin, 10 ml y agua desionizada hasta 900 ml.

A continuación, los medios se sometieron a autoclave durante 20 min a 115°C. Después de tratar los medios en autoclave, se añadió una solución de vitamina al 0,1% (v/v). Solución de antibióticos al 0,1% (v/v) que contiene penicilina (5 g/L), estreptomycin (5 g/L), neomicina (5 g/L) y cloranfenicol (5 g/L) también se añadió al medio de aislamiento

para suprimir crecimiento bacterial.

Después de preparar los medios, todos los cultivos se incubaron bajo CO<sub>2</sub> a 39°C durante una semana para reproducir los hongos del rumen. Cuando los hongos anaeróbicos del rumen alcanzaron la densidad óptica, se transfirieron anaeróticamente a reactores discontinuos para bioaumentar la digestión anaeróbica del estiércol animal.

Las especies de hongos aisladas del fluido ruminal y del estiércol de vaca se identificaron mediante la secuenciación del ADN micótico por medio de la identificación de la cepa y del análisis filogenético. Se utilizó un espaciador transcrito interno completo (ITS: parcial 18S, completo ITS 1, 5.8S, ITS 2 y parcial 28 S) para realizar la identificación de cepas y el análisis filogenético de hongos anaeróbicos aislados.

Se usaron pares de cebadores ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')/ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y L1 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')/NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') para amplificar el dominio D1 y D2 en el extremo 5' de la subunidad grande (LSU = *large sub unit*) de ADN ribosomal, respectivamente.

Según lo sugerido por Hibbett, se demarcaron diferentes regiones del locus de ARNr utilizando las secuencias consenso CATT/CAACTTCAG (final de 18S / inicio de 5.8S) y GAGTGTCATTA / TTGACCTCAAT (final de 5.8S / inicio de 28S) de una manera consistente. La alineación de secuencias utilizando MAFFT y el análisis filogenético utilizando Mr Bayes del paquete de bioinformática Geneious v6 se realizaron para reconstruir el análisis filogenético.

El impacto de los hongos anaeróbicos del rumen en la producción de biogás y biometano se determinó utilizando lotes de reactores anaeróbicos. Se utilizaron lodos granulares cultivados en un reactor anaeróbico discontinuo en serie a escala de laboratorio (900 mL) (ASBR por sus siglas en inglés de "*anaerobic sequenced batch reactor*") como inóculos metanogénicos.

El ASBR se realizó a 40°C, y la glucosa y el acetato (80%:20%, calculado como demanda química de oxígeno) se utilizaron como materia prima a una tasa de carga orgánica de 1 g de demanda química de oxígeno (DQO) / (L-día). Se usaron diferentes concentraciones

iniciales de hongos anaeróbicos del rumen y 3 g de VS/L de lodos metanogénicos en experimentos por lotes realizados a 40°C.

Se mezclaron cuatro tipos de hongos anaeróbicos del rumen a una velocidad equivalente.

- 5 El medio de cultivo comprende hongos anaeróbicos del rumen (*Orpinomyces* sp., *Piromyces* sp., *Anaeromyces* sp. y *Neocallimastix frontalis*) se utilizó en varias proporciones de inóculo: 0% (RO-Control), R1 (5%), R2 (15%), R3 (20%) (v/v). El reactor de control no fue enriquecido por hongos anaeróbicos del rumen. Se añadió inóculo fúngico solo una vez al comienzo del experimento. Además del estiércol, se añadieron
- 10 lodos granulares y agua para obtener las condiciones ideales.

- Después del apilamiento y la fijación, el nitrógeno gaseoso proporcionó un ambiente anaeróbico en todos los reactores. Se utilizó el contador Miligas (Ritter Digital Counter, U.S.A.) para medir las salidas de gas. El pH se ajustó a 7-7,4 y se agregó alcalinidad para
- 15 mantener el pH. Todos los reactores se pusieron a funcionar durante 40 días. El tampón contenía (por L): 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl; 0,4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O; 0,2 g de MgC<sub>12</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,08 g de CaC<sub>12</sub>.2H<sub>2</sub>O, 10 ml de solución de oligoelementos y 10 ml de solución de vitamina madre.

- 20 Se prepararon un oligoelemento y una solución vitamínica. Después de la preparación, se ajustaron de acuerdo con el procedimiento descrito en nuestro estudio anterior.

- Todos los análisis químicos de alcalinidad, sólidos totales (TS por sus siglas en inglés de "total solids") y sólidos volátiles (VS por sus siglas en inglés de "volatile solids") se
- 25 realizaron de acuerdo con los métodos estándar. La producción de biogás se controló mediante el uso de contadores Milligas (Ritter Digital Counter, U.S.A.) en ambos SBR.

- La composición del gas y la concentración de AGV se midieron mediante cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (Perichrom, France y Agilent
- 30 Technologies 6890N, USA, respectivamente) y una columna Elite-FFAP (30 mx 0,32 mm). El punto de ajuste del horno fue de 100°C y la temperatura máxima de la entrada fue de 240°C. Además, se utilizó gas helio como gas portador a una velocidad de 0,8 ml / min.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir biogás en digestores anaeróbicos mediante el uso de  
5 mezclas que incluyen hongos del rumen, caracterizado por que el procedimiento  
comprende las siguientes etapas:

- 10 - seleccionar cuatro especies de hongos anaeróbicos aislados del rumen en una  
proporción de 30% de *Orpinomyces sp.*, 25% de *Piromyces sp.*, 25% de  
*Anaeromyces sp.*, y 20% de *Neocallimastix frontalis* a la mezcla,
- añadir estas cuatro especies mezcladas en los digestores anaeróbicos  
alimentados con estiércol animal en diferentes proporciones de inóculos: 5% (R1),  
15% (R2), 20% (R3) (v/v).

15



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201990040  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2016  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad: **28-12-2016**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12P5/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤ <sup>6</sup> Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | PROCHAZKA J. et al. Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi. Engineering in Life Sciences, 2012, vol. 12, N° 3, páginas 343 - 351, ISSN 1618-0240 (print) ISSN 1618-2863 (electronic), DOI:10.1002/elsc.201100076                      | 1                          |
| A         | EP 2740799 A2 (EADS DEUTSCHLAND GMBH AIRBUS DEFENCE & SPACE GMBH) 11/06/2014, párrafos 1, 19; reivindicaciones 1-6.   | 1                          |
| A         | BR PI1001753 A2 (UNIV FED SERGIPE) 29/04/2014, Página 1, líneas 1-16; reivindicación 1.   | 1                          |
| A         | US 2008187975 A1 (KOHN RICHARD ALLEN) 07/08/2008, Párrafos 11-13, 38, 41, 42, 46-49, 78, 79, 104.   | 1                          |
| A         | ZHENG-BO, J. et al. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 2013, vol. 128, páginas 738 - 744, ISSN 0960-8524 (print) ISSN 1873-2976 (electronic), DOI:10.1016/j.biortech.2012.11.073 | 1                          |

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:

|   |  |                              |
|---|--|------------------------------|
| <p><b>Fecha de realización del informe</b><br/>06.02.2020</p> | <p><b>Examinador</b><br/>A. I. Polo Díez</p> | <p><b>Página</b><br/>1/4</p> |
|---|--|------------------------------|

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, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, CAPLUS, INTERNET, BD-TXTE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.02.2020

**Declaración**

|   |                    |           |
|---|--------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones   | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones   | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1 | <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       | Prochazka J et al. <i>Engineering in Life Sciences</i> vol. 12, Nº 3, Páginas 343 – 351. | 2012              |
| D02       | EP 2740799 A2 (EADS DEUTSCHLAND GMBH)  | 11.06.2014        |
| D03       | BR PI1001753 A2 (UNIV FED SERGIPE)   | 29.04.2014        |
| D04       | US 2008187975 A1 (KOHN RICHARD ALLEN)  | 07.08.2008        |
| D05       | ZHENG-BO, J. et al. <i>Bioresource Technology</i> , vol. 128, páginas 738 – 744.         | 2013              |

**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**

Ningún documento del estado de la técnica describe un procedimiento para producir biogás en digestores anaeróbicos que comprenda añadir una mezcla de los cuatro hongos mencionados en la reivindicación 1 de la solicitud.

Por ellos, la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad (art. 6.1 de la L.P.)

Sin embargo, dicha reivindicación no cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 de la L.P)

El documento D01 se considera el documento más cercano del estado de la técnica ya que describe un proceso para elevar el rendimiento en la producción de biogás a partir de estiércol animal utilizando hongos anaeróbicos del rumen. En este documento se utilizan tres de los hongos mencionados en la solicitud, como son *Anaeromyces*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, bien solos o combinados.

La reivindicación 1 difiere del procedimiento descrito en D01 en que se utiliza una mezcla de hongos que contiene, además de hongos de los tres géneros mencionados en D01, otro hongo anaeróbico ruminal de la especie *Neocallimastix frontalis*. Además, los cuatro hongos se encuentran en la mezcla en unas proporciones concretas (25% de *Anaeromyces*, 25% de *Piromyces*, 30% de *Orpinomyces*, 20% *Neocallimastix frontalis*) y se utiliza en diferentes proporciones al inocularla en los digestores.

En la solicitud en estudio no existen datos que prueben un efecto técnico asociado a esta diferencia (adición de del hongo *Neocallimastix frontalis*, combinación de los cuatro hongos y adición al digestor en las proporciones reivindicadas), por lo que el problema técnico a resolver por la invención se considera que es proveer de un método para producir biogás en presencia de hongos anaeróbicos del rumen, alternativo al ya divulgado en D01.

La solución que propone la solicitud de añadir el hongo de la especie *Neocallimastix frontalis* y mezclar en unas proporciones específicas los hongos no se puede considerar inventiva. Por un lado, el hongo anaeróbico *Neocallimastix frontalis* ya ha sido aislado del rumen con anterioridad y utilizado en digestores anaeróbicos con el fin de producir biocombustibles (ver documentos D02-D04) y, por otro lado, las proporciones de cada hongo en la mezcla, así como las proporciones en que la mezcla se inocula en el digestor son elecciones arbitrarias, sin efecto técnico demostrado.

Sería pues evidente para un experto en la materia, a la vista de documento D01, añadir otros hongos anaeróbicos a los ya utilizados y probar diferentes proporciones de los mismos. Para que la selección de una mezcla particular, como la de la reivindicación 1, tenga actividad inventiva, la selección debe implicar un efecto técnico y no ser arbitraria.

Por tanto, la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad pero no el de actividad inventiva.