

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 548**

21 Número de solicitud: 201990041

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/TR2016/050558

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2020

Fecha de concesión:

12.02.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.02.2021

73 Titular/es:

**ISTANBUL TEKNİK UNIVERSİTESİ (100.0%)
ITU Rektörlük Binası, İTÜ Ayazaga Kampusu
34469 Maslak, İstanbul TR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

54 Título: **Procedimiento para mejorar la producción de metano a partir de microalgas**

57 Resumen:

La presente invención está particularmente relacionada con un procedimiento, que utiliza bioaumentación con hongos de rumen anaeróbicos en proporciones variadas de inóculos sobre el rendimiento de digestores anaeróbicos de biomasa de microalgas para aumentar la producción de metano. En el procedimiento propuesto, se seleccionan y se mezclan cuatro especies de hongos anaeróbicos aisladas del rumen *Orpinomyces* sp., *Piromyces* sp., y *Anaeromyces* sp., *Neocallimastix frontalis*. Seguidamente, se añade la mezcla de hongos del rumen que contenía cuatro especies a los digestores anaeróbicos alimentados con microalgas *Haematococcus pluvialis* en diferentes proporciones de inóculos: 1% (F1), 5% (F2), 10% (F3), 15% (F4) y 20% (F5) (v/v).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para mejorar la producción de metano a partir de microalgas

5

Campo de la invención

10 La presente invención hace referencia a la mejora en la producción de metano utilizando digestores anaeróbicos de biomasa de microalgas.

La invención está particularmente relacionada con un procedimiento, que utiliza
15 bioaumentación con hongos de rumen anaeróbicos con proporciones variadas de inóculos en el rendimiento de digestores anaeróbicos de biomasa de microalgas para aumentar la producción de metano.

Antecedentes de la invención

Debido a que las microalgas tienen un alto rendimiento fotosintético, tasas de crecimiento elevadas y la característica de no requerir una fuente externa de carbono orgánico, se
25 cree que las microalgas son fuentes potenciales de bioenergía y de producción de biocombustibles.

La producción de biogás que comprende hidrógeno o metano a partir de la digestión anaeróbica de algas es actualmente una tecnología algo conspicua porque tiene la
30 capacidad de conservación de energía y características compatibles con el medio ambiente. Además de las condiciones ambientales que promueven la actividad microbiana, la degradación de los sustratos es un parámetro bastante importante a través del proceso anaeróbico.

35 Existen ya algunos avances presentes y conocidos en el estado de la técnica que se han

proporcionado para la bioenergía a partir de la biomasa.

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 WO2015044721A1 dentro del estado conocido de la técnica, la invención se refiere al procesamiento posterior de biomasa de microalgas para producir diferentes productos en un proceso de biorrefinería. La invención establece etapas interconectadas a partir de la extracción de biomasa de microalgas, siguiendo varios procesos productivos, incluidas alternativas para utilizar la biomasa restante. La invención permite mejorar el proceso general en sentido descendente adaptando cada etapa del proceso de producción para un uso completo de biomasa de microalgas produciendo varios productos de valor agregado de interés el ámbito comercial: proteínas, biodiesel y biogás o biometano. Además, la invención incluye alternativas de reutilización de aguas residuales para ser reutilizadas en los mismos procesos. La invención tiene aplicación en el procesamiento de biomasa, como microalgas y otros tipos de biomasa, para la producción de biocombustibles y coproductos.

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 ADNc; (V) ligar el ADNc a un vector de expresión bacteriófago seleccionado de lambda ZAP, lambda ZAPII o vectores de propiedades similares; (VI) seleccionar clones recombinantes positivos de xilanasas en un medio de cultivo que incorpora xilano mediante detección de hidrólisis de xilano; y (VII) purificar clones recombinantes positivos de xilanasas. También se proporcionan clones recombinantes positivos para xilanasas producidos por el método mencionado anteriormente, así como clones recombinantes positivos para xilanasas que tienen las siguientes propiedades: (I) producción de zonas de eliminación de xilano en un cultivo que contiene ADNc de xilanasas 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 mencionado anteriormente.

La digestión anaeróbica se puede realizar directamente sobre las algas después de una nueva recolección o sobre desechos de microalgas después de la extracción de lípidos. Con respecto al primero, la resistencia de la pared celular de la microalga puede ser un factor restrictivo significativo para la digestibilidad celular. Ciertas especies de microalgas, como la *Haematococcus sp.*, y *Chlorella sp.*, cuentan con celulosa recalcitrante en la pared celular, lo que protege a las microalgas contra la invasión de enzimas y también limita la biodegradabilidad de las algas.

La bioaugmentación con una combinación de hongos en el rumen en un proceso anaeróbico puede representar una alternativa adecuada al uso de tratamientos químicos previos de la biomasa de microalgas. De esta forma, los hongos del rumen anaeróbicos son prometedores para mejorar la producción de biogás a partir de diferentes especies de microalgas y macroalgas y también diversos sustratos lignocelulósicos.

30

Breve descripción de la invención y sus objetivos

El objetivo de esta invención es mejorar el potencial bioenergético de los digestores anaeróbicos mediante el uso de hongos del rumen.

Otro objetivo de esta invención es mejorar la degradación de la biomasa de algas mediante bioaugmentación utilizando hongos anaeróbicos de rumen.

- 5 Otro objetivo de la presente invención es obtener una mejora en la producción de biometano a partir de biomasa de microalgas de acuerdo con la bioaugmentación mediante hongos del rumen anaeróbicos en proporciones variadas de inóculos sobre el rendimiento de los digestores anaeróbicos.
- 10 En este procedimiento, se utilizaron hongos anaeróbicos del rumen, *Anaeromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces*, que tienen grupos de genes que se originan a partir de bacterias a través de la transferencia horizontal de genes. Los resultados implican que los hongos del rumen mejoraron la fermentación y la degradación de la biomasa de las microalgas porque promovieron la degradación de la pared celular,
- 15 mientras que la producción de metano aumentó en un 41% debido a la bioaugmentación con hongos del rumen durante los procesos anaeróbicos.

En general, los hallazgos aquí indican que la bioaugmentación con una combinación de hongos en el rumen en un proceso anaeróbico puede representar una alternativa

20 apropiada al uso de tratamientos químicos previos de la biomasa de microalgas. Por lo tanto, los hongos del rumen anaeróbicos son prometedores para mejorar la producción de biogás a partir de diferentes especies de microalgas y macroalgas y también diversos sustratos lignocelulósicos.

25

Descripción detallada de la invención

En este procedimiento de la invención, en primer lugar, se tomó líquido del rumen a través

30 de las fístulas del rumen de una vaca. El fluido se analizó mediante análisis metagenómico para determinar los hongos específicos del rumen anaeróbico en su interior. Los hongos del rumen aislados y cultivados se evaluaron con técnicas de identificación de cepas y análisis filogenético para caracterizar las especies de hongos del rumen anaeróbicos. Se aislaron cuatro especies que tenían una alta expresión de

35 enzimas que degradaban la lignocelulosa y se seleccionaron y se mezclaron en una

proporción de 30% de *Orpinomyces sp.*, 25% de *Piromyces sp.* y 25% de *Anaeromyces sp.*, 20% de *Neocallimastix frontalis*.

- 5 Posteriormente, a esta mezcla se le añadió en los digestores anaerobios alimentados con microalgas *H. pluvialis* en diferentes proporciones de inóculos: 1% (F1), 5% (F2), 10% (F3), 15% (F4) y 20% (F5) (v/v).

- 10 Para comprender el efecto de los hongos del rumen anaeróbicos en la producción de biogás, un digestor no se bioaumentó con hongos del rumen anaeróbicos para mantenerlo como un digestor de control: 0% (F0). Los digestores anaeróbicos alimentados con microalgas se prepararon de forma semicontinua con volúmenes de 2000 ml durante 40 días a 41°C.

- 15 Los reactores se pusieron a funcionar por duplicado en las mismas condiciones. El rendimiento de los digestores anaeróbicos se evaluó a través de la producción de biogás y biometano. El efecto inhibitorio de los digestores se controló con la medición de ácidos grasos volátiles (AGV o VFA por sus siglas en inglés de "*volatile fatty acids*").

- 20 Finalmente, la dinámica de la comunidad microbiana durante el proceso de digestión anaeróbica se distinguió según los análisis de Illumina Miseq y qPCR. Las muestras para todo el contenido de rumen que comprende líquido y sólidos se tomaron a través de las fístulas de rumen de una vaca (peso vivo: 400-450 kg) con técnicas confidenciales realizadas por veterinarios.

- 25 Las vacas tenían más de dos años y se alimentaban con heno de alfalfa, apenas pasto, legumbres, ensilaje y harina de soja durante los períodos de verano e invierno. Todas las muestras de fluido ruminal se lavaron con nitrógeno gaseoso (N₂) para proporcionar condiciones anaeróbicas después de la carga y del sellado. Varias muestras de líquido
30 del rumen se almacenaron a -20°C para extraer el ADN para un estudio metagenómico posterior del líquido del rumen.

- La metagenómica, también conocida como genómica ambiental, se empleó para determinar la abundancia e identidad de los hongos del rumen en una muestra. El estudio
35 metagenómico, basado en el ADN purificado total, se investigó exhaustivamente en

especies de hongos del rumen clasificadas por la función de los genes y el análisis de las vías a nivel del ADN. Inicialmente, las muestras de ADN calificadas se cortaron en fragmentos más pequeños mediante nebulización.

5 A continuación, la ADN polimerasa de T4, el fragmento de Klenow y el polinucleótidoquinasa de T4 convirtieron los resultados de la fragmentación en extremos romos. Después de la adición de una base de adenina (A) al extremo 3' de los fragmentos de ADN fosforilados romos, los extremos de los fragmentos de ADN se unieron con adaptadores. En ese momento, los fragmentos cortos se eliminaron con perlas de
10 AMPpure. Las bibliotecas de muestras se calificaron y cuantificaron con un Bioanalyzer Agilent 2100 y un sistema de PCR en tiempo real ABI StepOnePlus.

Las bibliotecas calificadas se secuenciaron utilizando la plataforma Illumina HiSeqTM. El sistema ABI StepOnePlus Real-Time PCR System se utilizó para calificar y cuantificar las
15 bibliotecas de muestras. Estas bibliotecas se secuenciaron utilizando de la plataforma Illumina HiSeqTM. Las lecturas de secuenciación calificadas producidas por la plataforma Illumina fueron preprocesadas y luego ensambladas de novo con SOAPdenovo2 y Rabbit.

Luego se empleó MetaGeneMark para predecir genes a partir de cóntigos [del inglés
20 "contig" o "contiguous"] ensamblados, construyendo un catálogo de genes específico del proyecto. Las lecturas preprocesadas también se asignaron a la base de datos de IGC y los genes mapeados se recuperaron e integraron en el catálogo de genes. Se utilizó CD-Hit para eliminar la redundancia.

25 El catálogo de genes se utilizó para contrarrestar con las bases de datos públicas, incluidas nr, Swiss-Prot, COG, KEGG, GO, CAZ y, eggNOG y ARDB para obtener anotaciones funcionales y taxonómicas. Antes del aislamiento de los hongos del rumen anaeróbicos, con el fin de cultivarlos, se prepararon medios complejos utilizando los protocolos descritos previamente.

30 Se prepararon dos soluciones de sal diferentes para su uso en los medios. Si bien la solución salina I involucró (g/L) KH₂PO₄ - 3,0; (H) 2SO - 3,0; NaCl - 6,0; MgSO - 0,6 y CaCl - 0,6, la solución de sal II incluyó K₂HPO₄ (3 g/L). La solución salina I presentó 150 ml de solución salina II, 150 ml de líquido ruminal centrifugado, 200 ml de bactocasitona
35 (Difco), 10 g de extracto de levadura (Oxoid), 2,5 g de NaHCO₃, 6 g de L-cisteína. A 900

ml se le añadieron 1 g de HCl, 2 g de fructosa, 2 g de xilosa, 2 g de celobiosa, 8 g de solución de oligoelementos, 10 ml de solución de hemina, 10 ml de solución de resazurina (0,1%, p / v) y 1 ml de agua desionizada.

- 5 A continuación, los medios se sometieron a autoclave durante 20 min a 115°C. Después de la autoclave, se agregaron al medio 0,1% (v/v) de dos soluciones de vitaminas diferentes. La solución de vitamina I contenía (g/L): tiamina HCl, 0,10; riboflavina, 0,20; pantotenato de calcio D, 0-60; ácido nicotínico, 1,00; nicotinamida, 1,00; ácido fólico, 0,05; cianocobalamina, 0,20; biotina, 0,20; piridoxina.HCl, 0,10; y ácido paminobenzoico, 0,01.
- 10 La vitamina II contenida en la solución (mg/L): tiamina HCl, 5; riboflavina, 5; pantotenato de calcio D, 5; ácido nicotínico, 5; ácido fólico, 2; cianocobalamina, 1; biotina, 1; piridoxina HCl, 10; ácido paminobenzoico, 5.

- 15 Se añadió solución de antibióticos al 0,1% (v/v) que contiene penicilina (5 g/L), estreptomicina (5 g/L), neomicina (5 g/L) y cloranfenicol (5 g / L) al medio de aislamiento para suprimir la el crecimiento bacteriano. Después de la preparación del medio, todos los cultivos se incubaron bajo CO₂ a 39°C en el transcurso de una semana para reproducir los hongos del rumen.

- 20 El ADN micótico se secuenció con identificación de cepas y análisis filogenético para identificar las especies aisladas de fluido ruminal y estiércol de vaca.

- 25 Este análisis se realizó con el espaciador transcrito internamente completo (ITS; parcial 18S, completo ITS 1, 5.8S, ITS 2 y parcial 28S) y D1/D2 en el extremo 5' del ADN ribosomal de la subunidad grande (LSU = large sub unit) siendo amplificado usando los 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').

- 30 Las secuencias consenso, CATT/CAACTTCAG (final de 18S/ inicio de 5.8S) y GAGTGTCATT/TTGACCTCAAT (final de 5.8S / inicio de 28S) se utilizaron para demarcar las diferentes regiones del locus de ARNr de una manera consistente según es sugerido por Hibbett (2016).

- 35 El paquete Geneious v6 Bioinformatics que utiliza MAFFT para el alineamiento de

secuencias y Mr Bayes para el análisis filogenético se aplicaron para llevar a cabo la reconstrucción filogenética.

Se utilizó fotoautótroficamente aire enriquecido con CO₂ al 2% para cultivar la cepa
5 SCCAP 34/7 de *H. pluvialis*. Se usó medio basal en negrita con N₂ triple y vitaminas (3N-BBM+V; CCAP 2015) a 25°C para hacer crecer células de microalgas en un sistema de foto biorreactor de 2 L. La fuente de luz fue una cámara de 9" x 9" x 9" con luces LED de 8000-10000 lux.

10 Después de la incubación, se obtuvo la biomasa de microalgas, que se concentró por centrifugación a 3600 x g durante 15 min. La biomasa de algas concentrada presentó un 11% (sobre la base de peso húmedo) del sólido total (ST), un 91,6% (sobre la base de peso seco) de sólido volátil (SV) y un 44, 16 y 26% (sobre la base de peso seco) de proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente.

15 Para los inóculos metanogénicos se empleó lodo granular que se cultivó en un reactor anaeróbico por lotes secuenciado a escala de laboratorio (1,5 L) (ASBR por sus siglas en inglés de "*anaerobic sequenced batch reactor*"). El ASBR tenía una temperatura de 41°C, y se utilizaron glucosa y acetato (80%: 20%, calculado como DQO [demanda química de
20 oxígeno]) como materia prima a una velocidad de carga orgánica de 1 g DQO/(L-día). Se emplearon diferentes concentraciones iniciales de *H. pluvialis* (2 g de SV / L de la biomasa de algas) y 3 g de SV / L de lodos metanogénicos para los experimentos de lotes realizados a 41°C.

25 El medio de cultivo que consiste en hongos anaeróbicos se utilizó en diferentes proporciones de inóculo: 0% (F0), 1% (F1), 5% (F2), 10% (F3), 15% (F4) y 20% (F5) (v/v). El tampón contenía (por L): 1,0 g de NH₄Cl; 0,4 g de K₂HP0₄.3H₂O; 0,2 g de MgC₁₂.6H₂O; 0,08 g de CaC₁₂.2H₂O, 10 ml de solución de oligoelementos y 10 ml de solución de vitamina madre. A continuación, se prepararon un oligoelemento y una
30 solución de vitamina y luego se ajustaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el estudio anterior.

Se tomaron muestras por triplicado de los lodos de los reactores F0, F1, F2, F3, F4 y F5 los días 5, 10, 20 y 30 y 40 y 40 durante el funcionamiento de los digestores anaeróbicos
35 para el aislamiento total del ADN. Los ADN totales se aislaron de las muestras de lodo de

1 ml con los kits de extracción de ADN PureLink Genomic. Un espectrofotómetro NanoDrop determinó la concentración.

5 La región hipervariable V4-V5 del gen 16S ARNr se reprodujo con cebadores específicos de la región que fueron diseñados para contener un adaptador de ilumina y secuencias de códigos de barras 518F-926R para bacterias y 518F-958R para *archaea*. Se empleó una doble ronda de PCR e indización dual en un Ciclador Térmico Peltier con Motor de ADN PTC-200 [PTC-200 DNA Engine Peltier Thermal Cycler] para generar los amplicones de muestra.

10

Se utilizó un ensayo picogreen y un fluorómetro (lector de placas SpectraMax GeminiXPS de 96 pocillos) para ajustar las concentraciones de los amplicones. Después de la determinación de la concentración, se colocaron en las mismas cantidades (~100 ng) en un solo tubo. Se aplicó la siguiente técnica para alejar fragmentos indeseables cortos y
15 limpiar el grupo de amplicones.

En primer lugar, el tamaño de la combinación se determinó utilizando perlas AMPure (de Beckman Coulter), y el producto se caracterizó en un gel al 1% que se cortó y purificó con un kit de purificación Qiagen MiniElute PCR, después de lo cual se determinó nuevamente
20 el tamaño de la combinación con perlas AMPure.

La PCR que contiene cebadores específicos de adaptadores de Illumina se usó para ajustar la calidad del grupo de amplicones. A partir de entonces, los productos de la PCR se pasaron por un chip DNA 1000 para bioanalizador Agilent 2100. El último conjunto de
25 amplicones se aceptó con la condición de que no se identificarían fragmentos largos después de la PCR y si hubiera fragmentos cortos, el procedimiento se repetiría nuevamente.

El kit de cuantificación de bibliotecas KAPA 454 (de KAPA Biosciences) y el sistema de
30 PCR en tiempo real StepOnePlus de Applied Biosystems cuantificaron el grupo de amplicones, que se determinó que estaban limpios. Finalmente, se siguió el protocolo illumina MiSeq de 300 pares de bases para obtener las secuencias.

Se aplicó qPCR a todos los digestores anaeróbicos para evaluar las concentraciones
35 óptimas de hongos. El ensayo de qPCR se realizó por triplicado utilizando un sistema ABI

7500 SDS con todos los digestores amplificados utilizando conjuntos de cebadores previos específicos para hongos anaeróbicos (cebador directo: 5'- GAGGAAGT AAAAGTCGT A AC AAGGTTTC-3', cebador inverso: 5'-CAAATTC AC AAAGGGT AGGATGATTT-3').

5

Se utilizó una concentración de cebador óptima de 350 nm y una concentración final de MgC12 de 4 mM para la qPCR en las siguientes condiciones de ciclo: desnaturalización a 94°C durante 4 min, seguida de 35 ciclos de 96°C durante 45 s, 56°C para 45 s, y 72°C durante 1 min con una extensión final posterior a 72°C durante 5 min. Ya se ha descrito la información detallada sobre el análisis de qPCR

10

El análisis de alcalinidad, sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) se realizó de manera apropiada con los métodos estándar. La producción de biogás se midió con contadores Milligas en ambos ASBR. La cromatografía de gases con un detector de ionización de llama y una columna Elite-FFAP (30 m X 0,32 mm) midió las composiciones de gas y las concentraciones de AGV. 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.

15

Se realizaron histogramas, gráficos q-q y la prueba de Shapiro-Wilk' para examinar la normalidad de los datos. La homogeneidad de la variación también se investigó mediante la prueba de Levene. El análisis de variación (ANOVA) o las pruebas t de muestras independientes se utilizaron para verificar las variaciones en la producción de biogás y la dinámica de la comunidad microbiana entre varias relaciones de inóculo de hongos anaeróbicos y F0. Para facilitar las comparaciones múltiples, también se aplicó la prueba de Tukey.

25

Los valores de las pruebas se interpretaron como desviación media y estándar. La aplicabilidad de la comunidad microbiana y las relaciones de inóculo se determinaron mediante la prueba de Pearson en términos de correlación. Se detectaron diferencias significativas en el nivel $p < 0,05$.

30

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para mejorar la producción de metano mediante el uso de digestores anaeróbicos de biomasa de microalgas caracterizado por que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

10 - seleccionar cuatro especies de hongos anaeróbicos aisladas del rumen, y mezclar en una proporción de 30% de *Orpinomyces sp.*, 25% de *Piromyces sp.* y 25% de *Anaeromyces sp.*, 20% de *Neocallimastix frontalis*.

- añadir estas cuatro especies a los digestores anaeróbicos alimentados con microalgas *Haematococcus pluvialis* en diferentes proporciones de inóculos: 1% (F1), 5% (F2), 10% (F3), 15% (F4) y 20% (F5) (v/v).

15



- ②① N.º solicitud: 201990041
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2016
③② Fecha de prioridad: **28-12-2016**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P5/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 2740799 A2 (EADS DEUTSCHLAND GMBH AIRBUS DEFENCE & SPACE GMBH) 11/06/2014, párrafos 1-19; reivindicaciones 1-6.	1
A	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	AYDIN, S. Enhancement of microbial diversity and methane yield by bacterial bioaugmentation through the anaerobic digestion of <i>Haematococcus pluvialis</i> , App. Microbio Biotechnol, 12.04.2016, vol. 100, páginas 5631-5637, ISSN 0175-7598, DOI:10.1007/s00253-016-7501-0	1
A	US 2008187975 A1 (KOHN RICHARD ALLEN) 07/08/2008, Párrafos 11-13, 38, 41, 42, 46-49, 78, 79, 104.	1
A	BR PI1001753 A2 (UNIV FED SERGIPE) 29/04/2014, Página 1, líneas 1-16; reivindicación 1.	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:

Fecha de realización del informe
06.02.2020

Examinador
A. I. Polo Díez

Página
1/4

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

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		SI
	Reivindicaciones	1	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	EP 2740799 A2 (EADS DEUTSCHLAND GMBH)	11.06.2014
D02	Prochazka J et al. Engineering in Life Sciences vol. 12, Nº 3, Páginas 343 – 351.	2012
D03	Aydin et al. App. Microbiol. Biotechnol.	12.04.2016

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 (párrafos 11-19) un proceso para producir biocombustibles, entre ellos biogás, a partir de algas (macro o microalgas), en el que se añaden microorganismos anaeróbicos del rumen al digestor anaeróbico, entre los que se citan tres de los hongos mencionados en la solicitud, como son *Piromyces*, *Orpinomyces* y *Neocallimastix frontalis*.

La reivindicación 1 difiere del procedimiento descrito en D01 en que se utiliza una mezcla concreta de microorganismos ruminales que son cuatro hongos en unas proporciones concretas (25% de *Anaeromyces*, 25% de *Piromyces*, 30% de *Orpinomyces*, 20% *Neocallimastix frontalis*) y que se inocula en diferentes proporciones al digestor. La microalga de partida, *Haematococcus pluvialis*, tampoco ha sido citada en D01.

En la solicitud en estudio no existen datos que prueben un efecto técnico asociado a estas diferencias (adición de esa mezcla concreta, selección de la microalga *Haematococcus*), por lo que el problema a resolver por la invención se considera que es proveer de un método alternativo al ya conocido en D01 para producir biogás a partir de microalgas utilizando microorganismos del rumen en el digestor anaeróbico.

La solución que propone la solicitud en la reivindicación 1 de añadir la combinación concreta de hongos ruminales y elegir la microalga *Haematococcus pluvialis* no se puede considerar inventiva. El documento D01 ya menciona tres de los hongos utilizados en la solicitud, y añadir un cuarto hongo anaeróbico como el *Anaeromyces* es una de las posibilidades que un experto en la materia contemplaría, ya que dicho hongo se ha aislado del rumen con anterioridad y se ha utilizado para aumentar el rendimiento en la obtención de biogás en digestores que contienen otros productos ricos en celulosa (ver documento D02). 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.

En cuanto a la elección de *Haematococcus pluvialis* como microalga para la obtención de biogás tampoco se puede considerar inventiva dado que esta especie se ha usado con esta misma finalidad anteriormente (ver documento D03)

Sería pues evidente para un experto en la materia, a la vista de documento D01, producir biogás a partir de microalgas y utilizar una mezcla de microorganismos anaeróbicos ruminales. La selección de unos hongos concretos, las proporciones elegidas, así como la microalga seleccionada, son evidentes para un experto en la materia a la vista del estado de la técnica. En ausencia de un efecto técnico demostrado dichas selecciones carecen de actividad inventiva.

En conclusión, la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad pero no el de actividad inventiva.