

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 170**

21 Número de solicitud: 201100896

51 Int. Cl.:

C12N 1/32

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación:

29.07.2011

43

Fecha de publicación de la solicitud:

08.02.2013

Fecha de la concesión:

07.06.2013

45

Fecha de publicación de la concesión:

19.06.2013

73

Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
OTRI-Vicerrectorado de I+D+I C/ Benito Pérez
Galdós, s/n
11002 Cádiz (Cádiz) ES**

72

Inventor/es:

**GÓMEZ MONTES DE OCA, José Manuel;
CANTERO MORENO, Domingo;
RAMÍREZ MUÑOZ, Martín y
COFRÉ CARVAJAL, Ociel**

54

Título: **MEDIO DE CULTIVO SIMPLIFICADO Y OPTIMIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL E
HIDRÓGENO, A PARTIR DE GLICERINA, POR ESCHERICHIA COLI, PARA PONTENCIAR LA
PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA**

57

Resumen:

Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por Escherichia coli.

La invención consiste en un medio de cultivo específico para el proceso de biotransformación de glicerina en etanol e hidrógeno, utilizando el microorganismo E. coli MG1655. Este medio de cultivo potencia el crecimiento del microorganismo con el objetivo de obtener una concentración de E. coli que permita obtener mayores índices de producción de etanol respecto a procesos similares reportados en bibliografía.

ES 2 395 170 B2

DESCRIPCIÓN

MEDIO DE CULTIVO SIMPLIFICADO Y OPTIMIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL E HIDRÓGENO, A PARTIR DE GLICERINA, POR *ESCHERICHIA COLI*, PARA POTENCIAR LA PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA.

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de los procedimientos biológicos y consiste en un medio de cultivo para aumentar la productividad de biomasa de *E. coli* con glicerina como fuente de carbono principal.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La glicerina es el principal constituyente de todas las grasas y aceites, ha sido el subproducto de mayor valor agregado producido durante la saponificación de aceites y grasas y reacciones de transesterificación en procesos oleoquímicos y de fabricación de Biodiesel, respectivamente (Kenar 2007).

15 En algunos países europeos, la producción de glicerina se ha incrementado significativamente debido al aumento en la producción de Biodiesel. Como consecuencia, los precios han caído significativamente y la mayoría de las compañías dedicadas a la producción de glicerina, por síntesis química han tenido que cancelar sus operaciones (da Silva *et al.*, 2009), convirtiéndose entonces la sobreproducción de glicerina en un problema que debe ser
20 resuelto.

La disponibilidad de glicerina y su bajo precio, han hecho crecer el interés en su utilización como fuente de carbono para diferentes procesos de fermentación, en reemplazo de otras fuentes de carbono utilizadas tradicionalmente en estos procesos (Dharmadi *et al.*, 2006). La glicerina no solamente es abundante y barata sino que su alto nivel de reducción, en
25 comparación a azúcares, ofrece la oportunidad de obtener compuestos químicos reducidos como succinato, etanol, xilitol, propionato, hidrógeno, etc. con rendimientos de producción superiores respecto a los obtenidos a partir de azúcares (da Silva *et al.*, 2009).

El proceso de biotransformación permite transformar un compuesto (materia prima) en otro de interés técnico, comercial, etc. (producto), por medio de enzimas o microorganismos que permitan catalizar las reacciones de transformación requeridas. El proceso de biotransformación presenta ventajas, frente a la síntesis química tradicional, respecto a su selectividad, especificidad y condiciones de proceso moderadas (presión, temperatura, pH), repercutiendo en beneficios relacionados a la no producción de isómeros no deseados, menor gasto energético, etc. lo que finalmente se traduce en un proceso más eficiente y factible desde el punto de vista técnico y económico.

Diversos microorganismos son capaces de metabolizar glicerina, como fuente de carbono *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Anaerobiospirillum*, etc., sin embargo la utilización comercial de estos organismos se ve limitada por el grado de patogenicidad que poseen, requerimientos nutricionales y dificultad para la manipulación genética de los mismos (Yazdani y Gonzalez, 2008).

Recientemente se ha descrito que *E. coli* puede fermentar eficientemente el glicerina cuando el pH del medio de cultivo es ácido, siendo el etanol y el succinato los principales productos de esta fermentación, lo que hace de éste un atractivo modelo para el aprovechamiento del glicerina en la producción de etanol e hidrógeno (Hakobyan *et al.*, 2005; Dharmadi *et al.*, 2006; Murarka *et al.*, 2008; Yazdani *et al.*, 2008; Gonzalez, 2009; Guebel *et al.*, 2009).

La optimización del medio de cultivo es un paso importante en el diseño de un proceso de fermentación. Un resultado deseable es la reducción en el coste de materiales y/o de energía.

Es posible corroborar la ausencia de un medio de cultivo específicamente formulado para el proceso de biotransformación de glicerina en etanol e hidrógeno, por medio de *E. coli* en condiciones anaerobias. Por lo tanto la presente invención supone un avance en esta área ya que, se formuló y optimizó un medio de cultivo específico para el proceso de biotransformación de glicerina en etanol, utilizando el microorganismo *E. coli* MG1655. Este medio de cultivo potencia el crecimiento del microorganismo con el objetivo de obtener una concentración de *E. coli* que permita obtener mayores índices de producción de etanol respecto a procesos similares reportados en bibliografía. El medio de cultivo desarrollado y optimizado en este trabajo se puede considerar una manera simple y atractiva de producir el

etanol e hidrógeno usando glicerina como fuente de carbono y *Escherichia coli* como biocatalizador, convirtiéndose en una alternativa atractiva ante futuras etapas de escalamiento, donde los bajos costos y la simplicidad en la formulación y preparación de un medio de cultivo es importante.

5

Referencias citadas:

- Da Silva, G.P., Mack, M., Conteiro, J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27: 30–39.
- 10 • Dharmadi, Y., Murarka, A., Gonzalez, R. 2006. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: A New Platform for Metabolic Engineering. *Biotechnology and Bioengineering*. 94(5): 821-829.
- Gonzalez, R. 2009. Anaerobic Fermentation of Glycerol. United States Patent Application. Pub. No.: US 2009/0186392 A1.
- 15 • Guebel, D.V., Cánovas, M., Torres, N.V. 2009. Analysis of the *Escherichia coli* Response to Glycerol Pulse in Continuous, High-Cell Density Culture Using a Multivariate Approach. *Biotechnology and Bioengineering* 102(3): 910–922.
- Hakobyan, M., Sargsyan, H., Bagramyan K. 2005. Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli*. *Biophysical Chemistry* 115: 55– 61.
- 20 • Kenar, J.A. 2007. Glycerol as a platform chemical: sweet opportunities on the horizon?. *Lipid Technology* 19(11): 249-253.
- Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S.S., Gonzalez, R. 2008. Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. *Applied and environmental microbiology*. 74(4) :1124–1135.
- 25 • Yazdani, S.S., Gonzalez, R. 2008. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*. 10: 340-351.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención consiste en un medio de cultivo formulado y optimizado para potenciar el crecimiento de la biomasa responsable de la producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina, en condiciones anaerobias. El medio de cultivo está compuesto de glicerina, Na₂SO₄, NaCl, MgSO₄·7H₂O y peptona.

Tanto glicerina y peptona, como las sales inorgánicas que componen el medio se presentan en la Tabla 1, donde es posible observar los rangos de concentración apropiados y rangos de concentración preferidos, expresados en g L⁻¹.

Tabla 1

Compuesto	Concentración apropiada (g L⁻¹)	Concentración preferida (g L⁻¹)
Glicerina	5-50	8-12
Na₂SO₄	0,02-1,2	0,05-1,05
NaCl	0-0,03	0,01-0,02
MgSO₄·7H₂O	0,01-0,05	0,02-0,04
Peptona	2-8	3-6

Este medio puede ser preparado directamente o en solución concentrada, preferiblemente 15x, la peptona puede ser preparada de manera separada.

En caso de ser necesario, el medio puede ser suplementado con sales inorgánicas trazas, presentadas en la Tabla 2, en concentraciones que no resulten inhibitorias para *E. coli*, durante este proceso.

Tabla 2

Compuesto	Concentración apropiada (g L ⁻¹)	Concentración preferida (g L ⁻¹)
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0-0,0045	0-0,00225
MnSO ₄ H ₂ O	0-0,0037	0-0,00185
CuSO ₄ 5H ₂ O	0-0,0047	0-0,00235
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0-0,0053	0-0,00265
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0-0,00055	0-0,000275
CoCl ₃ 6H ₂ O	0-0,001	0-0,0005

El pH del medio de cultivo puede ser ajustado a valores entre 6,0-6,5; de acuerdo a los requerimientos del proceso que se desee llevar a cabo.

En la tabla 3 se muestra una comparación de los parámetros de fermentación obtenidos en el medio propuesto, respecto a Murarka *et al.* (2008)

Tabla 3

Parámetro	Unidades	En este trabajo	Murarka <i>et al.</i> (2008)	Cepa
μ	h ⁻¹	0.0313±0.0015	0.040±0.003 (μ_m)	MG1655
Glicerol consumido	%	84.46±0.023	≈80 ⁺	MG1655
$Y_{p/s}$	$\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{glicerol}}}^{-1}$	0.581	0.461	MG1655
$Y_{x/s}$	$\frac{g_{\text{cel}}}{g_{\text{glicerol}}}^{-1}$	0.059±0.019	0.0329±0.0029	MG1655
q_p	$\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{cel}}} h^{-1}$	0.128	≈0.146 ⁺	MG1655
Q_x	$\frac{g_{\text{cel}}}{L} d^{-1}$	0.165±0.0126	≈0.0752 ⁺	MG1655

+calculado a partir de Murarka *et al.*, 2008.

El medio propuesto permite producir de una manera simple y atractiva etanol e hidrógeno, reduciendo tanto el coste de formulación, como el tiempo de preparación en usos a mayor escala.

5 Como se observa en la Figura 2, la fase estacionaria para el crecimiento de la biomasa fue alcanzada en 70 horas de fermentación comparadas a las 97 horas necesarias en el medio no-optimizado (Figura 1). Por otra parte, la producción del etanol máxima se alcanzó a las 80 horas para el medio optimizado (Figura 2) frente a las 120 horas necesarias para el medio no optimizado (Figura 1). Los parámetros de la fermentación fueron calculados para los
10 experimentos realizados con el medio de cultivo optimizado. Como control, estos resultados fueron comparados con datos previamente divulgados, según muestra la Tabla 1. El medio de cultivo usado por Murarka era un medio mínimo modificado diseñado por Neidhardt *et al.* (1973).

Los resultados obtenidos con el medio de cultivo optimizado son bastante
15 significativos frente a los reportados por Murarka *et al.* (2008) ya que se alcanzan valores de Q_x , $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ son 2,19, 1,79 y 1,26 veces más altos, respectivamente, que los datos divulgados por estos autores para un proceso similar.

Respecto a la producción de hidrógeno, se encuentran dentro del orden de magnitud respecto a los reportados en literatura, para procesos similares.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Muestra la cinética de fermentación obtenida para medio de cultivo no-optimizado: crecimiento de biomasa (o) (aparece multiplicado cinco veces), consumo de glicerina (◆) y producción de etanol (■).

25 **Figura 2.-** Muestra la cinética de fermentación obtenida para medio de cultivo optimizado: crecimiento de biomasa (o) (aparece multiplicado cinco veces), consumo de glicerina (◆) y producción de etanol (■).

30

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, en condiciones anaerobias para potenciar la productividad de biomasa, compuesto de glicerina, Na_2SO_4 , NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y peptona.
2. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 1, en el que la concentración de glicerina se encuentra en un rango de entre 5 y 50 g L⁻¹.
3. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 1, en el que la concentración de Na_2SO_4 se encuentra en un rango de entre 0,02 y 1,2 g L⁻¹.
4. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 1, en el que la concentración de NaCl se encuentra en un rango de entre 0 y 0,03 g L⁻¹.
5. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 1, en el que la concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se encuentra en un rango de entre 0,01 y 0,05 g L⁻¹.
6. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 1, en el que la concentración de Peptona se encuentra en un rango de entre 2 y 8 g L⁻¹.
7. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 y 2, en el que la concentración de glicerina preferida se encuentra en un rango de entre 8 y 12 g L⁻¹.
8. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 y 3, en el que la concentración de Na_2SO_4 preferida se encuentra en un rango de entre 0,05 y 1,05 g L⁻¹.
9. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 y 4, en el que la concentración de NaCl preferida se encuentra en un rango de entre 0,01 y 0,02 g L⁻¹.

10. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 y 5, en el que la concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ preferida se encuentra en un rango de entre 0,02 y 0,04 g L^{-1} .
- 5 11. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 y 6, en el que la concentración de Peptona preferida se encuentra en un rango de entre 3 y 6 g L^{-1} .
- 10 12. Medio de cultivo simplificado y optimizado para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 a 11, preparado directamente o en solución concentrada, preferiblemente 15x, la peptona puede ser preparada de manera separada.
13. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicaciones 1 a 12, suplementado con las sales inorgánicas $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- 15 14. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 13, en el que la concentración de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ se encuentra en un rango de entre 0 y 0,0045 g L^{-1} .
- 20 15. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 13, en el que la concentración de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se encuentra en un rango de entre 0 y 0,0037 g L^{-1} .
16. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 13, en el que la concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se encuentra en un rango de entre 0 y 0,0047 g L^{-1} .
- 25 17. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 13, en el que la concentración de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se encuentra en un rango de entre 0 y 0,0053 g L^{-1} .
18. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 13, en el que la concentración de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se encuentra en un rango de entre 0 y 0,0055 g L^{-1} .

19. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 13, en el que la concentración de $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se encuentra en un rango de entre 0 y $0,001 \text{ g L}^{-1}$.
- 5 20. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 14, en el que la concentración de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ preferida se encuentra en un rango de entre 0 y $0,00225 \text{ g L}^{-1}$.
21. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 15, en el que la concentración de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ preferida se encuentra en un rango de entre 0 y $0,00185 \text{ g L}^{-1}$.
- 10 22. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 16, en el que la concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ preferida se encuentra en un rango de entre 0 y $0,00235 \text{ g L}^{-1}$.
23. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 17, en el que la concentración de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ preferida se encuentra en un rango de entre 0 y $0,00265 \text{ g L}^{-1}$.
- 15 24. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 18, en el que la concentración de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ preferida se encuentra en un rango de entre 0 y $0,00275 \text{ g L}^{-1}$.
25. Medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli*, según reivindicación 19, en el que la concentración de $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ preferida se encuentra en un rango de entre 0 y $0,0005 \text{ g L}^{-1}$.
- 20 26. Uso del medio de cultivo simplificado y optimizado, según reivindicación 1, en procesos de producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina por *Escherichia coli*.
27. Uso del medio de cultivo simplificado y optimizado, según reivindicaciones 2 a 6, en procesos de producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina por *Escherichia coli*.
- 25 28. Uso del medio de cultivo simplificado y optimizado, según reivindicaciones 7 a 12, en procesos de producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina por *Escherichia coli*.
29. Uso del medio de cultivo simplificado y optimizado, según reivindicaciones 13, en procesos de producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina por *Escherichia coli*.

30. Uso del medio de cultivo simplificado y optimizado, según reivindicaciones 14 a 19, en procesos de producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina por *Escherichia coli*.
31. Uso del medio de cultivo simplificado y optimizado, según reivindicaciones 20 a 25, en procesos de producción de etanol e hidrógeno a partir de glicerina por *Escherichia coli*.

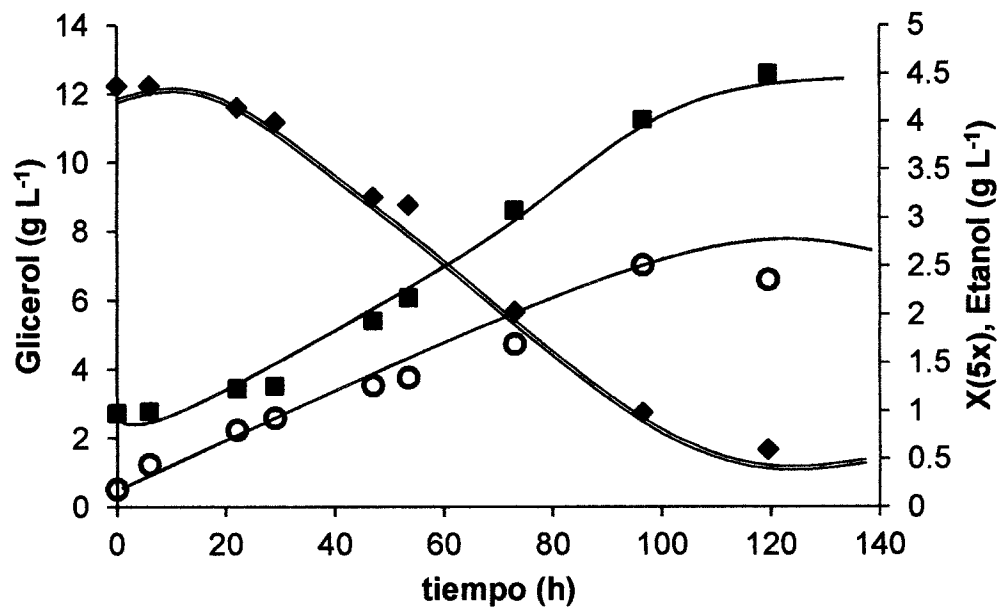


FIGURA 1

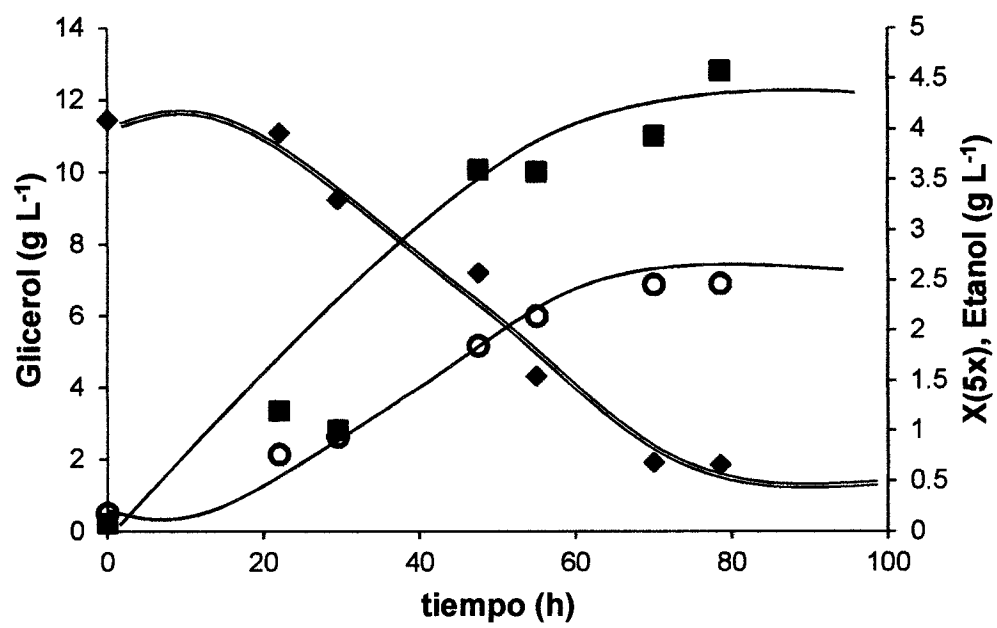


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100896

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/32** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007115228 A2 (RICE UNIVERSITY) 11.10.2007, página 2, línea 29 – página 4, línea 3; Tablas 1 y 2; ejemplo 2; reivindicaciones.	1-31
A	DHARMADI, Y. et al., 'Anaerobic fermentation of glycerol by Escherichia coli: a new platform for metabolic engineering', BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2006, Vol. 94, No. 5, páginas 821-819, ISSN: 0006-3592, todo el documento, en particular, Materiales y Métodos.	1-31
A	SHAMS YAZDANI, S. et al., 'Engineering Escherichia coli for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products', METABOLIC ENGINEERING, 2008, Vol. 10, No. 6, páginas 340-351, ISSN: 1096-7176 (print), ISSN: 1096-7184 (electronic), todo el documento, en particular, Materiales y Métodos.	1-31
A	GONZALEZ, R. et al., 'A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in Escherichia coli', METABOLIC ENGINEERING, 2008, Vol. 10, No. 5, Páginas 234-245, ISSN: 1096-7176 (print), ISSN: 1096-7184 (electronic), todo el documento, en particular, Materiales y Métodos.	1-31
A	MURARKA, A. et al., 'Fermentative utilization of glycerol by Escherichia coli and its implications for the production of fuels and chemicals.', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2008, Vol. 74, No. 4, páginas 1124-1135, ISSN: 0099-2240, todo el documento, en particular, Materiales y Métodos.	1-31
A	TRINH, C.T. et al., 'Metabolic engineering of Escherichia coli for efficient conversion of glycerol to ethanol.', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2009, Vol. 75, No. 21, páginas 6696-6705, ISSN: 0099-2240 (print), ISSN: 1098-5336 (electronic), todo el documento, en particular, Materiales y Métodos.	1-31

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
29.06.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-31	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-31	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	WO 2007115228 A2 (RICE UNIVERSITY)	11.10.2007
D02	DHARMADI, Y. et al., <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , (2006), 94(5): 821-9.	2006
D03	SHAMS YAZDANI, S. et al., <i>Metab. Eng.</i> , (2008), 10(6): 340-51.	2008
D04	GONZALEZ, R. et al., <i>Metab. Eng.</i> , (2008), 10(5): 234-45.	2008
D05	MURARKA, A. et al., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , (2008), 74(4):1124-35.	2008
D06	TRINH, C.T. et al., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , (2009), 75(21): 6696-705.	2009

En D1-D6 se describen diferentes medios de cultivo que contienen glicerina como fuente de carbono para la obtención de etanol e hidrógeno.

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

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

1.1 Reivindicación independiente 1.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un medio de cultivo para la producción de etanol e hidrógeno, a partir de glicerina, por *Escherichia coli* en condiciones anaerobias, que comprende básicamente glicerina como fuente de carbono, las sales inorgánicas Na₂SO₄, NaCl y MgSO₄·7H₂O, y peptona como fuente de nitrógeno. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D6, no se ha divulgado ningún medio de cultivo que comparta las mismas características técnicas del medio reivindicado en la solicitud de patente.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-31 es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1.

2.1.1. En los documentos D1 y D2 que constituyen el estado de la técnica más próximo, se analiza la fermentación anaerobia de la glicerina llevada a cabo por *Escherichia coli* para la producción de etanol e hidrógeno y el efecto de la composición del medio de cultivo sobre dicho proceso de fermentación (cf. D1: página 13, línea 6 – página 14, línea 12; Figuras 1 y 2; reivindicaciones 1-9. D2: Resultados y Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo medio de cultivo para llevar a cabo la fermentación de la glicerina con *E. coli* para producir etanol e hidrógeno.

2.1.3. La solución propuesta es el medio de cultivo de la reivindicación 1. En D1 se analiza el efecto de varios parámetros tales como el pH o las concentraciones de K⁺, Na⁺, (HPO₄)²⁻ y glicerina sobre el metabolismo de la glicerina en *E. coli*. En concreto, altas concentraciones de (HPO₄)²⁻ y K⁺ dificultan la fermentación de la glicerina, efecto que se hace más acusado a valores de pH alcalino. Además, se observa una mejoría en el proceso de fermentación de la glicerina cuando la concentración del compuesto en el medio de cultivo es de 5 o 10 g/L, o incluso mayor (cf. D1: página 2, línea 29 – página 4, línea 3; Ejemplo 2). El medio de cultivo de la invención se caracteriza básicamente porque no contiene iones (HPO₄)²⁻ y K⁺, la concentración apropiada de glicerina está comprendida entre 5 y 50 g/L y su pH se ajusta a valores entre 6,0 y 6,5 (cf. Reivindicaciones, Tablas 1 y 2).

Sobre la base del documento D1, se concluye que la solución propuesta por la solicitud de patente al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por esta razón, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-31 se considera que no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-31 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patente.