

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 443**

21 Número de solicitud: 201700078

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

01.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.08.2018

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

29.08.2018

Fecha de concesión:

20.02.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.02.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**DEIVE HERVA , Francisco Javier ;
SANROMÁN BRAGA, María Ángeles;
RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ , Ana María y
GUTIERREZ ARNILLAS, Esther**

54 Título: **Procedimiento para el incremento de producción de lipasa en cultivos de Halomonas mediante inducción química y biológica**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento para el incremento de la producción de lipasas en cultivos de microorganismos del género Halomonas mediante inducción química y/o biológica. La invención se refiere a un procedimiento de producción incrementada de la enzima lipasa en un organismo del género Halomonas mediante inducción química que comprende el diseño del medio de cultivo mediante la adición del agente químico, preparación del inóculo de Halomonas, crecimiento del cultivo puro de Halomonas y producción de lipasa en presencia del agente químico. O bien, mediante inducción biológica que comprende preparación del medio de cultivo e inóculo de Halomonas, crecimiento del cultivo y producción de lipasa en un cultivo mixto compuesto de Halomonas y del agente microbiano inductor.

ES 2 677 443 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el incremento de producción de lipasa en cultivos de *Halomonas* mediante inducción biológica.

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la microbiología industrial, más específicamente en la producción de biomoléculas a partir de microorganismos extremófilos. Debido a que uno de los mayores problemas de la síntesis enzimática a partir de este tipo de microorganismos radica en los bajos niveles de actividad
10 logrados, se pretende incrementar, mediante inducción biológica, los bajos niveles de producción de lipasa de una cepa halófila aislada recientemente en el sur de España, *Halomonas* sp LM1C (Gutiérrez-Arnillas *et al.*, 2016, New sources of halophilic lipases: Isolation of bacteria from Spanish and Turkish saltworks, *Biochem. Eng. J.* 109, 170-177), demostrando su viabilidad a escala matraz y biorreactor. La lipasa producida
15 mediante este procedimiento puede ser empleada en la industria alimentaria, textil, farmacéutica, de detergentes y de papel, en la producción de biodiesel y de cosméticos y en el tratamiento de aguas residuales (Daiha *et al.*, 2015, Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting, *PLoS ONE* 10 (6)).

20 ESTADO DE LA TÉCNICA

El informe "*Lipase Market by Source (Microbial Lipases, Animal Lipases), Application (Animal Feed, Dairy, Bakery, Confectionery, Others), & by Geography (North America, Europe, Asia-Pacific, Latin America, RoW) - Global Forecast to 2020*", elaborado por *MarketsAndMarkets*[®], prevé que el mercado de lipasas llegue a casi 600 millones de
25 dólares en el año 2020, con una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR, Compound annual growth rate) de 6,5% entre 2015 y 2020. Las lipasas (EC 3.1.1.3) son catalizadores con un alto grado de especificidad y velocidad de reacción, cuya principal función es la hidrólisis de triglicéridos. Además, en medios con baja actividad de agua, ejercen su función catalítica en reacciones de esterificación, transesterificación e

interesterificación. La versatilidad de estas enzimas permite su diversificación en numerosos sectores industriales, impulsando su éxito mundial. El desarrollo industrial promueve la demanda de lipasas por parte de la industria de detergentes, alimentaria, textil, farmacéutica, cosmética, petroquímica, entre otras. Del mismo modo, nuevos sectores emergentes, como el de los biocombustibles, están desarrollando nuevas técnicas de producción más sostenibles gracias al empleo de las lipasas (Houde *et al.*, 2004, *Lipases and their industrial applications: An overview*, *Appl. Biochem. Biotechnol. Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 118, 155-170).

Las empresas líderes en el mercado de lipasas como *Novozymes*[®] (Dinamarca), *Koninklijke DSM N.V.*[®], (Holanda), *Chr. Hansen Holdings A/S*[®] (Dinamarca), y *E. I. Du Pont de Nemours and Company*[®] (Estados Unidos), orientan sus esfuerzos a la búsqueda de nuevas fuentes de producción más competitivas así como nuevas aplicaciones. Aunque existen lipasas de origen animal y vegetal, se ha demostrado que las lipasas microbianas presentan un mayor interés debido a ventajas tales como su gran diversidad catalítica, sus elevados rendimientos, y la posibilidad de mejorar la competitividad de los procesos de producción mediante la modificación genética o la utilización de residuos como sustratos (Sangeetha *et al.*, 2011, *Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview*, *Res. J. Microbiol.*, 1-24).

La necesidad de nuevas enzimas más resistentes, que mantengan su capacidad de catálisis en condiciones extremas habitualmente encontradas en los procesos industriales, ha promovido el interés de buscar nuevos organismos productores entre los extremófilos. La mayoría de ellos son microorganismos que pueden ser clasificados atendiendo al tipo de condiciones extremas en las que habitan. Así, los organismos termófilos o psicrófilos son aquellos con un óptimo de temperatura de crecimiento superior a 60 °C o por debajo de 15 °C, respectivamente. De igual modo, se han encontrado organismos sobreviviendo a presiones por encima de 130 MPa (piezófilos), mientras que los organismos radiófilos como *Deinococcus radiodurans* soportan elevados niveles de radiación (Rothschild and Mancinelli, 2001, *Life in extreme environments*, *Nature* 409, 1092-1101). Atendiendo a su supervivencia en hábitats con niveles altos (> 9) y bajos (cerca de 0) de pH, son típicos los alcalófilos y acidófilos, respectivamente, y aquellos organismos que son capaces de crecer en ambientes con

bajo contenido en agua se clasifican como xerófilos. Por último, los organismos halófilos se desarrollan a concentraciones elevadas de sal (entre 2 y 5 M de NaCl) (Kamekura *et al.*, 1998, Diversity of extremely halophilic bacteria, Extremophiles 2, 289-295).

5 Como ya se ha mencionado, el principal atractivo de estos microorganismos radica en su capacidad de sintetizar enzimas que permanecen activas al operar en las condiciones extremas en las que el microorganismo es capaz de desarrollarse. En este sentido, las haloenzimas ejercen su acción catalítica no sólo a altas concentraciones de sal sino también en presencia de disolventes orgánicos y temperaturas elevadas (Oren,
10 2010, Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms, Environ. Technol. 31, 825-834). Aparte de estas características, la diversidad filogenética observada en halófilos, que incluye desde *archaeas*, bacterias y hongos hasta protistas, protozoos y algas, es otro atractivo para asegurar la existencia de enzimas con características adecuadas para una determinada aplicación.

15 Una de las ventajas de la producción microbiana de lipasa es que el medio de cultivo y las condiciones operacionales pueden ser optimizados para maximizar la biosíntesis enzimática. Sin embargo, en la mayoría de los casos los niveles de producción son bajos y es necesario el empleo de agentes inductores que generan aumentos en la producción enzimática en los cultivos microbianos (Benjamin and Pandey, 1996,
20 Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*, Bior.Technol., 55, 167-170). La elección del agente inductor se realiza en base a la enzima de interés. La mayoría de las sustancias empleadas utilizadas como inductores en cultivos microbianos son químicas o bien de naturaleza orgánica, de cualquier modo, se trata de un aumento en los costes de producción. En el caso de las lipasas, diversos estudios
25 muestran buenos resultados de inducción con compuestos de naturaleza lipídica.

Los agentes inductores se pueden diferenciar en función del mecanismo de acción. En la mayoría de los casos el inductor empleado tiene efecto directo en la actividad catalítica. De modo que, los inductores ampliamente utilizados en la producción de lipasas son los ácidos grasos, los triglicéridos y algunos ésteres. En el caso de los ácidos
30 grasos, existe una relación entre el tamaño de cadena y la producción enzimática. Se

observa una mayor actividad lipolítica con el aumento de la longitud de la cadena, pudiendo estar relacionada con la solubilidad de los ácidos grasos en el agua y el fenómeno de la activación interfacial. También, se ha observado que los ácidos grasos inducen mayores niveles de producción en comparación con otros compuestos de naturaleza lipídica (Obradors *et al.*, 1993, Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*, *Biotechnol. Letters*, 15, 357-360). Los triglicéridos como el aceite de oliva, de girasol, de palma, de coco, de maíz, etc., exhiben buenos resultados en cultivos para la producción de lipasas (Gulati R, Saxena RK, Gupta *et al.*, 1999, Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis, *Proc. Biochem.*, 35, 459-464). Por otro lado, otros compuestos que pueden contribuir a aumentar la actividad lipolítica extracelular debido a su capacidad para aumentar la permeabilidad de la membrana celular y facilitar la liberación de las enzimas al medio, son los surfactantes (Domínguez *et al.*, 2003, Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*, *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*, 78, 1166-1170).

Existe otro método de inducción que puede sustituir o bien coexistir con la inducción química. La inducción biológica ha sido ampliamente estudiada en la producción de lacasas y permite un aumento de los niveles de producción de lacasas mediante cultivo mixtos (Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Método para el incremento de la producción de lacasa en *Corioloopsis* mediante un inductor biológico. Patente española 2 365 460, 13-03-2010). Sin embargo, no existe referencia acerca de procesos de inducción biológica en cultivos microbianos para la producción de lipasas. En realidad, la ausencia de estudios centrados en el campo de las lipasas halófilas ha impedido hasta la fecha su comercialización a gran escala. Por ello, la investigación de agentes inductores de la actividad lipolítica y la implementación a escala biorreactor de cultivos de producción de lipasa halófila es crucial para contribuir al desarrollo de nuevos procesos catalíticos con menor impacto ambiental que los métodos convencionales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso de producción de lipasa por la bacteria del género *Halomonas* mediante inducción biológica que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación del medio de cultivo;
- b) preparación del inóculo de *Halomonas*;
- c) crecimiento de un cultivo y producción de lipasa en un cultivo mixto compuesto de *Halomonas* y del agente microbiano inductor;

10 donde el cultivo mixto de *Halomonas* y agente inductor se prepara en la etapa b) de preparación del inóculo o bien en la etapa c) de crecimiento del cultivo donde el microorganismo inductor se añade tras un tiempo de crecimiento del microorganismo *Halomonas*.

La composición base del medio de cultivo es (CECT 17 modificado):

15 7,5 g/L de peptona de caseína, 10,0 g/L de extracto de levadura, 3,0 g/L de citrato trisódico, 2,0 g/L de KCl, 20g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 mg/L de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ y 150,0 g/L NaCl.

Es conveniente destacar que la composición base del medio de cultivo puede sufrir ciertas modificaciones, es decir, se puede optar por el empleo de otras composiciones base del medio de cultivo distintas al listado en el párrafo anterior.

En una realización preferente, para la inducción biológica se pueden emplear especies de microorganismo pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Actinopolyspora*, *Alteromonas*, *Arhodomonas*, *Bacillus*, *Chromohalobacter*, *Dichotomicrobium*, *Dunaliella*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Haloarcula*, *Halobacillus*, *Halobacterium*,
25 *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halomonas*, *Halorhabdus*, *Halorubum*, *Haloterrigena*, *Halothermothrix*, *Halovibrio*, *Marinobacter*, *Marinococcus*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Nesterenkonia*, *Nocardiopsis*, *Ocenoabacillus*, *Pelagibacterium*, *Pseudalteromonas*, *Pseudomonas*, *Salinicoccus*,

Salinivibrio, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus*, *Vibrio* u otro microorganismo capaz de crecer en concentraciones elevadas de sal: 10-15% de NaCl.

Durante el procedimiento de producción de lipasas, el medio CECT17 modificado se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos.

- 5 En una realización más preferente, el inóculo de microorganismos del género *Halomonas* (2-5 % v/v) se añade al medio de cultivo seleccionado, esterilizado y atemperado. La inducción biológica, se puede hacer un cultivo mixto inoculando células activas del género *Halomonas* y del microorganismo inductor con una concentración 2-5 % v/v, o bien se puede añadir inóculo del organismo inductor (2-5 %
10 v/v) tras un tiempo de crecimiento del organismo del género *Halomonas*.

El crecimiento del cultivo de células del género *Halomonas* se puede realizar en matraces Erlenmeyer de 50-2.000 mL, los cuales serán tapados con tapón de celulosa que permita la aireación pasiva. El cultivo realizado en este tipo de recipientes se llevará a cabo en *shakers* que permitan controlar la temperatura (10-40 °C) y la
15 agitación (50-200rpm). Otro tipo de vasija para el cultivo de *Halomonas* puede ser un biorreactor con diferentes configuraciones: tipo *air-lift* o tipo tanque con agitación mecánica. En ambos casos, el volumen de trabajo puede ser de 1-10 L y estar conectados a una unidad de control que permite fijar la velocidad de agitación (50-700 rpm), la aireación (0,25-1 vvm) y la temperatura de operación (10-40 °C).

- 20 Para evitar la formación de espuma se adiciona un antiespumante que puede ser del tipo emulsión de un polímero de silicona activa y un emulsionante no iónico. La adición de dicho antiespumante se puede realizar de forma automática mediante una sonda de detección de espuma en el interior de las vasijas de cultivo conectada a un controlador que permita regular los ciclos de bombeo del antiespumante a la vasija de
25 reacción.

Durante crecimiento del cultivo y producción de lipasa en presencia del agente químico o biológico, el control de la biomasa y la actividad lipolítica comprende:

- a) medir la biomasa y la actividad lipolítica tomando muestras de las vasijas de cultivo

b) si la actividad lipolítica en la vasija de cultivo se encuentra alrededor de la actividad óptima, se detiene la reacción biológica y proceder a la separación de la biomasa del medio de cultivo por centrifugación y conservar la disolución sobrenadante a 20 °C, ya que su producción es extracelular.

5 La herramienta utilizada para determinar la biomasa y la actividad lipolítica es la espectrofotometría ultravioleta, considerando tanto los valores de concentración celular por calibrado de peso seco (turbidimetría a 600 nm) como los de producción enzimática. En este último caso, se monitoriza la hidrólisis de *p*-nitrofenil laurato (2,5
10 *et al.*, 2005, Production of thermostable lipolytic activity by *Thermus* species, Biotechnol. Prog. 21, 1198-1205) y considerando una unidad de actividad como la cantidad de enzima que produce un 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto.

Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Seguimiento de la actividad lipolítica (U/L) *Halomonas* sp. LM1C en cultivo matraz mediante inducción biológica de *Staphylococcus equorum* AMC7. Se muestra la actividad lipolítica de un cultivo puro de *Halomonas* sp. LM1C como referencia. Las
20 barras de error expresan la desviación estándar.

Figura 2. Seguimiento de la actividad lipolítica (U/L) de *Halomonas* sp. LM1C en cultivo en biorreactor de tanque agitado mediante inducción biológica de *Staphylococcus equorum* AMC7 y seguimiento de la biomasa (g/L) del cultivo mixto. Las líneas representan el ajuste de los datos a un modelo logístico.

25

EJEMPLOS DE UNA REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1

Producción de lipasa por Halomonas sp. LM1C mediante inducción biológica por Staphylococcus equorum AMC7 en matraz Erlenmeyer de 250 mL

En primer lugar se prepara un cultivo de *Halomonas sp. LM1C* y *Staphylococcus equorum AMC7* de 50 mL con medio CECT17 modificado (pH 6,9) a 14 °C y 150 rpm durante 24 horas, que servirá de inóculo para el matraz (3 % v/v). A continuación, se esteriliza (120 °C durante 20 minutos) 50 mL de medio CECT17 modificado (pH 6,9) junto con el matraz Erlenmeyer de 250 mL. El matraz se llena con el medio manteniendo las condiciones de esterilidad y se inocula en una proporción del 3% v/v. Se utiliza un *shaker* (Thermo Fischer Scientific® MAxQ 8000) para regular los parámetros operacionales a 14 °C de temperatura y 150 rpm de agitación.

Transcurridas 144 horas y verificados los niveles máximos de producción en torno a las 3.000 U/L (Figura 1), se detiene el proceso biológico para proceder a la eliminación de las células del medio de cultivo por centrifugación a 10.000 rpm, y conservándose el caldo de cultivo libre de células a -20 °C.

15 Ejemplo 2

Producción de lipasa por Halomonas sp. LM1C mediante inducción biológica por Staphylococcus equorum AMC7 en biorreactor de tanque agitado

En primer lugar se prepara un cultivo de *Halomonas sp. LM1C* y *Staphylococcus equorum AMC7* de 50 mL con medio CECT17 modificado¹ (pH 6,9) a 14 °C y 150 rpm durante 24 horas, que servirá de inóculo para el biorreactor (3 % v/v). A continuación, se esteriliza (120 °C durante 20 minutos) 1,5 L de medio CECT17 junto con el biorreactor de tanque agitado equipado con un impulsor dual tipo Rushton. El biorreactor se llena con el medio manteniendo las condiciones de esterilidad. Se utiliza una unidad de control (Biostat B, Braun Melsungen, Germany) para regular los parámetros operacionales. Es importante conectar la sonda de espuma para evitar los efectos negativos originados por la formación de espuma en el medio antes de fijar las condiciones operacionales en 300 rpm de agitación mecánica y de 0,3 vvm de aireación. Esta sonda está conectada a un depósito que contiene antiespumante SE-15 de Sigma Aldrich®. Una vez fijada la temperatura del biorreactor a 14 °C se lleva a cabo

la inoculación con 50 mL de células viables (24 horas) de *Halomonas* sp. LM1C y *Staphylococcus equorum* AMC7.

Transcurridas 240 horas y verificados los niveles máximos de producción en torno a las 1.400 U/L (Figura 2), se detiene el proceso biológico para proceder a la eliminación de las células del medio de cultivo por centrifugación a 10.000 rpm, y conservándose el caldo de cultivo libre de células a -20 °C.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el incremento de producción de lipasa en cultivos de *Halomonas* mediante inducción biológica que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación del medio de cultivo;
- 5 b) preparación del inóculo de *Halomonas*;
- c) crecimiento del cultivo y producción de lipasa en un cultivo mixto compuesto de *Halomonas* y del agente microbiano inductor;

donde el cultivo mixto de *Halomonas* y agente microbiano inductor se prepara en la etapa b) de preparación del inóculo o bien en la etapa c) de crecimiento de cultivo
10 donde el microorganismo inductor se añade tras un tiempo de crecimiento del microorganismo *Halomonas*.

2. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por el inductor biológico es un microorganismos seleccionado entre los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Actinopolyspora*, *Alteromonas*, *Arhodomonas*, *Bacillus*, *Chromohalobacter*,
15 *Dichotomicrobium*, *Dunaliella*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Haloarcula*, *Halobacillus*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halomonas*, *Halorhabdus*, *Halorubum*, *Haloterrigena*, *Halothermothrix*, *Halovibrio*, *Marinobacter*, *Marinococcus*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Nesterenkonia*, *Nocardiopsis*, *Ocenoabacillus*, *Pelagibacterium*, *Pseudalteromonas*,
20 *Pseudomonas*, *Salinicoccus*, *Salinivibrio*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus* y/o *Vibrio*.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la etapa b) y c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del agente biológico se inocula un cultivo puro o mixto en una proporción comprendida entre 2 y 5 % v/v.

25 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la etapa c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del biológico se realiza en vasijas tipo matraces Erlenmeyer de 50-2000 mL.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la etapa c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del biológico se realiza en vasijas

tipo biorreactor con configuración *air-lift* o tipo tanque con agitación mecánica, con volumen de trabajo en el rango de 1-10 L.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia biológico utiliza velocidades de
5 agitación del cultivo comprendidas entre 50- 700 rpm.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la etapa c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del agente biológico se emplea niveles de aireación del cultivo comprendidos en el rango 0,25-1 vvm.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la etapa c) de
10 crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del agente biológico se opera a temperaturas de cultivo comprendidas entre 10 y 40 °C.

9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la etapa c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del agente biológico se realiza en presencia de un antiespumante en un rango 0,01-1% (v/v).

15 10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la etapa c) de crecimiento del cultivo de *Halomonas* en presencia del agente biológico comprende:

a) determinación de la biomasa y la actividad lipolítica mediante toma de muestras del cultivo

b) cuando la actividad lipolítica en el cultivo se encuentre alrededor de la actividad
20 óptima, dependiente del inductor empleado, se detiene la reacción biológica y se procede a la separación de la biomasa del medio de cultivo por centrifugación y conservación de la disolución sobrenadante a 20 °C.

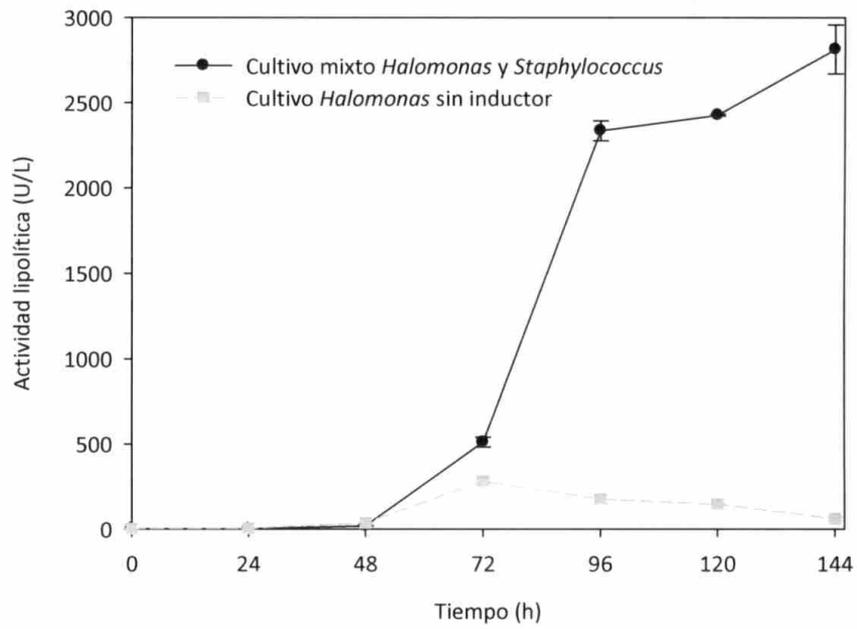


Figura 1

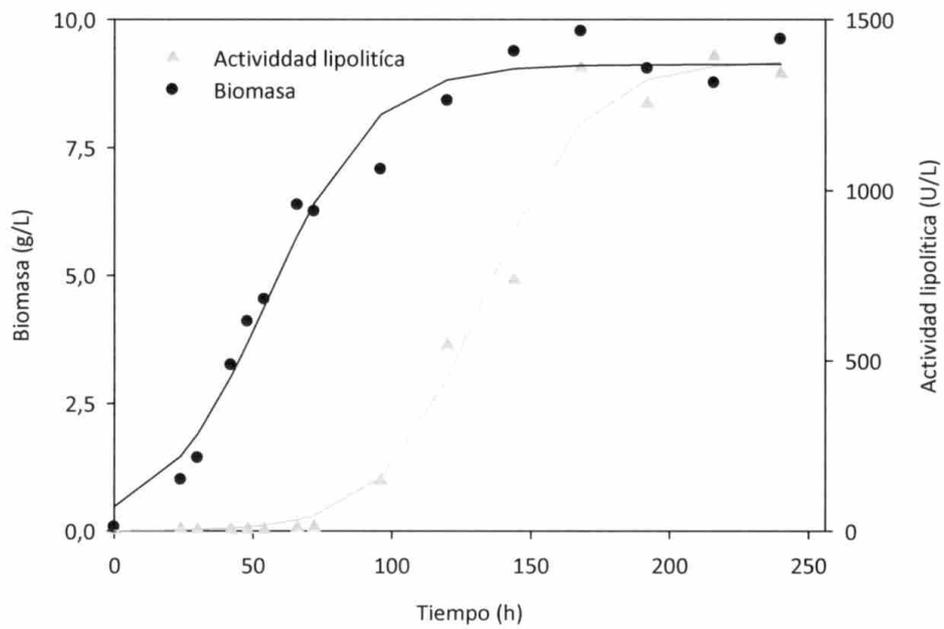


Figura 2



- ②① N.º solicitud: 201700078
②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/20** (2006.01)
C12N1/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	Gutierrez-Arnillas E et al. NEW SOURCES OF HALOPHILIC LIPASES: ISOLATION OF BACTERIA FROM SPANISH AND TURKISH SALTWORKS. 15/05/2016, Vol. 109, Páginas 170-177, ISSN 1369-703X(print) ISSN 1873-295X(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.bej.2016.01.015>. Materiales y Métodos; Resultados y Discusión. Materiales y Métodos; Resultados y Discusión.	1, 3, 4, 6-13
Y	Deive Francisco J et al. STRATEGIES FOR IMPROVING EXTRACELLULAR LIPOLYTIC ENZYME PRODUCTION BY THERMUS THERMOPHILUS HB27. 30/06/2009, Vol. 100, Páginas 3630-3637, ISSN 0960-8524, <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2009.02.053>. Métodos; Resultados. Métodos; Resultados.	1, 3, 4, 6-13
A	Dominguez Alberto et al. EFFECT OF LIPIDS AND SURFACTANTS ON EXTRACELLULAR LIPASE PRODUCTION BY YARROWIA LIPOLYTICA.. 31/10/2003, Vol. 78, Páginas 1166-1170, ISSN 0268-2575 (ISSN print). Todo el documento. Todo el documento.	1-13
A	EP 1475431 A1 (COGNIS DEUTSCHLAND GMBH) 10/11/2004, Todo el documento.	1-13
A	SHIMADA Y et al. INDUCTION OF GEOTRICHUM-CANDIDUM LIPASE BY LONG-CHAIN FATTY ACIDS. 30/11/1991, Vol. 74, Páginas 77-80, ISSN 0922-338X. Todo el documento. Todo el documento.	1-13

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
11.10.2017

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201700078

②² Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.2017

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N9/20** (2006.01)
C12N1/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	De Lourdes Moreno Maria et al. HALOPHILIC BACTERIA AS A SOURCE OF NOVEL HYDROLYTIC ENZYMES. 28/02/2013, Vol. 3, Páginas 38-51, ISSN 2075-1729(print) ISSN 2075-1729(electronic), <DOI: doi: 10.3390/life3010038>. Todo el documento. Todo el documento.	1-13

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 n.º:

Fecha de realización del informe
11.10.2017

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/5

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, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.10.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2, 5, (6-13) (en parte)	SI
	Reivindicaciones 1, 3, 4, (6-13) (en parte)	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	Gutiérrez-Arnillas, E. et al., <i>Biochem. Eng. J.</i> , (2016), <u>109</u> :170-7.	15.05.2016
D02	Deive, F.J. et al., <i>Bioresour Technol.</i> (2009), <u>100</u> (14): 3630-7.	30.06.2009
D03	Domínguez, A. et al, <i>J. Chem. Technol. Biotechnol.</i> , (2003), <u>78</u> (11): 1166-70.	31.10.2003
D04	EP 1475431 A1 (COGNIS DEUTSCHLAND GMBH)	10.11.2004
D05	Shimada, Y. et al., <i>J. Ferment. Bioeng.</i> , (1992), <u>74</u> (2): 77-80.	30.11.1991
D06	De Lourdes Moreno, M. et al., <i>Life (Base)</i> , (2013), <u>3</u> (1): 38-51.	28.02.2013

En D01 se describe una bacteria de la especie *Halomonas* sp. productora de enzimas lipolíticas.

En D02-D06 se describen métodos para mejorar la producción de enzimas lipolíticas a partir de diferentes microorganismos.

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 Reivindicaciones independientes 1 y 2.**

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 2, y el de las reivindicaciones dependientes 2-4 comprenden características técnicas que cumplen los requisitos de novedad con respecto al estado de la técnica anterior, representado por los documentos D01-D06.

En dicho estado de la técnica no se ha divulgado ningún procedimiento de producción de lipasa en cultivos de *Halomonas* sp. con las características técnicas referidas en dichas reivindicaciones.

Por consiguiente, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-13 es nuevo (Art. 4.1., 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. El objeto de la reivindicación 1 y el de las reivindicaciones dependientes 3, 4, 6-13 comprenden características técnicas que no cumple el requisito de actividad inventiva con respecto al estado de la técnica anterior, representado por los documentos D01-D02.

Puede considerarse que el problema técnico a resolver es la provisión de un nuevo método para incrementar la producción de lipasa en cultivos de *Halomonas* sp.

En D01 se describe el aislamiento e identificación de la estirpe LM1C de *Halomonas* sp. productora de lipasas halofílicas extracelulares y se analizan las condiciones óptimas de pH, temperatura y salinidad en cultivos de dicha estirpe con las que se obtiene una producción de enzimas lipolíticas mayor (cf D01: Materiales y métodos; Resultados y discusión).

La diferencia técnica entre el método reivindicado en la solicitud y el descrito en D01 radica en la inducción química de la producción de lipasa mediante la adición de un agente químico en el medio de cultivo de *Halomonas* sp (reivindicaciones 1 y 3). Sin embargo, en el estado de la técnica se han descrito diferentes procedimientos para mejorar la obtención de enzimas lipolíticas extracelulares mediante diferentes microorganismos productores basados en la adición al medio de cultivo de agentes químicos, inductores de la producción de dichas enzimas (cf. D02-D05). Concretamente, en D02 se describe el uso de dos tipos de agentes inductores de la producción de lipasa, agentes lipídicos (aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de coco y/o tributirina) y agentes surfactantes (Tween 80 y/o Triton X-100) (cf. D02: Métodos; Resultados).

Por consiguiente, se puede estimar que, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia llegaría mediante la mera combinación de las enseñanzas divulgadas en D01 y D02 a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente.

Por todo ello, se considera que las reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes 3, 4, 6-13 no son inventivas sobre la base de los documentos D01-D02.