

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 054 093**

21 Número de solicitud: 202430582

51 Int. Cl.:

C12P 7/18

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.07.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.01.2026

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100,00%)
Avenida Blasco Ibañez, 13
46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

PÉREZ RODRIGO, Marta;
CARRASCO SORLI, Pedro Miguel y
MARCO PICÓ, Francisco

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE RIBITOL, XILITOL Y OTROS POLIOLES MEDIANTE CULTIVO DE MICROALGAS TREBOUXIALES Y WATANABEALES, BIOMASA RESULTANTE DEL CULTIVO, Y SUS USOS**

57 Resumen:

Se describe un método para producir polioles o una mezcla de polioles a partir de microalgas, que comprende la etapa de cultivar las microalgas en condiciones y por un período de tiempo suficiente para producir dichos polioles, caracterizado porque las microalgas pertenecen a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales. Se describe también el uso de dichas microalgas, así como el de la biomasa obtenida por el cultivo de las mismas, como edulcorante, en productos higienizantes, en cosmética, y en productos para el cuidado facial y corporal.

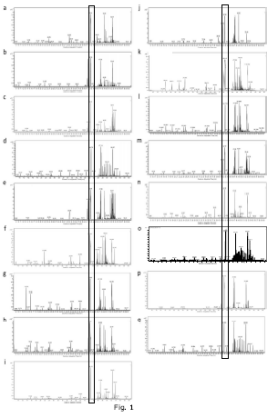


Fig. 1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE RIBITOL, XILITOL Y OTROS POLIOLES MEDIANTE CULTIVO DE MICROALGAS TREBOUXIALES Y WATANABEALES, BIOMASA RESULTANTE DEL CULTIVO, Y SUS USOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de obtención de ribitol, xilitol y otros polioles que tienen utilidad como edulcorantes mediante el cultivo de microalgas Trebouxiales y Watanabeales.

DESCRIPCIÓN

El uso de edulcorantes como alternativa al uso de azúcar en alimentos procesados y bebidas es un tema muy estudiado y discutido en la literatura científica. El consumo excesivo de azúcar se ha relacionado con un mayor riesgo de enfermedades crónicas, como la obesidad, la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer.

Esta problemática se acentúa especialmente en los alimentos procesados, que suelen contener grandes cantidades de azúcar para mejorar su sabor. La creciente preocupación por la obesidad y la diabetes, cuya reducción es una gran prioridad de la salud pública, ha llevado a la búsqueda de alternativas más saludables al azúcar en los alimentos procesados. Los edulcorantes no nutritivos ofrecen una alternativa con menos calorías y menos efectos negativos sobre la salud. Los edulcorantes sustitutivos de la glucosa también tienen otras aplicaciones en la industria alimentaria: mejora de la calidad de los alimentos, reducción de costos de producción y mejora de la vida útil de los productos. Dentro de los edulcorantes más utilizados en la industria alimentaria como alternativa a la sacarosa podemos encontrar moléculas de producción artificial, como la sacarina, aspartamo, sucralosa, acesulfamo de potasio y neotamo.

Hoy por hoy, no hay evidencias claras de que los edulcorantes artificiales presenten un riesgo significativo para la salud. De hecho, un consumo responsable puede suponer ventajas dada la notable reducción del contenido calórico, contribuyendo a la reducción de peso y a evitar alteraciones glucémicas que terminen en prediabetes o diabetes tipo 2. Otros estudios tratan

de analizar los efectos de los edulcorantes artificiales a largo plazo sobre la apetencia y la dieta de las personas. El elevado poder edulcorante de los edulcorantes artificiales pueden generar estímulos en nuestro sistema neurológico, una especie de activación de mecanismos de recompensa que puede generar perpetuación en nuestro umbral de dulzor y apetencia.

En este sentido, para tratar de solventar la creciente problemática relacionada con el uso de los edulcorantes artificiales que hoy conocemos, surgen otras alternativas, como es el caso de determinados productos naturales de origen biológico, como el esteviol, eritritol, xilitol y ribitol, de uso creciente en la industria alimentaria.

De estos edulcorantes de origen natural, los pentitales como el ribitol (también llamado adonitol) y el xilitol tienen ventajas frente a otros utilizados en la industria alimentaria, como su sabor similar al del azúcar, un bajo índice glucémico, su bajo contenido calórico y sus propiedades antibacterianas y de prevención de la caries dental. Debido a estas ventajas, el ribitol y el xilitol se utilizan cada vez más como alternativa natural y saludable a los edulcorantes artificiales en la industria alimentaria.

Los pentitales se puede encontrar de forma natural en la corteza de abedul (*Betula*), en algunas plantas como la *Adonis vernalis* y en algunas frutas y verduras (plátano, uva, ciruela amarilla, fresa, frambuesa, lechuga, zanahoria, coliflor, cebolla, etc.), aunque en pequeñas cantidades, cuestión que ha motivado el uso de otros sistemas de producción a escala industrial, que implican la transformación de ribosa o xilosa, ya sea mediante hidrogenación catalítica o bien mediante fermentación microbiana, que presentan costes elevados de producción.

La presente invención surge porque los inventores han identificado la capacidad de las microalgas Trebouxiales y Watanabeales de sintetizar una alta cantidad de pentitales y otros polioles. Esta capacidad abre la posibilidad del uso de las microalgas de estos órdenes como fuentes de producción de edulcorantes de una forma sostenible y mucho más económica. Pentitales como el ribitol, el xilitol y otros polialcoholes (también llamados azúcares alcoholes) tienen la ventaja de tener una menor capacidad calórica que el azúcar, pero se obtienen a nivel industrial en procesos medioambientalmente y económicamente costosos. El uso de cultivos de microalgas Trebouxiales y Watanabeales como productores de edulcorantes constituye una aproximación con menores costos y más sostenible, con una mínima generación de residuos favorables para el medio ambiente.

Descripción detallada de la invención

El proceso de producción de xilitol/ribitol a nivel industrial generalmente involucra el uso de xilosa/ribosa/arabinosa como molécula precursora, que se obtiene a partir de la materia prima lignocelulósica, como la corteza de abedul, el maíz, la avena, la paja de trigo y las semillas de algodón, entre otras materias primas. En la mayoría de los casos la transformación de azúcar a polialcohol a nivel industrial se realiza mediante síntesis química por hidrogenación catalítica de pentosas. Sin embargo, en la actualidad existen también métodos alternativos de producción de polialcoholes por vía biotecnológica mediante la fermentación de xilosa por cepas de levaduras como *Debaryomyces hansenii*, *Candida* sp., o *Pichia* sp.

Ambos métodos presentan algunas desventajas. El método más común, la hidrogenación catalítica de pentosas, puede ser costoso y consume una gran cantidad de energía. Por otro lado, los métodos de obtención de polialcoholes a partir de residuos agroindustriales y fermentación microbiana mediante bacterias o levaduras y sus enzimas pueden requerir un mayor tiempo y costos en la purificación del producto final, lo que puede hacerlos menos rentables. Además, los microorganismos utilizados en la fermentación pueden ser sensibles a las condiciones del proceso, lo que puede afectar la eficiencia y la calidad del producto final. Las levaduras productoras de pentitol presentan una baja tolerancia a compuestos como furanos y ácido acético, que pueden ser tóxicos para estos microorganismos. Por tal motivo, si la fuente de carbono se obtiene de biomasa lignocelulósica es importante evaluar la presencia de estos compuestos inhibidores, lo cual es costoso.

La producción de xilitol y ribitol en España es aún incipiente y se concentra en pequeñas empresas dedicadas a la producción de edulcorantes naturales y productos de cuidado personal. Sin embargo, en otros países como Finlandia, China y Estados Unidos, la producción se ha expandido significativamente en las últimas décadas y se estima que seguirá creciendo en el futuro. Por ejemplo, en Finlandia, el xilitol es producido en grandes cantidades a partir de la pulpa de abedul, siendo uno de los mayores productores y exportadores a nivel mundial. En China, la producción de xilitol y ribitol a partir de residuos agrícolas también se ha investigado ampliamente y se espera que tenga un gran potencial de producción en el futuro. A nivel internacional, el mercado global de estos polialcoholes ha experimentado un crecimiento significativo en los últimos años debido a la creciente

demanda de productos alimenticios y de cuidado personal con bajos contenidos de azúcar. Se espera que la demanda continúe creciendo en los próximos años impulsada por la creciente conciencia sobre la salud y la búsqueda de alternativas naturales al azúcar, y a los edulcorantes artificiales como la sacarina, aspartamo, sucralosa, acesulfamo de potasio y neotamo.

En el estado de la técnica podemos encontrar, como documento más frecuentemente citado de entre los que hacen referencia a métodos biológicos para la obtención de xilitol por medio de algas, la publicación "Production of xilitol by recombinant microalgae", de Pourmir Azadeh *et al.*, en Journal of Biotechnology vol. 165, issues 3-4, 10 June 2013, páginas 178-183. Este documento divulga la modificación del genoma del cloroplasto de la microalga verde eucariota *Chlamydomonas reinhardtii* para producir xilitol mediante la introducción de un gen que codifica una xilosa reductasa del hongo *Neurospora crassa*. Sin embargo, en este documento se hace uso de un alga específica, que además está modificada genéticamente, para la obtención de xilitol, compuesto que la variedad silvestre de esta alga no genera en cantidades detectables.

También, la publicación internacional WO2018112634A1 divulga el cultivo de la especie de hongo *Metschnikowia* para producir xilitol a partir de xilosa. En las condiciones preferidas, el cultivo produce 0,1 g por litro y por hora de xilitol a partir de xilosa cuando se cultiva en condiciones anaerobias a 30 °C durante 3 días, en un medio que contiene xilosa.

Asimismo, la publicación "Xylitol Production: Identification of New Producing Yeasts", por Clara Vida G.C. Carneiro *et al.*, en Microorganisms 2019, 7(11), 484, describe un estudio en el que los autores seleccionaron 960 cepas de levaduras con objeto de seleccionar aquellas con mayor capacidad de crecer en un medio que contenía xilosa como única fuente de carbono. Las seis mejores cepas consumidoras de xilosa se identificaron como *Meyerozyma* spp., mostrando *W. anomalus* el mayor rendimiento en producción de xilitol, con 0.83 g de xilitol/g de xilosa en el hidrolizado.

Por último, en el estado de la técnica también podemos encontrar producción de ribitol a partir de glucosa u otros azúcares por fermentación del hongo *Trichosporonoides* en la publicación internacional WO9823766A1. Para ello se utiliza un medio acuoso que contiene azúcar en condiciones aeróbicas.

Por ello, aún existe la necesidad de encontrar fuentes alternativas de producción de ribitol y xilitol, lo cual es de gran importancia debido a la creciente demanda de este edulcorante natural en la industria alimentaria y necesita de soluciones innovadoras para la producción sostenible de ribitol y xilitol, que permita promover la transición hacia una economía circular y baja en carbono.

Este problema ha sido resuelto por los inventores, que han desarrollado un método para obtener polioles o una mezcla de polioles a partir de microalgas que pertenecen a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales.

En consecuencia, en un primer aspecto la invención se dirige a un método de obtención de polioles o una mezcla de polioles a partir de microalgas que comprende la etapa de cultivar las microalgas en un medio de cultivo, en condiciones de cultivo y por un período de tiempo de cultivo suficiente para producir una biomasa que contiene dichos polioles, caracterizado porque las microalgas pertenecen a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales.

En un segundo aspecto, la invención se dirige al uso de la biomasa resultante del cultivo como edulcorante, y en particular, en la fabricación de chicles y caramelos sin azúcar, en productos horneados y postres, en productos lácteos, en bebidas sin azúcar, en suplementos nutricionales, en chocolates y dulces sin azúcar, en salsas y aderezos, en chocolates para perros, en pastas de dientes y enjuagues bucales, en productos farmacéuticos, etc, así como también en cosmética, por ejemplo en productos para la piel, el cabello y maquillaje, etc (listas no exhaustivas).

En un tercer aspecto, la invención se dirige al uso de las propias microalgas pertenecientes a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales como edulcorantes o en cosmética. Esto se debe a que los inventores han identificado que, si bien las microalgas en general no contienen cantidades significativas de azúcares alcoholes, sorprendentemente las microalgas de los órdenes citados sí que las contienen en cantidades significativas, cantidades que en cualquier caso se ven notablemente incrementadas cuando se les aplica el método de la invención. Pero incluso sin aplicarles el método de la invención, las microalgas de estos órdenes ya contienen un nivel significativo de azúcares alcoholes, por lo que pueden ser utilizadas como edulcorantes o en productos cosméticos sin necesidad de ser cultivadas en condiciones específicas de inducción.

La presente invención aporta dos elementos diferenciales: En primer lugar, los investigadores han identificado que es posible usar microalgas como sistema de producción de ribitol y xilitol, con la ventaja de que el escalado de su producción en biorreactores supondría la eliminación de la dependencia de sistemas industriales de deshidrogenación catalítica de D-xilosa u otros azúcares, intensivos en consumo energético, así como la problemática de costes asociada al uso de catalizadores caros, como los Niquel Raney utilizados en los sistemas industriales convencionales de producción de ribitol y xilitol. El segundo elemento diferenciador lo constituyen el tipo de microalgas a utilizar, puesto que las microalgas liquénicas Trebouxiales y Watanabeales presentan como principal potencial la producción de ribitol y xilitol en niveles mucho más importantes que otras fuentes de origen vegetal analizadas hasta la fecha y lo hacen de manera natural en grandes cantidades, algo que las diferencia sustancialmente de otras formas de producción biotecnológica mencionadas. Ambos elementos hacen que el uso de este tipo de microalgas pueda constituir un nuevo sistema de producción alternativo de ribitol y xilitol en el sector agroalimentario medioambientalmente más sostenible que los métodos de fabricación anteriormente mencionados.

Por otro lado, también hay que tener en cuenta que el tratamiento de residuos vegetales con productos químicos y microorganismos es un procedimiento más caro y que genera más residuos que su sustitución por microalgas crecidas en condiciones controladas. En consecuencia, el procedimiento propuesto es más sostenible ajustándose a los objetivos de desarrollo sostenible (ODS).

Las aplicaciones de este método de obtención de polioles respetuoso con el medio ambiente se dan en sectores tan variados como el de la alimentación, cosmética, industria farmacéutica y dental, entre otras. Algunas de las aplicaciones comerciales de las microalgas de los órdenes Trebouxiales o Watanabeales así como de la biomasa producto de su cultivo, tanto en su forma purificada, como utilizando versiones menos puras del producto que podrían aportar fibra, clorofila y otros compuestos de potencial interés, incluyen los siguientes usos:

Usos como edulcorantes:

- Chicles y caramelos sin azúcar: El xilitol es ampliamente utilizado en la fabricación de chicles y caramelos sin azúcar, ya que tiene un sabor dulce similar al azúcar, pero con menos calorías y un índice glucémico bajo.

- Productos horneados y postres: Se puede usar en la preparación de productos horneados, como panes, pasteles, galletas y muffins, para endulzarlos sin añadir calorías vacías. Además, el xilitol y el ribitol pueden contribuir a darles una textura adecuada.
- 5 - Productos lácteos: El xilitol y el ribitol se utiliza en la producción de yogures, helados y otros productos lácteos con el fin de reducir el contenido de azúcar y ofrecer alternativas más saludables.
- 10 - Bebidas sin azúcar: Se utiliza en la formulación de bebidas sin azúcar añadido, como refrescos, bebidas energéticas y bebidas deportivas.
- 15 - Suplementos nutricionales: El ribitol y el xilitol se presentan en forma de suplementos dietéticos y pastillas para la salud bucal y general. Se ha demostrado que tiene beneficios para la salud dental, como prevenir la caries al reducir el crecimiento de bacterias dañinas en la boca.
- 20 - Chocolates y dulces: El xilitol y el ribitol pueden encontrarse en chocolates y otros dulces como una alternativa al azúcar refinado, brindando dulzura sin los efectos negativos asociados con el azúcar.
- 25 - Salsas y aderezos: Pueden ser utilizado en la preparación de salsas, aderezos para ensaladas y condimentos para reducir la cantidad de azúcar en estos productos.
- 30 - Chocolates para perros: Debido a su naturaleza no tóxica para los perros y su capacidad para prevenir la formación de placa dental, también se utilizan en la fabricación de chocolates y golosinas para perros.
- Productos farmacéuticos: En algunas medicinas líquidas y tabletas masticables, el xilitol se utiliza como un agente que mejora el sabor y también actúa como un edulcorante sin aumentar los niveles de glucosa en sangre.

Usos en productos cosméticos, higienizantes o para el cuidado facial o corporal:

- Productos para la piel, el cabello y maquillaje: El xilitol y el ribitol se utiliza en productos cosméticos principalmente por sus propiedades humectantes y exfoliantes, que pueden mejorar la textura y la apariencia de la piel y el cabello.

- 5 - Pastas de dientes y enjuagues bucales: El xilitol se agrega en pastas de dientes y enjuagues bucales debido a sus propiedades antimicrobianas que pueden ayudar a prevenir la caries dental y promover la salud oral.

10 Los inventores han identificado que los polioles mayoritarios en muchas de las microalgas del orden Trebouxiales y Watanabeales son los pentitoles, azúcares alcoholes de cinco carbonos también clasificados como ribitol, xilitol y arabitól, conjuntamente con otros polioles como el sorbitol, manitol e inositol, y azúcares como sacarosa, glucosa, manosa, etc. Los pentitoles se puede encontrar de forma natural en la corteza de abedul (*Betula*), en algunas plantas como la *Adonis vernalis* y en pequeñas cantidades se encuentra en algunas frutas y
15 verduras (plátano, uva, ciruela amarilla, fresa, frambuesa, lechuga, zanahoria, coliflor, cebolla, etc.), aunque en proporciones inferiores a las presentes en las microalgas Trebouxiales y Watanabeales.

20 Además, la vía biotecnológica ofrece las posibilidades de menor costo y energía en comparación con los métodos químicos. Implica la conversión de azúcares en polialcoholes por medio de microalgas, lo que es más seguro para el medio ambiente que los medios de síntesis química alternativos.

25 El proceso de la invención mejora los métodos de producción biotecnológica conocidos todavía más, debido a que las microalgas Trebouxiales y Watanabeales producen una gran cantidad de pentitoles (conjuntamente con otras moléculas edulcorantes) de manera natural sin necesidad de partir de azúcares. Estas microalgas producen y almacenan xilitol y ribitol sin necesidad de aportar fuentes de carbono al medio, ya que se trata de organismos fotosintéticos. Sin embargo, para una producción más eficiente de polialcoholes se pueden
30 añadir opcionalmente al medio de cultivo diversas fuentes de carbono, desde polisacáridos complejos a monosacáridos y fuentes de aminoácidos libres o proteínas.

35 La producción de estos compuestos se realiza en medios de cultivo líquidos o sólidos, y para la obtención del edulcorante se pueden utilizar tanto células enteras como extractos de las mismas. El uso de estos microorganismos favorece un proceso de producción circular, dado

que los residuos que pudieran generarse de los extractos son completamente compostables, además de fitoestimulantes.

Breve descripción de las figuras.

5

La Figura 1 muestra los espectros obtenidos mediante cromatografía de gases de las microalgas a) *Asterochloris erici* b) *Asterochloris glomerata* c) *Myrmecia israelensis* d) *Trebouxia arnoldoi* e) *Trebouxia asymmetrica* f) *Trebouxia corticola* g) *Trebouxia cretacea* h) *Trebouxia decolorans* i) *Trebouxia impressa* j) *Trebouxia jamesii* k) *Trebouxia lynnae* l) *Trebouxia sp. OTU A25* m) *Trebouxia vaga* n) *Vulcanochloris guanchorum* o) *Watanabea lichenicola* p) *Watanabea acidophila* y q) *S. symbiontica*. En cada una de las muestras, el pico a 42.6 minutos aproximadamente, recuadrado en negro en las figuras, se identifica como el pentitol.

10

15

La Figura 2 muestra una comparación de los espectros obtenidos mediante cromatografía de gases de la microalga *Asterochloris erici* en medio de cultivo a) 3NBBMGC (con fuente de carbono orgánico añadido), b) 3NBBM (sin fuente de carbono orgánico añadido), y c) BBM (sin fuente de carbono orgánico añadido). En cada una de las muestras, el pico a 42.6 minutos aproximadamente, recuadrado en negro en las figuras, se identifica como el pentitol.

20

La Figura 3 muestra espectros obtenidos mediante cromatografía de gases de alta resolución de las microalgas a) *Asterochloris erici*, b) *Trebouxia lynnae* c) *Vulcanochloris guanchorum* y d) *Watanabea lichenicola*. En cada una de las muestras, el pico a 18.9 minutos aproximadamente, recuadrado en negro en las figuras, se identifica como el pentitol.

25

La Figura 4 muestra espectros obtenidos mediante cromatografía de gases de baja resolución (a) y de alta resolución (b-d) de las microalgas a) y b) *Chlorella vulgaris*, c) *Coenochloris sp.* y d) *Coccomyxa viridis*. En cada una de las muestras, el pico identificado como glucosa es el que aparece a 20.8 minutos aproximadamente, y el de sacarosa a 29.1 minutos, ambos recuadrados en negro en las figuras.

30

La Figura 5 muestra los porcentajes del metabolito principal sobre el total de metabolitos detectados en las tres microalgas Trebouxiales (*Trebouxia lynnae*, *Trebouxia jamesii* y *Asterochloris erici*) y en *Chlorella vulgaris*. Las algas Trebouxiales muestran una banda principal que constituye más del 40% del total por xilitol y ribitol, mientras que en el caso de *Chlorella vulgaris*, el compuesto principal es la glucosa.

35

La Figura 6 muestra la producción de microalgas en medio de cultivo 3N-BBMGC. a) Peso seco de alga (gramos) obtenido por litro de cultivo. b) Aumento de la concentración de células en el cultivo a lo largo del tiempo hasta su saturación.

5

La Figura 7 muestra un esquema explicativo del proceso de producción de polioles a partir de microalgas Trebouxiales y Watanabeales. Las tres formas de utilización del producto final se resaltan en letras blancas sobre fondo gris.

10 Especies productoras de pentitoles y otros edulcorantes

Los organismos productores para este nuevo método de síntesis son un grupo de microalgas verdes unicelulares. Estas microalgas, como todos los organismos vivos, están clasificados en categorías taxonómicas de diferentes órdenes cuyos miembros pueden variar a la vez que lo hacen los avances científicos en la materia. Según la clasificación taxonómica disponible en la actualidad en portales de referencia como NCBI Taxonomy Browser, Algaebase o World Register of Marine Species, en la presente memoria descriptiva se hace referencia a microalgas de los órdenes Trebouxiales y Watanabeales, pertenecientes a la clase Trebouxiophyceae. En concreto, nos referimos a las especies de los géneros incluidos en la Tabla 1 a continuación.

20

Tabla 1: Géneros de las microalgas clasificadas dentro de los órdenes Trebouxiales y Watanabeales.

Trebouxiales	Watanabeales
<i>Asterochloris</i>	<i>Calidiella</i>
<i>Dictyochloropsis</i>	<i>Chloroidium</i>
<i>Lobosphaera</i>	<i>Jaagichlorella</i>
<i>Myrmecia</i>	<i>Kalinella</i>
<i>Parietochloris</i>	<i>Massjukichlorella</i>
<i>Symbiochloris</i>	<i>Mysteriochloris</i>
<i>Thorsmoerkia</i>	<i>Phyllosiphon</i>
<i>Trebouxia</i>	<i>Polulichloris</i>
<i>Trochisciopsis</i>	<i>Viridiella</i>
<i>Vulcanochloris</i>	<i>Watanabea</i>

*Xylochloris**Heterochlorella**Heveochlorella**Parachloroidium*

Los inventores han demostrado la producción de pentitoles y otros edulcorantes de interés en, al menos, las especies representativas de estos dos órdenes mostradas en la Tabla 2.

- 5 Tabla 2: Especies de microalgas en las que se ha determinado la producción de pentitoles y otros compuestos mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS).

<i>Asterochloris erici</i>
<i>Asterochloris glomerata</i>
<i>Myrmecia israelensis</i>
<i>Trebouxia arnoldi</i>
<i>Trebouxia asymmetrica</i>
<i>Trebouxia cretacea</i>
<i>Trebouxia decolorans</i>
<i>Trebouxia impressa</i>
<i>Trebouxia jamesii</i>
<i>Trebouxia lynnae</i>
<i>Trebouxia</i> sp. OTU A25
<i>Trebouxia vaga</i>
<i>Vulcanochloris guanchorum</i>
<i>Symbiochloris symbiontica</i>
<i>Watanabea acidophila</i>
<i>Watanabea lichenicola</i>

- 10 Preferiblemente, en el método de la invención las microalgas no están modificadas genéticamente.

- 15 En una realización, el medio de cultivo no comprende fuentes de carbono añadidas. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende al menos una fuente de carbono añadida que se selecciona de entre polisacáridos complejos, monosacáridos y fuentes de aminoácidos libres o proteínas. El rendimiento en uno y otro caso depende mucho de la

especie y las condiciones utilizadas. En determinados casos, el rendimiento puede ser superior cuando se utiliza carbono añadido. Sin embargo, en el caso específico mostrado en la Figura 2, el rendimiento resultó ser muy similar con carbono y sin carbono añadido, si bien el tiempo de cultivo sin carbono añadido sí resultó ser más largo que con carbono añadido.

5

Algunos medios utilizables son las distintas variaciones del medio de cultivo Bold Basal Medium (BBM) que incluyen entre otras 3NBBM, 3NBBM+V, 3NBBM-GC, etc., Trebouxia medium también con sus variaciones, GoldMedium (GM) y sus variantes, así como otras muchas combinaciones posibles de soluciones de micro y macronutrientes.

10

Las condiciones de cultivo comprenden diversas condiciones, tanto controladas de laboratorio como no controladas/ambientales, pudiendo variar entre 40 °C y 0°C o incluso por debajo de 0 °C. Distintas intensidades lumínicas y longitudes de onda son posibles para su cultivo, desde 0 a 300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR), además de radiaciones en otras longitudes de onda infrarrojas o ultravioleta. También son posibles distintos fotoperiodos que pueden variar entre distintas horas de luz y oscuridad diaria, o bien oscuridad o luz continuas. Del mismo modo, el pH del medio de cultivo puede variar entre al menos $3 < \text{pH} < 9$. Y se pueden cultivar tanto en matrices sólidas como en líquidas. Por ejemplo, en realizaciones preferidas se pueden utilizar las siguientes condiciones: temperaturas de 20-25 °C, luz de 25 a 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR con un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad, $6 < \text{pH} < 8$ en cultivo líquido. Asimismo, las microalgas se pueden someter a cultivo en continuo o discontinuo. Si el cultivo se realiza en discontinuo, típicamente se realiza durante un período de tiempo dentro de la fase exponencial de crecimiento, en realizaciones preferidas, de 3 a 40 días, más preferiblemente dentro de la fase exponencial tardía, alrededor de 3 a 10 días.

25

El resultado del cultivo es típicamente una biomasa que comprende, entre otros compuestos, cantidades significativas de uno o más polioles tales que, por ejemplo, ribitol, xilitol, arabitól, sorbitol, manitol, inositol, así como otros azúcares tales como sacarosa, glucosa, o manosa.

30

Las microalgas pueden ser utilizadas como producto final por su composición rica en edulcorantes. Alternativamente, la biomasa producida por las microalgas puede ser procesada realizando extractos de la misma en solventes polares, separando los polioles junto con otros compuestos en solubles en el solvente elegido de restos celulares y otras moléculas que no interese preservar en el producto final. Por último, también es posible separar los distintos polioles mediante cristalización o cromatografía para obtener compuestos puros. En cualquier caso, de acuerdo con la presente invención, es posible utilizar como edulcorante tanto las

35

microalgas pertenecientes a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales *per se*, como a la biomasa obtenida rica en polioles cuando se aplica a dichas microalgas el método de la invención, en este último caso ya sea separando o extrayendo previamente los polioles de dicha biomasa, o no.

5

A continuación, se realizará una explicación más detallada de la invención, con especial referencia a las figuras anexas:

La Figura 1 muestra los espectros obtenidos mediante cromatografía de gases de las microalgas a) *Asterochloris erici* b) *Asterochloris glomerata* c) *Myrmecia israelensis* d) *Trebouxia arnoldoi* e) *Trebouxia asymmetrica* f) *Trebouxia corticola* g) *Trebouxia cretacea* h) *Trebouxia decolorans* i) *Trebouxia impressa* j) *Trebouxia jamesii* k) *Trebouxia lynnae* l) *Trebouxia sp. OTU A25* m) *Trebouxia vaga* n) *Vulcanochloris guanchorum* o) *Watanabea lichenicola* p) *Watanabea acidophila* y q) *S. symbiontica*. También se analizaron mediante esta metodología algunas de ellas cultivadas en medios 3NBBM y BBM donde también producen polioles de manera autótrofa, es decir sin aporte de carbono orgánico. Como ejemplo se muestran en la Figura 2 los espectros obtenidos para *Asterochloris erici*.

Para confirmar los resultados obtenidos también se utilizó un equipo de GC-MS de mayor resolución. Las microalgas fueron cultivadas en medio 3N-BBMGC sólido y analizadas mediante esta metodología, donde el pentitol sigue siendo el compuesto mayoritario. En la Figura 3 se muestran como ejemplo los espectros de cuatro especies de microalgas (tres también analizadas mediante GC-MS de baja resolución).

La utilización de ambas tecnologías confirma los resultados obtenidos en cuanto a la producción de polioles y otros compuestos.

Si comparamos especies Trebouxiales y Watanabeales con otras de órdenes como el de las Chlorellales (*Chlorella vulgaris* y *Coenochloris* sp.) y del clado Elliptochloris (*Coccomyxa viridis*) vemos que en estas no se detecta ribitol, xilitol o arabitól, o se detecta en proporciones muy bajas. Estas otras especies tienen una composición alta solamente en azúcares no alcoholes (glucosa y sacarosa) (Figura 4).

El método de síntesis de pentitoles a partir de estas microalgas es novedoso, versátil y sencillo. El género *Chlorella* es uno de los más utilizados a nivel industrial dentro del sector de las microalgas, y esta gran diferencia de composición supone un factor diferenciador a

favor de las microalgas Trebouxiales y Watanabeales, cuyo uso biotecnológico en la actualidad es prácticamente nulo. En la Figura 5 se muestra una comparativa entre tres de las algas productoras de pentitoles respecto a *Chlorella vulgaris*, una de las especies más utilizadas dentro de las algas verdes.

5

Las condiciones de cultivo en las que se ha demostrado una alta producción de pentitoles son diversas en cuanto a la composición de los medios de cultivo utilizados como a las condiciones de temperatura, irradiación, tiempos de cultivo, entre otras. Estos factores sumados a la diversidad de organismos productores dan lugar a una gran versatilidad según las condiciones disponibles para su uso industrial. El rendimiento de producción de estas microalgas es superior al de otras filogenéticamente cercanas que son empleadas industrialmente, como la ya mencionada *Chlorella vulgaris*, en las mismas condiciones de cultivo. Dando lugar a más biomasa y más células por volumen de medio de cultivo empleado. En la Figura 6 se muestra una comparación en uno de los medios de cultivo empleados.

15

Además, el método de síntesis biológica de pentitoles es sencillo, con tres posibles *outputs* según la pureza de los azúcares alcoholes que requiera para la aplicación de interés. El producto más directo es la biomasa de las microalgas sin procesar, que puede ser utilizado directamente como edulcorante. Una segunda opción es realizar un extracto de dicha biomasa en distintos solventes polares sin separar de otros compuestos de naturaleza compatible. Y, por último, los polioles como arabitol, ribitol o xilitol, mezcla de pentitoles o mezcla de polioles purificados se pueden separar mediante cromatografía. El proceso se refleja en la Figura 7.

25

Los subproductos de este método de obtención biológica son reutilizables y compostables, y pueden dar lugar a otras materias primas de interés.

ENSAYOS EXPERIMENTALES

30

Condiciones de cultivo

Las especies dispuestas en este estudio se obtuvieron de la colección ASUV de la Universidad de Valencia. Estas microalgas fueron cultivadas en medio 3N-BBMGC sólido (3 × N Bold's Basal Medium (Bischoff 1963) suplementado con glucosa (20 g/l⁻¹) e hidrolizado de caseína (10 g/l⁻¹)) en una cámara de cultivo a 20 ± 1 °C, iluminada a 25 μmol fotones m⁻² s⁻¹ PAR con un fotoperíodo de 12 h:12 h, luz – oscuridad hasta llegar a fase exponencial

35

tardía de crecimiento, entre 10 y 21 días. La identidad de los fotobiontes se comprobó secuenciando el fragmento ITS ribosómico nuclear (nrITS) (disponible previa solicitud).

Una selección de estas especies también fue cultivada en distintos medios líquidos con agitación a 120 rpm. Los medios de cultivo fueron el ya mencionado 3N-BBMGC, 3N-BBM (3 x N Bold's Basal Medium) y BBM (Bold's Basal Medium) hasta llegar a fase exponencial tardía de crecimiento, entre 3 y 10 días. Los dos últimos medios de cultivo no contienen carbono orgánico aprovechable por las microalgas, por lo que los azúcares alcoholes producidos por las algas se sintetizan a partir de carbono obtenido mediante fotosíntesis.

Extracción y perfilado de metabolitos

La biomasa obtenida se liofilizó y se determinó su peso seco mediante una balanza de precisión. El material de algas se molió finamente con un homogeneizador de tejidos programado a 6,5 m/s, 5 ciclos x 20 s y 5 s de descanso usando aprox. 300 mg de perlas de vidrio (diám. 500-750 µm). La detección se realizó mediante dos metodologías distintas, que se exponen a continuación.

Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de baja y alta resolución

La extracción en fase líquida de los metabolitos y la derivatización química se realizaron con base en el protocolo informado por Lisec et al. 2006 con modificaciones generales. Se agregaron 1400 µl de metanol de grado HPLC (preenfriado a -20 °C) a la muestra molida junto con 5 µl de solución patrón de prostaglandina B1 (PGB1) a una concentración de 10 mM en cloroformo como estándar interno (IS). La mezcla se incubó a 70 °C con agitación a 950 rpm durante 10 min, luego se centrifugó durante 10 min a 11000 g y se transfirieron 1200 µl del sobrenadante a un tubo de 1,5 ml con grado de pureza PCR clean. Las alícuotas se secaron en un sistema concentrador al vacío (SpeedVac) para una posterior derivatización química.

La derivatización consistió en metoxiaminación y posterior sililación. El proceso de derivatización también se llevó a cabo en un tubo vacío como control en blanco. Para la metoxiaminación se añadieron 40 µl (20 mg/ml en piridina) de clorhidrato de metoxiamina. Este reactivo se preparó justo antes de la realización de cada experimento. Las muestras se incubaron en agitación a 650 rpm durante 2 h a 37 °C. Para la sililación, se añadieron a cada

muestra 70 µl del reactivo N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), y 5 µl de alcanos saturados C7 – C30 a la primera y última muestra medida de cada lote como patrón interno y las muestras se incubaron en 650 rpm agitación durante 30 min a 37 °C. Las alícuotas derivatizadas se transfirieron a viales con inserto de vidrio para el análisis GC-MS.

5

Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de baja resolución

El análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se realizó con un espectrómetro de masas Agilent 5977^a con un analizador de cuadrupolo para columnas capilares (split/splitless, pulsos split y pulsos splitless). Se utilizó helio como gas portador, con un flujo constante de 1 ml/min. El modo de inyección fue splitless: 79,6 ml/min durante 1 min. Se utilizó una columna capilar apolar HP-5MS UI 30 m-0,25 mm-0,25 µm (19091S-433UI, Agilent). Se aplicó el siguiente programa de temperatura: la temperatura inicial fue de 60 °C por 5 min, seguida de una rampa de 10 °C/min a 250 °C por 5 min y una segunda rampa de 20 °C/min a 300 °C por 10 minutos. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo a 280 °C. La temperatura de la fuente MS fue de 230 °C y la del cuadrupolo de 150 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 2 µl. Los espectros de masas se adquirieron a 70 eV por impacto de electrones con un rango de exploración de 30 a 650 amu. El retraso del disolvente fue de 8 minutos.

20

Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de alta resolución

El análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases Agilent 7890B combinado con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent 7000C utilizando las mismas condiciones y modelo de columna incluidas en el apartado anterior.

30

Identificación y cuantificación de compuestos

El sistema ha integrado la deconvolución de picos y la coincidencia espectral para la identificación y cuantificación de objetivos en una matriz compleja tanto en el caso del análisis mediante GC-MS de baja como de alta resolución. El software de adquisición de datos del sistema fue MassHunter GC/MS Acquisition, Agilent Technologies. Inc. El detector selectivo de masas operaba en modo full scan o Scan, que consiste en escanear entre dos masas

35

para obtener información total sobre el contenido de la muestra a analizar. Las áreas de los picos correspondientes a cada uno de los compuestos estándar se integraron utilizando el software cualitativo MassHunter. Los estándares se identificaron según la coincidencia de sus espectros de masas contra la biblioteca comercial del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Gaithersburg, MD, EE. UU.) (Ausloos et al., 1999). Posteriormente, estas coincidencias espectrales de masas se analizaron manualmente para cada uno de los compuestos frente a la base de datos de espectros de masas de la base de datos Metabolome Database (GMD) de Golm (Kopka, 2006). Los datos de abundancia se normalizaron al IS y al peso seco de la muestra.

Conclusiones

Mediante GC-MS de baja resolución se determinó la composición en polioles, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y otros compuestos de las trece especies de microalgas Trebouxiales y Watanabeales. Estas fueron cultivadas en medio 3N-BBMGC sólido y los espectros obtenidos de estas muestras se incluyen en la Figura 1. En todos estos organismos se determinó que el compuesto mayoritario es un pentitol (xilitol, ribitol o arabitol según su conformación) que se identifica por su espectro de masas con un score superior al 90% en todos los casos.

Los ensayos anteriores demuestran que la capacidad de producir estas moléculas orgánicas hace de las algas Trebouxiales y Watanabeales una nueva alternativa sostenible a la producción tradicional de edulcorantes de forma industrial.

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de polioles o una mezcla de polioles a partir de microalgas que comprende la etapa de cultivar las microalgas en un medio de cultivo, en condiciones de cultivo y por un período de tiempo de cultivo suficiente para producir una biomasa que contiene dichos polioles, caracterizado porque las microalgas pertenecen a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las microalgas que pertenecen al orden Trebouxiales se seleccionan de entre los géneros *Asterochloris*, *Dictyochloropsis*, *Lobosphaera*, *Myrmecia*, *Parietochloris*, *Symbiochloris*, *Thorsmoerkia*, *Trebouxia*, *Trochisciopsis*, *Vulcanochloris* y *Xylochloris*, solos o en cualquier combinación entre ellos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las microalgas que pertenecen al orden Watanabeales se seleccionan de entre los géneros *Calidiella*, *Chloroidium*, *Jaagichlorella*, *Kalinella*, *Massjukichlorella*, *Mysteriochloris*, *Phyllosiphon*, *Polulichloris*, *Viridiella*, *Watanabea*, *Heterochlorella*, *Heveochlorella* y *Parachloroidium*, solos o en cualquier combinación entre ellos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las especies de microalgas se seleccionan del grupo que consiste en *Asterochloris erici*, *Asterochloris glomerata*, *Myrmecia israelensis*, *Trebouxia arnoldoi*, *Trebouxia asymmetrica*, *Trebouxia cretacea*, *Trebouxia decolorans*, *Trebouxia impressa*, *Trebouxia jamesii*, *Trebouxia lynnae*, *Trebouxia sp. OTU A25*, *Trebouxia vaga*, *Vulcanochloris guanchorum*, *Symbiochloris symbiontica*, *Watanabea acidophila* y *Watanabea lichenicola*, solas o en cualquier combinación entre ellas.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las microalgas no están modificadas genéticamente.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de cultivo no comprende fuentes de carbono añadidas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de cultivo comprende al menos una fuente de carbono añadida.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la fuente de carbono añadida se selecciona de entre polisacáridos complejos, monosacáridos y fuentes de aminoácidos libres o proteínas.
- 5 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 anteriores, en el que las condiciones de cultivo incluyen la aplicación de fotoperiodos que se seleccionan de entre oscuridad continua, luz continua o la aplicación de un número variable de horas de luz y oscuridad diarias alternadas.
- 10 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 anteriores, en el que la matriz del cultivo es sólida.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 anteriores, en el que la matriz del cultivo es líquida.
- 15 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 anteriores, en el que las condiciones de cultivo comprenden temperaturas entre 40 °C y 0 °C, intensidades lumínicas entre 0 y 300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, longitudes de onda entre el UV-C y el infrarrojo, y pH del cultivo entre 3 y 9.
- 20 13. El método de cualquiera de la reivindicación 12, en el que las condiciones de cultivo son: temperatura de 20-25 °C, intensidad lumínica de 25 a 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR con un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad, pH entre 6 y 8, en cultivo en matriz líquida.
- 25 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el tiempo de cultivo oscila entre 3 y 40 días.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el tiempo de cultivo oscila entre 3 y 10 días.
- 30 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que los polioles obtenidos se seleccionan del grupo que consiste en xilitol, ribitol, sorbitol, manitol o inositol, solos o en cualquier combinación entre los mismos.
- 35 17. El método de la reivindicación 16, en el que los polioles obtenidos incluyen además otros azúcares seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, glucosa, o manosa, solos o en cualquier combinación entre los mismos.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la biomasa resultante del cultivo es sometida a extracción con disolventes polares para obtener un extracto rico en polioles.
- 5 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la biomasa resultante del cultivo o el extracto sometido a extracción con disolvente polares son sometidos a cromatografía para separar los polioles.
- 10 20. Uso de la biomasa obtenida según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 anteriores como edulcorante.
21. Uso de la biomasa obtenida según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 anteriores en cosmética.
- 15 22. Uso de la biomasa obtenida según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 anteriores en productos higienizantes.
- 20 23. Uso de la biomasa obtenida según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 anteriores en productos para el cuidado corporal o facial.
24. Uso de las microalgas pertenecientes a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales como edulcorante.
- 25 25. Uso de las microalgas pertenecientes a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales en cosmética.
26. Uso de las microalgas pertenecientes a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales en productos higienizantes.
- 30 27. Uso de las microalgas pertenecientes a los órdenes Trebouxiales o Watanabeales en productos para el cuidado corporal o facial.
- 35 28. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, en el que las microalgas que pertenecen al orden Trebouxiales se seleccionan de entre los géneros *Asterochloris*, *Dictyochloropsis*, *Lobosphaera*, *Myrmecia*, *Parietochloris*, *Symbiochloris*, *Thorsmoerkia*, *Trebouxia*, *Trochisciopsis*, *Vulcanochloris* y *Xylochloris*, solos o en cualquier combinación entre ellos.

29. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28, en el que las microalgas que pertenecen al orden Watanabeales se seleccionan de entre los géneros *Calidiella*, *Chloroidium*, *Jaagichlorella*, *Kalinella*, *Massjukichlorella*, *Mysteriochloris*, *Phyllosiphon*, *Polulichloris*, *Viridiella*, *Watanabea*, *Heterochlorella*, *Heveochlorella* y *Parachloroidium*, solos o en cualquier combinación entre ellos.
30. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 29, en el que las especies de microalgas se seleccionan del grupo que consiste en *Asterochloris erici*, *Asterochloris glomerata*, *Myrmecia israelensis*, *Trebouxia arnoldoi*, *Trebouxia asymmetrica*, *Trebouxia cretacea*, *Trebouxia decolorans*, *Trebouxia impressa*, *Trebouxia jamesii*, *Trebouxia lynnae*, *Trebouxia sp. OTU A25*, *Trebouxia vaga*, *Vulcanochloris guanchorum*, *Symbiochloris symbiontica*, *Watanabea acidophila* y *Watanabea lichenicola*, solas o en cualquier combinación entre ellas.
31. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 30, en el que las microalgas no están modificadas genéticamente.
32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, en la fabricación de chicles o caramelos sin azúcar, en productos horneados y postres, en productos lácteos, en bebidas sin azúcar, en suplementos nutricionales, en chocolates y dulces sin azúcar, en salsas y aderezos, en chocolates para perros, en pastas de dientes y enjuagues bucales, en productos farmacéuticos, y en productos para la piel, el cabello y maquillaje.



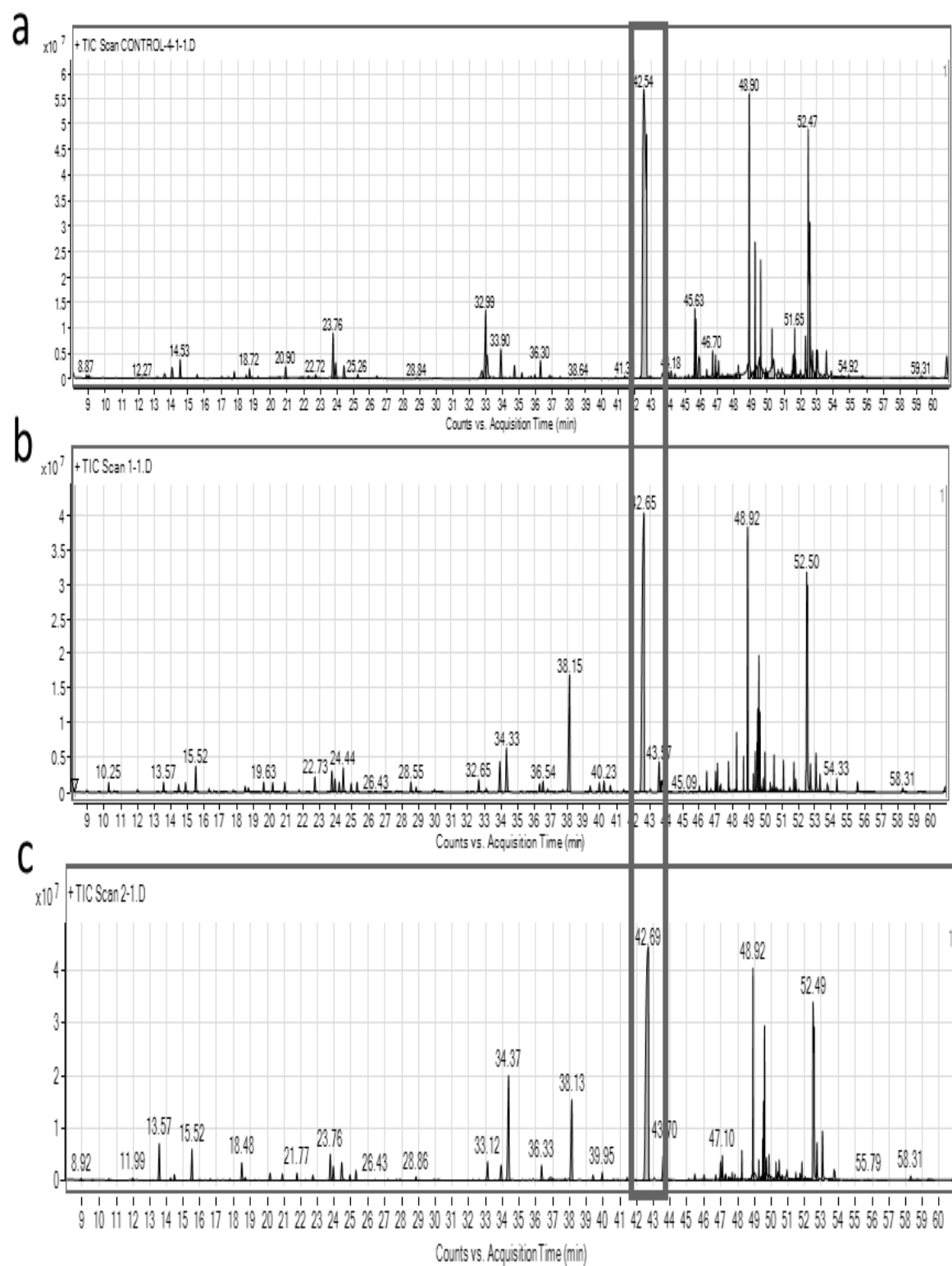


Fig. 2

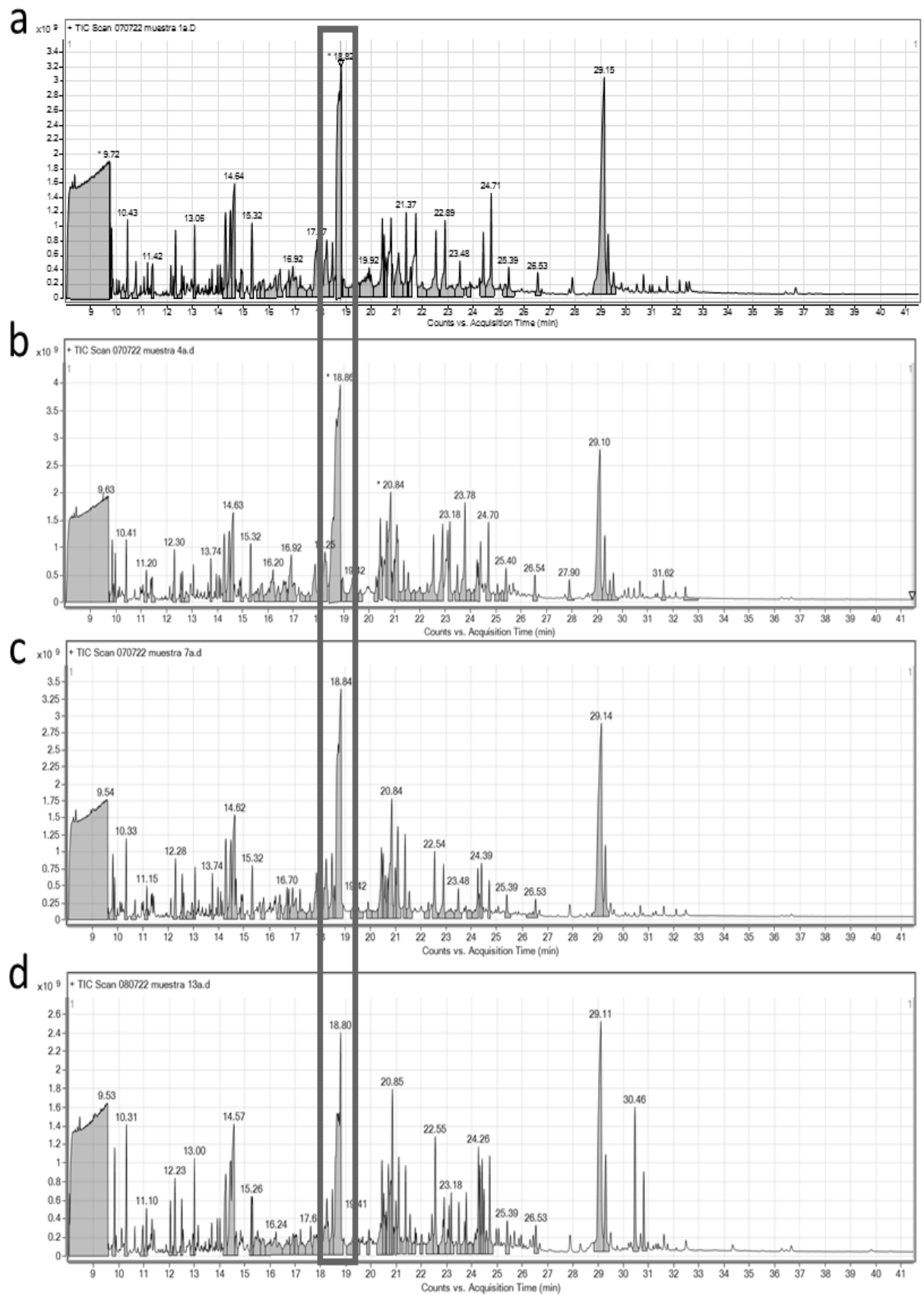


Fig. 3

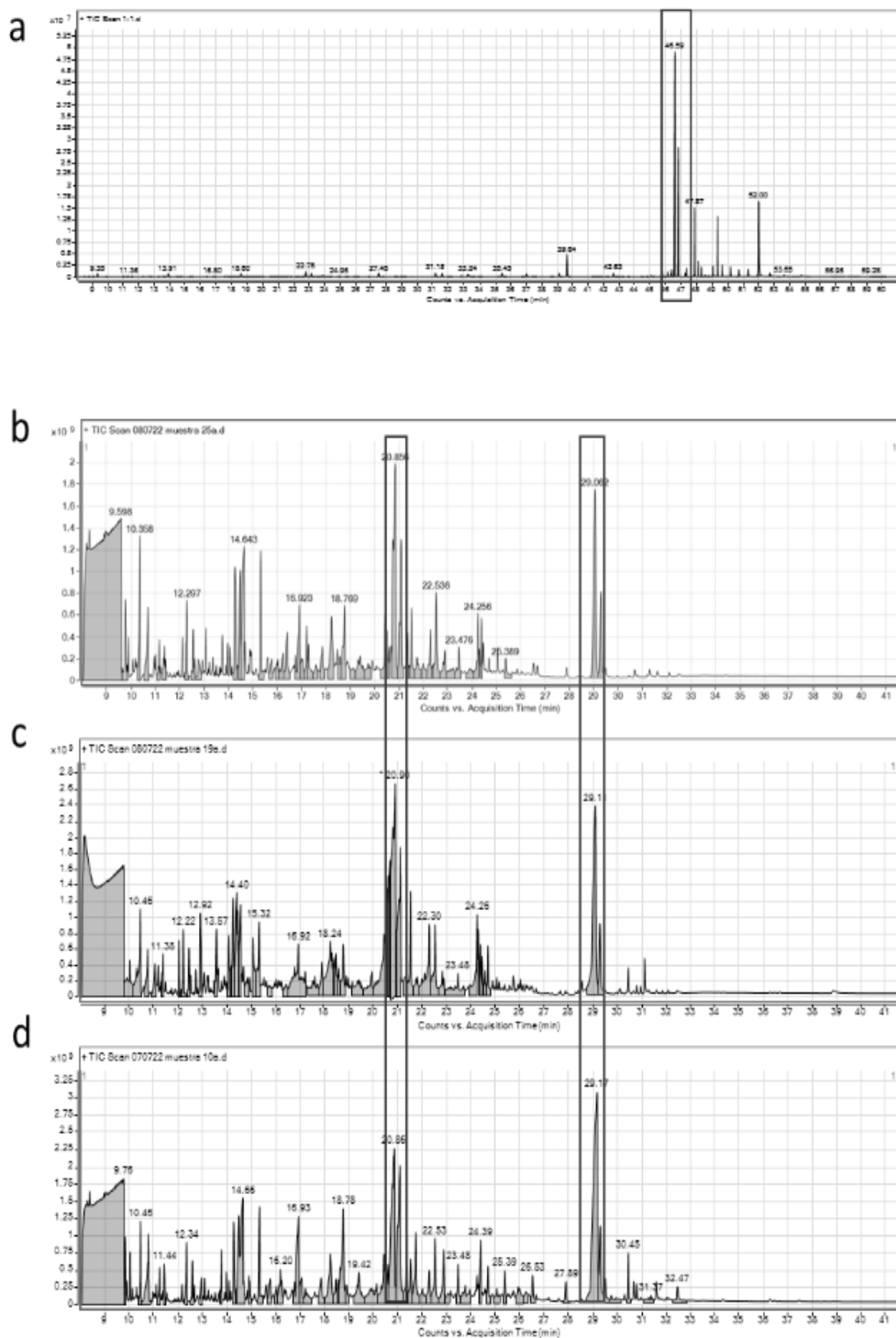


Fig. 4

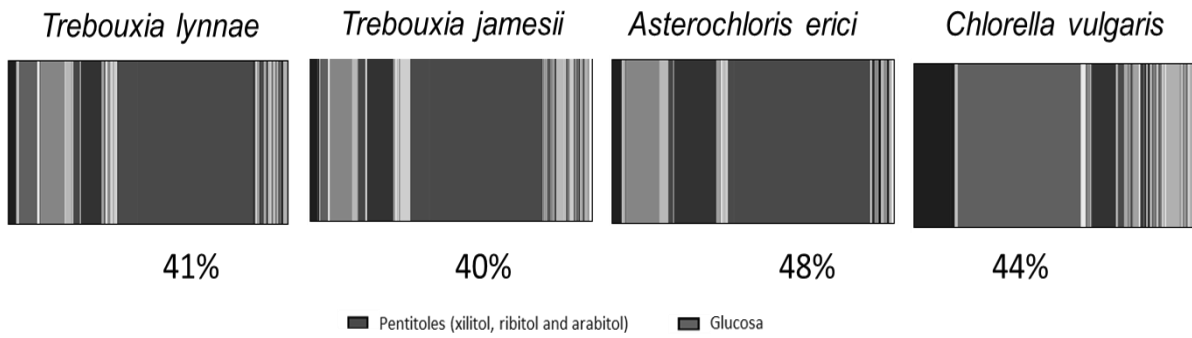


Fig. 5

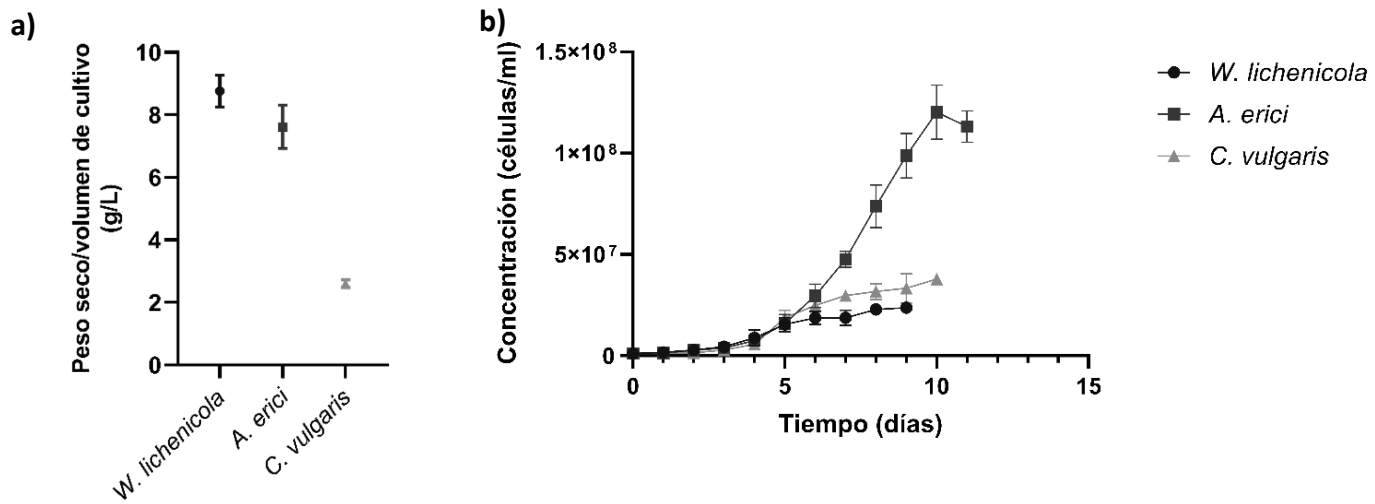


Fig. 6

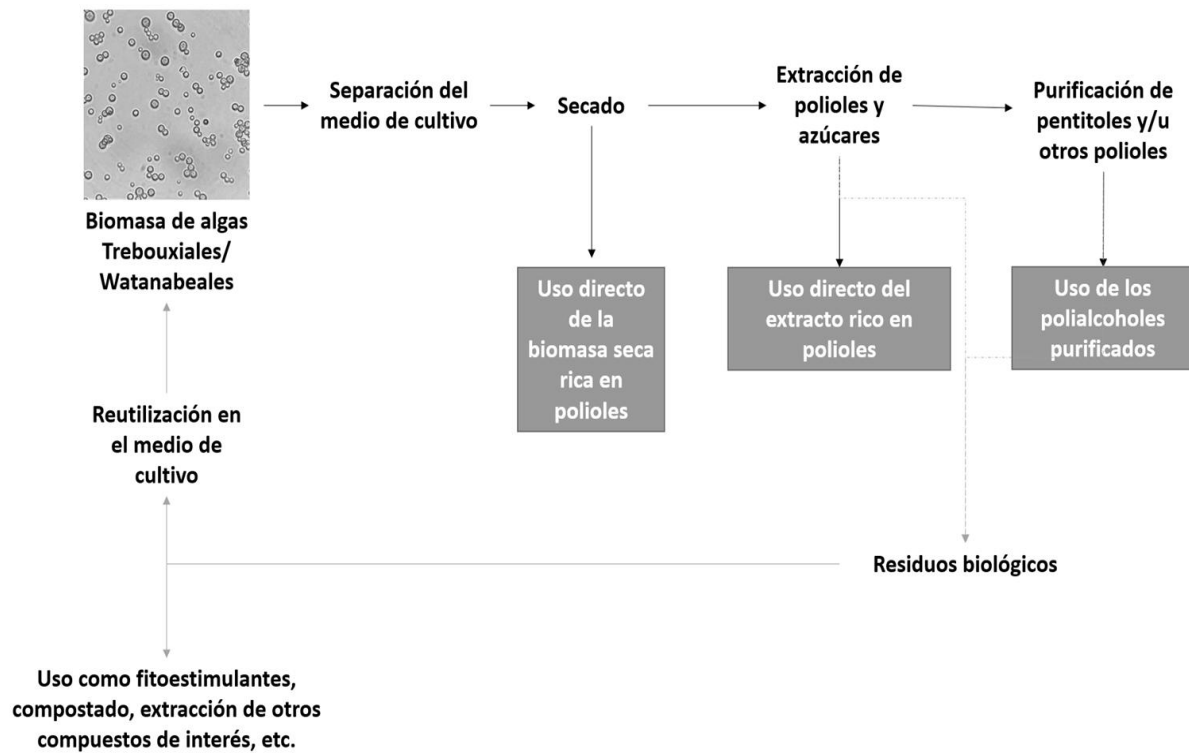


Fig. 7



- 21 N.º solicitud: 202430582
- 22 Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2024
- 32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: C12P7/18 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CORDEIRO, L.M.C. et al. First report on polysaccharides of <i>Asterochloris</i> and their potential role in the lichen symbiosis. International Journal of Biological Macromolecules, 01/07/2007, Vol. 41, Nº 2, Páginas 193-197, ISSN 0141-8130 [en línea] [recuperado el 29/05/2025] <DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.02.006>	1, 2, 4-16, 18, 19
A	GUSTAVS, L. et al. Polyol patterns in biofilm-forming aeroterrestrial green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology, junio 2011, Vol. 47, Nº 3, Páginas 533-537, ISSN: 0022-3646 (Print), ISSN: 1529-8817 (Electronic) [en línea][recuperado el 29/05/2025] <DOI:https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00979.x>	1, 2, 4-16, 18, 19
A	VIVIEN HOTTER, KARIN GLASER et al. Polyols and UV-sunscreens in the <i>Prasiola</i> -clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) as metabolites for stress response and chemotaxonomy. Journal of Phycology, abril 2018, Vol. 54, Nº 2, Páginas 264-274 [en línea][recuperado el 29/05/2025] <DOI: https://doi.org/10.1111/jpy.12619>	1, 2, 4-16, 18, 19

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 <input type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input checked="" type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº: 1, 2, 4-16, 18, 19 (todas parcialmente)
--

Fecha de realización del informe 05.06.2025	Examinador M. Rodríguez Venegas	Página 1/2
--	------------------------------------	---------------

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, SCOPUS, CAPLUS, INTERNET