

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 007**

21 Número de solicitud: 201600100

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)
C09B 61/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.01.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.07.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)
OTRI-UAL, Ctra. de Sacramento, s/n Edf. Central,
planta baja
04120 Almería ES

72 Inventor/es:

MAZZUCA SOBCZUK , Tania ;
IBÁÑEZ GONZÁLEZ , María José ;
MOLINA GRIMA , Emilio ;
HUERTAS SÁNCHEZ, Ana y
MAZZUCA, Marcia

54 Título: **Método de extracción de biliproteínas en cultivos de microorganismos utilizando disoluciones de glicerol**

57 Resumen:

Método de extracción de biliproteínas en cultivos de microorganismos utilizando disoluciones de glicerol. El objeto consiste en obtener extractos de ficobiliproteínas a partir de cultivos de microorganismos (como microalgas o cianobacterias) utilizando un solvente ecológico e inocuo para la salud humana con mayores rendimientos de extracción, menor número de etapas y menores requerimientos energéticos que los actualmente utilizados ya que funciona incluso con biomasa húmeda.

Se sumerge la biomasa en una disolución de glicerol a temperatura ambiente o temperatura controlada durante al menos 4 horas, se centrifuga y se obtiene el extracto rico en ficobiliproteínas directamente o bien mediante la adición, previo a la centrifugación, de un pequeño volumen de disolución buffer adecuada (como el buffer de disolución de ácido acético acetato de sodio pH 5.5 250 mM).

ES 2 627 007 A1

DESCRIPCIÓN**MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BILIPROTEÍNAS EN CULTIVOS DE MICROORGANISMOS UTILIZANDO DISOLUCIONES DE GLICEROL.****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención, se encuadra en el sector de la obtención de extractos de ficobiliproteínas a partir de biomasa de microorganismos como las microalgas o cianobacterias que son los más utilizados actualmente. Las ficobiliproteínas tienen
10 aplicaciones en la industria química, cosmética, farmacológica y alimentaria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Existen diversos procesos para extraer biliproteínas a partir de microalgas y
15 cianobacterias cuya utilización depende principalmente de la especie de microalga que sirva como materia prima así como del posterior método de purificación a emplear. La etapa inicial suele consistir en la ruptura de la pared celular de la microalga en cuestión y se suele partir de biomasa seca y liofilizada. Los tratamientos mecánicos de ruptura celular (congelación-descongelación, ultrasonidos, etc...) pueden a veces
20 reemplazarse por métodos enzimáticos o químicos (utilizando enzimas como por ejemplo la lisozima, o tritón X-100). El principio fundamental de los métodos de extracción es el choque osmótico y la fuerza iónica, para lo cual se han utilizado extracciones utilizando tampón de acetatos, tampón de fosfatos e incluso acetona
(Gombos, Csizmadia et al. 1984, Saxena 1988, Duerring, Schmidt et al. 1991,
25 Tchernov, Minkova et al. 1999, Campanella, Crescentini et al. 2000, Bermejo, Ación et al. 2003, Ruiz 2012).

Dependiendo de la técnica de purificación que se vaya a emplear en la etapa posterior un método resulta más atractivo que otro. Por ejemplo, para la purificación mediante
30 adsorción en lecho expandido, método que reduce el número de etapas necesarias con respecto a otros métodos convencionales, es necesario ajustar el pH a 5,5, de modo que a priori parecería interesante realizar la extracción a este pH para evitar tener que diluir el extracto. Sin embargo, aplicando la técnica que se propone en esta invención, la obtención de extractos proteicos mucho más concentrados y con un
35 mayor rendimiento permitiría trabajar con menores cantidades de cultivo en las etapas

previas, y esto redundaría también en los costes económicos de obtención del bioproducto.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

5

Método de extracción de biliproteínas en cultivos de microorganismos utilizando disoluciones de glicerol. El objeto consiste en obtener extractos de ficobiliproteínas a partir de cultivos de microorganismos (como microalgas o cianobacterias) utilizando un solvente ecológico e inocuo para la salud humana con mayores rendimientos de extracción, menor número de etapas y menores requerimientos energéticos que los actualmente utilizados ya que funciona bien con biomasa seca e incluso con biomasa húmeda.

Se sumerge la biomasa en una disolución de glicerol a temperatura ambiente o temperatura controlada durante al menos 4 horas, se centrifuga y se obtiene el extracto rico en ficobiliproteínas directamente o bien mediante la adición, previo a la centrifugación, de un pequeño volumen de disolución buffer adecuada (como el buffer de ácido acético-acetato de sodio pH 5.5 250 mM).

20

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Modo de realización preferente 1.

Se depositan 5 ± 2 g de biomasa húmeda de la microalga *Porphyridium cruentum* en un tubo Falcon de 50 ml, añadiéndosele con 20 ± 5 ml de Glicerol (98% pureza) . Se realizan dos extracciones similares mediante el procedimiento siguiente: la mezcla homogenizada obtenida se deja en agitación continua durante 24 horas a 4°C. Después de esto, la mezcla se centrifuga. Del sobrenadante centrifugado se extrae 1 ml para la determinación de β -ficoeritrina midiendo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 280nm, 545nm, 565nm, 620nm y 650nm cada extracto. La concentración de β -ficoeritrina (B-PE), en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\beta - PE [\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}] = \frac{(OD_{565\text{nm}} - 2.8[R - PC] - 1.34[APC])}{12.7}$$

Donde ODi indica densidad óptica del cultivo medida a la longitud de onda i en el espectrofotómetro y R_PC y APC se calculan utilizando las siguientes ecuaciones:

$$APC [mg \cdot ml^{-1}] = \frac{(OD_{650nm} - 0.19 \cdot OD_{620})}{5.65}$$

$$R - PC [mg \cdot ml^{-1}] = \frac{(OD_{620nm} - 0.7OD_{650})}{7.38}$$

5

El porcentaje de B-ficoeritrina extraída sobre la biomasa seca se calcula como:

$$\%BPE \text{ en la biomasa} = \frac{m_{BPE \text{ extraída}}}{m_{\text{biomasa húmeda}} \cdot (1 - x)}$$

10 Siendo x los gramos de agua por gramo de biomasa húmeda y siendo mBPE la masa de B- ficoeritrina extraída a partir de la biomasa.

La pureza de B ficoeritrina en el extracto obtenido se puede estimar utilizando el cociente de las densidades ópticas del extracto medidas a 545nm y 280nm, siendo mayor la pureza cuanto mayor sea ese cociente.

15 Para observar la ventaja de utilizar glicerol como solvente extractor estos resultados se han comparado con los de una extracción que sigue los mismos pasos pero utiliza tampón de acetatos de pH 5,5 concentración 250 mM, partiendo de la misma cantidad de biomasa.

20 Los resultados son los que se indican en la tabla 1.

Solvente	BFE (mg)	% BFE Extraído con respecto a la biomasa seca	A_{545}/A_{280}
Tampón Acetato pH 5'5 250 mM	4,93±0,42	1,39%	2,00±0,32
Glicerol	27,67±4,9	5,42%	1,40±0,34

Tabla 1. Extracción de B-ficoeritrina mediante el ampliamente utilizado buffer de acetatos 250 mM (pH 5.5) y extracción utilizando glicerol tal como se propone en la presente patente de invención. Datos obtenidos a partir de la extracción con biomasa húmeda de *Porphyridium cruentum*.

La utilización de glicerol al 98% de pureza para obtener extractos proteicos de B-ficoeritrina muestra una clara ventaja frente al uso del buffer de acetatos pH 5,5 250 mM tal como se aprecia en la tabla 1. A modo de ejemplo, cuando inicialmente se pesaron 5 ± 0.1 g de biomasa húmeda centrifugada de la microalga, con un 93,5% de humedad, los $27,67 \pm 4,9$ mg de β -ficoeritrina extraída suponen un 5,42% sobre masa seca. Este porcentaje es muy superior al obtenido cuando se utiliza el ampliamente referenciado tampón de acetatos pH 5`5 (250mM), donde la cantidad de β -ficoeritrina extraída es de $4,93 \pm 0,42$ mg que representan un 1,39% sobre la masa de biomasa seca.

Modo de realización preferente 2.

Se depositan 1 ± 0.2 g de biomasa húmeda de cianobacteria en un tubo Falcon de 50 ml, añadiéndosele con 10 ± 1 ml de Glicerol (98% pureza). Se realizan dos extracciones similares mediante el procedimiento siguiente: la mezcla homogenizada obtenida se deja en agitación continua durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de esto, se añaden 5 ml de tampón de acetatos 250 mM pH 5,5 y la mezcla se centrifuga inmediatamente. Del sobrenadante centrifugado se extrae 1 ml para la determinación de C-ficocianina midiendo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 280nm, 615nm, 620 nn, 650 nm y 652 nm. La concentración de C-ficocianina (B-PC), en mg·mL⁻¹) se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$C - PC [mg \cdot ml^{-1}] = \frac{(OD_{620nm} - 0.474OD_{652})}{5.34}$$

30

El porcentaje de C ficocianina extraído sobre la biomasa seca se calcula como:

$$\%CPC \text{ en la biomasa} = \frac{m_{CPC \text{ extraída}}}{m_{\text{biomasa húmeda}} \cdot (1 - x)}$$

Siendo mCPC la masa de C ficocianina extraída a partir de la biomasa.

La pureza de C ficocianina en el extracto obtenido se puede estimar utilizando el cociente de las densidades ópticas del extracto medidas a 620nm y 280nm, siendo mayor la pureza cuanto mayor sea ese cociente.

5

Para observar la ventaja de utilizar glicerol como solvente extractor estos resultados se han comparado con los de una extracción que sigue los mismos pasos pero utiliza tampón de acetatos de pH 5,5 concentración 250 mM, partiendo de la misma cantidad de biomasa.

10 Los resultados son los que se indican en la tabla 2:

Solvente	CPC (mg)	% CPC Extraído con respecto a la biomasa seca	A_{620}/A_{280}
Tampón Acetato pH 5'5 250 mM	0,15±0,02	1%	6
Glicerol	4,95±0,5	33%	21

La utilización de glicerol al 98% de pureza para obtener extractos proteicos de C-ficocianina muestra una clara ventaja frente al uso del buffer de acetatos pH 5,5 250 mM tal se aprecia en la tabla 2. A modo de ejemplo, cuando inicialmente se pesaron 1,4±0.2 g de biomasa húmeda centrifugada de la microalga, con un 90,0% de humedad, los 4,95±4,9 mg de C-ficocianina extraída suponen un 33% sobre masa seca. Este porcentaje es muy superior al obtenido cuando se utiliza el ampliamente referenciado tampón de acetatos pH 5'5 (250mM), donde la cantidad de C ficocianina extraída es de 0,15 mg que representan apenas el 1 % del peso de la biomasa seca.

20 La pureza del extracto de C ficocianina obtenido con glicerol es también mayor que la pureza del extracto obtenido con disolución de acetatos.

REIVINDICACIONES

1. Proceso de extracción de ficobiliproteínas a partir de biomasa de
5 microorganismos como son las microalgas o cianobacterias que consiste en poner en
contacto la biomasa con una disolución de glicerol que inicia el proceso de extracción.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque las células a
10 extraer pueden o no haber sufrido procesos de rotura celular previos a la extracción
con glicerol.
3. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las
15 células a extraer pueden o no haber sufrido un proceso de secado previo a la
extracción con glicerol.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1 en el cual a continuación o bien se
20 separa la disolución de glicerol conteniendo las ficobiliproteínas (extracto de
biliproteínas) o bien se adiciona a dicha mezcla una disolución capaz de disolver las
ficobiliproteínas para proceder a separarlas de la biomasa, como puede ser por
ejemplo el buffer de acetatos pH 5,5 250 mM.



- ②¹ N.º solicitud: 201600100
②² Fecha de presentación de la solicitud: 26.01.2016
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N1/12** (2006.01)
C09B61/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2014045177 A1 (ECOSYSTEM) 27/03/2014, Reivindicaciones 1-12;	1-4
A	ES 245829 A1 (UNIVERSIDAD DE ALMERIA) 15/09/2015, página 2, líneas 5 - 8; reivindicaciones 1-3;	1-4
A	FR 2453199 A1 (INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE) 31/10/1980, página 6, línea 20 - página 8, línea 22;	1-4
A	FR 2789399 A1 (ALPHA BIOTECH) 11/08/2000, Todo el documento	1-4

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
14.06.2017

Examinador
M. Ybarra Fernandez

Página
1/4

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

C12N, C09B

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.06.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	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 2014045177 A1 (ECOSYSTEM)	27.03.2014
D02	ES 245829 A1 (UNIVERSIDAD DE ALMERIA)	15.09.2015
D03	FR 2453199 A1 (INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE)	31.10.1980
D04	FR 2789399 A1 (ALPHA BIOTECH)	11.08.2000

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

El documento D01 reivindica un método para extraer y estabilizar ficocianina a partir de al menos un material que lo contiene. Dicho procedimiento se caracteriza porque incluye una etapa de maceración del material o materiales en glicerol o una mezcla agua / glicerol.

El documento D02 describe un procedimiento que consiste en concentrar cultivos de microalgas mediante un proceso económico y de bajo consumo energético, pudiendo reaprovechar el glicerol residual de la síntesis de biodiesel. La disolución de glicerol constituye la solución osmótica, que se pone en contacto con el cultivo de microalgas a través de una membrana semipermeable. La diferencia de presión osmótica entre el cultivo y la disolución de glicerol hace que el agua se transfiera al glicerol, lográndose así, sin adición de químicos ni gasto energético adicional, la concentración del cultivo.

El documento D03 describe un procedimiento para extraer el colorante azul contenido en algas cianofíceas, particularmente las del género *Spirulina*. El método comprende poner en contacto el alga marina fresca con una primera fase acuosa que contiene iones Ca^{2+} , con una concentración preferida de 0,02 a 0,2 gramos por litro de iones; separar la primera fase acuosa y la masa de algas; poner en contacto la masa de algas con una segunda fase acuosa a un pH alcalino; y separar la segunda fase acuosa a un pH alcalino; y separar esta segunda fase acuosa, de la que se extrajo ficocianina, con la masa residual de las algas. Un paso adicional se utiliza para extraer carotenoides.

El documento D04 reivindica la producción de un extracto de un microorganismo fotosintético que comprende: cultivar el microorganismo; transferir las células al medio de inducción para aumentar la producción de metabolitos; lisar las células en frío; mezclar el lisado con un medio de separación; y separar fracciones solubles e insolubles del lisado por filtración tangencial, en frío, para producir un extracto crudo.

La invención de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 es nueva e implica actividad inventiva. (Artículos 6.1, 8.1 LP11/86).