



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 259 542**

② Número de solicitud: 200500207

⑤ Int. Cl.:  
**C05F 11/08** (2006.01)  
**C05F 5/00** (2006.01)  
**A01N 63/02** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.01.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2006**

Fecha de la concesión: **10.09.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2007**

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla  
Pabellón de Brasil  
Paseo de las Delicias, s/n  
41012 Sevilla, ES**

⑱ Inventor/es: **Parrado Rubio, Juan;  
Bautista Palomas, Juan D. y  
Romero Ramírez, Eduardo J.**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la obtención de bioestimulantes vegetales a partir de residuos agroindustriales. El proceso comprende: a) Una fase fermentativa con microorganismos productores de enzimas hidrolíticas usando como base del medio de cultivo, residuos agroindustriales y  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones que favorecen la excreción de enzimas y b) una segunda fase en la que los caldos de fermentación serán utilizados como una herramienta hidrolítica sobre nuevos residuos que serán modificadas por las enzimas producidas en el paso primero.

Los residuos agroindustriales se caracterizan por ser materia orgánica de alto contenido proteico y con una alta susceptibilidad a ser hidrolizado debido a la desnaturalización de las proteínas producido en los procesos agroindustriales de los cuales proceden. Destacan los residuos de la industria del bioalcohol cuyos orígenes son semillas de sorgo, maíz, trigo y avena, residuos de la industria del aceite (procedentes de semillas de girasol, colza, etc.), residuos de la industria vitivinícola..

Los productos finales obtenidos son sustancias naturales con función bioestimulante (estimula el crecimiento, la floración, el enraizamiento,...) y también fertilizante (provee de nutrientes orgánicos a las plantas).

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

# ES 2 259 542 B1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales.

### 5 Objeto

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la obtención de bioestimulantes vegetales a partir de residuos agroindustriales.

10 El proceso comprende: a) Una fase fermentativa con microorganismos productores de enzimas hidrolíticas usando como base del medio de cultivo, residuos agroindustriales y  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones que favorecen la excreción de enzimas y b) una segunda fase en la que los caldos de fermentación serán utilizados como una herramienta hidrolítica sobre nuevos residuos que serán modificadas por las enzimas producidas en el paso primero.

15 Los residuos agroindustriales se caracterizan por ser materia orgánica de alto contenido proteico y con una alta susceptibilidad a ser hidrolizado debido a la desnaturalización de las proteínas producido en los procesos agroindustriales de los cuales proceden. Destacan los residuos de la industria del bioalcohol cuyos orígenes son semillas de sorgo, maíz, trigo y avena, residuos de la industria del aceite (procedentes de semillas de girasol, colza, etc.), residuos de la industria vitivinícola.

20 Los productos finales obtenidos son sustancias naturales con función bioestimulante (estimula el crecimiento, la floración, el enraizamiento,...) y también fertilizante (provee de nutrientes orgánicos a las plantas).

### Estado de la técnica

25 Actualmente, los fertilizantes orgánicos parten de sustratos orgánicos y sufren una serie de tratamientos que los transforman en mayor o menor grado en sustancias asimilables por la planta.

Los procesos productivos se dividen en fermentativos y enzimáticos:

30 Los procesos fermentativos utilizados en la actualidad de forma mayoritaria, son tratamientos microbianos, procesos de fermentación en estado sólido (compostaje).

35 Hay numerosas patentes que describen dichos procesos (Véase como ejemplo de ello, el “Procedimiento para la fabricación de un fertilizante orgánico a partir de excreta ganadera y residuos agroforestales”, patente española N° 2 151 845; “Procedimiento para la obtención de un fertilizante orgánico”, patente española N° 518.595).

40 En estos procesos, debido al poco control que se ejerce sobre el crecimiento microbiano que es inespecífico, hace que el producto final no sea homogéneo de una partida a otra, por lo que las producciones que se obtienen con ellos tampoco son siempre comparables.

45 Los procesos de producción mediante hidrólisis enzimática directa, son mucho más eficientes y dan lugar a productos líquidos que presentan una mayor capacidad bioestimulante, mayor biodisponibilidad y funcionalidad a la hora de su aplicación.

Estos procesos son mucho más eficientes, el tiempo de producción es de horas con respecto a semanas y meses de los procesos fermentativos. Sin embargo, las hidrólisis enzimáticas de diversos orígenes tienen el problema de coste de la enzima (o enzimas) empleadas en el proceso, lo cual suele hacer prohibitivo su uso.

50 Otros mecanismos como la hidrólisis química suele producir, como efectos colaterales, una gran cantidad de sustancias no absorbibles por la planta y, potencialmente tóxicas.

La técnica actual, hace incompatible el bajo coste (compostaje) con la alta calidad y control de producto (hidrólisis).

55 La presente invención contempla el uso de residuos agroindustriales con composiciones definidas a fin de que el producto final posea una proporción ideal de elementos nutritivos para el cultivo a tratar. Se trata de un proceso de producción de bioestimulantes mediante enzimas producidas en los mismos sustratos que dan lugar a los bioestimulantes, reduciéndose los costes del proceso. La presente invención consiste por tanto, en un proceso en dos fases para la obtención de un producto líquido rico en fitonutrientes solubles y de alta absorción, de calidad comparable a los obtenidos por hidrólisis enzimática pero de coste muy inferior.

60

### Descripción de la invención

65 La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la obtención de un producto líquido rico en fitonutrientes solubles y de alta absorción para su uso como fertilizantes y estimulantes de la germinación, el enraizamiento, el crecimiento, la floración, el cuajado y la maduración de plantas y sus frutos. Puede aplicarse en sus diferentes variantes a cualquier tipo de planta, momento del desarrollo vegetal, suelo y forma de cultivo, y potencialmente utilizable en agricultura ecológica.

## ES 2 259 542 B1

El procedimiento objeto de esta invención comprende dos fases que llamaremos Fase fermentativa e hidrolítica respectivamente y se obtienen dos tipos de productos: Sustancias solubles en forma líquida con capacidad bioestimulante y fertilizante y subproducto sólido con capacidad fertilizante.

5 La materia prima utilizada en el procedimiento de la presente invención como fuente de nitrógeno y energía para la generación de enzimas son sustratos vegetales insolubles y definidos y, generalmente, de una elevada insolubilidad. Todos tienen como característica común su alto contenido en Nitrógeno proteico y una alta susceptibilidad a ser hidrolizado debido a la desnaturalización de las proteínas producido en los procesos agroindustriales de los cuales proceden. Los sustratos utilizados en este proceso serán de origen vegetal y con altos contenidos proteicos  
10 como residuos de la industria de la algarroba, industria del bioalcohol, (con diferentes orígenes como maíz, sorgo, trigo, o cebada), industria aceitera (harinas desengrasadas de girasol, colza, etc) industria vitivinícola (orujo de uva) etc.

El procedimiento de la presente invención comprende dos fases:

15 La Fase Fermentativa: tiene como base un sustrato vegetal de alto contenido en nitrógeno y elevada desnaturalización proteica procedente de procesos agroindustriales siendo el medio de cultivo óptimo de *Bacillus licheniformis*, un microorganismo excretor de enzimas. En la fase fermentativa se ha de conseguir una producción de una fase líquida enriquecida en actividad hidrolítica de origen microbiano. Para ello, se introducen en un biorreactor una concentración de 0,5%-2% de sustrato vegetal (siendo las condiciones más óptimas en torno al 1%) y un inóculo de *B. licheniformis*  
20 junto con  $\text{CaCl}_2$  en cantidades a partir de 5 mmolar para favorecer la síntesis y estabilidad de las enzimas a producir. El biorreactor debe estar a pH neutro,  $T^{\circ}$  óptima para el desarrollo del microorganismo (35-37°C) y aireación durante 40-50 horas, obteniéndose una disolución del sustrato modificado con un elevado contenido en proteasas excretadas por el microorganismo, que se emplea en la fase hidrolítica del procedimiento como base enzimática para aumentar la  
25 productividad del bioestimulante objeto de la presente invención.

La Fase Hidrolítica del proceso consiste en tomar el caldo de fermentación de la fase fermentativa y diluirlo 20-30 veces hasta llegar a una concentración óptima para llevar a cabo la hidrólisis. Éste proceso requiere diversos controles entre los que podría citarse el pH (óptimo para la actividad enzimática, entre 7-8), la temperatura (55-60°C) y el tiempo (100 min-150 min) como factores fundamentales.

Esta fase puede llevarse a cabo en el mismo recipiente que la fase anterior simplemente añadiendo agua y el residuo agroindustrial con elevado potencial bioestimulante (10-20% p/v), obteniéndose la solubilidad del material vegetal introducido con capacidad bioestimulante.

35 Por último se procede a la separación sólido-líquido mediante centrifugación, a la concentración por evaporación y acidificando el medio para disminuir el pH facilitando el almacenaje, el transporte y, sobre todo, porque a esa concentración es totalmente estable.

40 Los sólidos resultantes no solubilizados, pueden emplearse como abono orgánico convencional y el líquido resultante es el producto con capacidad bioestimulante para su uso como fertilizantes y estimulantes de la germinación, el enraizamiento, el crecimiento, la floración, el cuajado y la maduración de sus plantas y frutos.

### 45 Modo de realización

A continuación se describe el proceso de obtención de bioestimulantes para dos casos concretos:

A) Residuos de la industria del bioalcohol procedentes de semillas de maíz.

50 B) Residuos de la industria de la algarroba.

La primera fase es la fase fermentativa, común en la producción de ambos tipos de bioestimulantes, radicando la diferencia en el sustrato utilizado en la segunda fase.

55 El medio de fermentación incluye los siguientes componentes:

Residuos de la industria del bioalcohol 10 gramos (base de medio de cultivo)

60 Cloruro de calcio 0.55 gramos (Activador de la producción de proteasas)

Cloruro de sodio 3 gramos

Agua hasta 1 litro.

65 Los microorganismos utilizados son bacterias del género *Bacillus* superproductoras de enzimas, en el ejemplo se ha utilizado una cepa de *Bacillus licheniformis* ATCC 21415.

## ES 2 259 542 B1

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

pH 7

5 Temperatura 37 grados centígrados

Tiempo de cultivo 53 horas.

10 El resultado de la fase anterior es una suspensión de partículas y bacterias en un líquido que lleva disuelto una cantidad considerable de actividad hidrolítica de la bacteria *B. licheniformis* empleada en el proceso.

15 La fase de fermentación es centrifugada y se procede a la separación en una fase líquida y otra sólida. La fase líquida libre de células se emplea como herramienta hidrolítica por su gran contenido en proteasas, siendo estable en frío durante un mes.

La segunda fase es la fase de hidrólisis en la cual se produce la conversión de los residuos agroindustriales en bioestimulantes:

20 En nuestro ejemplos se muestra la producción de dos tipos de bioestimulantes, la diferencia radica en la materia prima que se hidroliza siendo el proceso el mismo en ambos casos:

Primer Bioestimulante denominado BM: Procedente de residuos de la industria del bioalcohol procedentes de semillas de maíz.

25 Segundo Bioestimulante denominado BA: Procedente de residuos de la industria alimentaria de la algarroba.

En un reactor hidrolítico se introducen los siguientes materiales:

30 200 gramos de Residuo de la industria del bioalcohol procedentes de semillas de maíz para la producción BM ó 200 gramos de Residuo procedentes de la industria de la algarroba para la producción de BA

50 ml de la Fase líquida producida en la etapa anterior

35 Agua hasta 1000 ml

En el reactor se mantendrá constante dos parámetros:

Temperatura 55 °C

40 pH 7

Tiempo de reacción: 120 minutos

45 Una vez finalizado, el producto es centrifugado, y evaporado siendo su composición para cada caso:

El producto bioestimulante de residuos de maíz (BM) tiene la siguiente composición:

### *Características físico-químicas*

	%p/p
Humedad	65-60
pH	5.0-5.5
55 Densidad (Kg/l)	1.10-1.12
Cenizas	1.04-1.29
Nitrógeno total	4.44-5.08
60 Nitrógeno amoniacal	1.22-1.40
Nitrógeno proteico	3.22-3.68
Proteína Bruta	28-32
65 Aminoácidos libres	7-9

## ES 2 259 542 B1

El producto bioestimulante de algarroba (BA) tiene la siguiente composición

### Características físico-químicas

5		%p/p
	Nitrógeno total	2,6-3,2
	Nitrógeno amoniacal	0,26-0,33
10	Nitrógeno proteico	2,30-2,87
	Contenido Proteico	14,0-18,0
	Aminoácidos libres	7-9
15	Humedad	70-74
	pH	5,4
	Densidad (Kg/l)	1,08-1,11
20	Materia orgánica	24,3-28,2
	Cenizas	1,6-2,0

### Ejemplo de capacidad bioestimulante acortando tiempos de floración e incremento en el número de frutos

25 Utilizando como materias primas residuos de maíz de la industria del bioalcohol en la fase de fermentación y los residuos de algarroba como sustrato en la fase hidrolítica (BA), la potencia bioestimulante se ha estudiado en tomates, en invernadero con control de luz y temperatura (*Lycopersicon pimpinellifolium*) y se ha evaluado un parámetro como es la capacidad de incrementar el número de flores totales y el número total de frutos.

30 Se han utilizado dos controles, uno es la no bioestimulación (se utiliza sólo agua), y otro es el uso de un bioestimulante comercial de origen animal denominado Isabion y comercializado por Syngenta.

El producto, se ha empleado en forma líquida diluida para fertirrigación resultando que su dosis óptima va de una dilución 1/500 del BA.

35 Los resultados muestran una gran bioestimulación de las plantas las cuales producen más flores y más frutos que en los controles sin bioestimulación (sólo con agua) y con Isabion.

### Parámetros en el cultivo del tomate

40	Tiempo (semanas)	Altura de la planta (cm)			Número de flores por planta		
		Agua	Isabion	BA/BM	Agua	Isabion	BA/BM
45	8	Nd	Nd	Nd	1a	-	1a
	10	Nd	Nd	Nd	3a	-	4a
	12	Nd	Nd	Nd	8a	-	7a
	14	Nd	Nd	Nd	9ab	-	15
50	16	Nd	Nd	Nd	9ab	2a	32b
	18	53.7a†	69.5ab	83.8b	9ab	16ab	33b
55	Tiempo (semanas)	Número de frutos por planta					
		Agua	Isabion	BA/M			
	8	-	-	-			
	10	-	-	-			
60	12	1a	-	1a			
	14	1a	-	1a			
	16	2a	-	4a			
	18	3a	1a	15ab			

Nd: No determinada

† Diferentes letras indican que son significativamente diferentes.

# ES 2 259 542 B1

## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales **caracterizado** porque comprende dos fases: a) una fase fermentativa con microorganismos productores de enzimas hidrolíticas, usando como base del medio de cultivo residuos agroindustriales en agua (0,5-2% p/v) y CaCl<sub>2</sub> en condiciones de pH neutro, T<sup>a</sup> óptima para el desarrollo de microorganismos (35-37°C) y aireación durante un tiempo de 40-50 horas y b) una segunda fase en la que los caldos de fermentación serán utilizados como una herramienta hidrolítica sobre residuos agroindustriales que serán modificados por las enzimas producidas en el paso primero.

10 2. Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales según reivindicación 1 **caracterizado** por el empleo de *Bacillus licheniformis* como microorganismo productor de enzimas hidrolíticas.

15 3. Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales según reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque los residuos agroindustriales se componen de materia orgánica de alto contenido en nitrógeno proteico y con una alta susceptibilidad a ser hidrolizado.

20 4. Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales según reivindicaciones 1-3 **caracterizado** por concentraciones del 0,5-2% p/v en agua de residuos agroindustriales y cantidades de CaCl<sub>2</sub> a partir de 5 milimolar para favorecer la síntesis y estabilidad de las enzimas a producir.

25 5. Procedimiento para la obtención de bioestimulantes a partir de residuos agroindustriales según reivindicaciones 1-4 **caracterizado** porque en la segunda fase las condiciones óptimas de temperatura y tiempo oscilan entre 55-60°C y 100-150 minutos, respectivamente.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 259 542

② Nº de solicitud: 200500207

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2004033290 A1 (MATANO YUTAKA) 19.02.2004, todo el documento.	1-5
A	JP 10328643 A (KOOYO TECHNO KK; KOYO KK) 15.12.1998, resumen; párrafos [0009],[0012],[0013],[0016],[0017]; reivindicaciones 2,5.	1-5
A	JP 2001354488 A (CHUMOKU CO LTD; KANKYO SHIGEN KOGAKU KK) 25.12.2001, todo el documento.	1-5
A	JP 8157285 A (SHIKOKU KEISOKU KOGYO KK) 18.06.1996, todo el documento.	1-5
A	FR 2571717 A1 (GUILLON GENEVIEVE) 18.04.1986, todo el documento.	1-5
A	JP 2000107794 A (SANEI KOGYO KK; TAKENO YOSHIHIRO) 18.04.2000, resumen; párrafos [0011],[0012],[0015],[0016],[0017].	1-5
A	CN 1482105 A (WUHAN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 17.03.2004, (resumen) [en línea] [Recuperado el 18.05.2006] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1-5
A	JP 11217286 A (NISSHIN ENGINEERING KK; KAISE RIKI KK; NIKKEE CORP KK) 10.08.1999, (resumen) [en línea] [Recuperado el 18.05.2006] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1
A	KR 8800583 B1 (TO MAN YONG) 16.04.1988, (resumen) [en línea] [Recuperado el 18.05.2006] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1-3

#### 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

31.08.2006

Examinador

E. Ulloa Calvo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C05F 11/08** (2006.01)

**C05F 5/00** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)