



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 370 215**

② Número de solicitud: 201030719

⑤ Int. Cl.:
C12N 1/14 (2006.01)
A61K 36/63 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.05.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.12.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑧ Inventor/es: **Sampedro Quesada, Inmaculada;**
Aranda Ballesteros, Elisabeth;
García Romera, Inmaculada y
Ocampo Bote, Juan Antonio

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Medio de cultivo de hongos obtenido a partir de alpeorujos seco y extractado.**

⑦ Resumen:

Medio de cultivo de hongos obtenido a partir de alpeorujos seco y extractado.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujos seco y extractado, al extracto obtenible mediante dicho procedimiento y al uso del mismo para el cultivo de microorganismos, preferiblemente hongos. El empleo del extracto líquido de alpeorujos seco y extractado de la invención como medio de cultivo de hongos es económico y permite la obtención de una abundante masa fúngica, superior a la obtenible mediante otros medios convencionalmente empleados para el cultivo de estos microorganismos.

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo de hongos obtenido a partir de alpeorujo seco y extractado.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la microbiología y específicamente se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujo seco y extractado, al extracto obtenible mediante dicho método y al uso del mismo para el cultivo de microorganismos, preferiblemente de hongos. El empleo del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado de la invención como medio de cultivo de hongos es económico y permite la obtención de una abundante masa fúngica.

10

Estado de la técnica anterior

15 El cultivo del olivar y la extracción del aceite de oliva tienen una extraordinaria importancia económica y social. Los sistemas de extracción del aceite de oliva se han ido modificando en las últimas décadas cambiando con ello la producción, la composición y el aprovechamiento de los subproductos generados. Así, a inicios de los 90 se introdujo un sistema de extracción continuo de dos fases de aceite de oliva que consiguió una reducción en el consumo de agua y de energía, principal inconveniente del sistema de tres fases, y la consecuente eliminación de la producción de alpechines, pero trajo consigo el problema de que tras la centrifugación de la pasta de aceituna se produce, además de aceite, un nuevo subproducto consistente en un residuo sólido, de elevada humedad y rico en grasas y azúcares, denominado alpeorujo.

20

25 Los alpeorujos húmedos, tras un procesado posterior, se destinan a la obtención del aceite de orujo por medio de extracción con n-hexano, generando un residuo final denominado "alpeorujo seco y extractado" que, en su mayor parte, se emplea como combustible o se incinera para obtener energía mediante la cogeneración de energía eléctrica y térmica en las propias almazaras, dado su elevado poder calorífico (Caputo A. C., *et al.*, 2003, *Applied Thermal Engineering*, 23:197-214). Sin embargo, debido a la gran cantidad de residuo que se genera en cada una de las campañas oleícolas, es necesaria la búsqueda de vías alternativas para el tratamiento de estos subproductos. Por ello, se están intentando utilizar también como pienso para rumiantes, producción de compost (ES2103206 B1) y para la obtención de productos de interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

30

35 El alpeorujo seco y extractado está compuesto por los restos de pulpa y piel de las aceitunas y es un residuo muy rico en compuestos fenólicos como son el hidroxitirosol, salidroside, glucósido de luteolina, rutina, tirasol y oleuropeína, por lo que cuando es usado como fertilizante no puede aplicarse directamente al suelo debido a los efectos fitotóxicos de estos fenoles que además repercuten perjudicialmente en la población microbiana. Por ello, se ha propuesto la biotransformación de este subproducto para que pueda ser empleado como fertilizante orgánico. En este sentido, el alpeorujo seco y extractado se ha sometido a procesos de fraccionamiento y se han obtenido así extractos del mismo en los que se han cultivado hongos saprobitos capaces de llevar a cabo una detoxificación, de manera que así disminuye la fitotoxicidad de este residuo y puede ser finalmente empleado como fertilizante. En este caso los hongos crecen utilizando un extracto acuoso de alpeorujo seco y extractado como fuente de nutrientes, sin embargo, este extracto ha de encontrarse diluido un 50% para evitar que las condiciones de toxicidad del mismo sean limitantes para el crecimiento microbiano (Aranda Ballesteros, E., 2006).

40

45 El hidroxitirosol, el tirasol y la oleuropeína son potentes antioxidantes que se pueden extraer del alpeorujo seco y extractado por medio de tratamiento térmico al vapor. Este residuo se puede utilizar también para la producción de pectina, compuesto de gran interés en la industria alimentaria ya que es usada como agente gelificante, estabilizante y emulsionante (Cardoso S. M., *et al.*, 2003, *Carbohydrate Polymers*, 52:125-133). Además también se ha estudiado la mezcla del alpeorujo seco y extractado con polímeros termoplásticos para la fabricación de contenedores (Siracusa G., *et al.*, 2001, *Journal of Polymers and the Environment*, 9:157-161).

50

50 Por otro lado, las almazaras están empezando a separar los huesos presentes en el alpeorujo seco y extractado debido al aumento de su valor en el mercado, no sólo como combustible sino también por su uso como abrasivo, como materia prima para la obtención de carbón activo e incluso como inductor del compostaje de otros materiales orgánicos.

55

55 Por otra parte, desde antiguo y en la actualidad se emplean microorganismos para producir industrialmente productos con fines comerciales, como antibióticos, antioxidantes, fitohormonas, vitaminas, grasas insaturadas, proteínas, aminoácidos, fertilizantes, productos fitosanitarios, etc. Sin embargo, es necesario disponer de nutrientes minerales y carbohidratos como materia prima carbonada en el caldo de cultivo de estos microorganismos. Pero los carbohidratos son relativamente caros y, en muchos casos, de más alto precio que los productos generados mediante el proceso de fermentación. En el caso de los hongos, existen para su crecimiento diversos medios de cultivo, siendo los comúnmente empleados, por ejemplo, el extracto de malta, caldo patata-dextrosa (PDB) o Czapeck.

60

65 En resumen, existe por una lado la necesidad de encontrar nuevas aplicaciones industriales para la gran cantidad de alpeorujo seco y extractado que se obtiene como residuo en la industria oleícola, y por otro, la necesidad de disponer de medios de cultivo mejorados que aporten nutrientes minerales y carbohidratos como materia prima carbonada para el crecimiento *in vitro* de microorganismos, que sean más económicos y que permitan obtener una mayor masa fúngica que los existentes actualmente.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado así como el extracto obtenible mediante dicho método, y propone el uso del mismo para el cultivo de microorganismos, preferiblemente de hongos. El empleo del extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado de la invención como medio de cultivo de hongos es económico y permite la obtención de una abundante masa fúngica.

Mediante extracciones acuosas del alpeorujillo seco y extractado y posterior concentración del producto obtenido, en la presente invención se obtiene un extracto líquido óptimo para el cultivo de microorganismos de interés industrial, preferiblemente de hongos, más preferiblemente de hongos saprobios productores de metabolitos primarios y/o secundarios susceptibles de aplicación comercial. Así, se propone el extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado de la invención como una fuente de nutrientes barata para el cultivo de microorganismos, ya que permite obtener una masa microbiana abundante aplicable tanto a nivel agrícola como industrial.

El procedimiento de la invención conduce a la obtención de un extracto líquido de alpeorujillo seco y extracto cuyas características físico-químicas difieren de las de otros extractos líquidos de alpeorujillo seco y extractados obtenibles mediante otros métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, en el grado de concentración de sus componentes. Por tanto, como muestran los ejemplos de la presente invención, cuando se utiliza como medio de cultivo el extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado de la invención la masa microbiana obtenible es superior (más del triple) a la que se obtiene cuando se emplea como medio de cultivo cualquier otro extracto líquido de alpeorujillo sin concentrar obtenible mediante otros procedimientos, lo que demuestra que, al contrario de lo que se suponía hasta la fecha en relación a los efectos tóxicos de los fenoles presentes en este residuo sobre el crecimiento microbiano, los microorganismos son capaces de proliferar óptimamente en un extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado cuyos elementos constitutivos se encuentran doblemente concentrados.

Además, en la presente invención se muestran, a modo de ejemplo, pruebas comparativas de crecimiento de diversos hongos cultivados en el extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado de la invención y en medios convencionalmente empleados para el cultivo de hongos, como el extracto de malta, caldo patata-dextrosa (PDB) y Czapeck. Los resultados permiten apreciar un incremento del 200-300% en la masa fúngica cuando el cultivo se realiza en el extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado de la invención respecto a cuando se realiza en cualquiera de los otros medios.

De esta manera, la presente invención resuelve dos graves problemas, a saber, uno de naturaleza económica, en cuanto a que el extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado descrito aquí y propuesto como medio de cultivo es más rentable que los medios de cultivo convencionales; y otro de tipo ecológico, ya que la presente invención propone una nueva aplicación industrial de un residuo contaminante procedente de la industria oleícola como es el alpeorujillo seco y extractado.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujillo seco y extractado, de ahora en adelante "procedimiento de la invención", que comprende:

- a. realizar una extracción sólido-líquido de alpeorujillo seco y extractado mediante una disolución acuosa,
- b. filtrar el extracto obtenido en el paso (a),
- c. centrifugar el filtrado obtenido en el paso (b),
- d. filtrar el sobrenadante obtenido en la centrifugación del paso (c), y
- e. concentrar un 40-60% el filtrado obtenido en el paso (d).

El término "alpeorujillo seco y extractado" o "DOR" se refiere al residuo que se obtiene en el proceso de generación del aceite de orujo tras la extracción del alpeorujillo con n-hexano, que posee un bajo porcentaje de aceite, preferiblemente de entre el 0,2 y el 0,5%, una humedad de entre el 10% y el 13%, un elevado poder calorífico, de aproximadamente 4.000 kcal/g, está compuesto por lignina, celulosa, sustancias pécticas, hemicelulosas, lípidos, materia orgánica, compuestos fenólicos, etc., y presenta un pH ligeramente ácido, preferiblemente de entre 5 y 6.

La extracción sólido-líquido de alpeorujillo seco y extractado del paso (a) del procedimiento de la invención se podría realizar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante extractor rotativo orbital o mediante Soxhlet. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la extracción sólido-líquido del paso (a) se realiza mediante un extractor rotativo orbital. La extracción sólido-líquido mediante extractor rotativo orbital es una técnica conocida en el estado de la técnica en la que se obtiene una fracción sólida y un extracto líquido, el cual se obtiene mezclando un solvente, por ejemplo aunque sin limitarnos, agua, metanol o acetato de etilo, con el alpeorujillo seco y extractado. Se entiende por "disolución acuosa" cualquier disolución en la que el disolvente (o el disolvente mayoritario, en el caso de una mezcla de disolventes) sea agua. Esta disolución acuosa puede comprender, además de agua, otras sustancias tales como solutos, etc. En otra realización preferida, la disolución acuosa del paso (a) del procedimiento de la invención

ES 2 370 215 A1

es agua. En otra realización preferida, en la extracción sólido-líquido del paso (a) del procedimiento de la invención la proporción de alpeorujos seco y extractado y de disolución acuosa, preferiblemente agua, es 1:2 peso:volumen. En otra realización preferida, la extracción sólido-líquido del paso (a) del procedimiento de la invención se realiza durante entre 6 y 10 horas. En una realización más preferida, la extracción sólido-líquido del paso (a) del procedimiento de la invención se realiza durante 8 horas. Es decir, el alpeorujos seco y extractado se mezcla con una disolución acuosa, preferiblemente agua, durante, preferiblemente, entre 6 y 10 horas, más preferiblemente durante 8 horas, en una proporción de, preferiblemente, 1:2 peso:volumen.

Transcurridas entre 6 y 10 horas, preferiblemente 8 horas, el extracto obtenido en el paso (a) se somete a un proceso de filtrado, en el que dicho extracto se hace pasar a través de un material poroso como, por ejemplo, aunque sin limitarnos, tela, tamiz, malla o gasa. En otra realización preferida, la filtración del paso (b) del procedimiento de la invención se realiza a través de una gasa. En una realización más preferida, la gasa comprende un tamaño de poro de entre 100 y 150 μ .

A continuación, el material filtrado obtenido en el paso (b) se centrifuga. En una realización preferida, la centrifugación del paso (c) del procedimiento de la invención se realiza a entre 8.000 y 12.000 xg. En una realización más preferida, la centrifugación del paso (c) del procedimiento de la invención se realiza a 10.000 xg. En otra realización preferida, la centrifugación del paso (c) del procedimiento de la invención se realiza durante entre 8 y 12 minutos. En una realización más preferida, la centrifugación del paso (c) del procedimiento de la invención se realiza durante 10 minutos.

El sobrenadante obtenido en esta centrifugación se somete a un proceso de filtrado. En otra realización preferida, la filtración del paso (d) del procedimiento de la invención se realiza a través de un papel de filtro. Posteriormente, el material filtrado obtenido en el paso (d) se concentra entre un 40 y un 60%, preferiblemente un 50%, mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, evaporación, liofilización o rotavapor. En una realización preferida, la concentración del paso (e) del procedimiento de la invención se realiza mediante un rotavapor. Esta concentración mediante rotavapor se realiza, preferiblemente, durante entre 4 y 8 horas. Se entiende por "rotavapor" el dispositivo consistente en un motor eléctrico que produce el giro de un tubo al que se acopla un recipiente de fondo preferiblemente redondo que contiene la solución. Dicho recipiente se sumerge parcialmente en un baño de agua, mientras se mantiene el giro. Preferiblemente, la temperatura del baño no debe exceder de 35-40°C. Acoplado al sistema se encuentra un refrigerante por el que circula un líquido, preferiblemente agua, que produce la condensación del solvente que se recoge en un colector. El conjunto constituye un sistema cerrado conectado a una bomba de vacío, preferiblemente una trompa de agua o un circuito de vacío.

El procedimiento de la invención puede comprender otros pasos adicionales relacionados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, con la extracción sólido-líquido del paso (a) o con la conservación y/o tratamiento posterior del extracto líquido de alpeorujos seco y extractado obtenible.

Otro aspecto de la invención se refiere a un extracto líquido de alpeorujos seco y extractado, de ahora en adelante "extracto de la invención", obtenible mediante el procedimiento de la invención. En el extracto de la invención los fenoles y otros elementos constituyentes de los extractos líquidos de alpeorujos seco y extractado se encuentran el doble de concentrados de lo que lo están los extractos obtenibles mediante otros métodos de extracción-sólido líquido de este residuo. Este extracto de la invención se puede almacenar a una temperatura de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, entre -20°C y -80°C hasta su posterior utilización.

En una realización preferida, el extracto de la invención comprende:

- a. entre 45 y 65 g/l de carbono orgánico total, preferiblemente 55,7 g/l,
- b. entre 0,2 y 0,5 g/l de P, preferiblemente 0,39 g/l,
- c. entre 0,5 y 1 g/l de Ca, preferiblemente 0,87 g/l,
- d. entre 6 y 8,5 g/l de K, preferiblemente 7,7 g/l,
- e. entre 0,1 y 0,5 g/l de Mg, preferiblemente 0,22 g/l,
- f. entre 0,03 y 0,05 g/l de Na, preferiblemente 0,043 g/l,
- g. entre 0,05 y 0,2 g/l de S, preferiblemente 0,16 g/l,
- h. entre 0,006 y 0,01 g/l de B, preferiblemente 0,0083 g/l,
- i. entre 0,0008 y 0,002 g/l de Cu, preferiblemente 0,0015 g/l,
- j. entre 0,01 y 0,03 g/l de Fe, preferiblemente 0,025 g/l,

ES 2 370 215 A1

k. entre 0,002 y 0,004 g/l de Mn, preferiblemente 0,0034 g/l y

l. entre 0,003 y 0,005 g/l de Zn, preferiblemente 0,0046 g/l,

5 y se encuentra a un pH de entre 4.5 y 6, preferiblemente de 5.3. No obstante, el extracto de la invención presenta una composición variable, en cuanto a elementos químicos, proteínas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, enzimas, etc., que vendrá determinada por ciertos factores del procedimiento de la invención, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, el tipo de solvente empleado, la composición del material de partida, es decir, del alpeorajo seco y extractado, etc.

10

El extracto de la invención supone una fuente importante de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, preferiblemente de hongos, como demuestra el hecho de que al ser empleado como medio de cultivo permite la obtención de una abundante masa fúngica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del extracto de la invención para el cultivo de microorganismos. Los microorganismos que pueden ser cultivados en el extracto de la invención son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, bacterias, hongos, levaduras, protozoos o algas, y en general, cualquier microorganismo de interés biotecnológico, industrial o agrícola, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, aquellos microorganismos capaces de producir antibióticos, antioxidantes, fitohormonas, hormonas, vitaminas, grasas insaturadas o saturadas, proteínas, aminoácidos, compuestos fertilizantes o productos fitosanitarios. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microorganismo es un hongo. El término “hongo” se refiere a cualquier microorganismo perteneciente al reino *Fungi*, ya sea filamentosos o levaduriforme, caracterizado por poseer, entre otros componentes, una pared celular compuesta por quitina. Preferiblemente, los hongos que pueden ser cultivados en el extracto de la invención son hongos saprobios, más preferiblemente, hongos saprobios productores de metabolitos primarios y/o secundarios. Los “hongos saprobios” son todos aquellos hongos capaces de descomponer materiales orgánicos, vegetales o animales, para alimentarse.

25

En una realización más preferida, el hongo pertenece a un género seleccionado de la lista que comprende: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Chaetomium*, *Wardomyces*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pleurotus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Corioloropsis*, *Trametes*, *Pycnoporus*, *Phlebia*, *Fomes*, *Panus* o *Mortierella*. En una realización más preferida, el hongo pertenece al género *Trichoderma*. Se entiende por “*Trichoderma*” el género de hongos presente en los suelos, cuyas colonias son blancas cuando crecen en medio PDA (agar patata-dextrosa) y presentan una estructura reproductora típica en forma de botella, denominada *phialide*. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra, preferiblemente, entre 20 y 28°C, aunque crece bien entre 6 y 32°C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es, preferiblemente, del 92% y para su esporulación es de, preferiblemente, entre el 93% y el 95%. Ejemplos de hongos pertenecientes a este género son, aunque sin limitarnos, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. flavofuscum*, *T. stromaticum* o *T. reesei*.

En una realización aun más preferida, el hongo pertenece a la especie *Trichoderma harzianum*, la cual se puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos, produce toxinas y antibióticos, comprende las cuatro formas biológicas Th1, Th2, Th3 y Th4 y se caracteriza porque en su estadio temprano el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran rápidamente, preferiblemente, a 25°C. Las especies de este género prefieren un pH ácido de, preferiblemente, entre 4.5 y 5, aunque son capaces de crecer a un pH de entre 2 y 9. El tamaño de los conidióforos es de, preferiblemente, entre 62,5 y 69 μm por entre 3 y 4,7 μm . Los conidióforos son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de, preferiblemente, entre 6,3 y 15,6 μm por entre 2,7 y 3,4 μm .

En otra realización preferida, el hongo pertenece a la especie *Trichoderma koningii*, la cual se caracteriza porque sus colonias inicialmente se ven como una superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas a través del tiempo permite observarlas ligeramente algodonosas. El color de sus colonias cambia gradualmente de blanco a blanco verdoso y finalmente se tornan a un color verde oscuro. No produce pigmentos en el medio de cultivo, por lo que el reverso de la colonia es incoloro. Su temperatura de crecimiento oscila, preferiblemente, entre 20 y 25°C, con una temperatura óptima de 25°C. Su pH de crecimiento óptimo se encuentra, preferiblemente, entre 3.7 y 6. El contenido de humedad que favorece su crecimiento se encuentra, preferiblemente, entre el 70% y el 80%. Sus clamidosporas son intercalares o terminales, cilíndricas o globosas. Posee hifas hialinas septadas y ramificadas a ambos lados sin ser paralelas, conidióforos, fiálides y conidios aunque también pueden producir clamidosporas.

En otra realización preferida, el hongo pertenece a la especie *Trichoderma viride*, la cual se caracteriza por presentar colonias de color verde y unos conidióforos hialinos ramificados, pero no en verticilos, que nacen en racimos terminales de fiálides individuales o en grupo y presentan una forma globosa, subglobosa o elíptica. Este hongo es capaz de crecer a temperaturas moderadas, preferiblemente de entre 15 y 25°C, y en presencia de un pH preferiblemente ácido.

65

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

ES 2 370 215 A1

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

Ejemplos

5 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del procedimiento de la invención en la obtención de un extracto líquido de alpeorujos seco y extractado así como del uso de éste en el cultivo de microorganismos, preferiblemente hongos. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

15 *Procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujos seco y extractado.*

Se utilizó alpeorujos seco y extractado derivado de la tecnología de extracción en dos fases del aceite de oliva de las empresas oleícolas Colgra y Sierra Sur S.A. (Granada). El alpeorujos se autoclavó a 120°C durante 20 minutos y se conservó en recipientes herméticos a 4°C hasta su uso.

25 Se realizó la extracción sólido-líquido de alpeorujos seco y extractado mediante un extractor rotativo orbital con agua, durante 8 horas en la proporción 1:2 (peso:volumen). Transcurrido este tiempo la mezcla resultante se filtró a través de una gasa, se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró con papel de filtro. Posteriormente se concentró, mediante rotavapor, el volumen de extracto líquido un 50%. El extracto líquido se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

El extracto líquido obtenido por el procedimiento aquí descrito y empleado como medio de cultivo presentó la siguiente composición (tabla 1):

TABLA 1

Composición del extracto líquido de alpeorujos seco y extractado

Composición	Concentración (g/l)
Carbono orgánico total	55,7
P	0,39
Ca	0,87
K	7,7
Mg	0,22
Na	0,043
S	0,16
B	0,0083
Cu	0,0015
Fe	0,025
Mn	0,0034
Zn	0,0046
pH	5.3

ES 2 370 215 A1

Ejemplo 2

Cultivo de hongos en el extracto líquido de alpeorujo seco y extractado

5 Se comprobó el crecimiento de hongos pertenecientes a los géneros: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Chaetomium*, *Wardomyces*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pleurotus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Corioloropsis*, *Trametes*, *Pycnoporus*, *Phlebia*, *Fomes*, *Panus* y *Mortierella*, en el medio de extracto líquido de alpeorujo seco y extractado obtenido en el ejemplo anterior.

10 Ejemplo 2.1

Cultivo de Trichoderma harzianum (BAFC Cult. No LC-23) en el extracto líquido de alpeorujo seco y extractado

15 El hongo *Trichoderma harzianum* se cultivó en 2% de medio de cultivo agar-extracto de malta (MEA) (tabla 2) y se incubó en estufa a 28°C, tras su crecimiento se almacenó a 4°C hasta su uso.

TABLA 2

Composición medio MEA (g/l)

Composición	Concentración (g/l)
Extracto de malta	2
Peptona	2
Glucosa	20
Agar	15
pH	4.7

35 El hongo se cultivó, posteriormente, en matraces de 250 ml con 70 ml de los medios de cultivo siguientes:

1. Extracto líquido de alpeorujo seco y extractado de la invención,
2. Extracto líquido de alpeorujo sin concentrar,
3. Extracto de malta,
4. Medio caldo patata-dextrosa (Potato dextrose broth o PDB),
5. Medio Czapeck.

50 Tras la esterilización a 120°C durante 20 minutos, estos medios se inocularon con 2 cuadrados 0,5 x 0,5 cm de medio MEA con el hongo, y se dejaron crecer durante 15 días en agitación en una cámara de cultivo a 28°C.

La composición de cada uno de los medios de cultivo fue la que se muestra a continuación:

TABLA 3

Composición del medio extracto de malta (g/l)

Composición	Concentración (g/l)
Extracto de Malta	6
Maltosa	1,8

ES 2 370 215 A1

Extracto de levadura	1,2
Glucosa	6
pH	4.7

TABLA 4

Composición del medio caldo patata-dextrosa (g/l)

Composición	Concentración (g/l)
Dextrosa	20,0
Patata, Infusión de	4,0

TABLA 5

Composición del medio CZAPEK (g/l)

Composición	Concentración (g/l)
NO ₃ Na	2
ClK	0,59
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,59
SO ₄ Fe.7H ₂ O	0,01
PO ₄ H ₂ K	1
Sacarosa	30
pH	5

Transcurrido el período de incubación, los medios se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 minutos y se filtraron con filtros estériles para recoger el micelio. El micelio del hongo se lavó y tras su secado a 100°C se determinó el peso seco. Se obtuvieron los siguientes gramos de masa seca (tabla 6):

TABLA 6

Gramos de masa seca de micelio fúngico de Trichoderma harzianum obtenidos en cada medio de cultivo

Medio de cultivo	Masa seca de micelio fúngico (g)
Medio extracto líquido de alpeorujó	1,437

ES 2 370 215 A1

seco y extractado de la invención	
Medio extracto líquido de alpeoruj seco y extractado sin concentrar	0,452
Medio extracto de malta	0,632
Medio PDB	0,943
Medio CZAPEK	0,204

Ejemplo 2.2

*Cultivo de Trichoderma koningii (BAFC Cult. No B-51) en el extracto líquido de alpeoruj
seco y extractado*

Se utilizó el mismo medio de cultivo que en el ejemplo 2.1. y el inóculo de *Trichoderma koningii* se fabricó también de manera similar.

El hongo se cultivó, posteriormente, en matraces de 250 ml con 70 ml de los medios de cultivo siguientes:

1. Extracto líquido de alpeoruj
seco y extractado de la invención,
2. Extracto líquido de alpeoruj
sin concentrar,
3. Extracto de malta,
4. Medio caldo patata-dextrosa (Potato dextrose broth o PDB),
5. Medio Czapeck.

El cultivo se realizó durante 15 días en agitación en una cámara de cultivo a 28°C. Después de lavar y secar el micelio del hongo de la misma forma que la descrita en el ejemplo 2.1. se determinó el peso seco. Se obtuvieron los siguientes gramos de masa seca (tabla 7):

TABLA 7

*Gramos de masa seca de micelio fúngico de Trichoderma koningii obtenidos
en cada medio de cultivo*

Medio de cultivo	Masa seca de micelio fúngico (g)
Medio extracto líquido de alpeoruj seco y extractado de la invención	1,564
Medio extracto líquido de alpeoruj seco y extractado sin concentrar	0,421
Medio extracto de malta	0,441
Medio PDB	0,924
Medio CZAPEK	0,410

ES 2 370 215 A1

Ejemplo 2.3

Cultivo de Trichoderma viride (EEZ. No 12) en el extracto líquido de alpeorujos seco y extractado

5 Se utilizaron los mismos medios de cultivo y procedimientos que los descritos en los ejemplos 2.1. y 2.2. Se obtuvieron los siguientes gramos de materia seca (tabla 8):

TABLA 8

10 *Gramos de masa seca de micelio fúngico de Trichoderma viride obtenidos en cada medio de cultivo*

15	Medio de cultivo	Masa seca de micelio fúngico (g)
20	Medio extracto líquido de alpeorujos seco y extractado de la invención	1,569
25	Medio extracto líquido de alpeorujos seco y extractado sin concentrar	0,403
	Medio extracto de malta	0,466
	Medio PDB	0,845
30	Medio CZAPEK	0,593

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 370 215 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujo seco y extractado que comprende:
- a. realizar una extracción sólido-líquido de alpeorujo seco y extractado mediante una disolución acuosa,
 - b. filtrar el extracto obtenido en el paso (a),
 - 10 c. centrifugar el filtrado obtenido en el paso (b),
 - d. filtrar el sobrenadante obtenido en la centrifugación del paso (c), y
 - e. concentrar un 40-60% el filtrado obtenido en el paso (d).
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde la extracción sólido-líquido del paso (a) se realiza mediante un extractor rotativo orbital.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde en la extracción sólido-líquido del paso (a) la proporción de alpeorujo seco y extractado y de disolución acuosa es 1:2 peso:volumen.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la disolución acuosa del paso (a) es agua.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la extracción sólido-líquido del paso (a) se realiza durante entre 6 y 10 horas.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la filtración del paso (b) se realiza a través de una gasa.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la centrifugación del paso (c) se realiza a entre 8.000 y 12.000 xg.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la centrifugación del paso (c) se realiza durante entre 8 y 12 minutos.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la filtración del paso (d) se realiza a través de un papel de filtro.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la concentración del paso (e) se realiza mediante un rotavapor.
- 40 11. Extracto líquido de alpeorujo seco y extractado obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 45 12. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 11 para el cultivo de microorganismos.
13. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 12 donde el microorganismo es un hongo.
- 50 14. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 13 donde el hongo pertenece a un género seleccionado de la lista que comprende: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Chaetomium*, *Wardomyces*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pleurotus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Coriopsis*, *Trametes*, *Pycnoporus*, *Phlebia*, *Fomes*, *Panus* o *Mortierella*.
- 55 15. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 14 donde el hongo pertenece al género *Trichoderma*.
16. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 15 donde el hongo pertenece a la especie *Trichoderma harzianum*.
- 60 17. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 15 donde el hongo pertenece a la especie *Trichoderma koningii*.
- 65 18. Uso del extracto líquido de alpeorujo seco y extractado según la reivindicación 15 donde el hongo pertenece a la especie *Trichoderma viride*.



②① N.º solicitud: 201030719

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.05.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	<p>ARANDA, E. et al. Reducción de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujo en plantas de tomate mediante el uso de <i>Fusarium lateritium</i>. 16.11.2004, páginas 1-3. [en línea] [recuperado el 11.07.2011]. Ver página 1 Recuperado de Internet:<URL: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Calidad_Ambiental/Gestion_De_Los_Residuos_Solidos/compost/Reduccion_fitotoxisidad_alpeorujo.pdf</p>	1-6
Y	<p>ARANDA, E. et al. OLI-09, Decrease of plant toxicity caused by water-soluble substances of olive mill dry residue using saprobe fungi. 24.04.2003, páginas 1-4 [en línea] [Recuperado el 11.07.2011] Ver página 2. Recuperado de Internet:<URL: http://www.expoliva.com/expoliva2003/simposium/comunicaciones/OLI-09-TEXTO.PDF</p>	1-18
Y	<p>SAMPEDRO QUESADA, Mª I. Disminución de la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Tesis Doctoral, 2005. [en línea] [recuperado el 11.07.2011] Recuperado de Internet:<URL: http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/629/1/15433559.pdf ver páginas 48, 75, 76, 107, 171, 179</p>	1-18
A	<p>SAMPEDRO, I. et al. Bioconversion of olive-mill dry residue by <i>Fusarium lateritium</i> and subsequent impact on its phytotoxicity. Chemosphere, 2005. Vol. 60, páginas 1393-1400. ISSN 0045-6535. Doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.093</p>	1-4
A	<p>ARANDA, E. et al. Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residue by saprobe fungi. Chemosphere, 2007. Vol. 66, páginas 67-74. ISSN: 0045-6535. Doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.021</p>	

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
12.07.2011

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)
A61K36/63 (2006.01)
A01N65/00 (2009.01)

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

C12N, A61K, A01N

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, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, CROPU, PASCAL SCISEARCH, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7-18	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	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.

Consideraciones:

La presente solicitud tiene por objeto un procedimiento de obtención de un extracto líquido de alpeorujos seco y extractado que comprende (reivindicación 1):

- a) Realizar una extracción sólido-líquido de alpeorujos seco y extractado mediante una disolución acuosa.
- b) Filtrar el extracto obtenido en a).
- c) Centrifugar el filtrado obtenido en b).
- d) Filtrar el sobrenadante obtenido en la centrifugación, y
- e) Concentrar un 40-60% el filtrado obtenido en d).

La extracción sólido-líquido de a) se realiza mediante un extractor rotativo orbital (reiv. 2) siendo la proporción de alpeorujos seco y extractado frente a la disolución acuosa de 1:2 peso: volumen (reiv. 3), donde la disolución acuosa es agua (reiv. 4). La extracción se realiza entre 6 y 10 horas (reiv. 5).

La filtración de b) se hace a través de una gasa (reiv. 6) y la centrifugación de c) entre 8.000 y 12.000 xg (reiv. 7), durante 8 y 12 minutos (reiv. 8).

La filtración del d) se realiza a través de un papel de filtro (reiv. 9) y la concentración de e) mediante un rotavapor (reiv. 19).

También es objeto de protección un extracto líquido de alpeorujos seco y extractado obtenible mediante el procedimiento de 1-10 (reiv. 11) y el uso del extracto líquido para el cultivo de microorganismos (reiv. 12), donde el microorganismo es un hongo (reiv. 13), seleccionado de *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillum*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, etc. (reiv. 14).

El hongo pertenece al género *Trichoderma*, pudiendo ser de la especie *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* o *T. viride* (reivs. 15-18).

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	ARANDA, E. et al. Reducción de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorajo en plantas de tomate mediante el uso de <i>Fusarium lateritium</i> . páginas 1-3. [en línea] [recuperado el 11.07.2011]	16.11.2004
D02	ARANDA, E. et al. OLI-09, Decrease of plant toxicity caused by water-soluble substances of olive mill dry residue using saprobe fungi. Páginas 1-4 [en línea] [Recuperado el 11.07.2011]	24.04.2003
D03	SAMPEDRO QUESADA, M ^a I. Disminución de la fitotoxicidad del alpeorajo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Tesis Doctoral, 2005. [en línea] [recuperado el 11.07.2011]	2005
D04	SAMPEDRO, I. et al. Bioconversion of olive-mill dry residue by <i>Fusarium lateritium</i> and subsequent impact on its phytotoxicity. Chemosphere, 2005. Vol. 60, páginas 1393-1400.	2005
D05	ARANDA, E. et al. Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residue by saprobe fungi. Chemosphere, 2007. Vol. 66, páginas 67-74	

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**NOVEDAD**

Los documentos citados **D01** a **D05** se refieren al tratamiento del alpeorajo, siendo el más relevante el **D01**. En efecto,

* **D01** se refiere a la reducción de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorajo en plantas de tomate mediante el uso de *Fusarium lateritium* y divulga la extracción acuosa del alpeorajo mediante agitación orbital con una proporción de alpeorajo /agua 1:2 durante 8 horas. La suspensión se pasa por una gasa obteniéndose una fase sólida (alpeorajo lavado) y una líquida (extracto acuoso) que se puede concentrar hasta un 40% v/v (página 1, Metodología del trabajo empleada, cuarto párrafo), anticipando las características técnicas de las reivindicaciones 1 - 6.

Por ello, a la vista del documento D01, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 6** carecen de novedad de acuerdo al Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de obtener un extracto líquido de alpeorajo seco y extractado y su utilización para el cultivo de microorganismos como los hongos resulta obvio para el experto en la técnica a la vista de los documentos **D01** a **D03**.

* **D01** afecta no solo a la novedad sino también a la actividad inventiva de las reivindicaciones afectadas pero, además, los documentos **D02** y **D03** son relevantes para el estudio de la actividad inventiva de todas las reivindicaciones. Así,

* **D02** se refiere a la disminución de la toxicidad de las plantas causada por sustancias solubles en agua de residuos de alpeorajo (olive mill dry) usando hongos saprobios. El extracto acuoso de alpeorajo se obtuvo de un orbital agitando durante 8 horas con agua destilada en la proporción 1:2, la suspensión se filtró y se utilizó como medio de cultivo para hongos (página 2, líneas 3-10). La concentración llegó hasta el 15% (página 2) para el experto en la técnica sería evidente probar con otras concentraciones. Además, a la vista del documento **D03** que se refiere a la disminución de la fitotoxicidad del alpeorajo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares con extracto acuoso de alpeorajo seco y extractado (páginas 75, 76, 107) en cuyo medio todo los hongos ensayados (página 48) fueron capaces de crecer en ausencia de suplementos nutritivos externos (página 179).

A la vista del procedimiento de obtención de extracto acuoso de alpeorajo partiendo de alpeorajo seco y extractado, filtrando y centrifugando divulgado en **D02** como medio de cultivo de hongos divulgados en **D03**, para el experto en la técnica no supondría ningún esfuerzo inventivo llegar a todas las condiciones del procedimiento y su uso en cultivo de los microorganismos reivindicados en la solicitud en estudio.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D03, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 18** carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.