

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 683**

21 Número de solicitud: 201100606

51 Int. Cl.:

A01N 65/38 (2009.01)

A23K 1/14 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.05.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.12.2012

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

27.12.2012

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
OTRI-PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS
DELICIAS S/N
41012 SEVILLA, ES**

72 Inventor/es:

**PARRADO RUBIO, Juan;
BAUTISTA PALOMAS, Juan Dionisio y
TEJADA MORAL, Manuel**

54 Título: **OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO PROTEICO MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE HOJAS DE TABACO Y SU APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE.**

57 Resumen:

El objeto de la invención es obtener un producto a partir de hojas de tabaco (frescas y/o secas) desechadas para la fabricación del propio tabaco que actúen como en el campo agronómico como biofertilizante/bioestimulante. El proceso bioquímico seleccionado es mediante hidrólisis enzimática utilizando proteasas. Mediante esta metodología se obtienen extractos proteicos constituidos básicamente por péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres de una alta solubilidad. Su alto contenido en N-orgánico hace que dicho producto sea considerado óptimo para la agricultura, tal y como se comprueba en las experiencias realizadas en el cultivo de tomate.

ES 2 393 683 A1

DESCRIPCIÓN

Obtención de un extracto proteico mediante hidrólisis enzimática a partir de hojas de tabaco y su aplicación como fertilizante

5 **Objeto de la invención**

El objeto de esta invención es la obtención de un concentrado proteico a partir de hojas de tabaco (frescas y/o secas) no aprovechables para la fabricación de dicho tabaco mediante el proceso de hidrólisis enzimática lo que origina concentrados con un alto contenido proteico (80%). La mayoría de estos hidrolizados están
10 formados por péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres con alta solubilidad. Esto hace que estos compuestos proteicos se absorban por la planta a una mayor velocidad de manera más eficiente y, sobre todo, son una buena fuente de aminoácidos esenciales, muy importante para la nutrición de las plantas.

15

Estado de la técnica

El tabaco, es a día de hoy uno de los principales cultivos a nivel mundial cuyo fin no es alimenticio. En España se cultiva tabaco en 7 comunidades autónomas: Extremadura, Andalucía, Canarias, Castilla y León, Castilla la
20 Mancha, Navarra y País Vasco. Extremadura es la región autonómica donde se concentra el 85% de la producción española, seguida de Andalucía.

España es el tercer país de Europa con 40991 T de cosecha en 2005 y un valor de producción de 144,5 millones de euros en 2003 (ASTRA), dando empleo a más de 20000 familias.

25 La elaboración del tabaco, se hace en base a un proceso que consta de varias etapas, y que tiene por objeto producir en las hojas una serie de transformaciones químicas que las hacen más aptas y aceptables para el uso. Sin embargo, no todas las hojas de la planta del tabaco tienen la misma composición química, y por ello, en el cultivo del tabaco, no todas las hojas son aprovechadas
30 para la fabricación de tabaco.

Generalmente, las 2-3 hojas que se desarrollan en la parte más baja del tallo suelen quedar deterioradas por el contacto con las aguas de riego y con el suelo. Son hojas con menor contenido en nicotina, aroma, etc., y por tanto, resulta conveniente suprimirlas en la primera parte del ciclo vegetativo que sigue al
35 transplante.

Por otro lado, en la fase de despunte se suelen suprimir varias hojas que salen justo debajo de la inflorescencia. Este despunte influye notablemente en la composición física y química del tabaco curado. Con el despunte, al reducir el número de hojas a recolectar, los nutrientes se acumularán en las hojas que quedan.

Del mismo modo, en la fase de despallido y clasificación se manipulan las hojas seleccionadas para la fabricación de tabaco. Normalmente, a estas hojas se les retira la parte más gruesa del nervio, dos tercios en el caso de las hojas destinadas a tripa, y tres cuartas partes en el caso de los capotes.

Como consecuencia de todo esto, el cultivo de tabaco también origina un material vegetal no aprovechable para el proceso de elaboración de tabaco y que podría ser usado con otros fines, como por ejemplo, la obtención de biofertilizantes o bioestimulantes.

En los últimos años, ha ido aumentando el consumo de proteínas vegetales a causa de una mayor utilización de productos proteicos de buena calidad, ya sean en forma de concentrados o de aislados proteicos. Sin embargo, el uso de estos productos se ve limitado por su baja solubilidad o por sus caracteres potencialmente alergénicos. Estas dos razones han conducido al estudio de procesos de hidrólisis enzimática para obtener nuevos productos proteicos con características nutricionales y funcionales definidas, minimizando o eliminando los inconvenientes.

Estos nuevos productos, denominados biofertilizantes o bioestimulantes están constituidos generalmente péptidos, aminoácidos, polisacáridos, ácidos húmicos, fitohormonas, etc que son absorbidos directamente por la planta, gastando la misma una menor cantidad de energía para dicho proceso de absorción, lo cual repercute positivamente no solo en su crecimiento sino también en la calidad y producción del fruto o grano recolectado. El objetivo de estos productos no es suministrar la nutrición, sino más bien para favorecer y estimular el metabolismo de la planta, reducción de estrés, etc (Parrado et al., 1991, 2008). Por esta razón, el desarrollo de nuevos biofertilizantes/bioestimulantes, utilizando materiales naturales, se ha convertido en el foco de interés en la investigación.

Una gran parte de estos nuevos biofertilizantes/bioestimulantes se han procesado a partir de métodos bioquímicos, generalmente por medio de hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática se ha monitorizado mediante la técnica del pH-stat, utilizado un biorreactor con control de pH, temperatura y agitación y medida del consumo de NaOH. El parámetro usado para controlar la reacción hidrolítica

es el grado de hidrólisis (GH), el cual se define como el porcentaje de uniones peptídicas rotas (Adler Nissen, 1977). El fundamento de la técnica del pH-stat radica en que bajo condiciones de hidrólisis neutra o alcalina la disociación del grupo amino resulta significativa y el continuo consumo de base necesario para
5 mantener el pH constante durante la reacción es un medio de controlar la magnitud del proceso hidrolítico. Así pues, el grado de hidrólisis se define como la relación entre el número de uniones peptídicas rotas y el número total de uniones peptídicas.

En este sentido, cabe a destacar una gran cantidad de trabajos científicos
10 así como de patentes realizadas sobre distintos productos vegetales (algarroba, trigo, maíz, girasol, arroz, etc.) utilizando la hidrólisis enzimática, obteniendo productos caracterizados principalmente por su alto contenido en péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres y que tienen una importante repercusión en el mundo agrícola debido a una mejora en la nutrición de la planta, afectando
15 positivamente no solo a su crecimiento sino también a la producción del grano o fruto obtenido (Bautista, 1999; Bautista et al., 1996; Garcia-Martínez et al., 2007, 2008; Parrado et al., 2006, 2007a, 2007b; Pedroche et al., 2000; Romero et al., 2007; Villanueva et al., 1999). Del mismo modo, existe una gran cantidad de patentes que tratan sobre la obtención de productos solubles utilizables en la
20 agricultura y que se han elaborado mediante procesos de hidrólisis (ver referencias). Sin embargo, no hay patentes ni estudios de elaboración de biofertilizantes a partir de hojas de tabaco (frescas y/o secas) utilizando procesos enzimáticos directos. Se han encontrado patentado, procesos relacionados con tabaco y su conversión en fertilizantes compuestos por de polipéptidos y su uso
25 como producto agroquímico (PCT/EP2007/002075), en este caso el proceso es muy diferente y más complejo que el se describe en esta patente, ya que utiliza sustratos y procesos diferentes, en concreto los sustratos son células BY2 de tabaco y procesos de fermentación con microorganismos, separación de la células del medio de fermentación, homogeneización, precipitación de las
30 paredes celulares seguido de lavados para eliminar componentes citoplásmicos, hervido de las paredes celulares en disolución ácida para separar los azúcares unidos a las proteínas, digestión de las proteínas de las paredes en medio ácido o enzimático (usando enzimas proteolíticas), y finalmente, una separación de los péptidos y aminoácidos.

La hidrólisis enzimática es pues el procedimiento óptimo para conseguir la extracción de las proteínas a partir de las plantas de tabaco y su conversión en hidrolizados proteicos, principalmente debido a que es un proceso biológico donde la calidad del producto final permanece inalterada.

5

Una alternativa para el proceso de extracción sería una hidrólisis química, en la cual se hidrolizan/extraen las proteínas llevando a ebullición con ácido clorhídrico fuerte, seguido de enfriamiento y neutralización del hidrolizado con carbonato sódico o hidróxido sódico y separación del material sólido no hidrolizado.

10

Las concentraciones de ácido utilizadas son altas por ejemplo:

Acido Clorhídrico 35% , en la hidrólisis de proteína de maíz (ES 2 034 593),
Sulfúrico 3 Molar (EP2128114A2).

15

Estudios realizados han demostrado que los hidrolizados de proteína preparados con ácido clorhídrico contienen una cantidad de compuestos indeseables como dicloropropanoles (DCPs), especialmente 1,3 dicloropropan - 2 - ol y monocloropropanodiolos MCPs) y ha surgido el problema de su eliminación o más bien de la prevención de su formación.

20

La hidrólisis enzimática es un proceso muy eficiente, que se lleva a cabo en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, con lo que la calidad nutricional de los aminoácidos no resulta alterada, ya que de esta manera, no tiene lugar la destrucción o modificación de ciertos restos aminoacídicos, como sí ocurre con la hidrólisis química. Efectivamente para la extracción de proteínas es una técnica ampliamente utilizada, debido a su eficiencia y nulo impacto ambiental, pero no ha sido descrita en el substrato descrito en la invención, esto es, plantas de tabaco con un pretratamiento físico.

25

Descripción de las figuras

30

Figura 1.- Esquema del proceso de obtención de extractos proteicos

Figura 2.- Aspecto de la harina de hojas de tabaco

Figura 3.- Solubilidad de las HHT a distintos valores de pH

Figura 4.- Aspecto de los extractos proteicos obtenidos.

35

A. Concentrado (50 materia seca)

B. Atomizado en forma de polvo.

Figura 5.- Cromatografía de exclusión molecular, en columna Superdex 200HR 10/30 y distribución de los pesos moleculares de los concentrados proteicos. (A) 5 BB-163, (B) H-20, (C) GR, (D) BB-

Figura 6.- Solubilidad de los extractos proteicos obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática

10

Descripción de la invención

La Figura 1 muestra esquemáticamente el proceso de hidrólisis enzimática propuesto para obtener concentrados proteicos a partir de hojas de tabaco.

15 Las hojas de tabaco seleccionadas correspondieron a las variedades (BB-163, B-194., H-20 y G-20). Son hojas frescas y secas que se eliminaron de la planta durante la fase de despunte y que se situaban justo debajo de la inflorescencia. Las hojas de tabaco se secan en estufa a 50 ° C y se trituran posteriormente obteniendo así la harina de hojas de tabaco (HHT). La Tabla 1 20 muestra la composición química de HHT y la Figura 2 muestra una fotografía del aspecto de esta HHT. La solubilidad de dichas HHT no es alta en ningún caso (Figura 3). Sólo a pH muy alcalino logramos que la solubilidad sea algo significativa, pero en ningún caso superior al 31%. Esta baja solubilidad se debe en parte al calor aplicado en el proceso de secado para la obtención de la HHT, 25 aumentando así su indegradabilidad.

	HHT			
	BB-163	H-20	GR	BB-194
Humedad (g kg ⁻¹ , w/w)	72 ± 10	79 ± 9	84 ± 13	80 ± 11
Proteínas (g kg ⁻¹ , w/w)	239 ± 21	245 ± 26	258 ± 22	250 ± 23
Lípidos (g kg ⁻¹ , w/w)	25 ± 7	21 ± 5	19 ± 6	23 ± 6
Carbohidratos (g kg ⁻¹ ,	604 ± 36	639 ± 48	680 ± 41	666 ± 42
Cenizas (g kg ⁻¹ , w/w)	95 ± 14	93 ± 11	103 ± 16	98 ± 12
Ile (*)	4,1 ± 0,9	3,7 ± 1,1	5,1 ± 1,3	4,1 ± 1,0
Leu (*)	12,3 ± 1,2	7,2 ± 1,9	9,1 ± 2,1	8,3 ± 1,6
Lys (*)	2,5 ± 0,5	2,7 ± 0,8	3,3 ± 1,0	2,3 ± 0,7
Met (*)	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,4	0,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2

Phe (*)	3,6 ± 1,0	5,2 ± 1,1	5,7 ± 1,1	3,1 ± 0,6
Thr (*)	3,6 ± 0,8	2,9 ± 0,7	5,0 ± 1,3	3,5 ± 0,8
Trp (*)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Tyr (*)	3,4 ± 0,9	4,1 ± 1,1	2,8 ± 0,9	1,7 ± 0,5
Val (*)	5,5 ± 1,4	4,3 ± 1,1	7,5 ± 1,9	5,2 ± 1,4

Tabla 1. Composición química y aminoacídica (media ± desviación standard) de las HHT. Los resultados son la media de tres repeticiones.

(*) Resultados expresados como gramos por cada 100 g de proteína

5

Una variante es la utilización de la hoja de tabaco, principalmente hojas frescas, procedentes de descartes en la recogida del material, sin secado, se procede a su homogenización en el agua de la hoja, la pasta resultante tendrá un 35-40% de materia seca, con lo cual se ahorra agua, energía y tiempo.

- 10 Otra variante es la utilización de hoja de tabaco procedente de descartes del proceso de secado/fermentación industrial.

Los productos serán sometidos a un tratamiento físico de autoclavado, el cual aumenta la susceptibilidad de extracción proteica por parte de las proteasas.

- 15 El proceso se realiza a una presión interna al menos de 103 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura de 121 grados centígrados. Siendo el tiempo del proceso entre 15-20 minutos.

- 20 A continuación comienza el proceso de hidrólisis enzimático (tabla 3), dicha hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un bioreactor con control de pH, temperatura y agitación, como solvente agua de la red y como medio activo enzimas proteolíticas, preferentemente Subtilisina. A una concentración de sustrato entre 15-20% peso /volumen y una concentración de proteasas entre 0.1-0.3% peso/volumen de reacción, a partir de una solución stock de proteasa 70.000 Unidades de actividad/Ensayo de azocaseína)).

	BB-163	H-20	GR	BB-194
Humedad (g kg ⁻¹ , w/w)	78 ± 6	72 ± 8	79 ± 6	76 ± 5
Proteínas (g kg ⁻¹ , w/w)	801 ± 36	815 ± 42	791 ± 31	822 ± 40
Lípidos (g kg ⁻¹ , w/w)	9 ± 1.1	9 ± 1.0	8 ± 0.9	9 ± 1.2
Carbohidratos (g kg ⁻¹ , w/w)	63 ± 11	68 ± 9	80 ± 13	74 ± 12
Cenizas (g kg ⁻¹ , w/w)	52 ± 10	40 ± 7	45 ± 9	52 ± 12
Arg (*)	2.7 ± 0.5	2.8 ± 0.4	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.6

Tyr (*)	3.8 ± 0.9	4.1 ± 0.9	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.6
Ala (*)	5.6 ± 1.1	5.5 ± 1.0	6.1 ± 0.9	5.9 ± 1.0
Asp (*)	5.9 ± 1.5	5.7 ± 1.1	6.0 ± 1.3	6.9 ± 1.4
Cis (*)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glu (*)	20.1 ± 1.2	22.4 ± 1.5	22.3 ± 2.0	21.0 ± 1.8
Gly (*)	4.0 ± 1.2	3.1 ± 0.7	3.9 ± 0.8	4.2 ± 1.1
Pro (*)	8.5 ± 1.6	8.8 ± 1.4	8.3 ± 1.7	8.0 ± 1.9
Ser (*)	4.5 ± 1.0	4.8 ± 1.2	4.9 ± 1.1	4.8 ± 1.4
Trp (*)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
His (*)	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.7	2.9 ± 0.5
Ile (*)	3.8 ± 0.9	4.1 ± 0.8	4.0 ± 1.0	5.6 ± 1.2
Leu (*)	7.8 ± 1.1	7.5 ± 1.0	7.8 ± 1.3	7.4 ± 1.6
Val (*)	4.1 ± 1.0	4.4 ± 0.8	4.5 ± 1.3	3.8 ± 0.9
Lys (*)	2.8 ± 0.8	2.7 ± 0.6	3.0 ± 0.4	2.1 ± 0.7
Met (*)	1.1 ± 0.3	2.0 ± 0.8	1.0 ± 0.2	3.0 ± 0.6

Tabla 3. Composición química y aminoacídica (media ± desviación standard) de los extractos proteicos obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática. Los datos son la media de tres repeticiones.

5 (*) Resultados expresados como gramos por cada 100 g de proteína

En primer lugar es muy importante, previo al proceso de hidrólisis, la homogeneización y solubilización de los sustratos. El desarrollo de la reacción enzimática se realiza un pH=8-9,5 y T^a=50-60°C, lo que supone las condiciones óptimas de máxima actividad de las enzimas empleadas. La temperatura se regula con baño termostaticado y el pH con NaOH 6N para no incrementar en exceso el volumen de reacción. La etapa de disolución del sustrato dura hasta que el pH se equilibra (estabiliza); después de esta etapa empieza la hidrólisis con la adición de la enzima, el pH bajará a liberarse los restos amino terminales, por lo que se requiere la adición de NaOH para seguir manteniendo el pH óptimo de actuación de la enzima.

La principal diferencia entre los componentes proteicos de las HHT y sus correspondientes hidrolizados es el tamaño molecular de estos componentes. En el caso de los hidrolizados son fundamentalmente péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres (Figura 5), mientras que la mayoría de los componentes de las HHT son proteínas de alto peso molecular.

Al cambiar el tamaño molecular, aumenta drásticamente la solubilidad (Figura 6), aumentando así su absorción por la planta. Además, estos hidrolizados

proteicos debido a su relativamente alto grado de hidrólisis (>15%), pueden considerarse un producto potencialmente hipoalergénico para alimentación animal y como una buena fuente de nitrógeno orgánico para las plantas en caso de utilizarse como biofertilizante/bioestimulante, bien a través de la raíz o foliarmente.

5

Modo de realización de la invención

EJEMPLO:

A continuación se muestra un ejemplo de obtención de un extracto proteico a partir de hoja de tabaco, se ha procedido a utilizar la harina de hojas de tabaco (HHT). Una vez establecidas las condiciones óptimas del proceso hidrolítico, se ha elegido para la obtención de un extracto proteico los: temperatura 60°C, pH 8 y concentración de sustrato (15% p/v) y Subtilisina (0.2% peso/volumen, solución stock de proteasa 70.000 Unidades de actividad/Ensayo de azocaseína) este proceso se mantiene 120 minutos, alcanzándose un grado de hidrólisis final superior, en todos los casos, al 15%.

15

El procesamiento del medio de hidrólisis continúa con diferentes etapas: centrifugación, concentración (30-60% en Materia seca) y una etapa opcional de secado y conversión en polvo (atomización). La Figura 4 muestra una fotografía del aspecto del extracto proteico que se obtiene.

20

Para determinar los efectos de este nuevo producto, se seleccionó el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Momotaro) como cultivo indicador. Del mismo modo, se utilizó un extracto hidrolizado de algarroba para comparar los efectos de este biofertilizante/bioestimulante con el obtenido. El proceso de extracción y composición química del extracto enzimático de algarrobo se encuentran detallados en un trabajo anterior (Parrado et al., 2008).

25

Se seleccionaron semillas de tomate y se hicieron germinar en condiciones controladas de temperatura (20 °C) y humedad (60%). Las plántulas fueron transferidas a contenedores que tenían una turba comercial como sustrato.

30

El diseño experimental fue en bloques al azar, incluyendo 9 contenedores y 8 plántulas de tomate por contenedor. Se realizaron 3 tratamientos fertilizantes, realizándose 3 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron:

(1) tratamiento A0: contenedores fertilizados con una solución NPK (0.6 g N l⁻¹, 0.03 g P l⁻¹, 0.09 g K l⁻¹)

(2) tratamiento A1: contenedores fertilizados con un concentrado proteico de algarroba a una dosis de 1 cm³/500 ml⁻¹ agua

(3) tratamiento A2: contenedores fertilizados con el nuevo concentrado proteico de hojas de tabaco a una dosis de 1 cm³/500 ml⁻¹ agua

5

El tiempo experimental fue de 18 semanas, durante el cual se midió la altura de planta, se determinó el número de flores por planta, y el número de frutos por planta.

La tabla 4 muestra los parámetros analizados en el cultivo de tomate para los diferentes tratamientos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (p <0,05) entre el tratamiento no orgánico (A0) y los dos tratamientos orgánicos (A1 y A2), mostrando los valores más altos en los parámetros estudiados para los tratamientos A1 y A2. Parrado et al (2008) encontró la eficacia de un extracto enzimático de algarrobo en un cultivo de tomate haciendo hincapié en la importancia de este bioestimulantes/biofertilizante en el crecimiento de tomate y de la calidad del fruto obtenido. Los resultados encontrados para los concentrados de proteína de tabaco en hoja son ligeramente superiores a los obtenidos para los concentrados de proteínas de algarroba. Por lo tanto, creemos que al igual que los concentrados de proteínas de algarroba, las hojas de tabaco de concentrados de proteínas puede ser utilizado como bioestimulantes / biofertilizante en la agricultura.

Tiempo experimental (semanas)	Altura de planta (cm)			Número de flores por planta			Número de frutos por planta		
	Tratamiento A0	Tratamiento A1	Tratamiento A2	Tratamiento A0	Tratamiento A1	Tratamiento A2	Tratamiento A0	Tratamiento A1	Tratamiento A2
8	Nd	Nd	Nd	1a [†]	1a	1a	-	-	-
10	Nd	Nd	Nd	3ab ± 1	4b ± 1	4b ± 1	-	-	-
12	Nd	Nd	Nd	7bc ± 1	7bc ± 2	8c ± 2	1a [†]	1a	1a
14	Nd	Nd	Nd	8c ± 2	14cd ± 2	15cd ± 2	1a	2b ± 1	2b ± 1
16	Nd	Nd	Nd	9c ± 2	31d ± 4	33d ± 4	2b ± 1	4c ± 1	4c ± 1
18	54.1a [†] ± 1.4	82.5b ± 2.1	84.6b ± 2.5	9c ± 2	33d ± 5	34d ± 4	3bc ± 1	15d ± 3	16d ± 2

Tabla 4. Parámetros obtenidos (media ± desviación standard) en el cultivo de tomate. Los datos son la media de tres repeticiones

Nd: no determinado

†Columnas (media \pm desviación standard) seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de extractos proteicos a partir de hojas de tabaco mediante hidrólisis enzimática, caracterizado porque se realiza en un biorreactor con
 - a) una concentración homogeneizada de hojas de tabaco en materia seca de 10-20% peso/volumen,
 - b) enzimas proteolíticas, preferentemente subtilisina, a una concentración que oscila entre 0.1-0.3% peso/volumen de reacción
 - c) a una temperatura de 50-60 °C y
 - d) durante un tiempo de extracción de 90-a 150 minutos a pH entre 8 y 9,5.
2. Procedimiento para la obtención de extractos proteicos a partir de hojas de tabaco mediante hidrólisis enzimática según reivindicación 1, caracterizado porque el concentrado de hojas de tabaco se obtiene: a) *principalmente* a partir hojas frescas, las cuales serán secadas a 50°C, trituradas y mediante la adición de agua se obtendrá el concentrado con 10-20% de materia, b) sin secado, se procede a su homogenización en el agua de la hoja, de tal manera que la pasta resultante tendrá un 35-40% de materia seca y mediante la adición de agua se obtendrá el concentrado
3. Procedimiento para la obtención de extractos proteicos a partir de hojas de tabaco mediante hidrólisis enzimática según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las hojas de tabaco son pretratadas físicamente, mediante un tratamiento de autoclavado, el cual aumenta la susceptibilidad de extracción proteica por parte de las enzimas proteolíticas.
4. Procedimiento para la obtención de extractos proteicos a partir de hojas de tabaco mediante hidrólisis enzimática según reivindicación 3 caracterizado porque el tratamiento de autoclavado se realiza a una presión interna al menos de 103 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura de 121 grados centígrados durante un tiempo entre 15-20 minutos.

5. Utilización de los extractos proteicos obtenidos según el procedimiento descrito en las reivindicaciones anteriores compuestos principalmente por nitrógeno orgánico en forma de péptidos y aminoácidos libres como agente con una alta potencia biofertilizante/bioestimulante en todo tipos de cultivos.
5
6. Utilización de los extractos proteicos obtenidos según el procedimiento descrito en las reivindicaciones anteriores en cultivos agrícolas, bien mediante su aplicación directa en suelo por vía foliar o bien por fertirrigación.
10
7. Utilización de los extractos proteicos obtenidos según el procedimiento descrito en las reivindicaciones anteriores como suplemento proteico en la elaboración de dietas para alimentación animal.
15

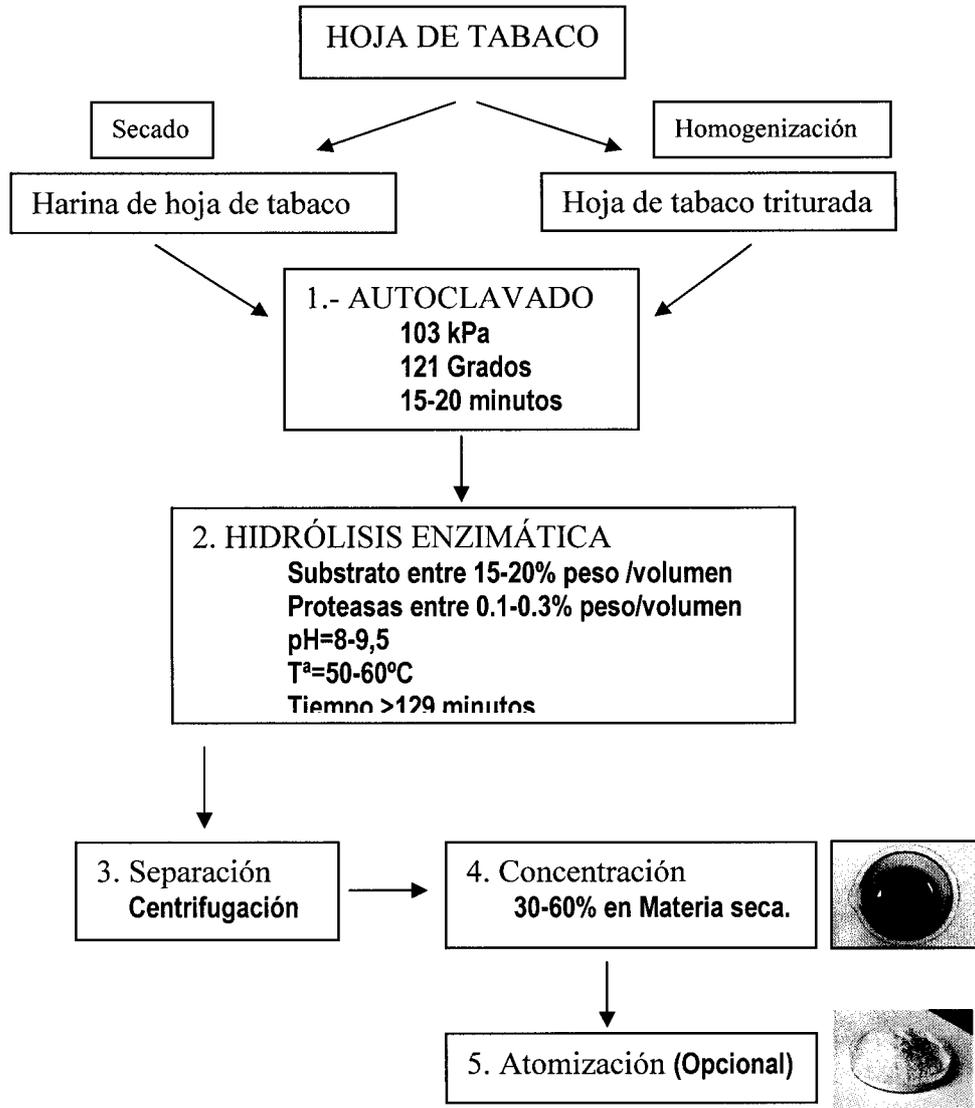


Figura 1



Figura 2

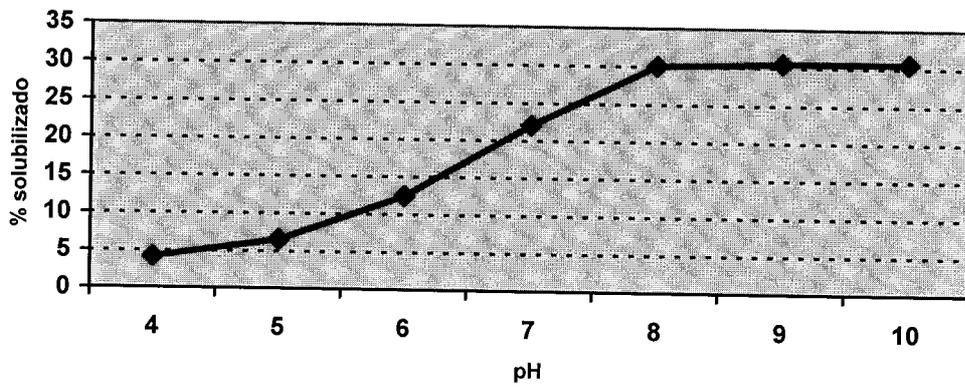
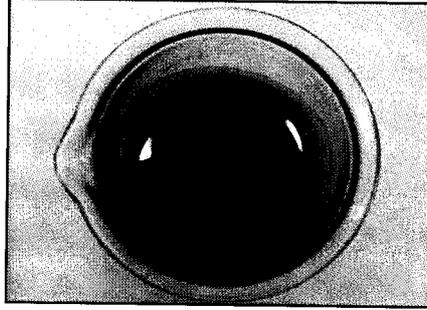


Figura 3

A)



B)

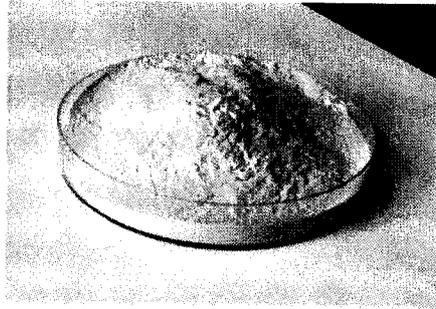
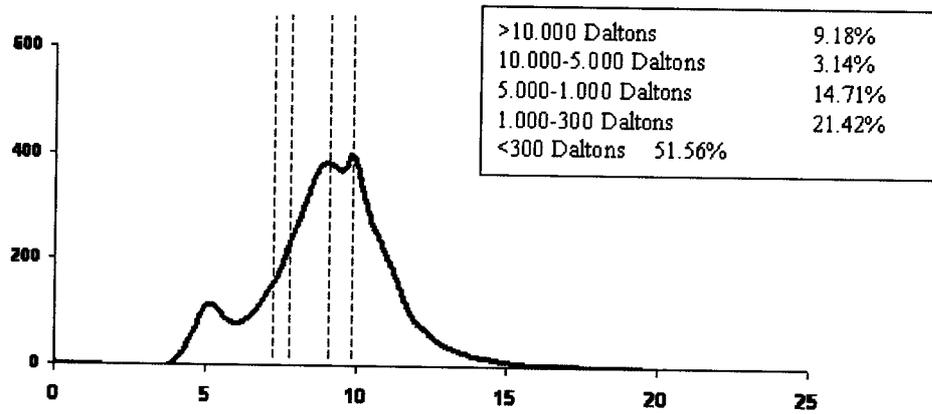
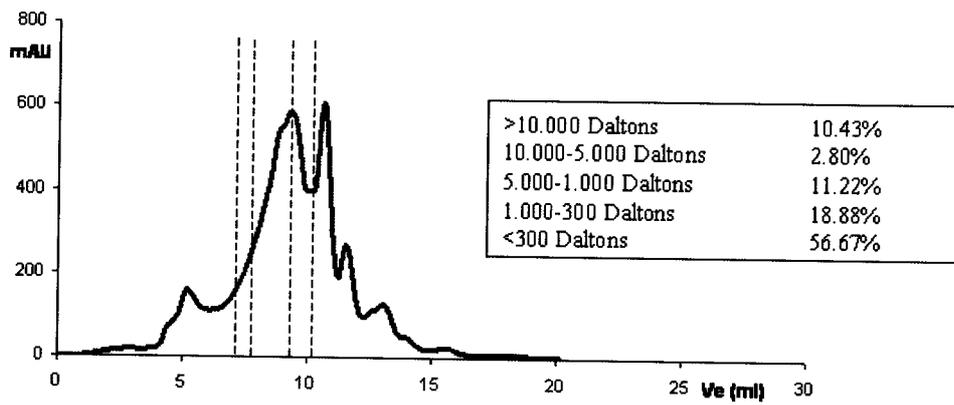


Figura 4

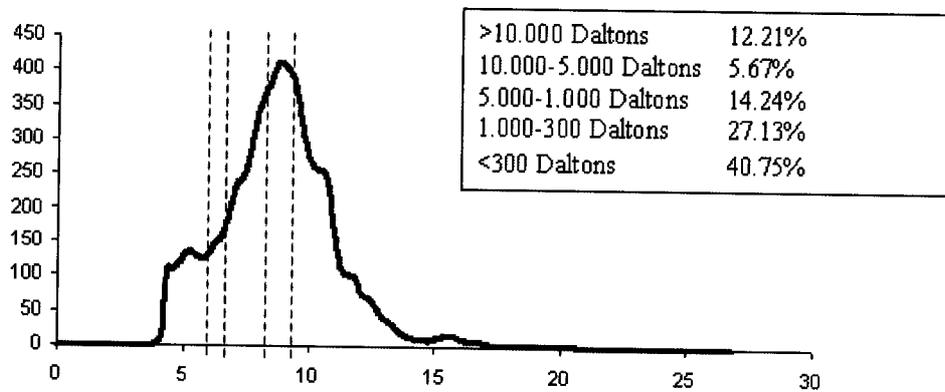
A)



B)



C)



D)

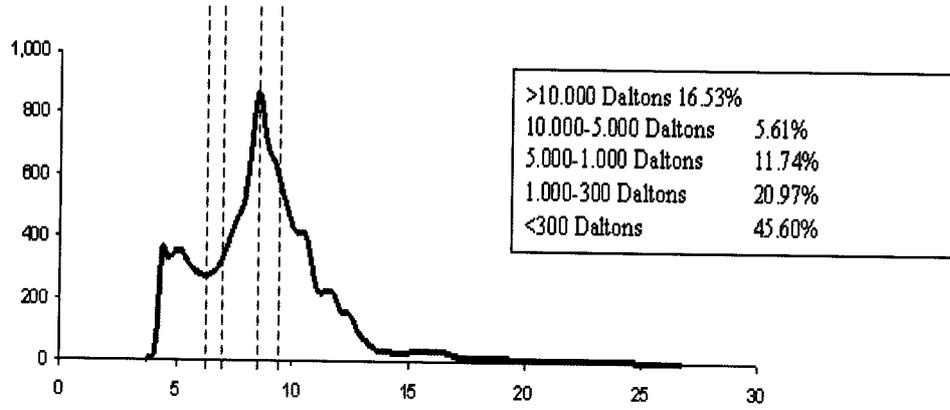


Figura 5

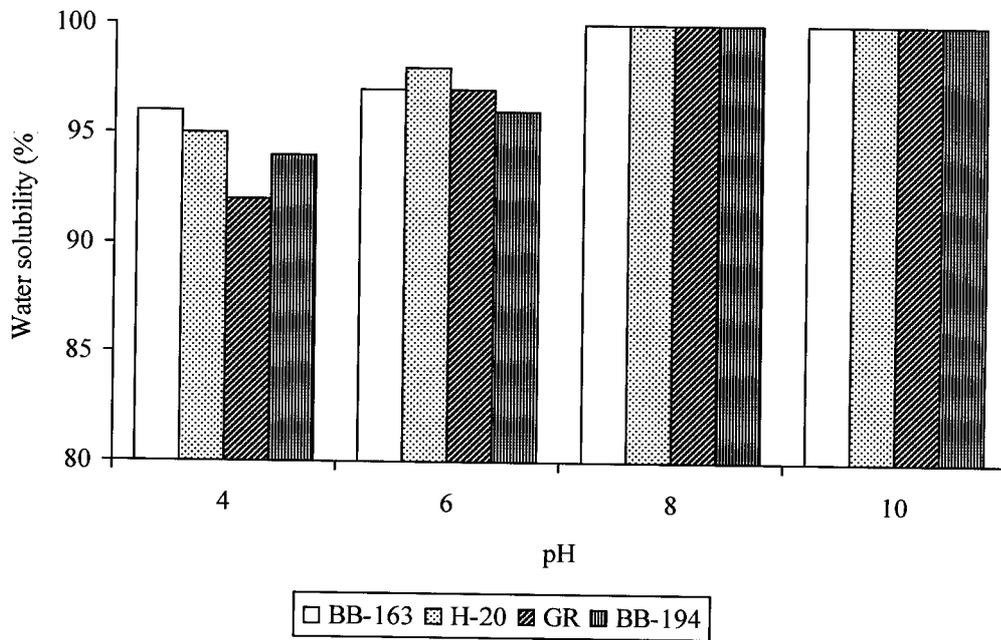


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100606

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.05.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N65/38** (2009.01)
A23K1/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ONE Bio Corp. "Company Information" en SHAREHOLDERDG.COM [online] publicado, al menos, antes de 22.02.2011 [recuperado en 23.11.2011]. Recuperado de Internet: <URL: http://shareholderdg.com/onbi/index.html>	1-6
A	CN 101607840 A (DENGHUI YUAN) 23.12.2009, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 23.11.2011]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW201015, N° DE ACCESO 2010-A27387 [15].	1-7
A	WO 2007104489 A1 (ARTERRA BIOSCIENCE S R L et al.) 20.09.2007, todo el documento.	1-6
A	CN 101993307 A (ZHAO-I) 30.03.2011, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 06.05.2008]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW201153, N° DE ACCESO 2011-E91855 [53].	1-6
A	CN 101993306 A (ZHAO-I) 30.03.2011, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 06.05.2008]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW201153, N° DE ACCESO 2011-E91857 [53].	1-6
A	WO 2009094631 A2 (NEWAGRICULTURE INC et al.) 30.07.2009, todo el documento.	1-6
A	CN 101204249 A (CHINA TOBACCO GUANGDONG IND CO) 25.06.2008, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 06.05.2008]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW200848, N° DE ACCESO 2008-H48436 [48].	1-6
A	WO 2007052282 A1 (NICO ORGO MANURES et al.) 10.05.2007, todo el documento.	1-6

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
24.11.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

A01N, A23K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	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	ONE Bio Corp. "Company Information" en SHAREHOLDERDG.COM [online] publicado, al menos, antes de 22.02.2011 [recuperado en 23.11.2011]. Recuperado de Internet: <URL:http://shareholderdg.com/onbi/index.html>	
D02	CN 101607840 A (DENGHUI YUAN)	23.12.2009
D03	WO 2007104489 A1 (ARTERRA BIOSCIENCE S R L et al.)	20.09.2007
D04	CN 101993307 A (ZHAO-I)	30.03.2011
D05	CN 101993306 A (ZHAO-I)	30.03.2011
D06	WO 2009094631 A2 (NEWAGRICULTURE INC et al.)	30.07.2009
D07	CN 101204249 A (CHINA TOBACCO GUANGDONG IND CO)	25.06.2008
D08	WO 2007052282 A1 (NICO ORGO MANURES et al.)	10.05.2007

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

La solicitud reivindica un procedimiento de obtención de un concentrado proteico a partir de hojas de tabaco. El extracto se obtiene mediante hidrólisis enzimática por proteasas (preferentemente subtilisina). La mayoría de los hidrolizados obtenidos está constituida por péptidos, oligopéptidos y aminoácidos libres con alta solubilidad.

Reivindica, asimismo, la utilización de estos concentrados, obtenidos mediante el procedimiento de la invención, como fertilizantes vegetales y como suplemento alimentario para animales.

D01-D08 representa el estado de la técnica anterior. De ellos, D01 es el más cercano al objeto de la invención de la solicitud. Se trata de una hoja informativa de una empresa que, entre otras actividades, suministra extractos naturales para distintos usos. Uno de esos extractos es uno de hojas de tabaco. Dicho extracto se utiliza como fertilizante para plantas. Aunque podría pensarse que supusiera un documento relevante para la actividad inventiva de la solicitud, el caso es que no se menciona en ningún momento que el extracto se obtenga mediante hidrólisis enzimática. Tampoco se dice nada que apunte a la utilización de proteasas ni biorreactores y tampoco a un proceso de autoclavado de las hojas previo a su extracción, tal y como se reivindica en la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-7 cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 y el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.