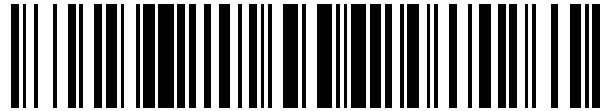


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 793**

21 Número de solicitud: 201830923

51 Int. Cl.:

**C05F 5/00** (2006.01)

**C05F 3/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**25.09.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**13.12.2018**

71 Solicitantes:

**BIORIZON BIOTECH, S.L. (100.0%)  
C/ Albert Einstein, nº 15 - Parque Científico  
Tecnológico de Almería (PITA)  
04131 ALMERÍA ES**

72 Inventor/es:

**ROJAS CRESPO, Elisa;  
IGLESIAS HERNANDEZ, David;  
ACIEN FERNANDEZ, Francisco Gabriel y  
POZO DENGRA, Joaquin**

74 Agente/Representante:

**CAPITAN GARCÍA, Nuria**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE BIOFERTILIZANTES Y BIOESTIMULANTES DE USO AGRÍCOLA A PARTIR DE BIOMASA DE MICROALGAS, INCLUYENDO CIANOBACTERIAS**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de concentrados de biofertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola a partir de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, donde, primero, se produce una liberación del contenido celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, a través de su rotura celular; seguidamente, se hidroliza con enzimas proteolíticas la fracción protéica y la pared celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, obtenidas con dicha liberación del contenido celular, hasta producir aminoácidos libres; y luego, se adiciona excipientes de nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) al producto de hidrólisis enzimática obtenido anteriormente.

ES 2 693 793 A1

**PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE BIOFERTILIZANTES Y BIOESTIMULANTES DE USO AGRÍCOLA A PARTIR DE BIOMASA DE MICROALGAS, INCLUYENDO CIANOBACTERIAS**

5

**DESCRIPCIÓN**

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se engloba en el campo de la producción de productos  
10 fertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola.

Dicha invención se relaciona con un procedimiento que permite la producción de un  
producto fertilizante y bioestimulante para uso agrícola, rico en aminoácidos libres,  
péptidos, así como, fitohormonas de origen natural procedentes de las microalgas,  
15 incluyendo cianobacterias, con aplicación tanto en agricultura extensiva como  
intensiva.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

20 Como es conocido, el uso en exceso de productos agroquímicos de origen sintético ha  
dado lugar a una degradación medioambiental masiva en todo el mundo, provocando  
el surgimiento de zonas muertas en los océanos, eutrofización, infertilidad del suelo y  
pérdida de biodiversidad.

25 Como alternativa al desastre medioambiental creado por el uso excesivo de los  
fertilizantes sintéticos, se tienen los biofertilizantes, los cuales, constituyen una  
alternativa rentable y sostenible a dichos fertilizantes sintéticos, pues no sólo mejoran  
la producción agrícola, sino que también, su uso hace disminuir la contaminación  
ambiental.

30

Los productos biofertilizantes se definen como aquellos que contienen  
microorganismos vivos o compuestos naturales derivados de organismos como  
bacterias, hongos y algas que mejoran las propiedades químicas y biológicas del  
suelo, estimulan el crecimiento de las plantas y restauran la fertilidad del suelo.

35

Son conocidos productos biofertilizantes a base de microalgas, incluyendo cianobacterias. Las microalgas, incluyendo cianobacterias, contienen altos niveles de micronutrientes y macronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, de ahí su aplicación en la producción de biofertilizantes. Se ha comprobado que existe una asociación entre una mayor absorción de nutrientes, una mayor acumulación de biomasa y mayores rendimientos de los cultivos a la incorporación de biofertilizantes de microalgas, incluyendo cianobacterias. Ha sido confirmado que los extractos celulares y el medio de crecimiento de varias especies de microalgas, incluyendo cianobacterias, contienen fitohormonas (giberelinas, auxinas y citoquininas), las cuales, han demostrado jugar un papel crucial en el desarrollo de las plantas.

Para la producción de microalgas, incluyendo cianobacterias, puede emplearse agua limpia y fertilizantes químicos, sin embargo, el bio-tratamiento de aguas residuales con microalgas, incluyendo cianobacterias, es particularmente interesante debido a sus capacidades fotosintéticas, convirtiendo la energía solar en biomasa útil e incorporando nutrientes tales como nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) que causan la eutrofización.

Se ha reportado el empleo de microalgas, incluyendo cianobacterias, en tratamientos de aguas residuales humanas, residuos ganaderos, residuos agroindustriales y efluentes industriales. Igualmente, las microalgas, incluyendo cianobacterias, han mostrado ser eficaces en el tratamiento de residuos como los purines, el efluente de las fábricas de procesamiento de alimentos y otros desechos agrícolas. También las microalgas, incluyendo cianobacterias, han sido empleadas para la eliminación de minerales tóxicos como plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg), escandio (Sc), estaño (Sn), arsénico (As) y bromo (Br).

Las microalgas, incluyendo cianobacterias, cultivadas en sistemas de tratamientos de aguas residuales o efluentes residuales constituyen una biomasa potencialmente importante para varias aplicaciones, tal como, biocombustibles, extracción de compuestos de valor añadido, biofertilizantes, etc. Sin embargo, la mayoría de los sistemas de tratamiento de aguas residuales que emplean biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, no incluyen su cosechado. Normalmente, la biomasa es vertida a los estanques, donde, se descompone en el fondo del estanque, liberando metano a la atmósfera y degradando la calidad del agua. En su lugar, la biomasa de

microalgas, incluyendo cianobacterias, podría ser procesada, por ejemplo, para producir biofertilizantes y bioestimulantes para la agricultura.

5 Por tal razón, se requiere crear un procedimiento, sencillo y económico, que permita aprovechar la producción de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, ya sea, cultivada en aguas limpias y fertilizantes químicos como en procesos de depuración de aguas residuales y/o en tratamientos de efluentes agroindustriales, para la obtención de extractos o concentrados de biofertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola.

10

El solicitante desconoce la existencia en el estado de la técnica de un procedimiento a tal fin que muestre unas características similares a las del procedimiento objeto de la presente invención.

15 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención queda establecida y caracterizada en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la misma.

20

El objeto de la invención es un procedimiento de obtención de concentrados de biofertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola a partir de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, el cual, comprende las siguientes etapas:

- 25 a) Producir una liberación de un contenido celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, a través de su rotura celular,
- b) Hidrolizar con enzimas proteolíticas un contenido proteico y pared celular de microalgas, incluyendo cianobacterias, obtenido con la liberación del contenido celular resultante en la etapa a) hasta producir aminoácidos libres, y
- 30 c) Adicionar excipientes de Nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) al producto de hidrólisis enzimática obtenido en la etapa b).

De esta forma, se logra producir un concentrado de biofertilizante y bioestimulante para su uso agrícola, ya sea, en agricultura extensiva como intensiva, rico en

35 aminoácidos libres, péptidos y fitohormonas de origen natural procedentes de

microalgas, incluyendo cianobacterias, las cuales, pueden haber sido cultivadas únicamente para este fin en aguas limpias y fertilizantes químicos, o bien, aprovechadas de procesos anteriores de depuración de aguas residuales y/o en tratamientos de efluentes agroindustriales. En este último caso, la producción de  
5 biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, resultante del proceso o tratamiento anterior es reciclada para otro fin, es decir, en la obtención de extractos o concentrados de biofertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola, favoreciéndose al medio ambiente.

10 **EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención es un procedimiento de obtención de concentrados de biofertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola a partir de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias.

15

El procedimiento parte de producir la liberación de un contenido celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, a través de su rotura celular, que implica el cosechado, la concentración y homogenización física de la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias.

20

Preferiblemente, para lograr la rotura celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, se parte de cosechar aproximadamente entre 5% y 60% del volumen de un reactor (fotobiorreactor), que contiene una concentración variable de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, en suspensión de entre 0,1 g/L y 20 g/L.

25

La biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, a cosechar puede ser biomasa aprovechada de un cultivo resultante de procesos de depuración de aguas residuales y/o tratamientos de efluentes agroindustriales, o de tratamientos de purines animales, digestatos de residuos orgánicos, lixiviados o residuos agrícolas, o bien,  
30 haber sido cultivada en aguas limpias y fertilizantes químicos para el presente fin, es decir, para producir biofertilizantes o bioestimulantes de uso agrícola.

Seguidamente, la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, cosechada anteriormente se concentra por decantación, por ejemplo, en un medio decantador en  
35 cuya salida se alcance una concentración en sólidos de biomasa de microalgas,

incluyendo cianobacterias, de entre 10 g/L y 30 g/L. Dependiendo de si lo requiere la microalga o cianobacteria, para facilitar la sedimentación, se adiciona un agente floculante, el cual, se adiciona en una concentración de entre el 0,1% y 20%.

5 Luego, la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, concentrada anteriormente en el medio decantador se bombea hacia unos medios de centrifugación, por ejemplo, una centrífuga en continuo, donde, se centrifuga hasta alcanzar dicha biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, en la corriente de salida una concentración en sólidos de entre 1% y 20%.

10

Posteriormente, la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, centrifugada se bombea hacia unos medios de homogenización por alta presión, por ejemplo, de entre 100 bares y 1000 bares, donde, se homogeniza hasta provocar finalmente la rotura celular de dichas microalgas, incluyendo cianobacterias, y así, liberar el contenido celular (metabolitos y biomoléculas) que a continuación será tratado para obtener los agentes fitoestimulantes en el concentrado a partir del cual se formulará el correspondiente biofertilizante y bioestimulante de uso agrícola.

Una vez producida la liberación del contenido celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, el contenido proteico y la pared celular de dichas microalgas, incluyendo cianobacterias, obtenidos se hidroliza con enzimas proteolíticas que terminan de romper las paredes celulares hasta producir los aminoácidos libres requeridos en la formulación del biofertilizante y el bioestimulante, de igual modo, se produce la hidrólisis enzimática de los restos de paredes celulares provenientes de la rotura celular por la anterior homogenización a alta presión realizada.

Preferiblemente, la hidrólisis enzimática del contenido proteico y de la pared celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, se realiza en un reactor del tipo tanque agitado a pH y temperatura controlados. Por ejemplo, se prefiere que el pH se mantenga entre 3,0 y 12,0, la temperatura se mantenga entre 25°C y 60°C, y la agitación se realice a entre 50 rpm y 500 rpm.

Así mismo, para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, primero se añade una enzima hidrolítica del tipo celulasa en una concentración de entre 0,01% y 20%. La enzima hidrolítica tipo celulasa es la responsable de terminar de romper las paredes celulares

y liberar todo el contenido celular al medio de reacción. Se deja reaccionar durante aproximadamente entre 5 minutos y 600 minutos, a los valores óptimos de pH y temperatura de la enzima hidrolítica empleada, bajo agitación constante a entre 50 rpm y 500 rpm. Durante este tiempo, tiene lugar la hidrólisis y ruptura de la celulosa que compone la pared celular de los microorganismos fotosintéticos que conforman las microalgas, incluyendo cianobacterias, que no hayan sido rotas previamente en la homogenización a alta presión.

Luego, pasado los minutos de reacción con las enzimas celulasa, se añade una mezcla o coctel de proteasas consistente en exopeptidasa y endopeptidasa en una proporción de 1:3. Esta reacción proteolítica está destinada a liberar aminoácidos libres a partir de la proteína constituyente de la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, dejándose reaccionar durante aproximadamente entre 0,5 horas y 12,0 horas bajo agitación constante a entre 50 rpm y 500 rpm y a valores de temperatura y pH óptimos para el coctel enzimático.

Posteriormente, se adicionan excipientes de Nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) al producto de hidrólisis enzimática obtenido anteriormente, preferiblemente, en sendas proporciones que ajustan el pH de dicho producto de hidrólisis enzimática a entre 3,0 y 12,0. Por ejemplo, los excipientes adicionados podrían ser compuestos inorgánicos, sólidos o líquidos, fuente de nitrógeno (N), fósforo (P) o potasio (K), o bien, ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

La adición de excipientes de Nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) al producto de hidrólisis enzimática se realiza para estabilizar a dicho producto para evitar fermentaciones indeseadas una vez se encuentre envasado el biofertilizante y bioestimulante en su envase final.

Así mismo, se prefiere que el producto de hidrólisis enzimática enriquecido con excipientes de Nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) (ajustado y estabilizado por pH) se envase en asepsia, propiciándose así, su mejor conservación hasta su empleo en la preparación de biofertilizante y bioestimulante de uso agrícola.

#### Ejemplo de realización

35

Se parte de un sistema de depuración de aguas residuales urbanas, basado en un fotobiorreactor tipo raceway de 100 m<sup>2</sup> de superficie, donde, se cosecha un 30% de su volumen, correspondiente a 6000 L, con una concentración de 1 g/L de biomasa del consorcio microalgas (incluyendo cianobacterias)-bacterias establecidas durante el  
5 proceso de depuración en el fotobiorreactor.

Seguidamente, el volumen cosechado, a un caudal de 2 m<sup>3</sup>/h, se hace pasar por un decantador de 1 m<sup>3</sup>, recogándose un concentrado en biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, de entre 2 y 3 g/L. El sobrenadante se recircula hacia el  
10 fotobiorreactor, mientras que la corriente concentrada de microalgas, incluyendo cianobacterias, se bombea a un caudal de 0,1 m<sup>3</sup>/h hacia una centrífuga continua donde se centrifuga a 2300 rpm hasta una concentración en sólidos de entre 25 g/L y 40 g/L.

15 Posteriormente, del mismo modo que a la salida del decantador, el sobrenadante clarificado se recircula hasta el fotobiorreactor, mientras que la corriente de salida concentrada en biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, centrifugada se bombea hasta un homogenizador por alta presión, donde tiene lugar la rotura celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, a un caudal de 0,1 m<sup>3</sup>/h.

20 El lodo resultante del proceso de homogenización de la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, se bombea hacia un reactor tipo tanque agitado, de 800 L de volumen total, con control de temperatura y pH bajo agitación constante a 50 rpm.

25 Una vez que el reactor tipo tanque agitado se llena hasta los 600 L de su volumen, se añaden 5,6 Kg de celulasa y la temperatura se ajusta a 35°C, manteniéndose el pH entre 10 y 12 por ajuste constante con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 35% y solución 1,0 molar de hidróxido de sodio (NaOH 1M), durante 280 minutos.

30 Transcurrido los 280 minutos, se añade el coctel de proteasas a una concentración del 0,02%, es decir, 0,12 Kg de la relación 1:3 de exopeptidasa y endopeptidasa, dejando transcurrir 9 horas adicionales de reacción a los valores de pH y temperatura anteriormente ajustados.



## ES 2 693 793 A1

Pasadas las 9 horas de reacción, el pH del producto de reacción se ajusta hasta 12,0, por medio de la adición de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

Seguidamente, el producto de reacción con pH ajustado, y con concentraciones de 5 nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K), se bombea para ser envasado asépticamente en garrafas de 50 L.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento de obtención de concentrados de biofertilizantes y bioestimulantes de uso agrícola a partir de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, que  
5 comprende las siguientes etapas:
- a) Producir una liberación de un contenido celular de las microalgas, incluyendo cianobacterias, a través de su rotura celular,
  - b) Hidrolizar con enzimas proteolíticas un contenido proteico y pared celular de microalgas, incluyendo cianobacterias, obtenido con la liberación del contenido  
10 celular resultante en la etapa a) hasta producir aminoácidos libres,
  - c) Adicionar excipientes de Nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) al producto de hidrólisis enzimática obtenido en la etapa b).
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en que la etapa a) incluye las siguientes  
15 sub-etapas:
- a.1) Cosechar aproximadamente entre 5% y 60% de un volumen de un reactor que contiene una concentración variable de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, en suspensión de entre 0,1 g/L y 20 g/L,
  - a.2) Concentrar por decantación la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, cosechada en la sub-etapa a.1), alcanzando una concentración en  
20 sólidos de biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, de entre 10 g/L y 30 g/L,
  - a.3) Centrifugar la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, concentrada en la sub-etapa a.2), alcanzando la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, una concentración en sólidos de entre 1% y 20%,  
25
  - a.4) Homogenizar a alta presión la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, centrifugada en la sub-etapa a.3) hasta provocar la rotura celular de dichas microalgas, incluyendo cianobacterias.
- 30 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, en el que en la sub-etapa a.2), para facilitar la sedimentación de la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, se adiciona un agente floculante.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el agente floculante se adiciona  
35 en una concentración de entre el 0,1% y 20%.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa b) se realiza en un reactor del tipo tanque agitado a pH y temperatura controlados, e incluye las siguientes sub-etapas:

5        b.1) Añadir una enzima hidrolítica del tipo celulasa en una concentración de entre 0,01% y 20%, y dejar reaccionar durante aproximadamente entre 5 minutos y 600 minutos,

10        b.2) Añadir una mezcla de proteasas consistente en exopeptidasa y endopeptidasa en una proporción de 1:3 y dejar reaccionar durante aproximadamente entre 0,5 horas y 12,0 horas.

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el pH se mantiene entre 3,0 y 12,0, la temperatura se mantiene entre 25°C y 60°C, y la agitación se realiza a entre 50 rpm y 500 rpm.

15

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, en la etapa c), los excipientes de Nitrógeno (N), fósforo (P) y/o potasio (K) son adicionados en tales proporciones que ajustan el pH del producto de hidrólisis enzimática a entre 3,0 y 12,0.

20        8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 7, en el que los excipientes adicionados en la etapa c) son compuestos inorgánicos, sólidos o líquidos, fuente de nitrógeno (N), fósforo (P) o potasio (K).

25        9.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el producto de hidrólisis enzimática pasteurizado se envasa en asepsia.

10.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, es cultivada en procesos de depuración de aguas residuales y/o tratamientos de efluentes agroindustriales.

30

11.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, es cultivada en tratamientos de purines animales, digestatos de residuos orgánicos, lixiviados o residuos agrícolas.

12.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa de microalgas, incluyendo cianobacterias, es cultivada en aguas limpias y fertilizantes químicos.

13.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biomasa a tratar es un  
5 consorcio microalgas (incluyendo cianobacterias) – bacterias.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201830923  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2018  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C05F5/00** (2006.01)  
**C05F3/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 107129412 A (JURONG AGRICULTURAL TECH PROMOTION CENTER) 05/09/2017, reivindicación 1	1, 7-13
X	CN 108424252 A 21/08/2018, reivindicación 1	1, 9-13
X	CN 108440194 A (QINGDAO MINGYUE SEAWEED GROUP CO LTD) 24/08/2018, reivindicación 1	1, 9-13
X	CN 108341721 A (MAO QIANGPING) 31/07/2018, reivindicaciones	1, 9-13

#### 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  
04.12.2018

Examinador  
I. Rueda Molíns

Página  
1/2

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

C05F

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, INTERNET, TXT