

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 187**

21 Número de solicitud: 201431786

51 Int. Cl.:

**C05F 1/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

02.12.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.02.2015

Fecha de la concesión:

24.11.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.12.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
Hospital Real. C/ Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

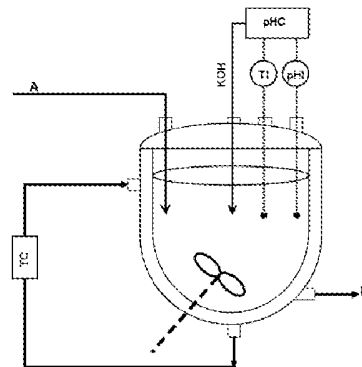
**GUADIX ESCOBAR, Emilia María;  
GUADIX ESCOBAR, Antonio María;  
PÉREZ GÁLVEZ, Antonio Raúl y  
ALMÉCIJA RODRÍGUEZ, María Del Carmen**

54 Título: **Procedimiento para producir fertilizantes ricos en aminoácidos**

57 Resumen:

Procedimiento para producir fertilizantes ricos en aminoácidos.

La presente invención propone un procedimiento de hidrólisis enzimática de harina de sangre para obtener fertilizantes con alto contenido en aminoácidos libres y aporte de hierro hémico, susceptible de ser utilizado como abono orgánico, y con mejor solubilidad que el sustrato de partida, lo que permite su aplicación foliar.



ES 2 529 187 B1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir fertilizantes ricos en aminoácidos

### SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se enmarca en industria química orientada a la agricultura, en concreto en la producción de abonos o fertilizantes y tiene aplicación en el sector ganadero como procedimiento para valorizar residuos contaminantes.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

#### Residuos procedentes de la ganadería

10 Los mataderos, aparte de los residuos derivados del despiece del animal, generan un importante caudal de sangre, que constituye un efluente muy contaminante con una demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) entre 250.000 y 375.000 mg O<sub>2</sub>/L. En la actualidad se está solucionando el vertido de las aguas procedentes del matadero, reutilizando este subproducto, deshidratando la sangre que una vez deshidratada y bajo la forma de harina constituye un concentrado de proteínas: hemoglobina, globulinas y albúminas.

#### 15 Fertilizantes

Las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios para su crecimiento y funciones fisiológicas utilizando como fuente exclusiva de nitrógeno los nitratos y sales amónicas, absorbidas desde el suelo o directamente por vía foliar, combinados con los carbohidratos obtenidos por vía fotosintética. Los nitratos y sales amónicas son los compuestos inorgánicos nitrogenados más comunes utilizados como nutrientes en agricultura.

20 La asimilación de nitratos a través de las raíces se lleva a cabo mediante dos etapas sucesivas donde en un principio los nitratos se reducen a nitritos y posteriormente a amoníaco bajo la acción de las enzimas nitrato reductasa (E.C.1.6.6.1) y nitrito reductasa (E.C.1.6.6.4). Ambas están presentes en los tejidos fotosintéticos y, en menor proporción, en las raíces. El amoníaco se combina posteriormente con los compuestos carbonatados para dar glutamina y ácido glutámico. Ambos aminoácidos son la base de las rutas metabólicas mediante las que se sintetizan el resto de amino ácidos necesarios para la planta.

30 Diversos estudios científicos demuestran que las plantas necesitan aumentar su contenido en aminoácidos libres bajo condiciones de estrés hídrico, salinidad, pesticidas, olas de calor o quemaduras provocadas por herbicidas u otros agentes. Así, por ejemplo, las plantas incrementan la producción de metabolitos de bajo peso molecular que ajustan el equilibrio osmótico y previenen las pérdidas de agua en condiciones de estrés hídrico. Varias especies de plantas acumulan ciertos aminoácidos como la prolina, y los ácidos aspártico y glutámico para aumentar su tolerancia frente a las altas temperaturas. Similarmente, la prolina y glicina han demostrado ejercer una acción protectora frente a las bajas temperaturas. Junto a su acción protectora frente a situaciones de estrés para la planta, los aminoácidos juegan un papel relevante en varias funciones fisiológicas de la planta, como la fotosíntesis, la polinización y la absorción y transporte de nutrientes.

40 El aporte directo de aminoácidos permite a la planta superar las situaciones de estrés citadas anteriormente sin que ésta tenga que recurrir al catabolismo de proteínas estructurales, con el perjuicio consiguiente para el crecimiento y productividad de la planta. El Triptófano, por ejemplo, es fundamental para el desarrollo geminal y radicular. Basado en las ventajas del aporte de aminoácidos para la planta, los primeros fertilizantes ricos en aminoácidos se desarrollaron a finales de los años setenta.

45 Los fertilizantes orgánicos constituyen una vía de aprovechamiento para los subproductos derivados de las industrias cárnicas, mataderos o residuos de la actividad pesquera. Todas

estas actividades generan subproductos no destinadas a envasado, que constituyen una fuente importante para la obtención de nitrógeno proteico para las plantas. La efectividad de los abonos orgánicos de este tipo ya ha sido comprobada por diversos estudios.

5 Entre estos fertilizantes orgánicos se encuentra la harina de sangre. Este subproducto se utiliza como fertilizante debido a su acción rápida y alto contenido nitroso.

10 Además tiene un alto contenido en proteína (80%, fundamentalmente hemoglobina), y aporta hierro hémico. Éste último, gracias a su efecto quelante, estabiliza los nutrientes del suelo mejorando su disponibilidad y absorción por parte de la planta. No obstante, el uso directo de harina de sangre plantea problemas, dada la baja solubilidad de este sustrato. Esto dificulta la formulación de disoluciones líquidas que la contengan (por ejemplo, productos fertilizantes de aplicación foliar). A su baja solubilidad se le une el bajo contenido de aminoácidos libres, ya que la mayoría se encuentran formando parte de las proteínas.

### **Hidrólisis química y enzimática**

15 La obtención de un producto rico en amino ácidos libres a partir de residuos proteicos se puede llevar a cabo mediante hidrólisis química o enzimática. Aunque la hidrólisis química puede dar lugar a un grado de hidrólisis elevado y por tanto un contenido importante en aminoácidos libres totales, éstos se encuentran en un 50% p/p bajo la forma dextrógira, y no son por tanto biológicamente activos. Unido a este inconveniente, la hidrólisis química destruye aminoácidos necesarios para la planta como el triptófano, de importancia clave en el desarrollo radicular de la planta, y conlleva la generación de sales que se han de eliminar del producto final. Algunos autores [W.I. Chan, K.V. Lo, P.H. Liao, *Solubilization of blood meal to be used as a liquid fertilizer*, J. Environ. Sci. Health B 42 (2007) 417–422] han propuesto un tratamiento combinado con microondas y peróxido de hidrógeno para hidrolizar la harina de sangre y mejorar así su solubilidad y contenido en amino ácidos libres. Este tratamiento ataca eficazmente los enlaces peptídicos de la proteína, liberando péptidos y amino ácidos libres, pero el hidrolizado final presenta una baja calidad nutricional, con fuerte desnaturalización de las proteínas y pérdidas de nutrientes, unido a la presencia de sustancias tóxicas en el producto final.

20 Todos estos inconvenientes se subsanarían mediante la hidrólisis enzimática, en la que todos los aminoácidos generados lo están bajo la forma levógira. Los aminoácidos levógiros son biológicamente activos puesto que son asimilados por la planta y reconocidos por el sistema enzimático de la misma, entrando a formar parte de las rutas metabólicas.

### **Procedimientos de hidrólisis para el aprovechamiento de residuos**

35 Existen procedimientos patentados que reivindican la hidrólisis enzimática como vía para solubilizar residuos industriales de origen vegetal (ES 2 173 036, US 20030165612) tales como tortas desengrasadas de la molturación de semillas o residuos de las industrias de fermentación. El proceso de solubilización enzimática emplea endoproteasas para obtener una fase líquida donde se ha solubilizado el 60 – 80% en peso de la proteína de partida. Entre las aplicaciones propuestas para estos hidrolizados se encuentran los fertilizantes orgánicos solubles.

40 Un procedimiento similar, recogido en la patente europea EP 2 415 737, reivindica la obtención de un fertilizante rico en aminoácidos a partir de sangre de cerdos o ganado. El procedimiento comprende una primera fase de homogeneización de tamaño seguida de hidrólisis enzimática mediante un extracto de endoproteasas de soja. La reacción transcurre sin control de pH y el rango de temperatura ensayado (50 – 70°C) es superior al empleado en el procedimiento descrito en esta invención, así como los tiempos de reacción (8 – 15 h), dando un hidrolizado con una composición en aminoácidos libres rica en ácido aspártico, leucina o ácido glutámico.

## OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es un procedimiento de hidrólisis enzimática de harina de sangre para obtener productos fertilizantes con alto contenido en aminoácidos libres y aporte de hierro hémico susceptibles de ser utilizados como abono orgánico, y con mejor solubilidad que el sustrato de partida, lo que permite su aplicación foliar.

Las principales ventajas que presenta la invención son:

- La harina de sangre de partida posee alto contenido en proteína (89% p/p), estabilidad microbiológica, y es rica en aminoácidos como la cisteína o la lisina, entre otros.
- La hidrólisis enzimática del sustrato permite que todos los aminoácidos formados estén en su forma levógira, asimilable por la planta.
- El control del pH durante la reacción permite que la enzima mantenga su actividad durante el transcurso de la reacción y por tanto permite obtener una solubilidad elevada con tiempos menores que los obtenidos mediante otros procedimientos donde el pH se deja libre.
- Los productos obtenibles mediante el procedimiento pueden llegar a tener niveles de aminoácidos libres de hasta 373 mg/L, dependiendo de las condiciones de operación.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.-** Esquema del dispositivo experimental. TI: sonda de temperatura; pHI: sonda de pH; pHC: equipo de valoración con KOH; TC: equipo de calefacción para el agua de encamisado; A: suspensión de harina de sangre; P: hidrolizado final.

**Figura 2.-** Gráfica que muestra los valores máximo y mínimo observados para la concentración en aminoácidos libres identificados (C.A.L.) en el rango de temperaturas y pH ensayados.

**Figura 3.-** Gráfica que muestra el perfil de la concentración de aminoácidos libres (C.A.L.) en el hidrolizado obtenido bajo las condiciones del ejemplo 1.

**Figura 4.-** Gráfica que muestra el perfil de la concentración de aminoácidos libres (C.A.L.) en el hidrolizado obtenido bajo las condiciones del ejemplo 2.

**Figura 5.-** Gráfica que muestra el perfil de la concentración de aminoácidos libres (C.A.L.) en el hidrolizado obtenido bajo las condiciones del ejemplo 3.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

A lo largo de la presente invención se entenderá por "harina de sangre" al concentrado proteico en polvo que resulta del secado de la fracción celular de la sangre previamente coagulada, con un contenido en proteína mínimo superior al 80% p/p.

Se entenderá por "temperatura de trabajo" al valor medio de temperatura del medio reaccionante, que se mantendrá constante en el interior del reactor mediante un sistema de encamisado conectado a baño termostático.

Se entenderá por "agente valorante" al compuesto adicionado durante la reacción de hidrólisis para mantener constante el pH del medio en el valor deseado. Un ejemplo de agente valorante es el hidróxido potásico (KOH)

Se entenderá por "grado de hidrólisis" al porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante la reacción enzimática, referidos al total de enlaces peptídicos que presenta la proteína de partida.

Se entenderá por "contenido en aminoácidos libres" a la masa de aminoácidos libres por volumen de hidrolizado obtenido y filtrado a vacío. Se indica como peso /volumen, p/v.

### **Procedimiento de obtención de fertilizantes**

5 La presente invención propone el uso de hidrólisis enzimática de harina de sangre como modo de obtener un hidrolizado final con una composición rica en amino ácidos libres y aporte de hierro hémico, susceptible de ser utilizado como abono orgánico.

10 Así, el procedimiento objeto de la invención es un proceso de hidrólisis enzimática de harina de sangre caracterizado porque mantiene la temperatura de trabajo constante a lo largo del proceso, preferentemente dentro del intervalo de máxima actividad de la enzima subtilisina empleada (50-60°C). A diferencia de los procedimientos de hidrólisis utilizados habitualmente, donde el pH se deja libre en el transcurso de la hidrólisis, el procedimiento propuesto mantiene el pH constante a lo largo de la reacción mediante adición de un agente valorante (por ejemplo, KOH).

15 En su realización más general, el procedimiento objeto de la invención comprende los siguientes pasos:

- Disolución de la harina de sangre en agua
- Calentamiento de la disolución hasta una temperatura de trabajo comprendida entre 40 y 65°C
- Ajuste del pH hasta un valor de trabajo comprendido entre 6 y 9.
- 20 - Adición de la enzima
- Mantenimiento del pH y la temperatura de forma constante hasta que finalice la reacción.

25 Manteniendo el pH constante se consigue que el proceso de hidrólisis necesite menos tiempo y menos cantidad de enzima. El pH juega un papel primordial en la estructura cuaternaria del sustrato e influye tanto en la solubilidad del sustrato como en la exposición de los enlaces peptídicos al ataque enzimático. La ruptura de enlaces peptídicos en el transcurso de la reacción conlleva una liberación de protones en función del equilibrio de disociación del grupo amino. La consecuencia directa es una bajada del pH de la disolución que puede incrementarse a lo largo del proceso mediante la adición un agente valorante, preferentemente  
30 KOH.

La elección de KOH como agente valorante frente a otras bases fuertes como la sosa (NaOH), se debe a que su adición proporciona iones potasio al producto final, incrementando así su valor fertilizante.

35 El procedimiento de hidrólisis parte de una disolución acuosa de sangre que se calienta a una temperatura de entre 40 y 65°C, preferentemente a una temperatura entre 50 y 60 °C, y se modifica el valor del pH de la disolución hasta situarlo en un valor entre 6 y 9, preferentemente entre 6,5 y 7,5 y más preferentemente, 7,5. Posteriormente se incorpora la enzima a la disolución y se mantienen los valores de temperatura y pH hasta que finalice el proceso.

40 En una realización particular, el proceso de hidrólisis finaliza tras un periodo comprendido entre 2 – 4 h, preferentemente 3h. Posteriormente se recupera el hidrolizado final y, opcionalmente, se retira la materia insoluble mediante filtración.

En otra realización particular, la enzima se añade en una proporción de entre el 2 y el 10% p/p de la proteína contenida en la disolución acuosa de harina de sangre, preferentemente 10% p/p. Relaciones enzima-sustrato superiores aumentarían el grado de hidrólisis final del

hidrolizado, y con ello su contenido en aminoácidos libres, pero se prefiere fijar su valor en 10% por criterios económicos, al ser el coste de la enzima un factor limitante en los procesos de hidrólisis.

5 En otra realización particular, la enzima utilizada es una proteasa de largo espectro, más particularmente, una serín endoproteasa, preferentemente subtilisina (*Bacillus subtilis*). Otras enzimas como la tripsina pueden hidrolizar la harina de sangre pero a niveles que no resultan interesantes para esta aplicación.

10 De forma preferente se utilizará como material de partida una harina de sangre con un contenido en humedad inferior al 10% p/p, un contenido de proteína entre 85 – 90% p/p y un porcentaje de hierro entre 0,20 - 0,30 % p/p.

A partir de este sustrato se obtiene una disolución acuosa de harina de sangre con una concentración de entre el 2 y el 20% en peso de proteína, preferentemente un 10%; a la que se le añade la enzima en una relación entre el 2 y el 10% en peso con respecto a la concentración de proteína.

15 A modo de ejemplo, si el sustrato es harina de sangre con un 90% p/p de proteína, 1L de disolución acuosa se obtendría añadiendo agua a una cantidad de harina de sangre comprendida entre 22,2 y 222,2 g, asumiendo una densidad aproximada para el agua de 1000 g/L.

20 La filtración se realiza a través de un medio con un tamaño de poro entre 5 - 20 micras. El filtrado resultante se calienta a 80 - 100 °C durante 10 - 15 minutos para inactivar térmicamente la enzima.

25 El hidrolizado se presenta en forma líquida, con contenido en nitrógeno soluble bajo la forma de péptidos y aminoácidos libres, que permite su uso como fertilizante. Dicho hidrolizado puede concentrarse posteriormente por evaporación o liofilización para conseguir un producto final con mayor enriquecimiento en aminoácidos libres.

Las ventajas que ofrece este procedimiento, respecto a otros procedimientos de obtención de abonos ricos en aminoácidos u otros sustratos de partida se enumeran a continuación:

30 - Se parte de un sustrato que constituye un subproducto abundante en los mataderos, que posee un alto contenido en proteína y además aporta hierro hémico, de probados beneficios para la planta. Su aprovechamiento es beneficioso desde el punto de vista medioambiental dada la alta carga contaminante de la sangre (DBO<sub>5</sub> entre 250 – 375 g de O<sub>2</sub>/L). El sustrato de partida presenta un contenido importante en aminoácidos tales como la Lisina, Metionina y Cisteína, del que son deficientes otros sustratos.

35 - El procedimiento para solubilizar la harina de sangre y liberar aminoácidos libres se basa en la hidrólisis enzimática. A diferencia de la hidrólisis química, todos los aminoácidos liberados por vía enzimática se encuentran bajo la forma levógiros y por tanto son biológicamente activos y fácilmente asimilables por la planta. Otra ventaja de la hidrólisis enzimática frente a la química estriba en que no se destruyen aminoácidos como el triptófano. El aporte de triptófano es fundamental para la planta como precursor del ácido indolacético, que potencia el desarrollo de las yemas y del sistema radicular. Por último, la hidrólisis química genera un contenido importante de sales que deben ser retiradas del producto final, aumentando así su coste de producción.

40

45 - La hidrólisis enzimática se realiza bajo control del pH. La ruptura de enlaces peptídicos durante la hidrólisis provoca que se liberen protones al medio y por consiguiente se produzca una bajada en el pH. Dicho descenso disminuye la propia actividad enzimática, y por tanto la velocidad y rendimiento de la reacción. El control del pH durante la reacción asegura que la enzima se mantenga en unos niveles aceptables de

actividad durante la misma y que por tanto se consigan grados de hidrólisis y solubilización superiores a las reacciones donde el pH se deja libre.

### **Sistema para implementar el procedimiento**

5 El procedimiento descrito se puede llevar a cabo en un sistema que comprende los siguientes elementos:

- Un recipiente para contener la disolución acuosa de harina de sangre. Dicho recipiente permitirá la alimentación de la disolución y evacuación del producto final. Dispondrá del espacio suficiente para asegurar la correcta agitación del medio reaccionante.
- 10 - Sistema para mantener la temperatura del medio reaccionante a un valor constante, equipado de una sonda de medición de temperatura conectada a una interfase gráfica que permita su monitorización en el transcurso de la hidrólisis. A su vez, el medio reaccionante deberá estar en contacto térmico con un baño termostatzado, a través un sistema de transmisión de calor por encamisado o serpentín.
- 15 - Sistema para mantener el pH constante, como un equipo de valoración automática dotado de sonda de pH, controlador y bureta dosificadora de agente valorante. Las desviaciones de pH en el medio, respecto al valor fijado para la reacción, son registradas por la sonda y se corrigen desde el equipo de titración mediante adición de agente valorante (KOH).

En una realización preferente (Figura 1), el sistema comprende:

20 Un reactor encamisado dotado de entradas superiores para introducción de una sonda de temperatura (TI), una sonda de pH (pHI) y una bureta dosificadora de KOH; un equipo de valorización con KOH; pHc, un equipo de calefacción para el agua de encamisado (TC). El reactor se alimenta mediante la boquilla superior con la suspensión de harina de sangre (A) de concentración entre 10 – 12 g/L, preferentemente entre 11,0 -11,5 g/L. Tras alimentación del medio reaccionante, se ajustará su temperatura al valor de temperatura de trabajo, dentro del intervalo 40 – 65°C, preferentemente entre 50 – 60°C, gracias al baño termostatzado y el sistema por camisa de calefacción. Una vez ajustada la temperatura de trabajo se procederá al ajuste del pH de trabajo a un valor entre 6 – 7,5 mediante la bureta dosificadora de KOH. En este punto se procederá a la adición de enzima, en relación de 5 a 10 g por cada 100 g de sustrato, preferentemente 10 g por cada 100 g de sustrato.

35 Iniciada la reacción, la temperatura del medio reaccionante y el pH se mantendrán en sus valores de trabajo mediante el sistema de encamisado y el equipo de valoración automática. Éste consta de un control de pH (pHC), una sonda de medición del pH (pHI), una sonda de medición de temperatura (TI) y una bureta dosificadora de KOH a concentración entre 1 - 5 N. El volumen de base añadido durante la reacción nos permitirá determinar la evolución del grado de hidrólisis durante la misma.

### **Fertilizantes con alto contenido en aminoácidos obtenibles**

40 Los fertilizantes obtenidos mediante el procedimiento descrito tienen una alta concentración de aminoácidos y comprenden en particular los siguientes aminoácidos en las proporciones indicadas: Cisteína (11,7 – 86,1 mg/L), tirosina (9,5 – 57,6 mg/L), lisina (5,6 – 54,6 mg/L), metionina (5,4 – 29,2 mg/L) y arginina (6,2 – 19,9 mg/L).

45 La caracterización del producto fertilizante en términos de contenido en aminoácidos libres puede llevarse a cabo mediante separación por columna de cromatografía líquida de alta resolución. La muestra previamente se derivatiza mediante 6-aminoquinolil-N-hydroxysuccinidil carbamato (Waters AccQ Kit, Millipore, Milford, EEUU), presentando así actividad fluorescente máxima a 395 nm, lo que permite su cuantificación. Los resultados del análisis cromatográfico

revelan una composición variada en aminoácidos libres, fuertemente influenciada por los parámetros experimentales (pH, temperatura y relación enzima- sustrato) con los que se llevó a cabo la hidrólisis del sustrato. La figura 2 recoge las concentraciones mínima y máxima (expresadas en miligramos de aminoácido por litro de hidrolizado) detectadas para cada aminoácido. Los aminoácidos mayoritarios presentes en el hidrolizado fueron cisteína (11,7 – 86,1 mg/L), tirosina (9,5 – 57,6 mg/L), lisina (5,6 – 54,6 mg/L), metionina (5,4 – 29,2 mg/L) y arginina (6,2 – 19,9 mg/L).

### **MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

Los reactores de mezcla perfecta empleados en el procedimiento son fácilmente escalables, y disponibles en el mercado con diferentes capacidades. El procedimiento en cuestión se ha ensayado con 3 reactores de capacidad 250 mL, 1 L y 10 L, obteniendo resultados similares en cuanto al rendimiento en aminoácidos libres. El criterio de escalado ha sido mantener constante la potencia de agitación específica (potencia de agitación por unidad de volumen del medio reaccionante). Ello se ha conseguido mediante el uso de sistemas de agitación de velocidad variable.

#### **Ejemplo de Fertilizante Obtenido 1**

Se pesan 2,25 g de harina de sangre con un contenido en proteína del 89% en peso, humedad inferior al 10% en peso y contenido en hierro del 0,2% en peso. La reacción se lleva a cabo mediante un reactor encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de bocas esmeriladas por las cuales se introduce un electrodo de pH y una sonda de temperatura. La temperatura se fija en 55°C gracias a un baño termostático. Se asegura un buen grado de mezcla en el reactor mediante un agitador magnético con el fin de mantener una composición constante en todo el volumen del reactor.

El pH se ajusta a 7,5 mediante adición de KOH 1 N. Este valor se mantiene constante durante la reacción mediante un sistema de valorización automática. Tras ajuste del pH, se adiciona la endoproteasa a razón de 100 mg de enzima por g de sustrato. El volumen de KOH añadido para mantener el pH constante se monitoriza durante la reacción de modo que nos permite conocer la evolución del grado de hidrólisis en el transcurso de la misma.

Tras 3 horas de reacción enzimática se recoge el hidrolizado final que se filtra a vacío mediante un dispositivo tipo Büchner dotado de filtro de celulosa Whatman grado 40 con tamaño de poro 8 µm. El filtrado resultante se calienta a 90 °C durante 10 minutos para inactivar térmicamente la enzima. Éste filtrado constituye el producto final líquido cuyo uso como fertilizante foliar se propone en esta patente.

A esta muestra se le determina el contenido en aminoácidos libres mediante separación por columna de cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, la muestra se inyecta en la columna de separación cromatográfica (Nova-Pak C18 4µm). La recta de calibrado se obtiene gracias a diferentes patrones de concentración 100 pmol/ µL para cada aminoácido.

La composición en aminoácidos libres para la muestra obtenida bajo las condiciones citadas anteriormente se muestra en la figura 3, donde las concentraciones para cada aminoácido se han expresado en miligramos de aminoácido por litro de fertilizante. Se observa una composición variada en todos los aminoácidos, excepto histidina, con predominio de los aminoácidos cisteína (86,1 mg/L), tirosina (57,6 mg/L), lisina (54,6 mg/L) y metionina (27,9 mg/L).

#### **Ejemplo de Fertilizante Obtenido 2**

Se pesan 11,25 g de harina de sangre con un contenido en proteína del 89% en peso, humedad inferior al 10% en peso y contenido en hierro del 0,2% en peso. La reacción se lleva a cabo mediante un reactor encamisado de 1 L de capacidad, con tapa separable provista de



bocas por las cuales se introduce un electrodo de pH y una sonda de temperatura. La temperatura se fija en 55°C. Se asegura un buen grado de mezcla en el reactor mediante un agitador mecánico con el fin de mantener una composición constante en todo el volumen del reactor.

5 El pH se ajusta a 6.5 mediante adición de KOH 2 N. Este valor se mantiene constante durante la reacción mediante un sistema de valorización automática. Tras ajuste del pH, se adiciona la endoproteasa a razón de 50 mg de enzima por g de sustrato. El volumen de KOH añadido para mantener el pH constante se monitoriza durante la reacción de modo que nos permite conocer la evolución del grado de hidrólisis en el transcurso de la misma.

10 Tras 3 horas de reacción enzimática se recoge el hidrolizado final que se filtra a través de un cartucho de 10 micras. El filtrado resultante se calienta a 90 °C durante 10 minutos para inactivar térmicamente la enzima. Éste filtrado constituye el producto final líquido cuyo uso como fertilizante foliar se propone en esta patente.

15 A esta muestra se le determina el contenido en aminoácidos libres mediante separación por columna de cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, la muestra se inyecta en la columna de separación cromatográfica (Nova-Pak C18 4µm). La recta de calibrado se obtiene gracias a diferentes patrones de concentración 100 pmol/ µL para cada aminoácido.

20 La composición en aminoácidos libres para la muestra obtenida bajo las condiciones citadas anteriormente se muestra en la figura 4, donde las concentraciones para cada aminoácido se han expresado en miligramos de aminoácido por litro de fertilizante. Se observa una composición variada en todos los aminoácidos, excepto histidina, con predominio de los aminoácidos cisteína (39,0 mg/L), tirosina (26,7 mg/L), lisina (24,6 mg/L) y metionina (15,4 mg/L).

### **Ejemplo de Fertilizante Obtenido 3**

25 Se pesan 112,5 g de harina de sangre con un contenido en proteína del 89% p/p, humedad inferior al 10% en peso y contenido en hierro del 0,2% en peso. La reacción se lleva a cabo mediante un reactor encamisado de 10 L de capacidad, con tapa separable provista de bocas esmeriladas por las cuales se introduce un electrodo de pH y una sonda de temperatura. La temperatura se fija en 50°C gracias a un baño termostático. Se asegura un buen grado de  
30 mezcla en el reactor mediante un agitador magnético con el fin de mantener una composición constante en todo el volumen del reactor.

35 El pH se ajusta a 6 mediante adición de KOH 4 N. Este valor se mantiene constante durante la reacción mediante un sistema de valorización automática. Tras ajuste del pH, se adiciona la endoproteasa a razón de 100 mg de enzima por g de sustrato. El volumen de KOH añadido para mantener el pH constante se monitoriza durante la reacción de modo que nos permite conocer la evolución del grado de hidrólisis en el transcurso de la misma.

40 Tras 3 horas de reacción enzimática se recoge el hidrolizado final que se filtra a vacío mediante un dispositivo tipo Büchner dotado de filtro de celulosa Whatman grado 40 con tamaño de poro 8 µm. El filtrado resultante se calienta a 90 °C durante 10 minutos para inactivar térmicamente la enzima. Éste filtrado constituye el producto final líquido cuyo uso como fertilizante foliar se propone en esta patente.

45 A esta muestra se le determina el contenido en aminoácidos libres mediante separación por columna de cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, la muestra se inyecta en la columna de separación cromatográfica (Nova-Pak C18 4µm). La recta de calibrado se obtiene gracias a diferentes patrones de concentración 100 pmol/µL para cada aminoácido.

La composición en aminoácidos libres para la muestra obtenida bajo las condiciones citadas anteriormente se muestra en la figura 5, donde las concentraciones para cada aminoácido se

han expresado en miligramos de aminoácido por litro de fertilizante. Se observa una composición variada en todos los aminoácidos, excepto histidina, con predominio de los aminoácidos cisteína (13,5 mg/L), tirosina (10,5 mg/L), lisina (5,6 mg/L) y metionina (5,4 mg/L).

### REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de hidrólisis enzimática de harina de sangre para obtener fertilizantes con alto contenido en aminoácidos que comprende los siguientes pasos:
  - Disolución de la harina de sangre en agua
  - 5 - Calentamiento de la disolución hasta una temperatura de trabajo comprendida entre 40 y 65°C
  - Ajuste del pH hasta un valor de trabajo comprendido entre 6 y 9.
  - Adición de la enzima
  - 10 - Mantenimiento del pH y la temperatura de forma constante hasta que finalice la reacción.
2. Procedimiento según reivindicación 1, caracterizado porque el pH se fija en un valor entre 6,5 y 7,5
3. Procedimiento según reivindicación anterior caracterizado porque el pH se fija en 7,5.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la cantidad de enzima utilizada está entre el 2 y el 10% del peso de la proteína contenida en la disolución acuosa, preferentemente un 10%.
- 15 5. Procedimiento según reivindicación anterior caracterizado porque la enzima es una endoproteasa de largo espectro, preferentemente subtilisina.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el tiempo de reacción es de 2 a 4h, preferentemente 3h.

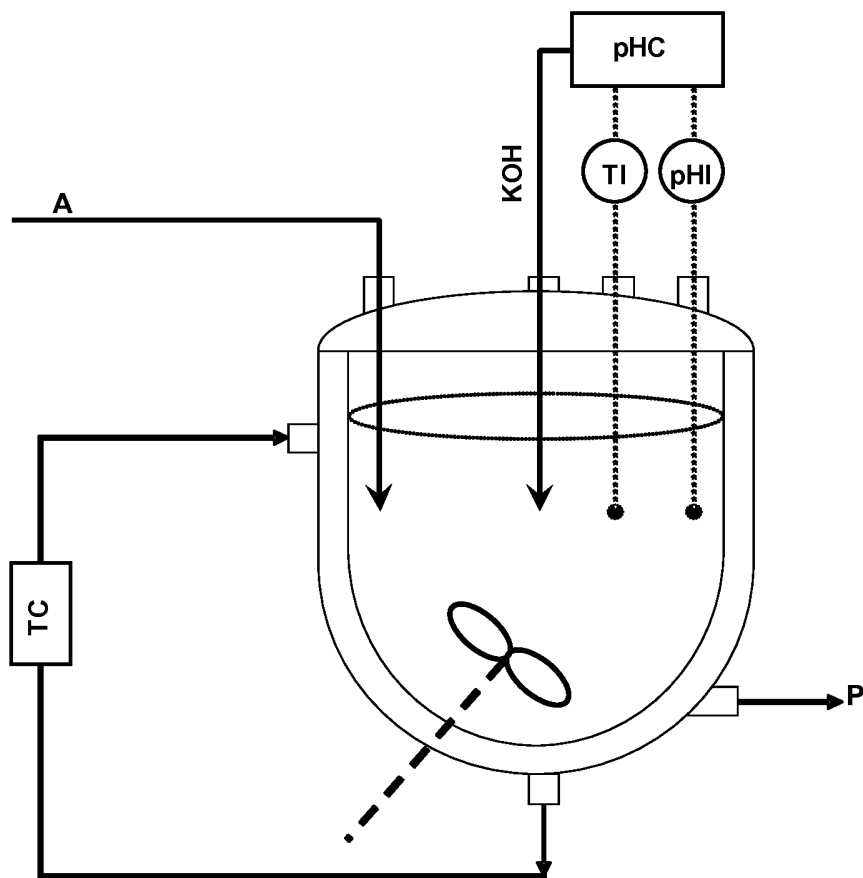


Figura 1

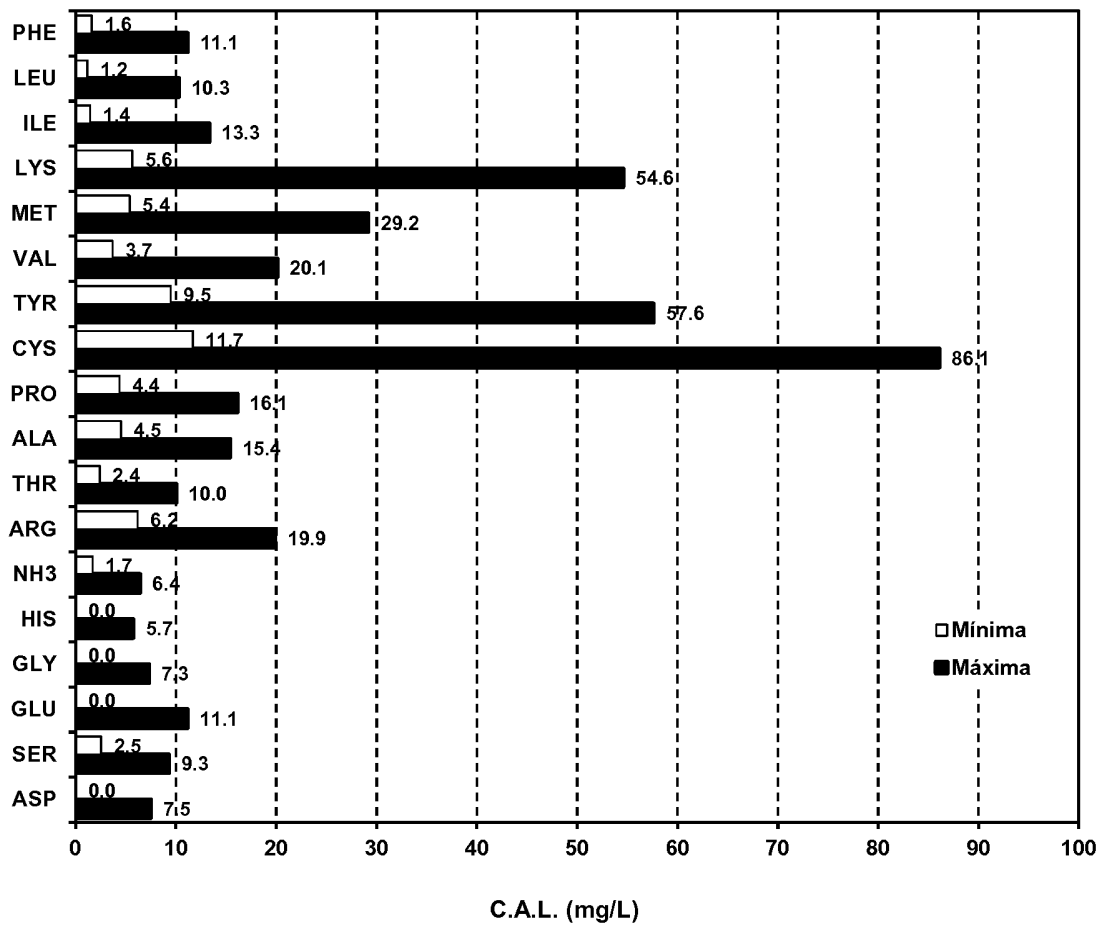


Figura 2

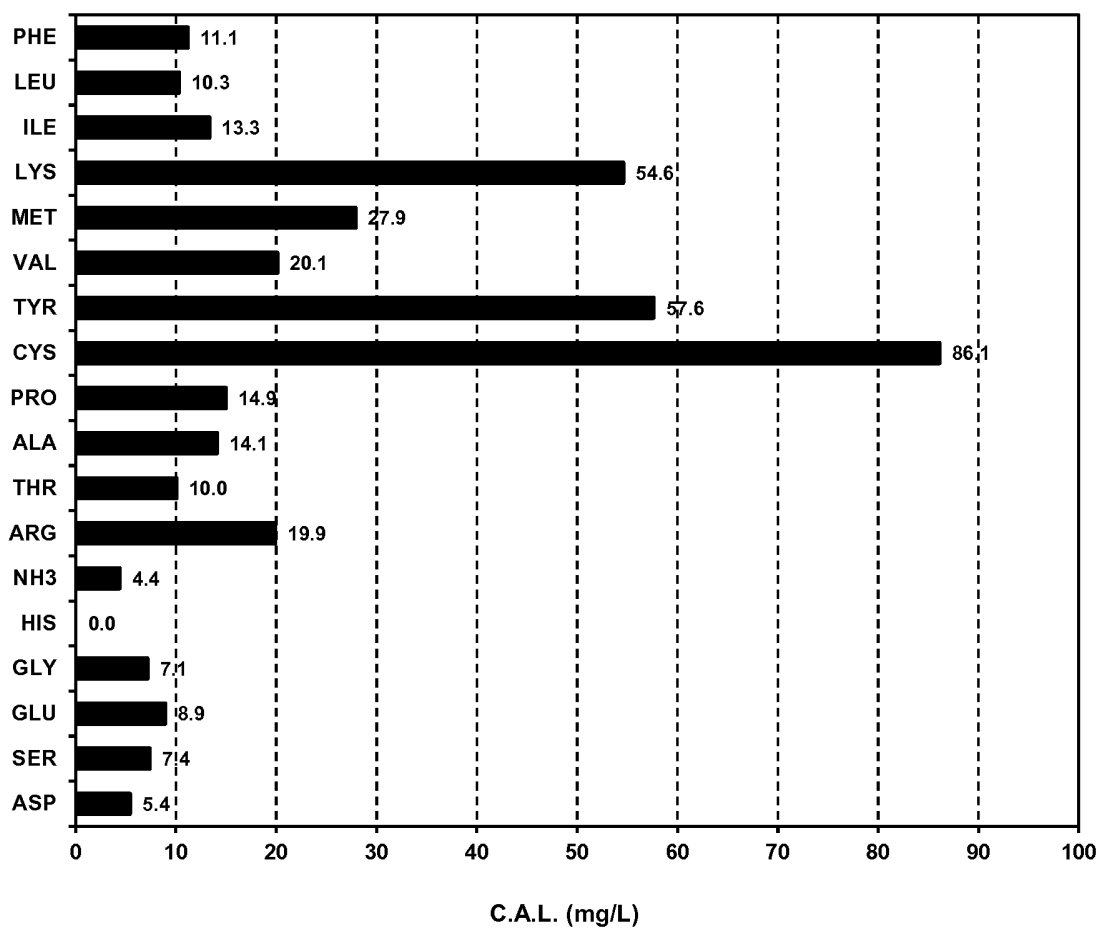


Figura 3

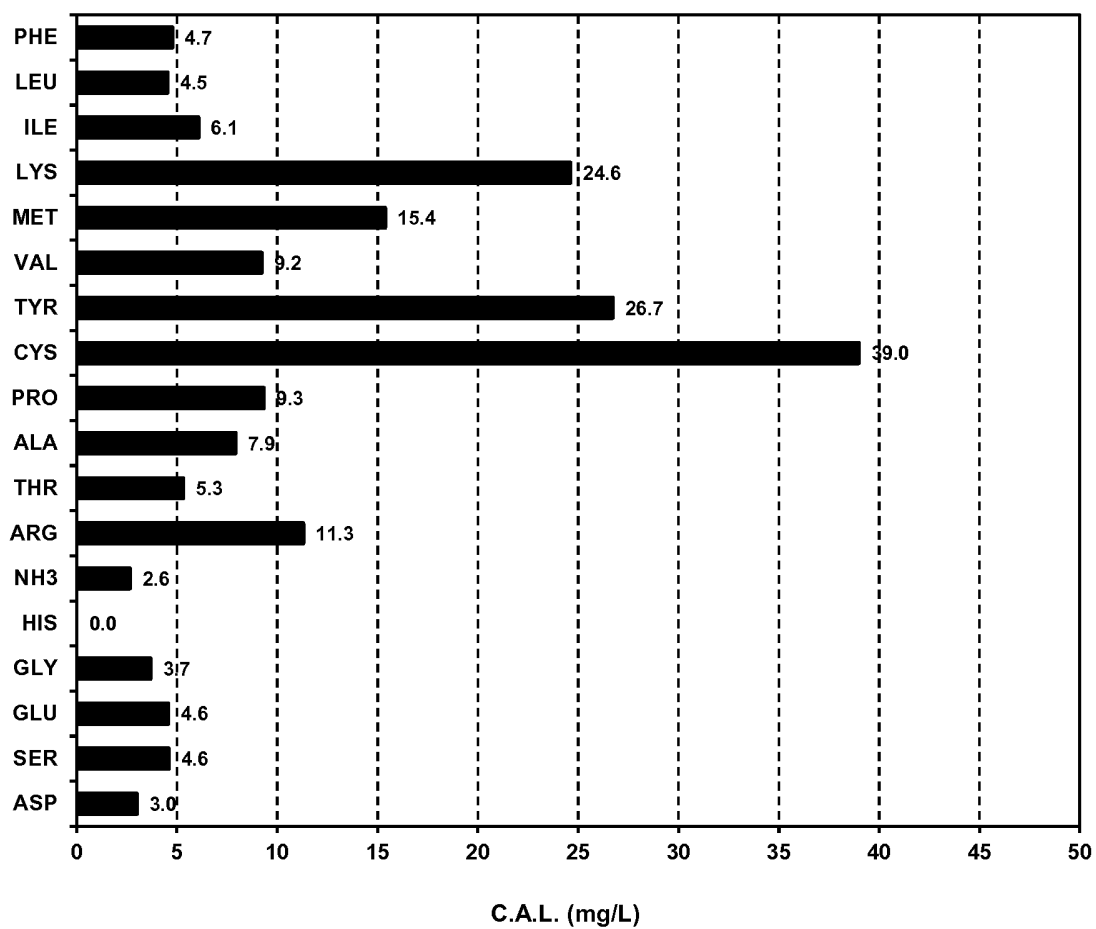


Figura 4

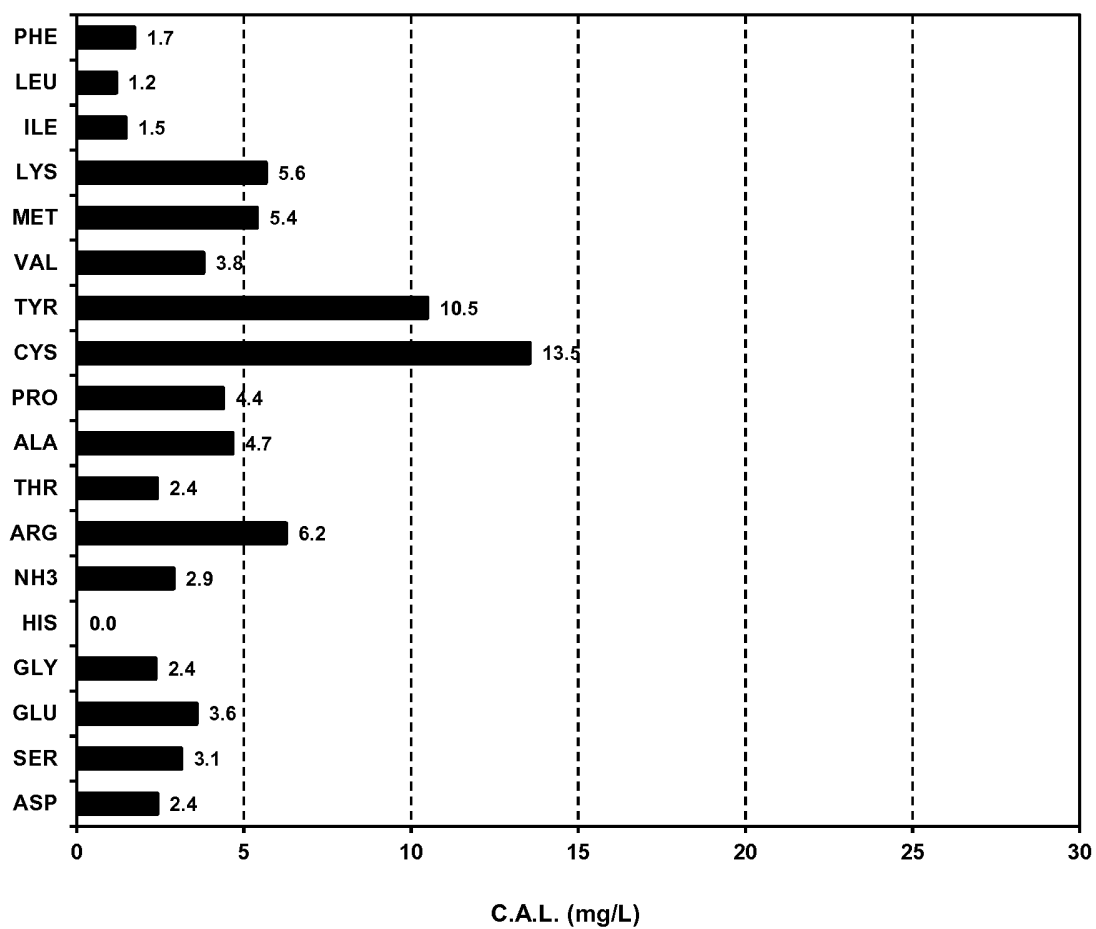


Figura 5





- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201431786  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2014  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl. : **C05F1/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PÉREZ-GÁLVEZ, R et al. Biochemical Engineering Journal. 2010, vol. 53, págs. 305-310, especialmente página 306; tabla 1.	1-6
A	ZHENG, Y et al. Optimisation of the Enzymatic Hydrolysis of Blood Cells with a Neutral Protease. BioMed Research International. 2013, págs. 1-10 [on line] , [recuperado el 05.02.2015]. Recuperado de internet, doi: 10.1155/2013/278927, todo el documento.	1-6
A	EP 2415737 A1 (OH JIN-YEOL) 2012, 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  
06.02.2015

Examinador  
J. Collado Martínez

Página  
1/4

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, TXTUS, NPL, XPESP, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.02.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	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	PÉREZ-GÁLVEZ, R et al. Biochemical Engineering Journal. 2010, vol. 53, págs. 305-310	2010

**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 presente solicitud tiene por objeto un procedimiento de obtención de fertilizantes con un alto contenido en aminoácidos mediante la hidrólisis enzimática de harina de sangre, manteniendo constantes el pH y la temperatura durante la reacción.

El documento D01 divulga un estudio sobre la optimización de las condiciones de un procedimiento de hidrólisis enzimática de harina de sangre para obtener un fertilizante orgánico (ver página 306; tabla 1).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Reivindicaciones 1-6

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la presente solicitud es D01. Dicho documento anticipa un procedimiento de hidrólisis enzimática de harina de sangre para obtener fertilizantes con el máximo grado de hidrólisis que garantice un contenido adecuado de aminoácidos libres en el producto final (D01: página 306). El procedimiento parte de la disolución de la harina de sangre en agua. Este primer paso no se menciona expresamente en D01, pero se considera implícito en la metodología divulgada en el documento. Además, el procedimiento de D01 comprende los siguientes pasos:

- Calentamiento de la disolución hasta una temperatura de trabajo comprendida entre 50-60 °C (D01: tabla 1).
- Ajuste del pH hasta un valor de trabajo comprendido entre 6 y 7,5 (D01: tabla 1). De nuevo, el ajuste previo del pH no se menciona explícitamente en D01, pero se considera implícito en el procedimiento divulgado, por cuanto el mantenimiento de un valor de pH determinado durante la hidrólisis implica obviamente la fijación de dicho valor en las condiciones de partida de la reacción.
- Adición de una endoproteasa de amplio espectro, en particular de EC 3.4.21.62 (subtilisina) (D01: página 306).
- Mantenimiento del pH y la temperatura constantes hasta que finaliza la reacción (D01: página 306).

Adicionalmente, el procedimiento de hidrólisis enzimática de D01 se lleva a cabo empleando una cantidad de enzima que está entre el 5 y el 10% del peso del sustrato proteico (D01: tabla 1), y el tiempo de reacción es de 3 horas (D01: página 306).

De lo anterior se desprende que D01 divulga todas las características definidas en la reivindicación independiente 1 y en las reivindicaciones dependientes 2 a 6. En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 a 6 no cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva establecidos en los artículos 6.1 y 8.1 de la LP 11/1986.