

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 903 008**

21 Número de solicitud: 202030981

51 Int. Cl.:

**C05F 3/00** (2006.01)

**C05F 17/20** (2010.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**30.09.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.03.2022**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**17.05.2022**

Fecha de concesión:

**10.11.2023**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**17.11.2023**

73 Titular/es:

**NEOALGAE MICRO SEAWEEEDS PRODUCTS, S.L.**

**(100.0%)**

**C/ Carmen Leal Mata Nº 191**

**33211 Gijón (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**CASADO BAÑARES, Victor**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **COMPOSICIÓN FERTILIZANTE QUE COMPRENDE PURÍN LÍQUIDO Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN**

57 Resumen:

La presente invención describe composiciones fertilizantes bioestimulantes y su procedimiento de obtención. Los fertilizantes se producen a partir de una reacción de hidrólisis cuyo elemento acuoso es purín procedente de explotaciones ganaderas y la fuente proteica es biomasa de microalgas. El fertilizante tiene unos los valores NPK similares o incluso superiores comparado con otras composiciones fertilizantes basados en biomasa de microalgas que carecen de purín, y mayor concentración de aminoácidos libres, lo que favorece el desarrollo de las plantas.

ES 2 903 008 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### COMPOSICIÓN FERTILIZANTE QUE COMPRENDE PURÍN LÍQUIDO Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

#### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se engloba dentro del sector agrícola y más concretamente dentro de la producción de productos fertilizantes y bioestimulantes.

#### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Los fertilizantes bioestimulantes o biofertilizantes son productos que contienen microorganismos vivos o compuestos orgánicos derivados de microorganismos, que proporcionan a las plantas los nutrientes necesarios para su desarrollo, al mismo tiempo que mejoran la calidad del suelo. Además de nutrirlas, las protegen de patógenos del suelo y estimulan su crecimiento.

20 Un bioestimulante se considera una sustancia o mezcla de ellas, que pueden incluir un microorganismo, que se aplica sobre plantas de cultivo, semillas o raíces con el objetivo de estimular procesos biológicos de la planta, normalmente mejorando la disponibilidad de nutrientes y optimizando su absorción. Los fertilizantes bioestimulantes pueden incrementar la tolerancia a estrés abiótico o la calidad de cosecha.

30 Las microalgas son organismos fotosintéticos que se están abriendo camino en la agricultura debido a sus propiedades bioestimulantes. Las microalgas se caracterizan por tener altos niveles de macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas. El uso de microalgas en las producciones agrícolas está atrayendo el interés de los productores, ya que se consideran una alternativa ambiental amigable y económica respecto a los productos sintéticos tradicionales. Las principales especies de microalgas bioestimulantes disponibles comercialmente son *Isochrysis spp.*, *Chaetoceros spp.*, *Chlorella spp.*, *Arthrospira spp.* y *Dunaliella spp.* (Priyadarshani y Rath 2012, J Algal Biomass Utln 3(4):89).

45 El documento ES 2693793 describe un proceso de obtención de un bioestimulante a partir de la hidrólisis enzimática de la biomasa de la microalga spirulina (*Arthrospira*

*spp.*). Sin embargo, este procedimiento requiere la adición de excipientes exógenos de nitrógeno (N), fósforo (P) o potasio (K) al producto de la hidrólisis enzimática. Los compuestos que se adicionan proceden de tratamientos agresivos con ácidos, como el ácido nítrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y otros ácidos fuertes. Este tipo de productos químicos requiere un manejo y un almacenamiento que es considerado de riesgo. Evitar estas fuentes peligrosas de NPK es un objetivo desde el punto de vista medioambiental y de la sostenibilidad del proceso, tanto en la huella de carbono, como en la eliminación de residuos peligrosos.

Los purines son compuestos de deshecho que se componen de agua y de excrementos de animales. Son similares al estiércol, pero la diferencia es que mientras este es una mezcla de excrementos de animales de granja combinados con otros vertidos (como el agua de lavado, restos de alimento o paja), el purín es una mezcla de agua, excrementos y otros vertidos que incluye al menos un 85% de agua. Los purines se han usado tradicionalmente como fertilizantes aplicados directamente sobre los cultivos cercanos a las granjas de explotación ganadera en las que se producen dichos purines. La gestión de los purines producidos en estas explotaciones obliga a su aplicación en cultivos cercanos, para a) deshacerse del residuo y b) evitar su transporte. Sin embargo, se ha comprobado que los purines derivados de la producción masiva de ganado, aves o peces en granjas o piscifactorías favorecen la contaminación por eutrofización de las aguas superficiales o acuíferos, lo que lleva consigo la contaminación de los suelos. Además de la contaminación por eutrofización, otros problemas de la acumulación y uso directo de los purines son los malos olores y la emisión de gases de efecto invernadero. El problema llega a ser más grave cuando la contaminación por nitratos procedentes de los purines pasa a las redes de agua potable de los municipios y, por tanto, son ingeridos por los ciudadanos. El riesgo no es solo de tipo medioambiental, ya que se favorece la proliferación de microorganismos tóxicos que pueden producir enfermedades. Por último, otro aspecto a tener en cuenta es que el transporte de purines para su aplicación directa o para la creación de balsas de almacenamiento de purines, tiene el inconveniente adicional del consumo combustible para transportar un material cuya composición tiene normalmente alrededor de un 90 - 85% de agua. Se considera que transportar purines a más de 100 km de la granja de explotación ganadera (distancia a la que habitualmente se encuentran las zonas aptas para el vertido) no es viable.

Existe por lo tanto un problema en el estado del arte relativo a la producción de fertilizantes bioestimulantes que a su vez ayude a la gestión de los purines de origen animal. Son necesarios procedimientos que reduzcan la cantidad de purines generados

y además eliminan los olores generados durante su aplicación en el campo. La presente invención soluciona estos problemas.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 La presente invención soluciona los problemas detectados en el estado del arte, describiendo un procedimiento para la obtención de un fertilizante de uso agrícola cuya base es purín líquido.

15 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una composición fertilizante caracterizado por comprender las siguientes etapas:

- 20 a) obtención de un purín líquido;
- b) introducción del purín líquido obtenido en la etapa a) en un tanque de biocatálisis;
- c) introducción de biomasa de una microalga en el tanque de biocatálisis;
- d) calentamiento de la muestra de la etapa c);
- 25 e) ajustar pH de la muestra de la etapa d), añadir al menos una enzima de tipo endoproteasa, e incubar la mezcla;
- f) ajustar pH de la mezcla de la etapa e), añadir al menos una enzima de tipo
- 30 exoproteasa, e incubar la mezcla;
- g) obtención de la composición fertilizante.

35 En otra realización, la invención se refiere a la composición fertilizante obtenido de acuerdo con el procedimiento anterior.

40 En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para fertilizar un cultivo que comprende aplicar la composición fertilizante de la invención.

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45

**Figura 1.** Fotografías de bandejas de lechugas después de cada tratamiento. C- (control negativo), C+ (solución comercial), T1 (fertilizante basado en purines) y T2 (fertilizante

50 basado en microalgas).

**Figura 2.** Biomasa aérea (g) de las plantas de lechuga. El valor LSD se refiere al test estadístico de Fisher. C- (control negativo), C+ (solución comercial), T1 (fertilizante basado en purines) y T2 (fertilizante basado en microalgas). a, b, c y d se refieren a las diferencias estadísticas entre los grupos de análisis. Rango de p-valor: >0.05: ns; 0.05-0.01: \*; 0.01-0.001: \*\*; <0.001: \*\*\*; ns: No significativo.

**Figura 3.** Fotografías de las raíces de lechuga de cada tratamiento. C- (control negativo), C+ (solución comercial), T1 (fertilizante basado en purines) y T2 (fertilizante basado en microalgas).

**Figura 4.** Biomasa radicular (g) de las plantas de lechuga. El valor LSD se refiere al test estadístico de Fisher. C- (control negativo), C+ (solución comercial), T1 (biofertilizante 1) y T2 (biofertilizante 2). a, b, c y d se refieren a las diferencias estadísticas entre los grupos de análisis. Rango de p-valor: >0.05: ns; 0.05-0.01: \*; 0.01-0.001: \*\*; <0.001: \*\*\*; ns: No significativo.

## EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición fertilizante de uso agrícola obtenida a partir de microalgas y cuya base es purín líquido, a su procedimiento de obtención y un procedimiento para fertilizar un cultivo aplicando la composición fertilizante de la invención.

En una realización de la invención se describe el procedimiento para la obtención de la composición fertilizante, que se caracteriza por comprender las siguientes etapas:

- a) obtención de un purín líquido;
- b) introducción del purín líquido obtenido en la etapa a) en un tanque de biocatálisis;
- c) introducción de biomasa de una microalga en el tanque de biocatálisis;
- d) calentamiento de la muestra de la etapa c);
- e) ajustar pH de la muestra de la etapa d), añadir al menos una enzima de tipo endoproteasa, e incubar la mezcla;
- f) ajustar pH de la mezcla de la etapa e), añadir al menos una enzima de tipo exoproteasa, e incubar la mezcla;
- g) obtención de la composición fertilizante.

El purín líquido en la etapa a) se obtiene del lavado de las explotaciones de ganado, que incluye los excrementos sólidos y líquidos de los animales. Una vez recogido este residuo líquido, se centrifuga y se decanta o filtra, obteniendo el purín de la fracción líquida. El uso de purín líquido en la presente invención permite la reutilización de un  
5 residuo perjudicial para el suelo y los acuíferos, enriquece el fertilizante en elementos químicos como nitrógeno y potasio y además ayuda a disminuir los olores asociados a purines líquidos.

10 En una realización preferida, el purín líquido se obtiene de una explotación de ganado porcino, lanar, vacuno, caballar o avícola. En una realización más preferida, el purín líquido se obtiene de una explotación de ganado porcino.

15 En la etapa b) del procedimiento, el purín líquido obtenido en la etapa a) se introduce en un tanque de biocatálisis, en el que posteriormente tendrá lugar una hidrólisis enzimática. Un tanque de biocatálisis es cualquier reactor que permita que se lleve a  
20 cabo una reacción de hidrólisis enzimática, permita un control de temperatura durante toda la reacción (termostatzado), la mantenga en agitación (por ejemplo, que tenga una pala agitadora incorporada) y controle el valor del pH de la mezcla.

25 En la etapa c) se añade la biomasa de una microalga al tanque de biocatálisis. La concentración de microalga frente al volumen total de purín es de un 5 a 30 % p/v. En  
30 una realización preferida, la concentración de microalga es del 20 % p/v respecto al volumen total de purín líquido. En una realización preferida, la microalga se selecciona entre los géneros *Scenedesmus*, *Nanochloropsis*, *Chlorella* y *Arthrospira*. En una  
35 realización más preferida, la microalga es una cianobacteria del género *Arthrospira*, conocida como spirulina (o espirulina). La microalga puede ser húmeda o seca, en este caso en polvo. La relación preferida entre la microalga y el agua presente en la mezcla  
40 (procedente del purín líquido) para que tenga lugar la hidrólisis, es 1:10 a 1:20. Esta relación de elementos hace posible el encuentro en las siguientes fases del procedimiento entre las enzimas y las proteínas procedentes de la microalga, sin que  
45 haya una viscosidad excesiva debido al resto de componentes de la biomasa, algo que ocurre con relaciones superiores a 1:20.

En la etapa d) comienza el proceso de hidrólisis enzimática. Para ello, en primer lugar,  
50 se calienta la muestra presente en el tanque de biocatálisis (microalga y purín líquido) a una temperatura entre 50 – 65 °C en agitación entre 50 y 100 rpm. En el caso de que la biomasa de la microalga sea de origen sólido, es necesario que esté bien resuspendida

en el purín líquido antes de que comience la hidrólisis. Durante esta etapa, la biomasa de la microalga se hidrata con el agua del purín y el pH de la reacción va disminuyendo por las propias interacciones entre ambos ingredientes. Esta etapa de calentamiento o de hidratación de la microalga dura entre 60 y 120 minutos.

5 A continuación, se añaden las enzimas proteolíticas o proteasas que llevarán a cabo la hidrólisis de las proteínas de la biomasa de la microalga. La concentración de cada una de ellas debe ser del 1 a 20 % (p/p) respecto a la cantidad de microalga. La relación  
10 entre el sustrato (microalga) y cada enzima es importante para que la reacción sea efectiva. En una realización más preferida, la concentración de cada enzima es del 2 - 10 % (p/p) respecto a la cantidad de microalga. En una realización todavía más preferida, la concentración de cada enzima es del 2 - 4 % (p/p) respecto a la cantidad  
15 de microalga.

La adición de las enzimas tiene lugar en dos fases. En la etapa e), la primera enzima  
20 utilizada en la reacción es una endoproteasa (o una combinación de endoproteasas). La endoproteasa hidroliza los enlaces amídicos dentro de la cadena de proteína a pH 8 – 9. En una realización preferida de la invención, la endoproteasa se selecciona del grupo  
25 que consiste en: una serín endoproteasa, una cisteín endoproteasa, una aspártico proteasa o una metaloproteasa. La endoproteasa puede ser de origen bacteriano, vírico, animal o vegetal. Ejemplos no limitativos de fuentes bacterianas son endoproteasas de  
30 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *E. coli*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Streptococcus sp* o *Pseudomonas*, entre otros.. Ejemplos no limitativos de fuentes animales son endoproteasas de glándulas pancreáticas, endoproteasas de membrana o endoproteasas específicas de inmunoglobulinas. En una  
35 realización más preferida, la endoproteasa pertenece a la especie *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.* o es una combinación de las mismas. En una realización más preferida, endoproteasa se selecciona del grupo que consiste en una endoproteasa cuyo código  
40 enzimático de acuerdo con el esquema NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) es EC 3.4.1.1, EC 3.4.1.2, EC 3.4.1.3, EC 3.4.1.4, EC 3.4.4.16, EC 3.4.21.62, EC 3.4.18.1, EC 3.4.22.2 o EC  
45 3.4.23.1.

Antes de añadir la enzima en la etapa e) es necesario que el pH de la reacción sea entre  
50 pH 8 y 9. Por este motivo, antes de la adición de la endoproteasa se ajusta el pH de la muestra a 8 – 9 con una base (como por ejemplo hidróxido sódico). A medida que progresa la reacción, se produce una disminución del pH en la mezcla debida a la rotura

de los enlaces peptídicos. La reacción tiene lugar a una temperatura ente 50 y 70 °C entre 2 y 8 horas. En una realización preferida, la reacción tiene lugar a 65 °C durante tres horas.

A continuación, en la etapa f), antes de añadir la enzima, es imprescindible revisar el pH de la mezcla y, en caso de ser necesario, ajustar el pH a 6-7. Esta segunda enzima proteolítica es una exoproteasa (o una combinación de exoproteasas). La exoproteasa elimina los aminoácidos terminales de las proteínas. En una realización preferida de la invención, la exoproteasa se selecciona del grupo que consiste en: una aminopeptidasa, una carboxipeptidasa, una dipeptidil-peptidasa, una peptidil-dipeptidasa, una tripeptidil-peptidasa o una dipeptidasa. La exoproteasa puede ser de origen bacteriano, vírico, animal o vegetal. Ejemplos no limitativos de fuentes bacterianas son exoproteasas de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *E. coli*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Streptococcus sp* o *Pseudomonas*, entre otros. Ejemplos no limitativos de fuentes animales son exoproteasas de glándulas pancreáticas, exoproteasas de membrana o exoproteasas específicas de inmunoglobulinas. En una realización más preferida, la exoproteasa procede de *Aspergillus oryzae*. En otra realización más preferida, la exoproteasa se selecciona del grupo que consiste en una exoproteasa cuyo código enzimático de acuerdo con el esquema NC-IUBMB es EC 3.4.11, EC 3.4.16, EC 3.4.17 o EC 3.4.18. En otra realización más preferida, durante la etapa f) se utiliza la combinación de proteasas cisteína proteasa (EC 3.4.22), subtilisina (EC 3.4.21.62), leucina aminopeptidasa (EC 3.4.11.1) y carboxi peptidasa ácida (EC 3.4.18.1).

Antes de añadir la enzima en la etapa f) es necesario que el pH de la reacción sea entre pH 6 y 7. Por este motivo, antes de la adición de la exoproteasa se ajusta el pH de la muestra a 6 – 7 con un ácido (como por ejemplo ácido cítrico). La reacción tiene lugar a una temperatura ente 50 y 70 °C entre 2 y 8 horas. En una realización preferida, la reacción tiene lugar a 65 °C durante tres horas.

Para obtener una alta eficiencia en la reacción de hidrólisis, es necesaria una combinación de enzimas que trabajen a diferentes pHs y compuestos ácidos y bases fuertes que permitan regular las condiciones de la reacción.

Para finalizar la hidrólisis proteica las enzimas se inactivan con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. La inactivación con calor tiene lugar a temperatura superior a 80 °C. El pH de la composición fertilizante obtenida en la

etapa g) se ajusta a un pH entre 3 y 4 y finalmente el producto se envasa para su almacenaje o aplicación en cultivo.

5 Tener un valor de pH adecuado en las diferentes etapas de la reacción de hidrólisis es esencial en la invención para que la reacción tenga lugar. En el caso de que estos compuestos ácidos o bases usados para ajustar el pH durante la reacción queden libres en la composición una vez finalice la reacción, estos forman sales, por lo que su cantidad en el producto final es residual.

10 El purín en la etapa a) sirve como el elemento líquido de la hidrólisis enzimática. En los procedimientos hidrolíticos descritos en el estado del arte se introduce únicamente agua. No hay ningún caso descrito en el que este elemento líquido en el que tiene lugar la hidrólisis sea purín procedente de explotaciones ganaderas. Esto es algo  
15 completamente novedoso. Además, las ventajas de introducir purín líquido como el elemento acuoso de la reacción es que se consigue aumentar la cantidad de elementos químicos NPK (nitrógeno-fósforo-potasio) en la composición fertilizante final.  
20

Para conseguir una composición fertilizante adecuada, es necesario una alta eficiencia de la reacción de hidrólisis, dado que el resultado de esta reacción va a determinar las características del producto final. La eficiencia de la hidrólisis depende de las condiciones de reacción utilizadas (concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de reacción, pH y temperatura). Las características fisicoquímicas de los purines han sido estudiadas y es necesario conocerlas para diseñar la reacción de hidrólisis y obtener un producto final adecuado que sea un fertilizante de plantas.  
25  
30

35 La incorporación del purín al inicio de la hidrólisis permite controlar desde el inicio la reacción, ya que la esta está afectada por la relación “medio de reacción (purines) y sustrato (microalga)” y “sustrato (microalga) y enzimas (endo- y exoproteasas)”. De esta forma se evita un efecto de dilución que surgiría si el purín fuera añadido una vez la  
40 reacción de hidrólisis hubiera comenzado.

45 Otra realización de la invención se refiere a la composición fertilizante (o biofertilizante) obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

El porcentaje de purín líquido respecto al total del fertilizante es desde un 75 % hasta  
50 un 95 % v/v respecto a la cantidad total de composición fertilizante obtenida. En una

realización preferida, el porcentaje de purín líquido inicial en el procedimiento constituye el 80 % (v/v) de la composición fertilizante obtenida al finalizar la reacción.

La composición fertilizante obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente tiene un contenido NPK de 1,5 – 3,0 p/v (N); 1,0 – 2,0 p/v (P) y 0,1- 0,5 p/v (K), sin  
5 necesidad de incorporar otras fuentes nutricionales. En una realización preferida, el contenido NPK del fertilizante es de 1,8:1,5:0,3. El aporte de elementos es notable en el contenido de nitrógeno y potasio, si se tiene en cuenta que un hidrolizado de  
10 microalgas en crudo, sin elementos añadidos, tiene un contenido NPK de 0,9:0,2:0,05.

El empleo de purín como fuente de nutrientes en la composición fertilizante evita el uso  
15 (manipulación y almacenamiento) de sustancias químicas nocivas, como el ácido nítrico, el ácido fosfórico, el nitrato potásico o el sulfato potásico. Además, el uso del purín también evita realizar mezclas químicas tóxicas o contaminantes para obtener al final una composición fertilizante con unos valores NPK similares a los fertilizantes obtenidos  
20 a partir de procedimientos que usan estas sustancias químicas nocivas.

La composición fertilizante obtenida mediante el procedimiento de la invención tiene una  
25 cantidad de aminoácidos libres disponibles incrementados de 2 a 5 % respecto a la cantidad de aminoácidos libres presentes en fertilizantes basados en microalgas, pero sin purín líquido como base líquida de la reacción. Los aminoácidos libres son fácilmente asimilables por las plantas a nivel foliar y radicular, lo que incrementa el potencial  
30 bioestimulante de la composición fertilizante de la invención.

La composición fertilizante además logra las mismas (e incluso mayores) tasas de  
35 producción en cultivos y benefician la floración y cuajado, mediante su aporte NPK. Durante la hidrólisis de este procedimiento se generan L-aminoácidos, fácilmente asimilables por la planta, al contrario de los aminoácidos obtenidos mediante hidrólisis  
40 ácida, que son D-aminoácidos.

La composición fertilizante también proporciona a la planta otras moléculas esenciales  
45 para el desarrollo del organismo vegetal como fitohormonas y pigmentos antioxidantes que ayudan a la planta a realizar sus procesos internos de una manera más eficiente. Además, los minerales provenientes del purín se incorporan a la composición fertilizante debido a la disminución progresiva del pH durante la reacción de hidrólisis producida  
50 por los aminoácidos libres generados. Esto es completamente diferente a otras hidrolisis

enzimáticas a partir de biomasa de microalgas, en las que les añaden componentes químicos a pH bajo para modificar el contenido NPK una vez finalizada la reacción.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para fertilizar un cultivo que comprende aplicar la composición fertilizante de la invención, obtenida mediante un procedimiento que se caracteriza por comprender las siguientes etapas:

- a) obtención de un purín líquido;
- b) introducción del purín líquido obtenido en la etapa a) en un tanque de biocatálisis;
- c) introducción de biomasa de una microalga en el tanque de biocatálisis;
- d) calentamiento de la muestra de la etapa c);
- e) ajustar pH de la muestra de la etapa d), añadir al menos una enzima de tipo endoproteasa, e incubar la mezcla;
- f) ajustar pH de la mezcla de la etapa e), añadir al menos una enzima de tipo exoproteasa, e incubar la mezcla;
- g) obtención de la composición fertilizante.

En una realización preferida, se aplica una cantidad de 3 a 5 ml de composición fertilizante por litro de riego. La composición fertilizante se puede aplicar sobre cualquier tipo de cultivo. En una realización preferida, el cultivo se selecciona del grupo que consiste en cultivos hortofrutícolas, pastos de forraje o cereales.

Otra realización de la invención se refiere a una composición fertilizante que comprende purín líquido y biomasa de una microalga.

En una realización preferida, el porcentaje de purín líquido respecto al total de la composición fertilizante es desde un 75 % hasta un 95 %.

En otra realización preferida, la composición fertilizante tiene un contenido NPK de 1,5 – 3,0 p/v (N); 1,0 – 2,0 p/v (P) y 0,1- 0,5 p/v (K). En una realización más preferida, el contenido NPK del fertilizante es de 1,8:1,5:0,3.

En otra realización preferida, la composición fertilizante tiene una cantidad de aminoácidos libres disponibles incrementados de 2 a 5 % respecto a la cantidad de aminoácidos libres presentes en fertilizantes basados en microalgas, pero sin purín líquido.

Las ventajas del procedimiento de la presente invención son:

- aprovechamiento de un residuo de difícil gestión que ocasiona graves problemas de contaminación de suelos y acuíferos;
- buen uso de la gestión del agua, ya que permite la reutilización total del agua residual producida en granjas, lo que ahorra el 100% de agua necesaria para producir los hidrolizados de microalgas de la invención;
- reducción de los compuestos volátiles de los purines, evitando los aromas desagradables que generan.
- evita la manipulación de compuestos químicos nocivos durante la hidrólisis;

## EJEMPLOS

El propósito de los ejemplos indicados a continuación sirve para ilustrar la invención, sin por ello limitar el alcance de la misma.

Se han realizado una serie de ensayos en los que se ha desarrollado una metodología específica para la obtención del fertilizante bioestimulante basado en hidrólisis cuyo elemento acuoso es purín, añadiendo a la reacción biomasa de microalgas y enzimas proteolíticas. Para el desarrollo del proceso se han seleccionado las enzimas óptimas en base a su eficacia, se han tenido en cuenta las inhibiciones del purín en la reacción, se han optimizado las condiciones de hidrolisis, el escalado del proceso y se ha realizado un análisis de los productos obtenidos.

### Ejemplo 1. Procedimiento de obtención de la composición fertilizante

En una botella de 1 litro con agitación magnética, control de agitación, pH y temperatura, se añadieron 200 ml de purín de cerdo filtrado procedente de una granja de cerdos. A continuación, se añadieron 28 gramos de la microalga seca spirulina producida por los inventores. La spirulina se resuspendió en el purín con agitación a 300 rpm y temperatura controlada de 55 °C. Se ajustó el pH de la mezcla a 8 con 2 ml de hidróxido sódico 10 M y se mantuvo a 55 °C durante 60 minutos.

A continuación, se añadieron 3 gramos de la endoproteasa de *Bacillus sp.* para romper los enlaces peptídicos de las proteínas de la microalga. La reacción tuvo lugar en agitación a 65 °C durante cuatro horas. A medida que la reacción progresaba, el pH disminuyó debido a la rotura de los enlaces peptídicos de las proteínas de la biomasa. Por este motivo el control del pH es un factor determinante para la reacción, y debe ser

monitorizado y ajustado durante las cuatro horas que dura la reacción. Esta etapa del procedimiento puede realizarse con una única endoproteasa, siempre que se respeten el pH, los tiempos, y la concentración respecto a la biomasa de microalga.

5 A continuación, se ajustó el pH a 7 con ácido cítrico. Se añadió la exoproteasa de *Bacillus oryzae*. Tras seis horas de reacción a 65 °C, se inactivaron las enzimas con calor a 80 grados centígrados. Por último, se ajustó el pH a 3,4. Esta etapa del procedimiento puede realizarse con una única exoproteasa.

10 Hay que destacar que también se han obtenido fertilizantes adecuados usando la reacción cócteles de endoproteasas y/o cócteles con exoproteasas.

### 15 **Ejemplo 2. Procedimiento a escala industrial**

20 En un reactor de 1000 litros con pala agitadora, control de agitación, pH y temperatura se introdujeron 900 litros de purín de cerdo filtrado.

25 Se añadieron 110 kg de microalga spirulina seca, que se resuspendió con agitación a 300 rpm a temperatura controlada de 65 °C. Tras una hora de hidratación, se ajustó el pH a 8 con 4 litros de hidróxido sódico 10 M.

30 A continuación, se añadieron 3 kg de una endoproteasa y se monitorizó el pH 8 de la reacción durante tres horas a 65 °C. Finalizada la primera fase de ruptura, se ajustó el pH a 7 con ácido cítrico. Se añadieron 3 kg de una exoproteasa y tras 3 horas de incubación a 65 °C se inactivaron las enzimas a 80 °C, y se ajustó el pH a 3,4 y el producto se envasó.

### 40 **Ejemplo 3. Análisis de la composición fertilizante**

45 Se realizaron analíticas de perfil de aminoácidos libres y de valor NPK de la composición fertilizante obtenida el procedimiento descrito en el ejemplo 1 .

50 Los L-aminoácidos generados contienen la concentración suficiente y en una buena proporción para lograr mayores tasas de producción que en cultivos agrícolas (datos disponibles, pero no mostrados). La concentración de aminoácidos presente en la composición fertilizante se analizó mediante el método ISO 13903. El resultado se muestra en la Tabla 1:

**Tabla 1:** concentración de aminoácidos libres en la composición fertilizante

|    | <b>Compuesto</b> | <b>Resultado (g/100 g)</b> |
|----|------------------|----------------------------|
| 5  | Valina           | 0.311                      |
|    | Treonina         | 0.191                      |
|    | Tirosina         | 0.185                      |
|    | Serina           | 0.168                      |
| 10 | Taurina          | < 0.009                    |
|    | Prolina          | 0.011                      |
|    | Ornitina         | <0.010                     |
| 15 | Metionina        | 0.108                      |
|    | Lisina           | 0.181                      |
|    | Leucina          | 0.425                      |
|    | Isoleucina       | 0.216                      |
| 20 | histidina        | 0.023                      |
|    | Glicina          | 0.081                      |
|    | Fenilalanina     | 0.214                      |
| 25 | Cistina          | <0.007                     |
|    | Arginina         | 0.260                      |
|    | Alanina          | 0.277                      |
| 30 | Ác. Glutámico    | 0.175                      |
|    | Ác. Aspártico    | 0.087                      |

También se midió la concentración NPK (relación nitrógeno/fósforo/potasio). El resultado se indica en la Tabla 2:

**Tabla 2:** Determinación NPK de la composición fertilizante

|    | <b>Determinación</b>    | <b>Valor</b>                          | <b>Método</b>    |
|----|-------------------------|---------------------------------------|------------------|
| 40 | Fósforo soluble en agua | 0.282 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | RD 1110/1991     |
|    | Potasio soluble en agua | 1.55 % K <sub>2</sub> O               | Orden 17/09/1981 |
| 45 | Nitrógeno total         | 1.81 % N                              | ITE: QUI002      |
|    | Nitrógeno orgánico      | 1.51 %N                               | RD 1110/1991     |

Como se puede observar en las tablas anteriores, la composición fertilizante de la invención tiene aminoácidos libres que pueden captar las raíces y hojas de las plantas, y un contenido NPK aumentado (especialmente en nitrógeno y potasio), lo que supone una ventaja.

**Ejemplo 4. Ensayo de campo: lechuga**

Con el fin de verificar el efecto del bioestimulante en un cultivo, se realizó un ensayo en lechuga (variedad Romana).

5

Para la realización del ensayo, se evaluaron cuatro tratamientos:

- Control positivo (solución nutritiva comercial con npk 20:20:20 y micronutrientes pata comparar los tratamientos con una fertilización intensiva que tiene un contenido en nutrientes de 10 a 20 veces superior).
- Tratamiento T1: fertilizante con base de purín y biomasa de microalgas (invencción).
- Tratamiento T2: fertilizante comercial a partir de biomasa de spirulina.
- Control negativo (C-): agua.

10

15

20

Se comparó la eficacia de los tratamientos T1 y T2 en el desarrollo de las plantas de lechuga, para establecer si la base de purín en el producto T1 tenía algún efecto.

25

Se han realizaron dos aplicaciones radiculares de cada tratamiento a través de riego. Las dosis de los tratamientos se indican en la tabla 3.

**Tabla 3:** Productos testados con sus dosis correspondientes

30

35

| Muestra | Tratamiento                  | Dosis  | Forma de aplicación |
|---------|------------------------------|--------|---------------------|
| C-      | -                            | -      | Riego               |
| C+      | Solución nutritiva comercial | 3 g/L  | Riego               |
| T1      | purines + microalgas         | 3 ml/L | Riego               |
| T2      | microalgas                   | 3 ml/L | Riego               |

40

Se realizó un muestreo final después de 20 días de ensayo y se midieron los siguientes parámetros: biomasa aérea y biomasa radicular en relación con el crecimiento de la planta.

45

La Figura 1 muestra fotografías de las plantas del ensayo.

50

Se midió la biomasa aérea de las plantas después de cortar las lechugas en la base del tallo y pesarlas en una balanza de precisión SARTORIUS. La Figura 2 muestra el gráfico que representa el resultado del análisis de la biomasa de las plantas. Para ver la relevancia de los datos se realizó un ANOVA simple y se usó el test LSD (*Least Significance Difference*) de Fisher para comparar las medias. Las letras a, b, c y d

indican las diferencias significativas entre los valores de cada tratamiento. Se observa que las plantas con el tratamiento T1 tienen una mayor biomasa aérea respecto al control negativo (50 %) y respecto al tratamiento T2 sin purines (28 %) y además este incremento es estadísticamente significativo (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

5

La Figura 3 muestra fotografías de las raíces de las plantas del ensayo. Se midió la biomasa radicular de las raíces. Para ello se cortó cada raíz en la base del tallo, se limpió bien para eliminar los restos de vermiculita de la planta, se dejaron secar y se pesaron en una balanza de precisión. La Figura 4 muestra el gráfico que representa el resultado. El análisis estadístico fue el mismo que en el caso de la biomasa aérea de las plantas. La figura muestra que las raíces plantas con el tratamiento T1 tienen una mayor biomasa radicular respecto al control negativo (42 %) y al tratamiento T2 sin purines (16 %).

10

15

De estos datos se concluye que la composición fertilizante de la invención (T1) con base de purines tiene un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de las plantas de lechuga, y muestra un incremento en el crecimiento aéreo y radicular en relación con otros biofertilizantes basados en microalgas (T2).

25

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la obtención de una composición fertilizante que se caracteriza por comprender las siguientes etapas:
- 5           a) obtención de un purín líquido;
- b) introducción del purín líquido obtenido en la etapa a) en un tanque de biocatálisis;
- 10           c) introducción de biomasa de una microalga en el tanque de biocatálisis, donde la relación entre la microalga y el agua presente en el purín líquido es 1:10 a 1:20;
- d) calentamiento de la muestra de la etapa c);
- 15           e) ajustar el pH de la muestra de la etapa d), añadir una enzima de tipo endoproteasa e incubar la mezcla;
- f) ajustar el pH de la mezcla de la etapa e), añadir una enzima de tipo exoproteasa e incubar la mezcla;
- 20           g) obtención de la composición biofertilizante.
- 25           2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el purín líquido es un purín procedente de explotaciones de ganado porcino, lanar, vacuno, caballar o avícola.
- 30           3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el purín líquido procede de ganado porcino.
- 35           4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la concentración de biomasa de microalga es de 5 a 30 % p/v respecto al volumen de purín líquido.
- 40           5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la microalga se entre los géneros *Scenedesmus*, *Nanochloropsis*, *Chlorella* y *Arthrospira*.
- 45           6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque la microalga es una microalga del género *Arthrospira*.
- 50

7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en la etapa c) la muestra se calienta entre 50 – 65 °C en agitación entre 50 y 100 rpm entre 60 y 120 minutos.
- 5 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la concentración de cada enzima en las etapas e) y f) es de 1 a 20 % (p/p) respecto a la cantidad de microalga.
- 10 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque la concentración de cada enzima en las etapas e) y f) es de 2 – 8 % (p/p) respecto a la cantidad de microalga.
- 15 10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la incubación en la etapa e) tiene lugar durante un periodo entre 2 y 8 horas, a una temperatura entre 50 y 70 °C y a pH 8 - 9.
- 20 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque la incubación en la etapa e) tiene lugar a 65 °C durante tres horas y a pH 8.
- 25 12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la incubación en la etapa f) tiene lugar durante un periodo entre 2 y 8 horas, a una temperatura entre 50 y 70 °C y a pH 6 -7.
- 30 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la incubación en la etapa f) tiene lugar a 65 °C durante tres horas y a pH 7.
- 35 14. Composición fertilizante obtenida por el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 13.
- 40 15. Composición fertilizante de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada por contener un 75 – 95 % v/v de purín líquido respecto al contenido total de fertilizante.
- 45 16. Composición fertilizante de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, caracterizada por tener un contenido NPK de 1,5 – 3,0 p/v (N); 1,0 – 2,0 p/v (P) y 0,1- 0,5 p/v (K).
- 50

17. Procedimiento para fertilizar un cultivo que comprende aplicar sobre el cultivo una composición fertilizante de acuerdo con de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.
- 5
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque se aplica de 3 a 5 mL de fertilizante por litro de riego.
- 10
19. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 17 o 18, caracterizado porque el cultivo se selecciona del grupo que consiste en cultivos hortofrutícolas, pastos de forraje o cereales.

FIGURA 1

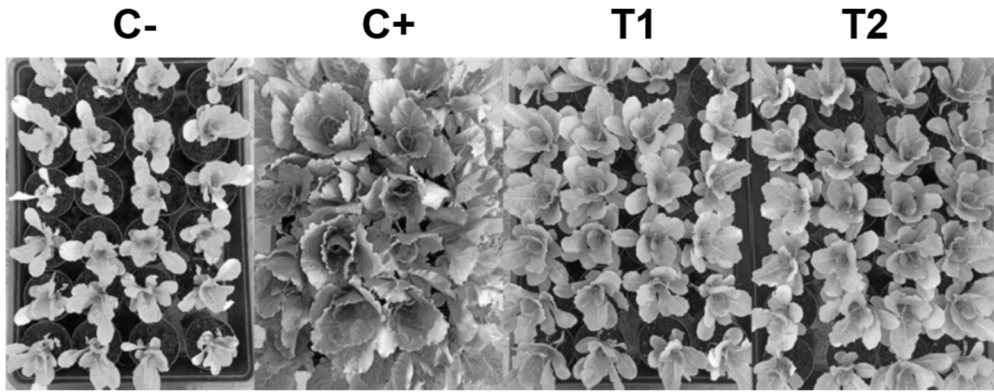


FIGURA 2

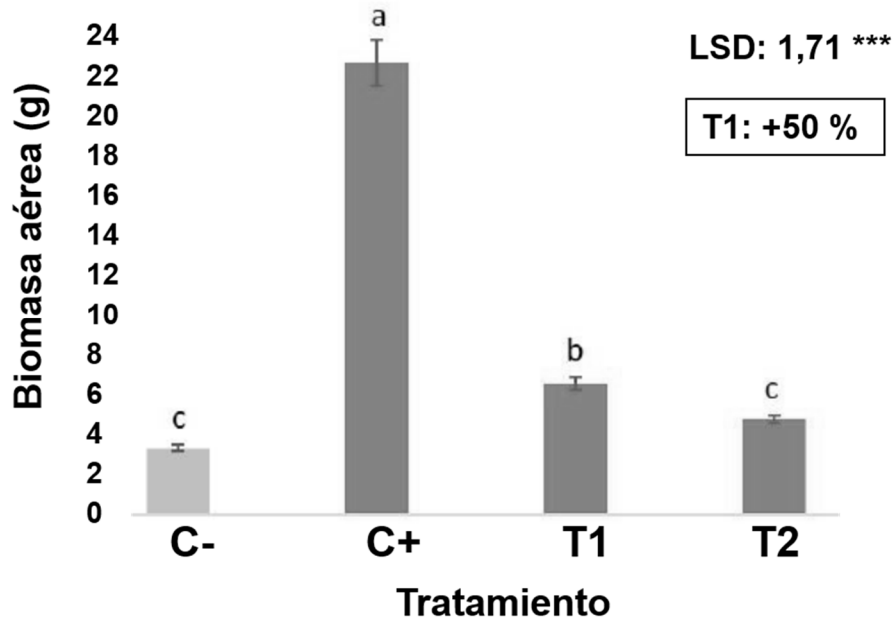


FIGURA 3

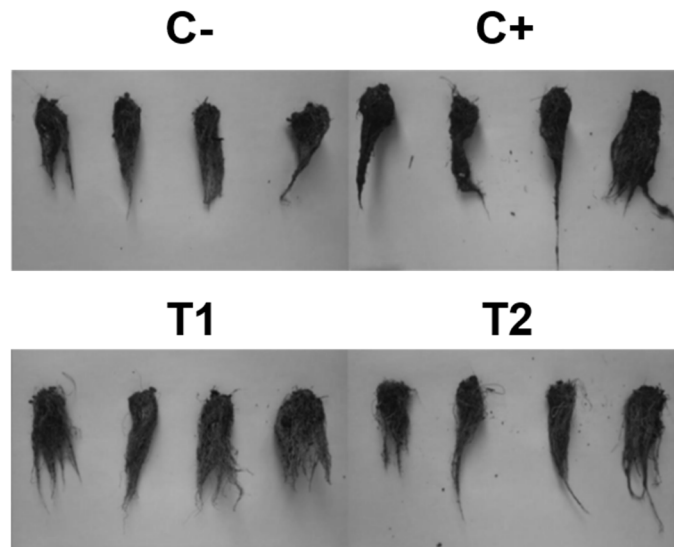


FIGURA 4

