

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
7 de marzo de 2013 (07.03.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2013/030422 A1**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*C05F 5/00* (2006.01) *C12F 3/06* (2006.01)  
*A23K 1/06* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2012/070599
- (22) Fecha de presentación internacional:  
1 de agosto de 2012 (01.08.2012)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201131423 29 de agosto de 2011 (29.08.2011) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
**HEINEKEN ESPAÑA, S.A.** [ES/ES]; Avda. de Andalucía, 1, E-41007 Sevilla (ES).
- (72) Inventor; e
- (75) Inventor/Solicitante (para US solamente): **PARRADO RUBIO, Juan** [ES/ES]; Avda. de Andalucía, 1, E-41007 Sevilla (ES).
- (74) Mandatario: **CARPINTERO LOPEZ, Mario**; Herrero & Asociados, S.L., C/ Alcalá, 35, E-28014 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:  
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOFERTILISERS AND BIOSTIMULANTS FOR AGRICULTURE AND ANIMAL FEEDING

(54) Título : PROCEDIMIENTO PARA OBTENER BIOFERTILIZANTES Y BIOESTIMULANTES PARA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN ANIMAL

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing an organic enzymatic extract from residues from the production of beer, carried out in a single container and comprising the following steps: (a) adding to the residues, in the form of a suspension, a concentrated base for adjusting the pH of said residues; (b) subjecting the mixture obtained in (a) to a pressure higher than the atmospheric pressure and to a high temperature; and (c) subjecting the mixture obtained in (b) to an enzymatic hydrolysis in order to obtain an organic enzymatic extract. Said method enables the production of extracts that have a large biofertilising and biostimulating capacity and a large capacity for bioabsorption by animals and plants, and as such they are especially useful in ecological agriculture and animal feeding.

(57) Resumen: La invención define un procedimiento para obtener un extracto enzimático orgánico a partir de residuos procedentes de la fabricación de la cerveza que se efectúa en un solo recipiente y que comprende las etapas de: (a) añadir a los residuos en forma de suspensión una base concentrada para ajustar el pH de los mismos; (b) someter la mezcla obtenida en (a) a una presión superior a la presión atmosférica y a una temperatura elevada; y (c) someter la mezcla obtenida en (b) a una hidrólisis enzimática para obtener un extracto enzimático orgánico. Dicho procedimiento permite obtener extractos con gran capacidad biofertilizante y bioestimulante y gran capacidad de bioabsorción por animales y plantas, por lo que son especialmente útiles en agricultura ecológica y en alimentación animal.



WO 2013/030422 A1

**PROCEDIMIENTO PARA OBTENER BIOFERTILIZANTES Y  
BIOESTIMULANTES PARA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN ANIMAL**

**CAMPO DE LA INVENCION**

5           La invención se refiere al campo de la química aplicada a la agricultura, más  
concretamente a la nutrición vegetal orgánica, y a la alimentación animal. En  
particular, la invención se refiere a un procedimiento para obtener extractos  
enzimáticos orgánicos a partir de residuos de la industria cervecera que pueden  
emplearse como bioestimulantes y biofertilizantes en agricultura, particularmente  
10 agricultura ecológica, y como suplementos proteicos en alimentación animal.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15           Como es bien conocido en el estado de la técnica, un fertilizante es una  
sustancia orgánica o inorgánica, natural o sintética, que se emplea para enriquecer  
el suelo y aportar a las plantas uno o varios de los elementos nutritivos  
indispensables para su desarrollo vegetativo normal.

20           Además de ser una fuente completa de nutrientes para las plantas, los  
fertilizantes orgánicos aportan materia orgánica al suelo que, para suelos arenosos  
o con arcillas de baja actividad, por ejemplo, representa una mejora en las  
propiedades físicas, químicas y biológicas, por su efecto acondicionador. Dichos  
fertilizantes pueden contener micronutrientes y microorganismos beneficiosos tales  
como levaduras, bacteria u hongos.

25           Así, por ejemplo, Kobayashi y col. han estudiado el efecto de un extracto de  
levadura *Saccharomyces cerevisiae* combinado con un fertilizante inorgánico sobre  
el crecimiento de plantas de guisante ("Effect of yeast extracts on higher plants"  
*Plant and Soil* (1980), 57(1), 41-7; "Effect of addition of the materials autolyzed from  
yeast cells on plant growth" Kankyo Kagaku Sogo Kenkyusho Nenpo (1980), 7, 87-  
30 90).

          Igualmente, Kudryasheva y col. ("Amino acids and their utilization,  
Pishchevaya Promyshlennost (Moscow, Russian Federation) (1992), (4), 13-14) han  
efectuado un estudio sobre el uso de aminoácidos procedentes de diferentes cepas

de levadura, particularmente, la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*, en fertilizantes, aditivos alimentarios, etc.

5 En el documento HU 9902060 se describe una composición acuosa fertilizante para las hojas y las raíces de las plantas que contiene la levadura *Saccharomyces*, además de elementos traza, agentes acomplejantes, agentes tamponantes y otra serie de nutrientes tales como aminoácidos, ácidos húmicos, enzimas, azúcares, etc.

10 Más recientemente, en el documento CN 1966663 (“COMPOSITE MICROORGANISM FOLIAGE FERTILIZER BACTERIA AGENT AND ITS PRODUCING METHOD AND USE”, 23/05/2007) se describe un agente microbiano que se compone de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Mucor racemosus* y *Aspergillus oryzae*, y que se usa como fertilizante foliar para promover el crecimiento de las plantas de raíz y hojas al mejorar los suelos cultivados y  
15 aumentar el rendimiento de los cultivos.

Asimismo, el documento CN 19191800 describe un nutriente para animales y plantas que se prepara diluyendo lodos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en agua hasta obtener una emulsión; mezclando ésta con papaína, proteinasa neutra y  
20 cloruro sódico; hidrolizando la mezcla después; inactivando las enzimas; y finalmente, concentrando o secando el producto obtenido. El producto final contiene una gran cantidad de nutrientes alta velocidad de absorción.

25 El documento CN 1911870 describe un nutriente para plantas que mejora los microorganismos del suelo, promueve el crecimiento de las plantas, aumenta la tasa de utilización de fertilizantes y aumenta la resistencia de las plantas a las enfermedades y al estrés. Este nutriente comprende la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus*, y otros componentes tales como derivados de la patata o del café, glucosa, peptona,  
30 sulfatos de magnesio y manganeso, fosfato de hidrógeno dipotásico y cloruro sódico.

En el documento US 2003022357 se describe un fertilizante biológico a base de células de levaduras del género *Saccharomyces* y lodos procedentes de plantas

de almacenamiento o tratamiento de aguas residuales, en cuya fabricación las células de levadura se activan mediante la aplicación de un campo magnético.

Asimismo el documento US 2002187900 describe un fertilizante biológico que comprende células de levadura del género *Saccharomyces* activadas electromagnéticamente combinadas con purines de ganado vacuno. Análogamente, el documento US2002187552 divulga un fertilizante biológico que también comprende células de *Saccharomyces* activadas electromagnéticamente combinadas con purines de ave.

Mediante tecnología enzimática se han obtenido fertilizantes utilizando otros residuos orgánicos tales como los residuos vegetales provenientes de parques y jardines, residuos animales, residuos agroindustriales y residuos sólidos domiciliarios.

Las actividades agroindustriales producen una gran cantidad, sólo en España del orden de millones de Tm/año, de subproductos orgánicos agroindustriales (SOA) resultantes de actividades tan diversas del sector como la actividad vitivinícola, cervecera, la producción cárnica, harinera, arrocera, láctea, etc. La generación de grandes cantidades de subproductos es uno de los principales problemas que se crean, debido a su acumulación en el medio, y hoy en día existe una gran presión política y social para reducir la contaminación.

A pesar de su diverso origen, todos estos subproductos agroindustriales se caracterizan por su elevado contenido en materia orgánica, siendo especialmente muy ricos en proteínas. Esto determina que sean considerados los reservorios de proteínas con mayor potencial de aplicación en la industria alimentaria, en la farmacéutica y también en la industria agroquímica (orgánica), que los utiliza para la obtención de productos nutricionales destinados a las plantas, así como también al suelo (fuente de nitrógeno).

Con el objeto de mejorar las propiedades de las proteínas y lograr así un mayor aprovechamiento, en los últimos años se han desarrollado y optimizado los procesos de extracción de proteínas, como es el caso de los procesos de hidrólisis,

que logran mejorar su calidad funcional.

Así, el documento US 5,393,318 A (“A METHOD OF PRODUCING ORGANIC FERTILIZER BY USING FISH AS RAW MATERIAL”; 28/02/1995) se refiere a un método para producir abono orgánico mediante el uso de pescado como materia prima. El método comprende varias etapas: cocción del pescado y posterior eliminación de los sólidos y grasas para obtener una solución madre, que será sometida a hidrólisis enzimática, dando un líquido clarificado que puede utilizarse como fertilizante.

En el documento US 20020129631 A1 (“METHOD FOR THE PREPARATION OF A PROTEIN HYDROLYZATE USABLE AS A FERTILIZER”; 07/03/2002) se expone un método para la consecución de un hidrolizado proteico útil como fertilizante a partir de la cocción y prensado de residuos de carnicería aplicando dos hidrólisis enzimáticas.

El documento WO 2006/082264 (“METHOD OF OBTAINING BIOSTIMULANTS FROM AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES”; 10/08/2006) se refiere a un método de obtención de bioestimulantes vegetales a partir de residuos agroindustriales tales como los residuos de la industria de la algarroba o los de la industria del bioalcohol procedentes de semillas de maíz, por ejemplo. El método contempla una primera etapa fermentativa en la que se producen los microorganismos secretores de enzimas hidrolíticas, donde el medio de cultivo es el residuo; y una segunda fase en la que estos caldos de fermentación de los residuos se utilizan como instrumentos hidrolíticos para tratar más de los mismos residuos.

Asimismo, el documento US 2007/0039362 A1 (“PROGRESSIVE DIGESTION PROCESS FOR PRODUCING FERTILIZER”; 22/02/2007) muestra un proceso de digestión enzimática progresiva para la producción de fertilizantes a partir de una mezcla de productos ricos en materia orgánica tales como estiércol, residuos alimentarios procedentes de la industria alimentaria o de vertederos, restos del procesado de verduras o recortes de césped. Esta digestión progresiva consta de dos primeros episodios mesófilos y un tercero termófilo, con separación de sólidos.

También en el documento US 2008/0302151 A1 (“SOLUBLE LIQUID FERTILIZER FOR ORGANIC AGRICULTURE DERIVED FROM SOY MEAL”; 11/12/2008) se expone un proceso de fabricación de un fertilizante orgánico mediante hidrólisis enzimática de harina de soja, con eliminación de los insolubles resultantes de dicha hidrólisis.

La patente WO 2010/114203 (“METHOD FOR MANUFACTURING AMINO ACID LIQUID FERTILIZER USING LIVESTOCK BLOOD AND AMINO ACID LIQUID FERTILIZER MANUFACTURED THEREBY”; 07/10/2010) describe un método de producción de un fertilizante aminoacídico líquido por hidrólisis enzimática de la sangre de ganado.

Por otro lado, Celus et al. (CELUS, I. et al. “ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BREWER’S SPENT GRAIN PROTEINS AND TECHNOFUNCTIONAL PROPERTIES OF THE RESULTING HYDROLYSATES”, *J. Agric. Food Chem.*, Sept. 2007, Vol. 55 nº 21, páginas 8703-8710) describen la hidrólisis enzimática de las proteínas del grano agotado de cervecería o bagazo (BSG), que es el residuo insoluble de la malta de cebada resultante de la fabricación del mosto previamente a la fermentación alcohólica del mismo para la elaboración de la cerveza, y que constituye el principal subproducto de la industria cervecera. Los hidrolizados resultantes, por sus buenas propiedades espumantes y emulsionantes, se emplean en la industria alimentaria y de bebidas.

Asimismo, en el documento ES 2329750 A1 (“PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN PRODUCTO FERTILIZANTE A PARTIR DE LOS RESIDUOS DE LA FABRICACIÓN DE LA CERVEZA”, HEINEKEN ESPAÑA SA, 30/11/2009) se describe un proceso en varias etapas de fabricación de un fertilizante a partir de residuos procedentes de la fabricación de la cerveza tras la fermentación alcohólica del mosto. Dicho proceso es un proceso multietapa con separación de fases en el que los residuos se alcalinizan, se someten a separación para obtener una fase líquida, la cual se somete posteriormente a un tratamiento ácido y de la cual se separa, a su vez, una fase sólida que, finalmente, se somete a hidrólisis enzimática o a hidrólisis ácida. Este procedimiento, sin embargo, presenta los inconvenientes

de ser complejo y costoso y, además, puede producir desechos ácidos. El producto fertilizante obtenido, presenta un bajo rendimiento y puede contener una gran cantidad de sustancias no absorbibles por las plantas y potencialmente tóxicas.

5 Continúa existiendo en el estado de la técnica, por tanto, la necesidad de aprovechar los residuos de la industria cervecera obtenidos tras la fermentación alcohólica del mosto de un modo más sencillo y rentable.

10 Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que el tratamiento físico de todos los residuos de partida sin separación de fases a una presión superior a la atmosférica y a una temperatura elevada, una vez tratados con una base concentrada y antes de someterlos a la hidrólisis enzimática permite obtener, de un modo más sencillo, menos costoso y menos contaminante, extractos orgánicos enzimáticos que contienen prácticamente toda la proteína hidrolizada en  
15 forma de aminoácidos libres, oligopéptidos y otros péptidos de mayor peso molecular y, además, prácticamente todos los nutrientes del residuo de partida. Dichos extractos, por tanto, presentan una mayor capacidad biofertilizante y bioestimulante, así como una mayor capacidad de bioabsorción por animales y plantas. Por todo ello, estos productos son especialmente útiles en agricultura ecológica y en alimentación animal, como aditivos nutricionales de alto valor  
20 añadido para ganado o para acuicultura, por ejemplo.

### **OBJETO DE LA INVENCION**

25 La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar un procedimiento para obtener extractos enzimáticos orgánicos a partir de residuos procedentes de la fabricación de la cerveza.

Por otro lado la invención tiene por objeto proporcionar los extractos enzimáticos orgánicos obtenibles por dicho procedimiento.

30

Finalmente, la invención tiene por objeto proporcionar el uso de dichos extractos orgánicos en agricultura y alimentación animal.

### **DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra el diagrama en bloques de una realización particular del procedimiento de la invención, en la que los residuos de la fabricación de la cerveza en forma de suspensión en cerveza se someten a tratamiento alcalino, seguido de un tratamiento físico y una hidrólisis enzimática para obtener directamente un extracto orgánico enzimático (HED-C), así como, tras etapas adicionales de concentración y/o separación, otros extractos orgánicos enzimáticos de interés (HED-C concentrado, EOED-S y EOED-S concentrado) y materia orgánica insoluble (MOI-D).

La figura 2 muestra el diagrama en bloques de una realización particular del procedimiento de la invención, en la que los residuos de la fabricación de la cerveza en forma de suspensión en cerveza se separan de la misma y se resuspenden luego con agua antes de someterlos a tratamiento alcalino, seguido de un tratamiento físico y una hidrólisis enzimática para obtener directamente un extracto orgánico enzimático (HEP-C), así como, tras etapas adicionales de concentración y/o separación, otros extractos orgánicos enzimáticos de interés (HEP-C concentrado, EOEP-S y EOEP-S concentrado) y materia orgánica insoluble (MOI-P).

La figura 3 muestra el perfil peptídico de uno de los extractos obtenidos mediante el procedimiento de la invención.

La figura 4 muestra la producción en gramos de tomate Cherry en función del tiempo, cuando se aplican una composición control y dos extractos obtenidos mediante el procedimiento de la invención.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un procedimiento para obtener un extracto enzimático orgánico a partir de residuos procedentes de la fabricación de la cerveza (en adelante "el procedimiento de la invención"), que comprende las siguientes etapas:

- (a) añadir a los residuos en forma de suspensión una base concentrada para ajustar el pH de los mismos;
- (b) someter la mezcla obtenida en (a) a una presión superior a la presión

- atmosférica y a una temperatura elevada; y
- (c) someter la mezcla obtenida en (b) a una hidrólisis enzimática para obtener un extracto enzimático orgánico;

y que se efectúa en un solo recipiente.

5

En el contexto de la invención la expresión “residuos procedentes de la fabricación de la cerveza” se refiere a los subproductos obtenidos durante el proceso de obtención industrial de la cerveza. Más en particular estos residuos están constituidos por levaduras y sub-productos procedentes de la fermentación

10 alcohólica de la malta de cebada (proteínas, vitaminas hidrosolubles del complejo B, fosfatos, minerales tales como potasio, azufre, magnesio, calcio o sodio, ácidos grasos insaturados, lecitinas, cefalinas, carbohidratos tales como glucógeno, trealosa, glucanos o mananos, alcohol etílico, dióxido de carbono, trazas de ésteres, aldehídos, cetonas y alcoholes superiores, etc.). Estos residuos pueden

15 estar suspendidos en cerveza, tal y como salen de la planta industrial, sin necesidad de secado ni concentración, o bien encontrarse en forma sólida una vez que se ha eliminado la cerveza remanente. La cerveza remanente puede separarse mediante cualquier método convencional tal como filtración, sedimentación o centrifugación, por ejemplo.

20

En una realización particular del procedimiento de la invención, la composición elemental de los residuos a tratar, expresada en porcentaje en peso, es la siguiente:

	% C	% N	% P	% K	% S
Residuos suspendidos en cerveza	44,22	7,73	1,48	1,78	0,36
Residuos sin cerveza remanente	47,06	8,56	1,22	0,65	0,36

25

En el caso de partir de residuos sólidos sin cerveza remanente, se añade a los mismos un disolvente adecuado a fin de obtener una suspensión que pueda someterse al procedimiento de la invención.

Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, este

comprende una etapa previa a la etapa (a) en la que se obtienen los residuos en forma de suspensión. En una realización preferida, en esta etapa previa el disolvente se añade a los residuos sólidos hasta obtener una suspensión con una concentración de materia seca de un 8-25% en peso, preferiblemente de un 15% en peso.

En otra realización preferida, el disolvente empleado para suspender los residuos sólidos es agua. En otra realización preferida, el disolvente empleado para suspender los residuos sólidos es una solución líquida o una suspensión con materia orgánica procedente de cualquier industria agroalimentaria que tenga un contenido en materia seca inferior al 10% en peso, preferiblemente del 4-8% en peso. En una realización más preferida, el disolvente empleado para suspender los residuos sólidos es suero procedente de la elaboración de quesos. En una realización aún más preferida, el disolvente empleado para suspender los residuos sólidos es suero procedente de la elaboración de quesos con un contenido en materia seca inferior al 10% en peso, preferiblemente del 4-8% en peso.

Por otro lado, en el contexto de la invención la expresión “en un solo recipiente” (*one-pot*) se refiere a que el procedimiento se efectúa sin etapas intermedias de separación de modo que el aprovechamiento de los residuos de partida es total, es decir, el rendimiento en nitrógeno y de masas es del 100%.

Asimismo, en el contexto de la invención la expresión “biofertilizantes y bioestimulantes” se refiere a compuestos con capacidad de estimular el crecimiento y el desarrollo de plantas y cultivos, así como de incrementar y potenciar la actividad microbiológica del suelo.

Los residuos en forma de suspensión se someten al tratamiento alcalino de la etapa (a) del procedimiento de la invención, para lo cual se emplea una base adecuada seleccionada por el experto. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, la base de la etapa (a) se selecciona de entre hidróxido amónico, hidróxido potásico e hidróxido cálcico. En una realización preferida, la base es hidróxido amónico. En otra realización preferida, la base es hidróxido potásico. Dicha base se usa en forma concentrada para no aumentar

demasiado el volumen de reacción lo que encarecería los costes de energía al calentar, concentrar, etc., así como los costes de equipamiento. Dicha concentración será seleccionada por el experto en función del rango de pH que desee obtener para llevar a cabo la hidrólisis enzimática posterior. En una  
5 realización más preferida se usa hidróxido amónico al 28% en peso. En otra realización más preferida se usa hidróxido potásico 10 M.

Tras el tratamiento alcalino de los residuos en forma de suspensión, se procede al tratamiento físico de la mezcla a una presión superior a la presión  
10 atmosférica y a una temperatura elevada.

Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (b) se aplica una presión de 102-141 kPa a una temperatura elevada. En una realización preferida, en la etapa (b) se aplica una presión de 105-120 kPa a una  
15 temperatura elevada. En una realización más preferida, en la etapa (b) se aplica una presión de 115 kPa a una temperatura elevada.

Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (b) se aplica una presión superior a la presión atmosférica a una temperatura  
20 de 90-140 °C. En una realización preferida, en la etapa (b) se aplica una presión superior a la presión atmosférica a una temperatura de 100-130 °C. En una realización más preferida, en la etapa (b) se aplica una presión superior a la presión atmosférica a una temperatura de 120 °C.

En otra realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (b) se aplica una presión de 102-141 kPa a una temperatura de 90-140 °C. En una realización preferida, en la etapa (b) se aplica una presión de 105-120 kPa a una  
25 temperatura de 100-130 °C. En una realización más preferida, en la etapa (b) se aplica una presión de 115 kPa a una temperatura de 120 °C.

Este tratamiento físico se efectuará en cualquier dispositivo adecuado seleccionado por el experto, tal como un autoclave, por ejemplo.  
30

Tras el tratamiento físico del procedimiento de la invención, se procede al

tratamiento enzimático. Opcionalmente, tras el tratamiento físico y antes del tratamiento enzimático se añade una base concentrada para que la mezcla a tratar tenga el valor de pH óptimo de la enzima a usar.

5 La enzima a emplear en la hidrólisis enzimática de la etapa (c) es una enzima proteolítica de origen microbiano, vegetal o animal. Así, la enzima a emplear en el procedimiento de la invención puede ser una proteasa alcalina tal como la subtilisina, una proteasa neutra producida por *Bacillus sp.*, tripsina o quimotripsina, por ejemplo.

10

Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, la enzima empleada en la etapa (c) es una proteasa alcalina. En una realización preferida, la enzima empleada en la etapa (c) es subtilisina.

15

En otra realización particular del procedimiento de la invención, la hidrólisis enzimática de la etapa (c) se efectúa empleando una concentración de un 0,05%-0,5% en volumen de una solución stock de enzima con una actividad de 70.000 unidades (ensayo de azocaseína). En una realización preferida, la hidrólisis enzimática de la etapa (c) se efectúa empleando una concentración de un 0,3% en volumen de dicha solución stock.

20

Por otro lado, las condiciones de presión, temperatura, pH y tiempo de la hidrólisis enzimática serán aquellas en las que se consiga la máxima actividad de la enzima. Así pues, en otra realización particular del procedimiento de la invención, la hidrólisis enzimática de la etapa (c) se efectúa a una temperatura de 40-70 °C y a un pH de 8-11 durante un tiempo de 2-48 h. En una realización preferida, la hidrólisis enzimática de la etapa (c) se efectúa a una temperatura de 55 °C y a un pH de 9,2 durante un tiempo de 24 h.

25

30

En una realización particular del procedimiento de la invención, durante la hidrólisis enzimática se mantiene constante el valor de pH mediante la adición de una base, tal como, por ejemplo, hidróxido amónico o hidróxido potásico.

El tratamiento enzimático puede efectuarse en cualquier dispositivo adecuado

seleccionado por el experto, tal como un reactor con control de temperatura y agitación, por ejemplo.

5 Tras esta hidrólisis enzimática final se obtiene un extracto enzimático orgánico, en adelante “extracto enzimático orgánico de la invención”, que contiene prácticamente toda la proteína de partida hidrolizada, es decir, más de un 90% en peso, en forma de aminoácidos libres, oligopéptidos y otros péptidos de mayor peso molecular y, también, prácticamente todos los nutrientes del residuo de partida y, en su caso, los nutrientes de la solución líquida o suspensión de materia orgánica de la  
10 industria agroalimentaria empleada en la suspensión de los residuos sólidos sin cerveza remanente.

Así, en otro aspecto de la invención se proporciona un extracto enzimático orgánico obtenido mediante el procedimiento de la invención descrito con anterioridad. Dicho extracto es rico en proteínas, la mayoría en forma de péptidos y aminoácidos libres de alta bioabsorción (aminoácidos libres, oligopéptidos y péptidos de bajo peso molecular con un tamaño inferior a 10.000 daltons, así como en carbohidratos, y está exento de grasas y colesterol. Su composición química  
15 nutricional en peso seco es la siguiente:

20	Proteínas	45-55%
	Carbohidratos	40-45%
	Cenizas	Resto

Los aminoácidos, oligopéptidos y péptidos de bajo peso molecular que lo constituyen son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación para las plantas, tanto por vía foliar como radicular, transportándose a los órganos del vegetal tales como brotes, flores o frutos, por ejemplo (Gjalakshimi y col., 2004; Bioresource Technology (92):291-296; Parrado y col., 2008 Bioresource Technology 99 (2008) 2312–2318). Allí pueden ser empleados para que la planta elabore sus propias proteínas, ahorrándose una serie de procesos metabólicos consumidores de energía (Higgings, C.F., Payne, J.W., 1982. Plant peptides. In: Boulder, D., Parthier, B.,(Eds). Encyclopedia of Plant Physiology, 14A. Springer. 438-458). Y no sólo pueden ser absorbidos y empleados por las plantas, la microfauna existente en  
25  
30

el medio edafológico es capaz de usarlos como fuente nitrogenada, fundamental para su crecimiento y actividad. Este nitrógeno es un elemento fundamental, ya que es un constituyente básico de las proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, etc. y, por tanto, permite el desarrollo de la actividad metabólica de plantas y microorganismos. Asimismo, los aminoácidos, oligopéptidos y péptidos de bajo peso molecular son también fácilmente absorbibles y asimilables por los animales cuando son incorporados a la dieta de los mismos.

Por ello, el extracto enzimático orgánico de la invención puede usarse como tal en aplicaciones agrícolas y ganaderas, por ejemplo.

Así, en otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del extracto enzimático orgánico previamente descrito en agricultura y en alimentación animal. Más en particular, el extracto enzimático orgánico de la invención puede emplearse como bioestimulante y biofertilizante en agricultura ecológica dada su especial composición de aminoácidos libres, oligopéptidos y péptidos de bajo peso molecular. Igualmente puede emplearse como aditivo nutricional de alto valor añadido para alimentación animal, más en particular, en piensos para animales en ganadería (bovina, ovina, caprina, etc.) o acuicultura, o para animales domésticos o de compañía, por ejemplo.

El método de aplicación del extracto enzimático orgánico de la invención a un cultivo agrícola puede efectuarse mediante cualquier técnica convencional tal como, por ejemplo, aplicación directa en el suelo, o por vía foliar o por fertirrigación.

Por otro lado, el extracto enzimático orgánico de la invención puede someterse alternativamente a etapas posteriores de concentración y/o separación para su estabilización.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa posterior a la etapa (c) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido tras dicha etapa (c) se somete a concentración para obtener un extracto enzimático orgánico concentrado, en adelante "extracto enzimático orgánico concentrado de la invención". El extracto enzimático orgánico concentrado de la invención tiene al

menos un 40% en peso de materia seca, preferiblemente al menos un 50% en peso de materia seca y, más preferiblemente, un 50-55% en peso de materia seca. Esta concentración puede efectuarse mediante cualquier método convencional del estado de la técnica, tal como, por ejemplo, mediante calentamiento y empleando un rotavapor con baño termostatzado o un sistema de osmosis inversa, por ejemplo, o bien otro dispositivo adecuado.

En otra realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa posterior a la etapa (c) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido tras dicha etapa (c) se somete a separación para obtener: (i) un extracto enzimático orgánico soluble, en adelante "extracto enzimático orgánico soluble de la invención", y (ii) una fase sólida, en adelante "materia orgánica insoluble de la invención". Esta separación puede efectuarse mediante cualquier método convencional del estado de la técnica, tal como, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación empleando un decanter u otro dispositivo industrial adecuado, por ejemplo.

El extracto enzimático orgánico soluble de la invención contiene prácticamente toda la proteína de partida hidrolizada, es decir, más de un 90% en peso, y, por tanto, presenta una composición que lo hace también adecuado para su uso en aplicaciones agrícolas y ganaderas. Más en particular, puede emplearse como bioestimulante y biofertilizante en agricultura ecológica dado su especial composición de aminoácidos libres, oligopéptidos y péptidos de bajo peso molecular. Igualmente puede emplearse como aditivo nutricional de alto valor añadido para alimentación animal, más en particular, en piensos para animales en ganadería (bovina, ovina, caprina, etc.) o acuicultura, o para animales domésticos o de compañía, por ejemplo.

La materia orgánica insoluble de la invención, a su vez, puede someterse a un proceso final de secado para obtener un subproducto sólido en forma de pasta con un contenido de humedad del 10-15% en peso. Dicho secado puede efectuarse mediante cualquier método convencional, tal como el uso de hornos de secado de aire circulante, por ejemplo.

La materia orgánica insoluble de la invención, concentrada o sin concentrar, puede emplearse también como aditivo nutricional de alto valor añadido para alimentación animal, más en particular, en piensos para animales en ganadería (bovina, ovina, caprina, etc.) o acuicultura, o para animales domésticos o de compañía, por ejemplo.

Opcionalmente, el extracto enzimático orgánico soluble de la invención puede someterse posteriormente a concentración. Así, en una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa posterior a la etapa (c) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido tras dicha etapa (c) se somete a separación seguida de una etapa de concentración del extracto enzimático orgánico soluble obtenido para obtener un extracto enzimático orgánico soluble concentrado, en adelante "extracto enzimático orgánico soluble concentrado de la invención". El extracto enzimático orgánico soluble concentrado de la invención tiene al menos un 40% en peso de materia seca, preferiblemente al menos un 50% en peso de materia seca y, más preferiblemente, un 50-55% en peso de materia seca. Esta concentración puede efectuarse mediante cualquier método convencional del estado de la técnica, tal como, por ejemplo, mediante calentamiento y vacío empleando un rotavapor con baño termostatzado o un sistema de osmosis inversa, por ejemplo, o bien otro dispositivo adecuado.

El extracto enzimático orgánico concentrado de la invención y el extracto enzimático orgánico soluble concentrado de la invención son extractos con una composición que los hace también adecuados para su uso en aplicaciones agrícolas y ganaderas. Más en particular, pueden emplearse como bioestimulantes y biofertilizantes en agricultura ecológica dado su especial composición de aminoácidos libres, oligopéptidos y péptidos de bajo peso molecular. Igualmente pueden emplearse como aditivo nutricional de alto valor añadido para alimentación animal, más en particular, en piensos para animales en ganadería (bovina, ovina, caprina, etc.) o acuicultura, o para animales domésticos o de compañía, por ejemplo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

**EJEMPLO 1****Obtención de extractos a partir de un residuo de fabricación de la cerveza en forma de suspensión en cerveza.**

5

En la **Figura 1** se muestra el diagrama en bloques de esta realización particular del procedimiento de la invención.

10

Se trataron 500 g de un residuo cervecero en forma de suspensión en cerveza (RFC) en un reactor de cristal abierto con NH<sub>3</sub> al 28% hasta un pH de 9,6 con agitación (60-80 rpm). El porcentaje en materia seca del RFC era del 10,27% p/p (10,77% p/v) y la composición química del mismo era la siguiente:

Tabla 1. Composición química elemental del RFC (% en peso)

% C	% N	% P	% K	% S
44,22	7,73	1,48	1,78	0,36

15

Tras el tratamiento alcalino se procedió a un proceso físico a una presión de 115 kPa y a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos en un autoclave. La solución así obtenida se ajustó a un pH de 9,2 con potasa 10 M.

20

Esta solución a pH 9,2 se mantuvo a 55°C en un baño termostatzado con agitación (60-80 rpm) y se le añadió un 0,3% v/v de Subtilisina (solución stock de proteasa 70.000 Unidades de actividad/Ensayo de azocaseína). El pH se mantuvo con amoníaco al 28%. Estas condiciones de hidrólisis se mantuvieron durante 24 horas.

25

El extracto enzimático orgánico (HED-C) líquido resultante se recogió a las 24 horas, siendo su composición la siguiente:

Tabla 2. Composición química elemental del HED-C (% en peso)

% C	% N	% P	% K	% S
42,73	7,1	1,27	3,88	0,34

30

Tabla 3. Composición química nutricional en peso seco

Proteínas	47%
Carbohidratos	46%
Cenizas	6%

5 El rendimiento en nitrógeno y de masas de este proceso es del 100%, ya que no hay separación en fases y el aprovechamiento del RFC es total.

10 A continuación se concentraron 500 ml de HED-C 5 veces en un rotavapor con baño termostatzado a 70°C, obteniéndose un extracto enzimático orgánico concentrado (HED-C concentrado) en forma de sirope estable con un 50-55% en peso de materia seca.

15 Por otra parte, se centrifugaron 500 ml de HED-C a 4000 G durante 30 minutos. Se obtuvieron así 400 ml de un extracto enzimático orgánico soluble (EOED-S, 80% del volumen inicial) y 107,5 g de materia orgánica insoluble (MOI-D), con contenidos en materia seca en peso del 9,77 y 20,35%, respectivamente. A continuación se muestran en la Tabla 4 las composiciones químicas de ambos productos en materia seca. El rendimiento en masa de la obtención del EOED-S es del 65%, mientras el MOI-D mantiene un 35% de la materia inicial.

20

Tabla 4. Composición química elemental del EOED-S y de la MOI-D (% en peso)

EOED-S				
% C	% N	% P	% K	% S
41,86	8,11	1,32	4,82	0,37

MOI-D				
% C	% N	% P	% K	% S
44,39	5,16	1,18	2,08	0,29

Tabla 5. Composición química nutricional en peso seco del EOED-S

Proteínas	54%
-----------	-----

Carbohidratos	39%
Cenizas	6%

Asimismo, se determinó la composición de aminoácidos del EOED-S, así como su perfil peptídico. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7.

5 Tabla 6. Composición de aminoácidos del EOED-S (% en peso)

	% de aminoácidos		% de aminoácidos
Isoleucina	2,89	Alanina	5,9
Leucina	4,87	Arginina	1,9
Lisina	8,81	Asparagina	4,85
Cisteína + Metionina	0,67	Aspártico	2,78
Fenilalanina + Tirosina	3,82	Glutámico	7,8
Treonina	2,21	Glicina	3,27
Triptófano	0,98	Histidina	7,29
Valina	5,87	Serina	3,04

Tabla 7. Perfil peptídico del EOED-S (% en peso)

Tamaño (Daltons)	% del total
> 10.000	38,31
10.000 – 5.000	18,07
3.000 – 1.000	12,23
1.000 - 300	6,18
< 300	25,22

10 En la **Figura 3** se muestra una gráfica con el perfil peptídico del extracto EOED-S, en el que los péptidos con un tamaño inferior a 300 Da se corresponden con aminoácidos libres y péptidos de pequeño tamaño.

15 A continuación se procedió a la concentración del EOED-S, quedando 50,5 ml de un extracto enzimático orgánico soluble concentrado (EOED-S concentrado) en forma de sirope con un 77,4% en peso de materia orgánica. La MOI-D se secó a

90 °C hasta contener 25 g con un 10-15% en peso de humedad.

## EJEMPLO 2

### Obtención de extractos a partir de un residuo de fabricación de la cerveza en forma de suspensión en agua.

En la **Figura 2** se muestra el diagrama en bloques de esta realización particular del procedimiento de la invención, en el que se parte de un residuo en forma de suspensión en agua que, a su vez, se ha obtenido del residuo cervecero en forma de suspensión en cerveza del que se ha eliminado la cerveza remanente y al que posteriormente se le ha adicionado agua.

Así, se trataron 500 ml de un residuo cervecero en forma de suspensión en cerveza (RFC) en una centrífuga a 4000 G durante 1-2 horas manteniendo la temperatura en 4 °C.

Se extrajeron los 354 ml de sobrenadante obtenido (cerveza), quedando 149 g de un residuo cervecero en forma sólida (RFC-Sol), con un porcentaje de materia seca del 24,30% en peso y cuya composición se muestra en la Tabla 8:

Tabla 8. Composición química elemental del RFC-sol (% en peso)

% C	% N	% P	% K	% S
47,06	8,56	1,22	0,65	0,36

A los 149 g del RFC-Sol se le añadieron 354 ml de agua de la red, y se homogeneizó, hasta completar el volumen inicial (500 ml). A continuación se alcalinizó con amoníaco hasta pH 9,6 con agitación.

Esta solución se sometió a un proceso físico a una presión de 115 kPa y a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos en un autoclave. La solución así obtenida se ajustó a un pH de 9,2 con potasa 10 M.

Esta solución a pH 9,2 se introdujo en un reactor abierto y se mantuvo a 55 °C en un baño termostatzado con agitación (60-80 rpm) y se le añadió un 0,3% v/v

de Subtilisina (solución stock de proteasa 70.000 Unidades de actividad/Ensayo de azocaseína). El pH se mantuvo con amoníaco al 28%. Estas condiciones de hidrólisis se mantuvieron durante 24 horas.

5 Se recogió el extracto enzimático orgánico (HEP-C) resultante siendo su composición la siguiente:

Tabla 9. Composición química elemental del HEP-C (% en peso)

% C	% N	% P	% K	% S
45,17	7,80	1,04	3,45	0,34

10

Tabla 10. Composición química nutricional en peso seco

Proteínas	52%
Carbohidratos	41%
Cenizas	6%

15

El rendimiento en nitrógeno y de masas de este proceso es del 100%, ya que no hay separación en fases y el aprovechamiento del RFC-Sol es total.

20

A continuación, se concentraron 500 ml de HEP-C en un rotavapor con baño termostático a 55 °C, obteniéndose un extracto enzimático orgánico concentrado (HEP-C concentrado) en forma de sirope estable con un 50-55% en peso de materia seca.

25

Por otra parte, se centrifugaron 500 ml de HEP-C a 4000 G durante 30 minutos.

Se obtuvieron de esta manera 400 ml en forma del extracto enzimático orgánico soluble (EOEP-S), con un 5,86% en peso de materia seca (23,44 g) y 107,5 g de materia orgánica insoluble (MOI-P), con un 19,58% en peso de materia seca (21 g).

El rendimiento de masas fue del 52,81% en el EOEP-S y del 47,19% en la MOI-P. El rendimiento en nitrógeno fue del 55% en el EOEP-S y del 45% en la MOI-P.

5

Las composiciones químicas de ambos productos obtenidos se recogen la Tabla 11.

Tabla 11. Composición química elemental del EOEP-S y la MOI-P(% en peso)

EOEP-S

% C	% N	% P	% K	% S
42,8	8,784	1,38	4,34	0,38

MOI-P

% C	% N	% P	% K	% S
43,83	6,09	1,5	1,78	0,32

10

A continuación se procedió a la concentración hasta 10 veces en volumen del EOEP-S (conteniendo éste aproximadamente un 60% en peso de materia seca). La MOI-P se secó a 90 °C hasta contener un 10-15% en peso de humedad, obteniéndose 16,75 g del mismo.

15

**EJEMPLO 3**

**Aplicación de los extractos obtenidos en el ejemplo 1 como bioestimulantes y biofertilizantes en la producción de tomate cherry en invernadero.**

20

Dos de los extractos obtenidos en el Ejemplo 1 (HED-C y EOED-S) se ensayaron en la producción de tomate Cherry en invernadero (condiciones controladas de humedad y temperatura). El control se trató exclusivamente con agua, utilizando como soporte turba rubia.

25

Los grupos ensayados se definieron por bandejas con 5 macetas cada una, y a cada bandeja se aplicó un producto diferente. Los tratamientos comenzaron tras la germinación de las plantas y su trasplante a la maceta.

Las dosis empleadas fueron de 1,3 gramos de HED-C/litro de agua de riego y de 0,939 gramos de EOED-S/litro de agua de riego, en función del contenido nitrogenado.

5

#### Altura de la plantas

Se midió el crecimiento en altura en centímetros de los diferentes grupos ensayados. Los resultados se muestran en la Tabla 12:

10

Tabla 12. Altura media de las plantas (cm)

Tiempo (días)	Control	HED-C	EOED-S
1	20,4	19,4	19,4
8	27,4	27,6	31
21	34	34,5	35,3
35	40,7	47	47,7

15

Todos los grupos ensayados superaron estadísticamente al grupo control en altura.

#### Producción de tomate

20

En la Tabla 13 se presentan los datos de los gramos de tomate Cherry producidos por planta.

Tabla 13. Peso de tomates Cherry producidos (g)

	90 días	105 días	120 días
CTRL	0	44,52	179,78
HED-C	0	137,50	272,20

EOED-S	0	146,32	285,88
--------	---	--------	--------

En la **Figura 4** se muestran gráficamente estos resultados, de los que se concluye que la aplicación de los extractos de la invención induce un incremento notable en la producción de tomates.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para obtener un extracto enzimático orgánico a partir de residuos procedentes de la fabricación de la cerveza, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- (a) añadir a los residuos en forma de suspensión una base concentrada para ajustar el pH de los mismos;
  - (b) someter la mezcla obtenida en (a) a una presión superior a la presión atmosférica y a una temperatura elevada; y
  - 10 (c) someter la mezcla obtenida en (b) a una hidrólisis enzimática para obtener un extracto enzimático orgánico;
- y porque se efectúa en un solo recipiente.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa previa a la etapa (a) de obtención de los residuos en forma de suspensión.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa posterior a la etapa (c) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido se somete a concentración para obtener un extracto enzimático orgánico concentrado con al menos un 40% en peso de materia seca.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa posterior a la etapa (c) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido se somete a separación para obtener: (i) un extracto enzimático orgánico soluble, y (ii) una fase sólida.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el extracto enzimático orgánico soluble se somete a concentración para obtener un extracto enzimático orgánico soluble concentrado con al menos un 40% en peso de materia seca.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la base

concentrada de la etapa (a) se selecciona de entre hidróxido amónico, hidróxido potásico e hidróxido cálcico.

5

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la base concentrada de la etapa (a) es hidróxido amónico.

10

8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa (b) se aplica una presión de 102-141 kPa a una temperatura de 90-140°C.

15

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se aplica una presión de 115 kPa a una temperatura de 120 °C.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima empleada en la etapa (c) es una proteasa alcalina.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la enzima empleada en la etapa (c) es subtilisina.

20

12. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa (c) se efectúa la hidrólisis enzimática a una temperatura de 40-70 °C y a un pH de 8-11 durante un tiempo de 2-48 h.

25

13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque la hidrólisis enzimática se efectúa a una temperatura de 55 °C y a un pH de 9,2 durante un tiempo de 24 h.

30

14. Extracto enzimático orgánico obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado porque contiene más de un 90% en peso de la proteína de los residuos de partida hidrolizada en forma de aminoácidos libres, oligopéptidos y otros péptidos de mayor peso molecular.

15. Uso del extracto enzimático orgánico según la reivindicación 14 en

agricultura y en alimentación animal.

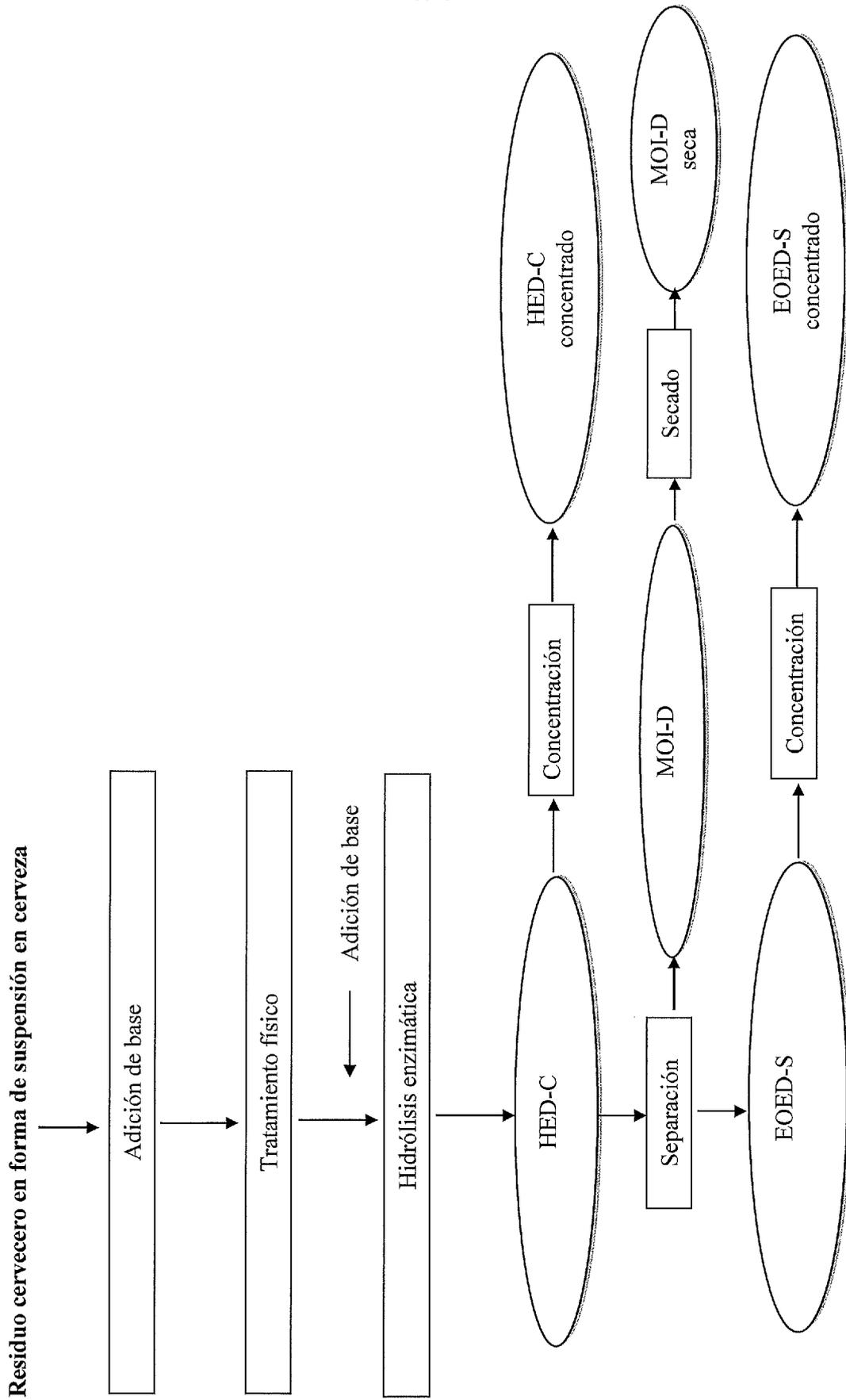


Fig. 1

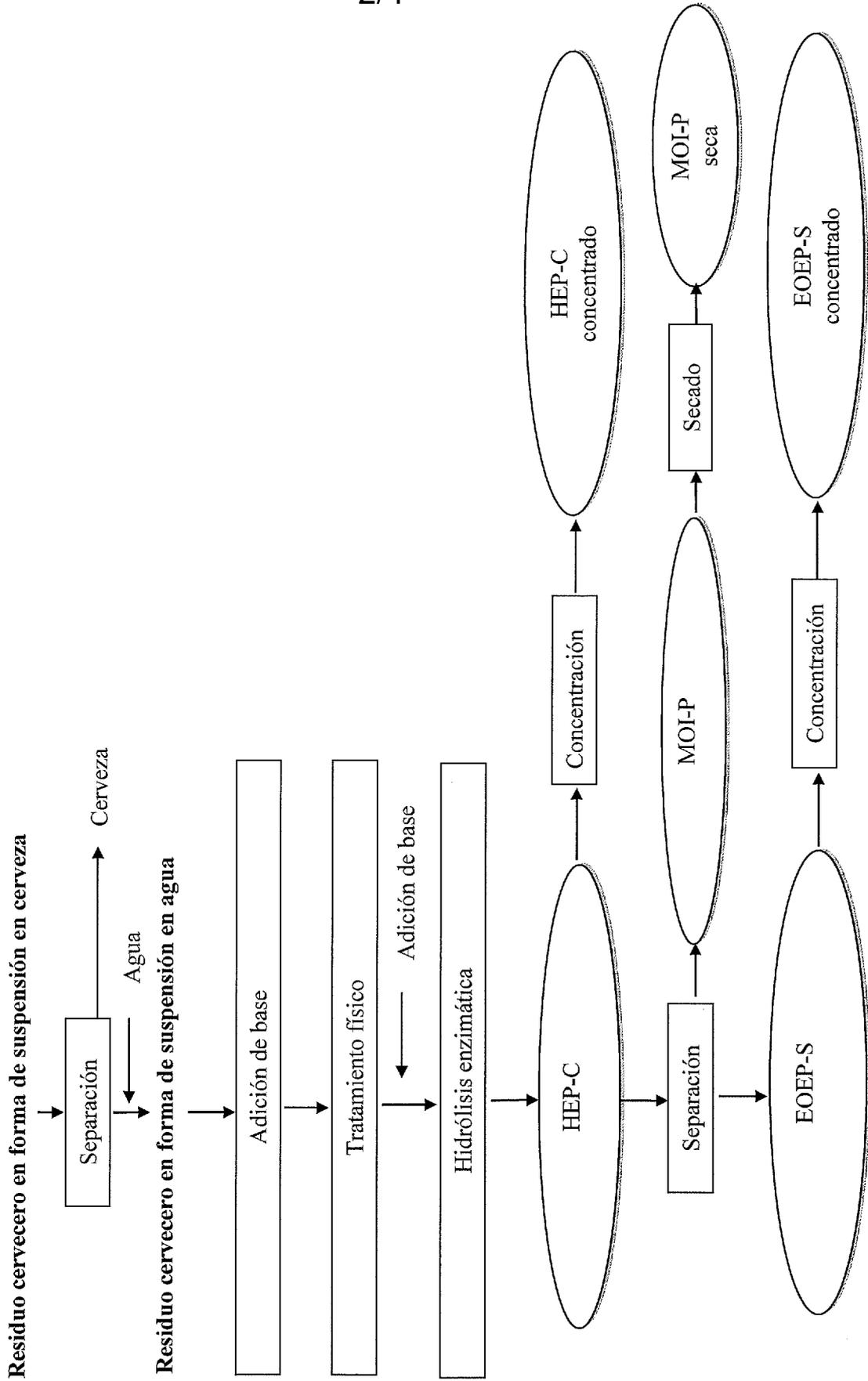
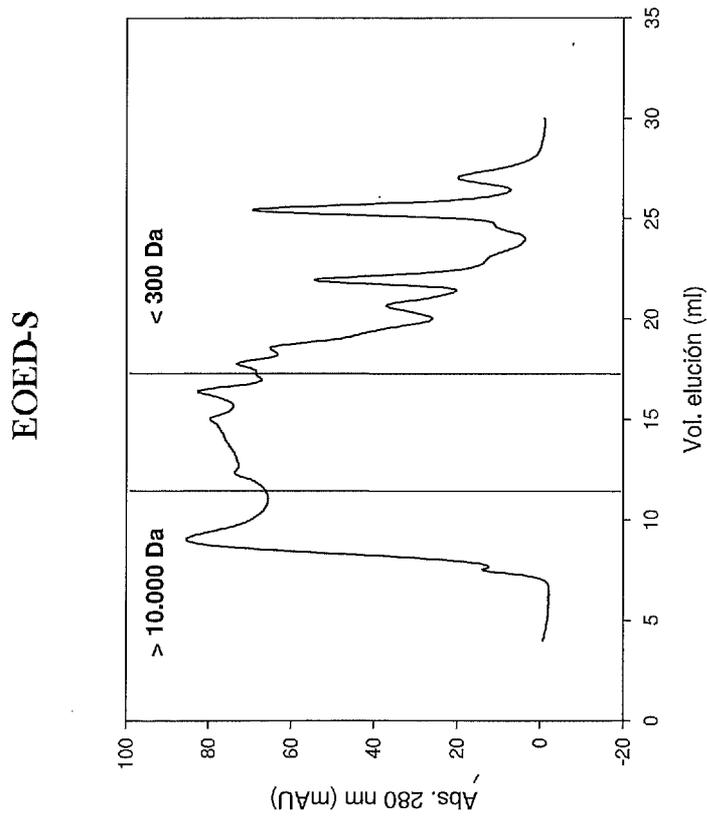


Fig. 2



**Fig. 3**

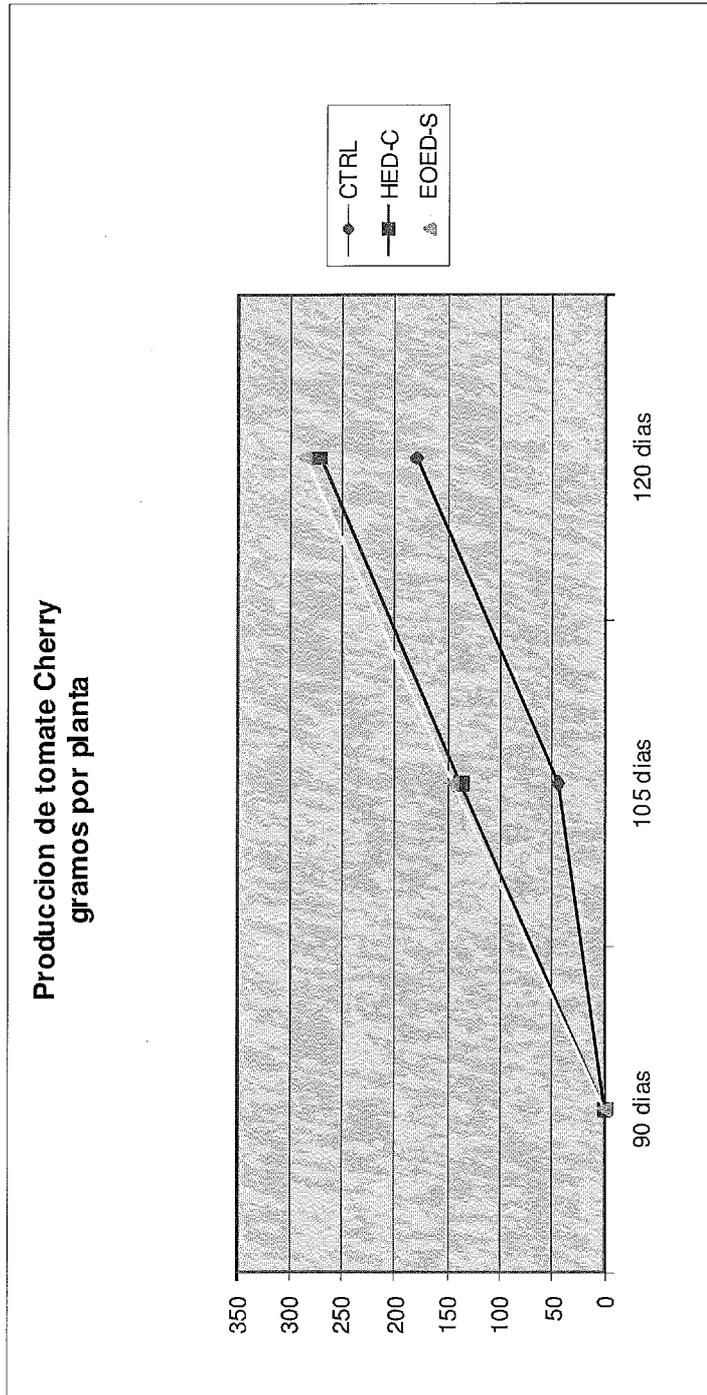


Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2012/070599

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C05F, A23K, C12F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, TCPAT, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, REGISTRY, FSTA, AGRICOLA.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2329750 A1 (HEINEKEN ESPANA S A ) 30/11/2009, the whole document.	1-15
A	GB 2176487 A (ERNSTER JOHN H ) 31/12/1986, the whole document.	1-15
A	CN 1919800 A (CHEN JINGHUA ) 28/02/2007, (abstract) WPI / Thomson [on line] [retrieved on 22.10.2012]. Retrieved from: EPOQUENET, EPO, DW200749, accession number 2007- 497249 [49], the whole document.	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search  
05/11/2012

Date of mailing of the international search report  
**(07/11/2012)**

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
B. Pérez Esteban

Telephone No. 91 3498484

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2012/070599

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2329750 AB	30.11.2009	EP2128114 A EP20090161082	02.12.2009 26.05.2009
-----	-----	-----	-----
GB2176487 A	31.12.1986	NONE	
-----	-----	-----	-----
CN1919800 A	28.02.2007	CN100369867 C	20.02.2008
-----	-----	-----	-----

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

*C05F5/00* (2006.01)

*A23K1/06* (2006.01)

*C12F3/06* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES2012/070599

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C05F, A23K, C12F

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, TCPAT, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, REGISTRY, FSTA, AGRICOLA.

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	ES 2329750 A1 (HEINEKEN ESPANA S A ) 30/11/2009, todo el documento.	1-15
A	GB 2176487 A (ERNSTER JOHN H ) 31/12/1986, todo el documento.	1-15
A	CN 1919800 A (CHEN JINGHUA ) 28/02/2007, (resumen) WPI / Thomson [en línea] [recuperado el 22.10.2012]. Recuperado de: EPOQUENET, EPO, DW200749, n° de acceso 2007- 497249 [49], todo el documento.	1-15

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
05/11/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**07 de noviembre de 2012 (07/11/2012)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
B. Pérez Esteban  
N° de teléfono 91 3498484

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070599

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2329750 AB	30.11.2009	EP2128114 A EP20090161082	02.12.2009 26.05.2009
-----	-----	-----	-----
GB2176487 A	31.12.1986	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
CN1919800 A	28.02.2007	CN100369867 C	20.02.2008
-----	-----	-----	-----

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C05F5/00* (2006.01)

*A23K1/06* (2006.01)

*C12F3/06* (2006.01)