

"COMPOSICIÓN AGRÍCOLA DE ÁCIDO INDOLACÉTICO CON FOTOESTABILIDAD MEJORADA, PROCESO DE PRODUCCIÓN Y USO DE LA MISMA"

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a composiciones agrícolas para la promoción del crecimiento vegetal que comprenden ácido indolacético (AIA) de origen biológico y/o sintético con fotoestabilidad aumentada, así como al proceso de producción y uso de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La producción de hormonas vegetales por parte de bacterias es uno de los principales factores responsables de promover el crecimiento de las plantas. Las fitormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico) son sustancias orgánicas que intervienen en la regulación del crecimiento de las plantas (Raven et al., 2001). La principal auxina de
15 origen natural se denomina ácido indolacético (AIA) y tiene un gran potencial para ser utilizada como regulador del crecimiento de las plantas. Diversos microorganismos, como bacterias y hongos del suelo y/o asociados a las plantas, sintetizan hormonas de crecimiento idénticas a las de las plantas, entre ellas el ácido indolacético (AIA). El uso de
20 composiciones agrícolas que comprenden hormonas vegetales, como EIA, es por lo tanto deseable para promover el crecimiento de las plantas de cultivo.

- En las plantas, el AIA microbiano producido por bacterias del género *Azospirillum spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*,
25 *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium spp.* y *Bradyrhizobium spp.* se ha relacionado con la estimulación del crecimiento de las plantas (Patten y Glick, 1996; Idris et al., 2007; Kochar et al., 2011; Shao et al., 2015).

Se cree que un microorganismo puede seleccionar una ruta particular para la biosíntesis de AIA de entre las varias que posee, en función del entorno. También se ha informado de que en muchas bacterias existe más de una ruta para la síntesis de AIA, siendo la mayoría de ellas la vía dependiente del triptófano (Patten y Glick, 1996 La inducción de la biosíntesis de AIA a través de vías dependientes de triptófano es bien conocida y estudiada (Tullio et al., 2019; Iamada et al., 2017). La producción de ácido indolacético por fermentación de *Azospirillum* se describe, por ejemplo, en el documento CN 104 975 052.

Aunque la molécula de AIA presenta una estabilidad relativamente alta frente a factores físicos como la temperatura y el pH del medio de cultivo (Hiratsuka et al., 1989), la fotodegradación de la fitormona constituye uno de los mayores impedimentos con respecto al uso de composiciones agrícolas que comprenden AIA (Dunlap y Robacker, 1988; Stasinopoulos y Hangarter, 1990 e Hiratsuka et al., 1989). La degradación lumínica puede reducir el AIA sintetizado hasta en un 90%, dependiendo de la longitud de onda y la intensidad.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones agrícolas que contengan la fitohormona AIA con fotoestabilidad aumentada, de modo que el compuesto pueda permanecer estable y activo durante períodos de tiempo más largos tras la aplicación de la composición a un cultivo vegetal a escala comercial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la concentración de AIA sintético y AIA biológico en diferentes tiempos de exposición a la luz UV, sometidos al proceso de estabilización bajo condiciones específicas de temperatura y presión. Pruebas de la participación de las melanoidinas en la fotoestabilidad del compuesto.

La **Figura 2** muestra la concentración del AIA biológico bajo diferentes tiempos de estabilización y exposición a la luz UV.

DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención enseña que, sorprendentemente, es posible obtener una composición para aplicación agrícola que comprende ácido indolacético (AIA) con fotoestabilidad aumentada combinando AIA con pigmentos de tipo melanoidina en dicha composición. El AIA utilizado en las composiciones y métodos de la presente invención puede ser de origen biológico y/o sintético.

Como se demostrará en el presente documento, la estabilización mediante la combinación de pigmentos de tipo melanoidina y AIA confiere fotoprotección al AIA de origen biológico y/o sintético.

En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una combinación de AIA con pigmentos de tipo melanoidina. Una composición de la presente invención puede contener opcionalmente aditivos, o vehículos agronómicamente aceptables, tales como aditivos para el tratamiento de semillas y surcos de siembra, protectores celulares para tanques de pulverización, acondicionadores de suelos, adyuvantes de lechadas, polímeros para recubrimiento de semillas, polímeros para recubrimiento de gránulos de fertilizantes químicos u orgánicos, fertilizantes sólidos, fertilizantes líquidos utilizados en formulaciones para productos foliares, activadores de endosporas, entre otros fines.

Una composición según la presente invención puede ser acondicionada en un envase adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente se puede utilizar una bolsa y/o botellas de plástico sin necesidad de intercambio de oxígeno del producto final. El acondicionamiento del producto presentado por la presente invención no requiere protección contra la luz, ya que es fotoestable. Preferiblemente, el volumen envasado puede contener aproximadamente 1 - 20 L y puede almacenarse en ambientes refrigerados, o a temperatura ambiente, comprendiendo el rango de aproximadamente 10 - 35°C.

La presente invención proporciona además métodos para preparar una composición agrícola de AIA con fotoestabilidad aumentada mediante la combinación de AIA con melanoidinas. En una forma de realización específica de la presente invención, la combinación de AIA con pigmentos
5 similares a la melanoidina se consigue sometiendo una mezcla que comprende AIA y fuentes de nitrógeno y azúcares reductores a condiciones de temperatura y presión que promueven la conversión de las fuentes de nitrógeno y azúcares reductores en pigmentos similares a la melanoidina mediante la reacción de Maillard. En una forma de realización
10 alternativa, el AIA y los pigmentos similares a la melanoidina se combinan tras la formación de dichos pigmentos por la reacción de Maillard.

El término "fuentes de nitrógeno" incluye, aunque sin limitarse a ellos, los aminoácidos, péptidos y proteínas de origen biológico o sintético conocidos en la técnica y las mezclas o extractos biológicos que los
15 contengan.

El término "azúcares reductores" incluye, entre otros, cualquier azúcar capaz de actuar como agente reductor por tener un grupo aldehído libre o un grupo cetona libre conocido en la técnica y las mezclas o extractos biológicos que los contengan.

20 En una forma de realización preferida de la presente invención, la mezcla que comprende dicho AIA y dichas fuentes de nitrógeno y azúcares reductores se obtiene por fermentación de bacterias productoras de AIA en un medio de cultivo que contiene triptófano. El caldo obtenido de esta fermentación contiene AIA producido por las bacterias y fuentes de
25 nitrógeno y azúcares reductores procedentes del medio de cultivo fermentado. Tras dicha fermentación, el zumo se somete a condiciones de temperatura y presión que promueven la conversión de fuentes de nitrógeno y azúcares reductores en pigmentos de tipo melanoidina mediante la reacción de Maillard, de modo que los pigmentos de tipo
30 melanoidina confieren fotoprotección al AIA de la composición.

El término "bacterias productoras de AIA" incluye, entre otras, bacterias del género *Azospirillum spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium spp.* y *Bradyrhizobium spp.* (Patten y Glick, 1996).

5 Preferiblemente, la bacteria productora de AIA es *Azospirillum brasilense*.

En consecuencia, una forma de realización específica preferida de la presente invención incluye un método de producción a escala industrial de una composición para uso agrícola que comprende las etapas de fermentación de un compuesto que comprende una o más cepas de bacterias productoras de AIE y triptófano, para la biosíntesis del ácido indolacético (AIA); y estabilización en condiciones de temperatura y presión que promueven la conversión de fuentes de nitrógeno y azúcares reductores en pigmentos similares a la melanoidina mediante la reacción de Maillard.

10 La presente invención proporciona además una composición producida por el método de la presente invención, y el uso de la misma.

Ventajosamente, en una forma de realización preferida, la presente invención permite obtener una composición de AIA agrícola con fotoestabilidad aumentada obtenida únicamente por vías biológicas y exenta de insumos sintéticos.

20 La presente invención también proporciona forma de realización preferidas que incluyen parámetros adicionales para el método de producción de una composición agrícola de AIA a escala industrial, tales como parámetros de presión, temperatura, oxigenación (volumen de aire y agitación) y medios de cultivo para la fermentación de bacterias productoras de AIA que permiten la producción de altas concentraciones de AIA.

Como comprenderá el experto en la materia, pueden emplearse diferentes cepas de bacterias productoras de AIA, preferiblemente *Azospirillum*

brasileña, así como pueden combinarse diferentes parámetros de cultivo y fermentación con la presente invención.

En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un proceso para producir una composición agrícola que comprende las etapas de:

(a) fermentación de un compuesto de una o más cepas de bacterias productoras de AIA y triptófano para la biosíntesis del ácido indolacético (AIA); y

(b) estabilización en condiciones de temperatura y presión que promuevan la conversión de fuentes de nitrógeno y azúcares reductores en pigmentos similares a la melanoidina mediante la reacción de Maillard.

Sorprendentemente, la fotoestabilidad del AIA en una composición según la presente invención se obtiene combinándolo con melanoidinas, sin las cuales el uso del bioproducto en agricultura sería imposible debido a su degradación por la luz. Los pigmentos descritos anteriormente son capaces de filtrar la luz que incide sobre el producto final protegiendo la fitormona AIA, ya sea biosintetizada por la ruta inducida por el triptófano o de origen sintético.

En una forma de realización preferida de la presente invención, los pigmentos de melanoidina surgen de un proceso conocido como reacción de Maillard. Esta reacción presenta tres etapas, según la intensidad, y en la etapa más avanzada se produce la polimerización de compuestos aminados con fragmentos de azúcares en pigmentos castaños, las melanoidinas (Van Boekel, 1998). En las realizaciones que implican el uso de una mezcla que consiste en un caldo obtenido por fermentación de bacterias productoras de AIA, esta reacción se produce después de dicha fermentación, convirtiendo las fuentes de nitrógeno y los azúcares reductores, introducidos durante el proceso de fermentación, en los pigmentos que garantizan la estabilidad del AIA. Esto significa que los altos

niveles de fitohormona en el producto final permanecen muy estables, incluso en condiciones de irradiación de luz, dentro del envase en el que se almacena y vende el producto, o en la aplicación agrícola en semillas, surco de plantación, irrigación o vía foliar, ambientes bajo alta incidencia
5 de longitudes de onda UV, sin perjudicar su eficiencia agronómica.

En una forma de realización específica, la bacteria productora de AIA es *Azospirillum* sp. más preferiblemente *Azospirillum brasilense*. En una forma de realización preferida, una o más cepas de *A. brasilense* se seleccionan del grupo que consiste en Ab-V5, Ab-V6, Sp6, Sp7, Sp245,
10 Cd, 8-I, Az39. En un modo aún más preferente, se utilizan tanto cepas Ab-V5 como Ab-V6.

En una forma de realización preferida, la estabilización de la fitohormona se lleva a cabo en el ambiente del fermentador. Preferiblemente, el proceso de estabilización se lleva a cabo durante unos 15 a 120 minutos
15 a una temperatura de alrededor de 100 °C a aproximadamente 130 °C. Preferiblemente, la estabilización del producto se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 49033,26 - 196133,04 N/m².

En una forma de realización preferida, según la presente invención, la fermentación del cultivo de *A. brasilense* por lotes, o por lotes alimentados,
20 tiene lugar durante aproximadamente 18 - 96 horas.

En una forma de realización preferida, el método de la presente invención comprende expandir de forma secuencial (escalar) el cultivo de *A. brasilense* para inocular el cultivo de fermentación. Preferentemente, la expansión secuencial se inicia en volúmenes de 100 mL, que sirven de
25 inóculo para unos 10 L. Estos a su vez se inoculan en unos 180 L, que finalmente se transfieren a reactores que contienen unos 2.000 L.

En una forma de realización preferida, los cultivos de cepas de *A. brasilense* se expanden en frascos de unos 100 mL por incubación en un agitador orbital a unas 80 rpm a aproximadamente 150 rpm. El tiempo de

incubación es preferiblemente de unas 18 horas a unas 96 horas. Preferiblemente, las cepas de *A. brasilense* se cultivan en matraces de acero inoxidable que contienen unos 10 L de medio de cultivo. El tiempo de incubación es preferiblemente de unas 18 a unas 96 horas con un
5 caudal de aire de unos 0,25 Nm³/h a unos 1,0 Nm³/h (=0,41 - 1,66 vvm).

En una forma de realización preferida, la temperatura de cultivo para la multiplicación de cepas de *A. brasilense* según la presente invención es de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 38 °C.

En una forma de realización preferida, las cepas Ab-V5 y Ab-V6 de *A.*
10 *brasilense* se inoculan juntas en el proceso de ampliación a partir del cultivo de 180 L descrito para la presente invención. Para ello, en una forma de realización preferida, tras cultivar las cepas en dos matraces de acero inoxidable de unos 10 L, dichos matraces se inoculan en tanques que contienen unos 180 L de medio de cultivo, incubándose durante unas
15 18 a unas 96 horas. El caudal de aire es preferentemente de 1,25 a 3,0 Nm³/h aproximadamente (= 0,1 - 0,25 vvm).

En una forma de realización preferida, la etapa de fermentación se lleva a cabo a una temperatura de entre 22 °C y 38 °C aproximadamente. El caudal de aire es preferentemente de aproximadamente 1,0 Nm³/h a
20 aproximadamente 2,5 Nm³/h (= 0,0085 - 0,021 vvm). La presión es preferentemente de aproximadamente 49033,26 a aproximadamente 117679,82 N/m². La agitación es preferentemente de aproximadamente 40 hz a aproximadamente 45 hz. La etapa de fermentación se lleva a cabo preferentemente durante unas 18h a unas 96h.

25 En una forma de realización preferida, el medio de cultivo utilizado para el escalonamiento del cultivo y/o fermentación de *A. brasilense* a la escala de 100 mL es el medio NFb (Döbereiner, 1995). Para las otras escalas de producción, 10, 180 y 2000 L, en un modo preferencial, se utiliza el medio de cultivo descrito en la Tabla 1.

En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona una composición agrícola EIA con fotoestabilidad aumentada obtenible por un método según la presente invención como se ha descrito anteriormente .

- 5 En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona además el uso de la composición agrícola según la presente invención para su aplicación a cultivos agrícolas como promotor del crecimiento vegetal o producto bioquímico. Se aplica preferentemente a las semillas en el surco de plantación, en el riego o mediante pulverización foliar.
- 10 En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona el uso de la fitohormona fotoestabilizada AIA según la presente invención para la preparación de una composición agrícola para optimizar el crecimiento de un cultivo agrícola y/o aumentar el rendimiento de un cultivo agrícola.
- 15 En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona plantas, partes de plantas y/o semillas recubiertas por la composición obtenida según la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Escalamiento de los cultivos

- 20 Las cepas Ab-V5 y Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* se inoculan por separado en matraces que contienen 100 mL de medio de cultivo NFb (Döbereiner, 1995), se incuban en un agitador orbital a 80-150 rpm a 22-38 °C durante aproximadamente 18-96 horas. El siguiente paso de escalamiento consiste en inocular matraces de acero inoxidable con 10 L
- 25 de medio de cultivo (Tabla 1), en los que las cepas se cultivan por separado y se incuban durante aproximadamente 18 - 96 horas, con un caudal de aire de 0,25-1,0 Nm³/h (=0,41 - 1,66 vvm) y una temperatura aproximada de 22-37 °C. Transcurrido este tiempo, cada cultivo se inocula en tanques que contienen 180 L de medio de cultivo y se incuba durante

aproximadamente 18 - 96 horas, con un caudal de aire de 1,25-3,0 Nm³/h (=0,1 - 0,25 vvm) y una temperatura que oscila entre 22-38 °C.

Tabla 1 Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Azospirillum brasilense*, cepas Ab-V5 y Ab-V6

	Reactivos	1L
01	Fosfato de potasio dibásico	2 - 8 g
02	Fosfato de potasio monobásico	2 - 6 g
03	Cloruro de calcio	0,01 - 0,03 g
04	Sulfato de magnesio	0,1 - 0,3 g
05	Cloruro de sodio	0,1 - 0,2 g
06	Cloruro de amonio	0,5 - 2 g
07	Extracto de levadura	0,5 - 2 g
08	Ácido málico	2 - 6 g
09	Hidróxido de potasio	2 - 8 g
10	Solución de micronutrientes* ¹	1- 3 mL
11	Fe-EDTA	0,02 - 0,08 g
12	CMC	2 - 8 g
13	Sacarosa	20 - 40 Kg
14	Gelatina	0,5 - 2 g
15	Triptófano	0,1 - 0,5 g

5

Tabla 2. Solución madre de micronutrientes y cantidad necesaria para 1 L de solución final de micronutrientes

	Reactivos	1 L (solución madre)	1 L (micronutrientes)
01	Molibdato de amonio	190 g	84 mL
02	Sulfato de manganeso	300 g	84 mL
03	Ácido bórico	93,6 g	648 mL
04	Sulfato de cobre	10 g	84 mL
05	Sulfato de zinc	10 g	84 mL

Ejemplo 2 - Fermentación en biorreactor

- 10 Para el crecimiento en un fermentador de 2.000 L, se utiliza un medio de cultivo que contiene el aminoácido triptófano indicado en la Tabla 1. Los parámetros de crecimiento para *A. brasilense* en fermentadores de 2.000 L son: presión 49033,26 - 117679,82 N/m², agitación entre 40 - 45 hz, a 22

- 38 °C y flujo de aire 1,0 - 2,5 Nm³/h (= 0,0085 - 0,021 vvm), durante 18 - 96 h.

Ejemplo 3 - Estabilización

Tras 18 - 96 h de fermentación, los metabolitos se estabilizan esterilizando el medio que contiene los microorganismos durante unos 15 - 120 minutos, a 100 - 130 °C y 49033,26 - 196133,04 N/m² de presión.

Ejemplo 4 - Fotoestabilidad

Para la validación de la formulación que garantiza la fotoestabilidad de la fitohormona del ácido indolacético se realizaron dos procedimientos. En el primer ensayo se compararon: i) el AIA sintético con agua (sin la protección de las melanoidinas); ii) el AIA sintético con el mismo medio de cultivo utilizado en el proceso de producción de AIA biológico de la presente invención e (iii) el AIA biológico; con todas las muestras sometidas al proceso de esterilización a 121°C durante aproximadamente 1 hora, como se afirma para la estabilización de los compuestos indólicos debido a la producción de melanoidinas mediante la reacción de Maillard. Tras el período necesario para el proceso de estabilización, las concentraciones de AIA se evaluaron mediante el reactivo de Salkowski, según la metodología propuesta por Glickmann y Dessaux (1994).

Los resultados presentados en el gráfico 1 demuestran que el AIA sintético sin el proceso de estabilización reivindicado se degrada completamente tras 4 horas de exposición a la luz UV. En la primera hora de exposición la fotodegradación alcanza ya el 74,5%. Sin embargo, cuando se evaluó el AIA producido biológicamente por *Azospirillum brasilense*, se encontró una mayor estabilidad, ya que la reducción en la concentración de este compuesto fue menor en comparación con el AIA sin estabilización (diluido en agua), especialmente después de 1, 2 y 4 horas de exposición a la luz UV con sólo 0,7%, 17,2% y 29,1% de degradación respectivamente. Del mismo modo, cuando añadimos AIA sintético a la formulación presentada

en la solución técnica, seguido de la etapa de estabilización, obtuvimos el mismo comportamiento, de fotoprotección a la luz UV. Esto demuestra la sorprendente capacidad de los pigmentos producidos mediante la reacción de Maillard, las melanoidinas, para proteger de la fotodegradación a la fitohormona ácido indolacético de origen biológico y sintético. Leasure y colaboradores (2013) informaron de la dificultad de uso del ácido indolacético en las plantas debido a la alta tasa de fotodegradación, destacando la importancia de la solución práctica que se reivindica para la viabilidad del uso agrícola a escala comercial del AIA, un potente promotor del crecimiento vegetal, de origen natural, capaz de contribuir a la sostenibilidad de la agroindustria.

En el segundo procedimiento (Gráfico 2), se evaluaron diferentes tiempos del proceso de estabilización de la formulación con AIA biológico, variando entre 15 minutos, 1 hora y 1h 30 minutos, con el fin de evaluar el papel de la concentración de melanoidina en la fotoprotección.

Al igual que en el primer ensayo, el proceso de estabilización de la fitohormona AIA fue eficaz y aumentó la estabilidad del compuesto frente a la radiación de luz ultravioleta. También se observa que la exposición del compuesto indólico a diferentes tiempos del proceso de estabilización favorece la fotoprotección en una relación directamente proporcional, es decir, cuanto mayor es el tiempo del proceso, mayor es la estabilidad obtenida, especialmente cuando el proceso de estabilización del AIA biológico fue de 1h y 30 minutos, proporcionando una alta estabilidad del AIA sintetizado por *Azospirillum brasilense*. El sorprendente efecto sobre el incremento de la estabilidad de la AIA se confirmó aplicando la prueba de medias de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) con diferencias significativas en todos los tiempos de exposición a la luz ultravioleta probados en el presente ensayo. Es importante señalar que, aunque el 54,85% de la fotodegradación de los AIA biológicos se produce sin llevar a cabo el proceso de estabilización, la protección parcial de los AIA biológicos se

produce debido al proceso de esterilización del medio de cultivo antes del cultivo de los microorganismos.

Los resultados obtenidos demuestran la eficacia de los pigmentos producidos durante el proceso de estabilización, las melanoidinas, que
5 presenta la solución técnica en el aumento de la estabilidad de la fitohormona AIA sometida a la radiación luminosa. Esta solución ofrece diversas posibilidades de aplicación del compuesto promotor del crecimiento vegetal y contribuye a la sostenibilidad agrícola, fundamental para el equilibrio socioambiental, siendo impactada positivamente por
10 soluciones innovadoras y aplicables, que proporcionan incrementos a los cultivos importantes y no degradan el medio ambiente.