(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 541 080**

(21) Número de solicitud: 201530657

(51) Int. CI.:

A01N 43/16 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

14.05.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

15.07.2015

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (90.0%)
C/ Ramiro de Maeztu, 7
28040 Madrid ES y
UNIVERSITÄT HAMBURG (10.0%)

(72) Inventor/es:

BERROCAL LOBO, Marta;
DOMÍNGUEZ NÚÑEZ, José Alfonso;
ARANAZ CORRAL, Inmaculada;
MAGEL, Elisabeth A. y
WINKLER, Alexander

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

(54) Título: **Uso de oligosacáridos como fertilizante para plantas y procedimiento de obtención del fertilizante**

(57) Resumen:

Uso de oligosacáridos como fertilizante para plantas y procedimiento de obtención del fertilizante. Uso de oligosacáridos compuestos de N-acetilglucosamina y glucosamina como fertilizante para plantas, donde el porcentaje de N-acetilglucosamina en dichos oligosacáridos es de entre 60 y 100% y donde la longitud de dichos oligosacáridos es de entre 1 y 6 monosacáridos. Procedimiento de obtención de dichos oligosacáridos que comprende: (a) resuspender quitina con un porcentaje de N-acetilglucosamina entre un 85% y un 100% en agua, (b) calentar la composición resultante a una temperatura entre 120 y 180°C durante un tiempo entre 20 y 40 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente y (c) sonicar la composición resultante a una potencia entre 50 y 60 Hz durante un tiempo entre 5 y 120 minutos a una temperatura entre 20 y 25°C.

ES 2 541 080 A1

USO DE OLIGOSACÁRIDOS COMO FERTILIZANTE PARA PLANTAS Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL FERTILIZANTE

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de oligosacáridos acetilados derivados de quitina, en concreto oligosacáridos de entre 1 y 6 monosacáridos de longitud y un porcentaje de N-acetilglucosamina entre 60 y 100% como fertilizantes. Los oligosacáridos pueden utilizarse en solitario o mezclados con otros oligosacáridos insolubles o con fertilizantes, ya sea en estado sólido o en resuspensión. La presente invención también se refiere a un procedimiento de obtención de un fertilizante para plantas compuesto por una mezcla de oligosacáridos de entre 1 y 6 monosacáridos con un grado de acetilación entre un 60 y 100% a partir de quitina, que comprende calentamiento y sonicación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, es un biopolímero de alto peso molecular, compuesto por glucosa, rica en carbono y grupos amino, que se unen formando N-acetilglucosamina y glucosamina en proporción variable, lo que le confiere un alto porcentaje en nitrógeno y carbono en su composición. Cuando la cantidad de glucosamina (grupos no acetilados) es lo suficientemente elevada el polímero se hace soluble en medios ácidos acuosos y recibe el nombre de quitosano (aproximadamente esto ocurre cuando el porcentaje de glucosamina es del 60% o superior).

Entre las muy diversas alternativas que se han empleado hasta la fecha como fertilizantes se encuentra el uso de biopolímeros naturales derivados de quitina, solubles y de alto peso molecular, sin embargo su uso y comercialización como fertilizantes no se ha extendido quizá debido a sus conocidas propiedades como activadores de la defensa vegetal y por tanto activadores del estrés en las plantas. La activación del estrés en plantas viene comúnmente asociada a una inhibición del crecimiento vegetal y es por esto que ambos compuestos se han utilizado más comúnmente como plaguicidas y acompañantes de fertilizantes (Khoushab F et al. Chitin research revisited. Mar Drugs. June 28;8(7):1988-2012; Ramírez M. A et al. (2010). Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. Biotechnol. Apl. Dec;27:4; Zhang J et al. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. Mol Plant. 3(5): 783-93).

El quitosano, así como la quitina, son utilizados en laboratorio y en cultivos como activadores de la respuesta de defensa en las plantas, por ser la quitina, el componente principal tanto del exoesqueleto de insectos como de las esporas de un alto porcentaje de hongos fitopatógenos. El efecto que tanto el quitosano como la quitina de alto peso molecular, producen en plantas, activando a nivel molecular, la inmunidad innata y procesos relacionados con estrés biótico es bien conocido (Povero G et al. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. J Plant Res. 2011 Sep;124(5):619-29; Zhang J. et al. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. Mol Plant. 3(5): 783-93; Ramonell, K. M. et al. (2002). Microarray analysis of chitin elicitation in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant Pathology 3(5): 301-311; Ramonell, K. et al. (2005). Chitin: An elicitor which induces genes implicated in Powdery Mildew Defense responses. Plant Phys. 138:2; Berrocal-Lobo M et al. (2010). ATL9, a RING Zinc Finger Protein with E3 Ubiquitin Ligase Activity Implicated in Chitin and NADPH Oxidase-Mediated Defense Responses. PLoS ONE 5(12): e14426.) Diversos estudios han determinado que los fragmentos de quitina de una longitud de 8 monómeros son reconocidos de forma específica y con mayor afinidad por receptores capaces de activar la respuesta inmune vegetal (Miya A et al. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 4;104(49):19613-8; Liu T et al. (2012). Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. Science. Jun 1;336(6085):1160-4. doi: 10.1126/science.1218867; Akamatsu A et al. (2013). An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. Cell Host Microbe. Apr 17;13(4):465-76; Hayafune M et al. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 21;111(3):E404-13; Cao Y et al. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. Elife. Oct 23;3. doi: 10.7554/eLife.03766). Se ha visto que este reconocimiento activa una respuesta en las plantas relacionada con el estrés causado por fitopatógenos, hecho que se ha constatado en diversas especies vegetales como arroz, tomate, trigo, melón, soja o encina (Ebel, J. et al. (1994). Elicitors of plant defense responses. Int. Rev. Cytol. 148:1-36; Shibuya, N. et al. (1996). Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-Acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. Plant Cell Physiol. 37:894-898; Stacey G et al. (1997) Chitin Recognition in rice and legumes. Plant Soil 194: 161-169; Yamada, A. et al. (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. Biosci. Biotech.

Biochem. 57: 405-409; Felix, G. et al. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. Plant J. 4:307-316; Roby, D. et al. (1987). Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 143:885-892; Day, R. B. et al. (2001). Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. Plant Physiol. 126:1162-1173; Nishizawa, Y. et al. (1999). Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: Differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. Plant Mol. Biol. 39:907-914). Es por ello que tanto la quitina como el quitosano de alto peso molecular, han sido empleados mezclados o por separado incluso combinados, acompañando a otras sustancias como activadores de la defensa y el estrés en plantas.

La presente invención se refiere a la obtención de un fertilizante compuesto por una mezcla de quitina acetilada en un alto porcentaje y parcialmente digerida, compuesta por fragmentos pequeños lo que le concede un carácter insoluble (y por ello no contaminante) y permite una mayor accesibilidad a su contenido en glucosa y grupos acetilo que las mezclas citadas de quitina en su estado polimérico original, evitando la activación de estrés en la plantas y la necesidad por parte de las plantas o de otros microorganismos u organismos del suelo de liberar quitinasas para la hidrólisis previa de este compuesto para su absorción y digestión.

Un alto número de organismos vivos contienen quitina en su estructura (crustáceos, nematodos, insectos, cefalópodos, hongos, algas, etc.) y muchos microorganismos del suelo y del medio marino poseen capacidad quitinoclástica ó quitinolítica y utilizan la quitina como fuente principal de carbono y nitrógeno para su crecimiento. Estos microorganismos quitinolíticos, ya procedan del medio terrestre o marino pertenecen principalmente a los géneros *Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes*; son capaces de degradar los grandes polímeros de quitina procedentes de las estructuras de otros organismos (cubierta de esporas, caparazón de crustáceos, esqueleto de insectos, esqueleto de cefalópodos...), transportar los pequeños derivados de quitina al interior y utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno en su metabolismo intermedio. El mecanismo molecular por el que estos organismos utilizan la quitina como fuente de carbono y nitrógeno es bien conocido (LeCleir, G. R. et al. Chitinase Gene Sequences Retrieved from Environment-Specific Distributions. 2004, 70(12):6977. DOI:Appl. Environ. Microbiol. 10.1128/AEM.70.12.6977-6983.2004).

Por otro lado, el posible mecanismo de utilización de estos biopolímeros de quitina por parte de las plantas es desconocido a nivel molecular, aunque se conocen receptores específicos de los mismos, así como de transportadores de amonio o de glucosa, que son los componentes principales de dichos biopolímeros. Es bien conocido que las plantas reconocen la quitina de alto peso molecular y liberan enzimas quitinasas que producen su degradación evitando el crecimiento del patógeno atacante, los fragmentos resultantes sirven de alimento a la microflora del suelo.

La utilización de quitina o quitosano, en forma, exclusivamente, de polímero de alto peso molecular tiene dos desventajas para su uso sobre las plantas, la primera es principalmente debido a que a pesar de ser degradada por los microorganismos del suelo y del medio marino, tal y como se ha citado previamente, estos compuestos son reconocidos por las plantas como potenciales componentes de las paredes de hongos, nematodos e insectos induciendo una respuesta de defensa vegetal asociada a la producción de estrés con la consecuente inhibición del crecimiento vegetativo. Esta respuesta a estrés se ha corroborado más recientemente, en mayor extensión, mediante el estudio de diversos perfiles genéticos obtenidos del genoma de plantas tratadas con quitina en su estado polimérico original, que es la forma exclusiva que ha sido utilizada como plaguicida y fertilizante. En estos casos se ha visto que grupos o *clusters* de genes están induciendo una activación de respuesta de defensa relacionada con el estrés biótico y la presencia de hongos (Ramonell, K. M. et al. (2002). Microarray analysis of chitin elicitation in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant Pathology 3(5): 301-311; Berrocal-Lobo M et al. (2010). ATL9, a RING Zinc Finger Protein with E3 Ubiquitin Ligase Activity Implicated in Chitin and NADPH Oxidase-Mediated Defense Responses. PLoS ONE 5(12): e14426).

Debido a estos datos cabe esperar que la actividad beneficiosa de estos biopolímeros, de alto peso molecular, haya sido más bien atribuida al efecto positivo que producían sobre el desarrollo de la biomasa de los microorganismos quitinolíticos del suelo, más que al efecto directo que pudieran producir en las plantas tratadas.

La segunda desventaja de los compuestos de alto peso molecular es que el derivado más común, el quitosano, al ser desacetilado es soluble en ácidos y se administra diluido en dichos ácidos, con la consiguiente contaminación que produce tanto por lixiviación como por evaporación, este polímero también es bien conocido por su efecto activador del estrés en

las plantas (Povero G et al. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. J Plant Res. 2011 Sep;124(5):619-29).

La quitina en la naturaleza, aparece asociada a proteínas, sales minerales y pigmentos que son eliminadas durante su extracción. La quitina 100% acetilada es poco frecuente en la naturaleza siendo extraída de diatomeas (*Thalassiosira fluvialitis y Cytlotella cryptica*). El quitosano de forma natural sólo está presente en algunos hongos. Las muestras de quitosano comercial se preparan a partir de la desacetilación química de la quitina a partir del exoesqueleto de crustáceos. La desacetilación rara vez se produce de forma completa y por ello en la estructura del quitosano aparecen cantidades variables de N-acetilglucosamina. El proceso de extracción de quitina y de preparación química de quitosano a partir de micelio de hongos o de caparazón de crustáceos es bien conocido, e incluye varias fases consecutivas de lavado y homogeneizado, demineralización con ácido clorhídrico, desproteinización con hidróxido sódico, extracción con acetona y posterior secado, el proceso de desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano requiere además, de un segundo tratamiento con hidróxido sódico. El método descrito en la presente invención no precisa del uso de ácidos, dado que se obtienen fragmentos acetilados a partir de quitina acetilada en un alto porcentaje, aunque la mezcla obtenida puede servir para ser desacetilada con posterioridad para otros usos. Es por ello que en el método de la presente invención, tampoco requiere de la solubilización previa de la quitina para la obtención del fertilizante.

La variabilidad de la quitina proviene de su origen natural y de la fuente de obtención y sus propiedades fisicoquímicas pueden variar dependiendo de la edad del individuo, o su estado fisiológico. Esta variabilidad incluye varios parámetros como la relación entre unidades acetiladas y desacetiladas, su distribución a lo largo de la cadena, su estructura cristalina y la longitud de las cadenas que la componen. La quitina en origen también varía según la proporción de proteínas, sales minerales y/o pigmentos u otros compuestos asociados a la misma y presentes en el individuo en el momento de la extracción.

La quitina extraída de crustáceo presenta una estructura cristalina tipo α mientras que la quitina aislada de pluma de calamar presenta una estructura cristalina tipo β. Se ha descrito una tercera forma polimórfica tipo γ aunque no está claro si existe realmente o aparece debido al procesado para obtener la quitina. La β-quitina presenta una estructura más abierta que la hace más accesible al ataque de agentes reactivos y enzimas y en su composición se asocia con un mayor porcentaje de proteínas que la forma α.

Los compuestos de nitrógeno inorgánico se han utilizado desde principios del siglo XX en prácticamente la totalidad de los fertilizantes industriales utilizados hasta nuestros días. La sobre-explotación del suelo agroforestal ha llevado a la pérdida del contenido de nitrógeno orgánico de los suelos y esto ha llevado al uso incontrolado y desproporcionado del nitrógeno inorgánico como fertilizante y a su acumulación hasta la saturación, tanto en ecosistemas terrestres como en zonas costeras y océanos.

Debido, principalmente, a la solubilidad de estos compuestos, tan sólo un tercio del nitrógeno aportado por los fertilizantes inorgánicos es asimilado por los cultivos, el resto es liberado a la atmósfera y al agua de escorrentía. Los principales efectos producidos por la nitrificación y denitrificación incluyen, entre otros, el incremento en la emisión de gases invernadero, principalmente óxido nítrico en forma de gas, la acidificación del suelo de cultivo y la eutrofización de los ecosistemas, con la consiguiente producción de áreas muertas tanto forestales como agrícolas. Dentro de estos cambios y bajo estas condiciones, la biodiversidad del suelo así como la del medio marino disminuyen o incluso desaparecen, siendo los sistemas agroforestales los más afectados. Como resultado de la sobreexplotación agrícola altas cantidades de nutrientes son removidas del ciclo natural del nitrógeno provocando que la regeneración natural del medio resulte imposible.

En la actualidad los altos niveles de contaminación por nitrógeno y la sobre-explotación de suelo agroforestal son tan altos que se hace necesaria la búsqueda urgente de nuevas alternativas a los fertilizantes de nitrógeno inorgánico actuales. En esta línea, la presente invención permite la obtención de un fertilizante orgánico, no contaminante del medio, debido a su carácter insoluble, basado en biopolímeros altamente acetilados y de bajo peso molecular, mediante un protocolo sencillo y barato, a partir de quitina y/o sus derivados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona el uso de oligosacáridos compuestos de N-acetilglucosamina y glucosamina como fertilizante para plantas, donde el porcentaje de N-acetilglucosamina en dichos oligosacáridos es de entre un 60 a un 100% y donde la longitud de dichos oligosacáridos es entre 1 y 6 monosacáridos, en adelante uso de la invención.

Los oligosacáridos tienen una longitud entre 1 y 6 monosacáridos, por lo que no generan el estrés vegetal producido por los polímeros de alto peso molecular. Esta mezcla de oligosacáridos puede combinarse con los de alto peso o usarse sin combinar.

Los oligosacáridos tienen carácter insoluble, por lo que no producen contaminación del medio ya que no sufren lixiviación o evaporación, permaneciendo en el suelo hasta que son degradados o consumidos.

La presente invención también proporciona un procedimiento de obtención de un fertilizante para plantas compuesto por oligosacáridos de N-acetilglucosamina y glucosamina, donde el porcentaje de N-acetilglucosamina en dichos oligosacáridos es entre un 60 y un 100%, donde la longitud de dichos oligosacáridos es entre 1 y 6 monosacáridos y donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) resuspender quitina (previamente homogeneizada) con un porcentaje de N-acetilglucosamina entre un 85% y un 100% en agua,

(b) calentar la composición resultante de la etapa (a) a una temperatura entre 120 y 180ºC durante un tiempo entre 20 y 40 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente y

(c) sonicar la composición resultante de la etapa (b) a una potencia entre 50 y 60 Hz durante un tiempo entre 5 y 120 minutos a una temperatura entre 20 y 25ºC, en adelante procedimiento de la invención.

La quitina utilizada en la etapa (a) del procedimiento de la invención se (debe preferentemente) puede homogeneizar con mortero y/o molinillo, o moledora industrial hasta la obtención de una mezcla homogénea con textura harinosa. Dependiendo del origen de la quitina, puede ser necesario una desproteinización previa, desmineralización, decoloración u otro proceso de purificación adicional que no requiere de su solubilización. La quitina de la etapa (a) puede proceder de todo tipo de materiales de origen orgánico o industrial que contengan quitina o quitosano y que hayan sido modificados hasta obtener quitina acetilada entre un 85% y un 100%.

Para asegurar la obtención de una mezcla enriquecida con oligosacáridos de bajo peso molecular que no sean solubles, la quitina debe estar acetilada entre un 85 y un 100%. Si la proporción de quitina acetilada de partida es inferior al 50%, formando quitosano, el producto obtenido finalmente será distinto al obtenido en el procedimiento de la invención, por tanto en este caso la quitina puede requerir también de un proceso previo de acetilación o de otra modificación adicional.

En la etapa (a) del procedimiento de la invención, la quitina se puede resuspender en una solución de agua destilada con un nivel de pureza tipo “MiliQ”, que se encuentre a un valor de pH de partida de entre 5-8 preferentemente. El valor final de pH de la suspensión será el proporcionado por el producto en dicha suspensión. Este valor de pH podrá ajustarse añadiendo un regulador de pH. Por ejemplo, se puede ajustar a un valor de pH de 5 a 6. El valor de pH no afecta al producto en ese intervalo, ni a la actividad detectada de la mezcla final.

La temperatura durante la etapa (c) del procedimiento de la invención no debe superar los 25ºC. La modificación de esta temperatura puede afectar a las propiedades del producto.

En la etapa (c) del procedimiento de la invención, se puede utilizar preferentemente un sonicador de tipo Ultrasons-H, un sonicador industrial o aparato similar utilizando la potencia y temperatura recomendadas.

Otra realización es el procedimiento de la invención, donde en la etapa (a) la quitina se resuspende a una concentración entre 0,04 a 4 g/l.

Otra realización es el procedimiento de la invención, donde la composición resultante de la etapa (c) se somete a un proceso de secado.

La composición resultante de la etapa (c) podrá secarse por diferentes métodos, como roto-evaporación, evaporación o secado a alta temperatura para su posterior uso, no afectando el método de secado a la composición final de la mezcla. El secado permite tanto el transporte como el almacenamiento de la mezcla, así como el tratamiento directo del medio a tratar con la mezcla directamente en su estado sólido si se requiere.

El producto obtenido por el procedimiento de la invención podrá utilizarse en estado sólido o en resuspensión en agua destilada, tal y como ha sido obtenido y dado que se encuentra en condiciones estériles, podrá ser almacenado sin sufrir contaminaciones, tanto a temperatura ambiente como en frigorífico a 4ºC. También podrá resuspenderse en otros líquidos siempre que éstos no afecten a sus propiedades químico físicas.

Es recomendable almacenar el producto obtenido por el procedimiento de la invención a una temperatura entre 4ºC a 25ºC, dado que este intervalo de temperaturas no afectará a las propiedades del producto, ya sea en resuspensión o en estado sólido.

El producto obtenido también puede mezclarse en distintas proporciones con quitinas y quitosanos de alto y bajo peso molecular para obtener los efectos deseados, así como con microorganismos, sustancias o productos del mercado ya existentes, para un uso muy diverso, debiendo mantener sus propiedades químico físicas si se pretende obtener el efecto descrito en la presente invención.

El procedimiento de la invención permite la obtención de un fertilizante que podría ser obtenido a partir de cualquiera de las quitinas de diverso origen anteriormente citadas, incluida aquella quitina o quitosano procedentes de uso industrial, siempre que el compuesto de partida fuera el descrito en la presente invención. Por tanto el procedimiento permite el reciclaje de quitina y sus derivados para su uso posterior como fertilizantes orgánicos.

El procedimiento de la invención permite la obtención de biopolímeros ricos en nitrógeno orgánico, insolubles y de bajo peso molecular que pueden ser directamente metabolizables por parte de los microorganismos quitinolíticos, proporcionándoles una fuente de alimento parcialmente “digerida”. La presencia de estos biopolímeros en el medio produce, como consecuencia, la estimulación del crecimiento vegetal, por lo que estos biofertilizantes, obtenidos mediante el procedimiento de la invención, son excelentes restauradores de la biomasa de suelos sobreexplotados y suelos degradados, como por ejemplo, terrenos agrícolas sobre explotados, pobres en nitrógeno o en desuso, o suelos forestales quemados o degradados por otras causas.

Los biofertilizantes obtenidos con el procedimiento de la invención son biocompuestos en un estado parcialmente digerido; los organismos que los utilizan como fuente de carbono y nitrógeno no requieren digerirlos mediante la liberación de enzimas quitinolíticas, lo que les permite un considerable ahorro energético. Adicionalmente contienen nitrógeno orgánico, se obtienen mediante un proceso de bajo coste y por último, son insolubles y por tanto, no se liberan a la atmósfera o se disuelven en el agua, tampoco contienen sustancias ácidas que puedan alterar la composición del entorno, además de ser metabolizados con alto rendimiento por y al ritmo que lo requieran los microorganismos del suelo.

Tal y como se ha mencionado, el producto obtenido por el procedimiento de la invención, al ser de bajo peso molecular no es reconocido por las plantas como componente de la estructura del fitopatógeno y por tanto no genera la respuesta a estrés que producen éstos, estando esta respuesta a estrés asociada generalmente a la inhibición del desarrollo vegetativo.

Dada la gran versatilidad en sus posibles usos el método de aplicación del producto puede ser muy diverso, ya sea en suspensión, en una solución de riego por goteo, pulverización, inyección en tierra, inmersión radicular o aplicado en seco, ya sea o no compactado. La concentración del producto puede variar según el uso, dependiendo del efecto deseado y de la especie vegetal, cultivo celular, microbiológico, sustrato, solución...etc donde el producto sea aplicado.

El producto obtenido por el procedimiento de la invención puede utilizarse como biofertilizante sobre cualquier tipo de sustrato o medio de crecimiento conocido, como fuente de carbono y nitrógeno de diversos organismos así como producto industrial para diversas aplicaciones farmacológicas y químicas.

Resulta posible la combinación del producto obtenido por el procedimiento de la invención con otros compuestos y fertilizantes orgánicos o inorgánicos de uso corriente y de alto contenido en nitrógeno, carbono o potasio como son el guano procedente de aves, murciélagos…etc u otras formas de administración de urea, la harina de peces, la harina de cuernos o huesos, la sangre de productos cárnicos, la harina de plumas, el estiércol de distinto origen, la alfalfa, los lodos de depuradora, el serrín, el compost procedente de gusanos y/o bacterias, los extractos de algas marinas, la paja...etc.

Recientemente se han publicado patentes sobre la preparación de materiales basados en quitina y quitosano con el objeto de producir bioplásticos (Fernandez J G et al. (2014). Manufacturing of Large-Scale Functional Objects Using Biodegradable Chitosan. Bioplastic Macromol. Mater. Eng. 2014, 299, 932–938; WO2013131079A1). Cualquiera de estos objetos podrían ser reciclados y usados como fertilizantes mediante el procedimiento de la invención después de someter el producto a un tratamiento de reacetilación en caso de que fuera necesario.

Cualquier material derivado de quitina y/o quitosano empleado por diversas industrias como la alimentaria (materiales de empaquetamiento, bolsas….), biomédica (cápsulas, píldoras, membranas …) u otras, podría ser reciclado análogamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Análisis mediante Maldi-tof de la mezcla obtenida indicando la composición y el peso molecular de los oligosacáridos de la misma. Se indican los picos obtenidos en el análisis, y los correspondientes pesos moleculares (m/z) de los oligosacáridos derivados de la quitina obtenidos.

Figura 2. Se muestra el incremento en el contenido de nitrógeno total de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en medio pobre de nitrógeno, tratadas el producto (CHL) y con la mezcla de alto peso molecular (CHH) tras diez días del tratamiento, comparadas con los controles sin tratar.

Figura 3. Se muestra el contenido de carbono total de plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), tratadas con el producto (CHL) y con la mezcla de alto peso molecular (CHH), tras veinte días de crecimiento en un medio controlado en condiciones de laboratorio “in vitro”, comparado con las plantas sin tratar, crecidas en las mismas condiciones.

Figura 4. Se muestra el incremento en el peso fresco de plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0), tratadas con el producto (CHL) y con la mezcla de alto peso molecular (CHH) y sin tratar después de 20 días de crecimiento, en un medio controlado en condiciones de laboratorio “in vitro”.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1. Obtención de una composición que comprende oligosacáridos conforme al procedimiento de la invención

Como material de partida se utilizó polvo purificado compuesto por quitina ultrapura de Sigma#C9752 (Sant Louis, MO, USA), con un grado de acetilación del 95% (Lote Nº: 107K7005V), derivada de cáscaras de gambas, y compuesta por Poli(N-acetil-D-glucosamina), Poli-(1→4)-β-N-acetil-D-glucosamina, de fórmula molecular $C_8H_{15}NO_6$ y peso

molecular 221,2078. Se homogeneizó el material de partida en mortero de porcelana hasta la obtención de una mezcla de textura harinosa y se re-suspendió el polvo en agua destilada (Milipore, agua MiliQ) en un bote de cristal esmerilado y oscuro, a una concentración 100mg/l, se preparó un volumen de 5 ml de cada solución.

Se autoclavó la solución durante 20 minutos a 121ºC (autoclave P-Selecta). Se dejó enfriar el producto a temperatura ambiente, tras lo cual se sometió a un proceso de sonicación a una potencia de 50 Hz en baño de agua durante 5 minutos a temperatura no superior a 25ºC.

El producto se almacenó a temperatura ambiente de no más de 25ºC o a 4ºC si no se utilizaba el mismo día. Se realizó un análisis Maldi-Tof del producto obtenido. Los resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 1.

Tabla 1. Resultados del análisis Maldi-tof. Se indican los picos obtenidos en el análisis, correspondientes a los pesos moleculares (m/z) de los oligosacáridos derivados de la quitina, en estado acetilado (A), correspondiendo A2 al dímero, A3 al trímero, A4 al tetrámero, A5 al pentámero y A6 al hexámero de quitina, indicando la intensidad de cada oligosacárido en la mezcla y el porcentaje correspondiente de cada uno dentro de la mezcla, según su intensidad. Se indican los pesos moleculares teóricos, en función del aducto formado con el ión Na^+.

m/z obtenido	m/z teórico [MNa^+]	asignación	intensidad	%
446,85	447,16	A2	1166	34,53
650,09	650,24	A3	1203	35,63
853,28	853,31	A4	750	22,21
1056,33	1056,39	A5	219	6,48
1259,56	1259,47	A6	38	1,12

Ejemplo 2. Ensayos de crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Se aplicó el producto obtenido en el ejemplo 1, estéril y resuspendido en agua a una concentración de 50 mg/l y 100 mg/l (adición a una temperatura menor de 65ºC) sobre un medio líquido estéril en caliente, conteniendo Murashige&Skoog (No. #1B-M0233, Duchefa Biochemie, NY, USA) el cual contiene la mitad del Nitrógeno suministrado de forma estándar

para obtener un crecimiento adecuado de estas plantas y Agar bacteriológico a una concentración de 9 g/l y 1% de Sacarosa (peso/volumen), el pH del medio se ajustó a 5,75 con ácido clorhídrico diluido. Se aplicó un volumen de entre 30-40 ml de este medio sobre placas petri® cuadradas hasta su completa solidificación. Sobre el medio se colocaron 120 semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo *Columbia*, por cada placa, colocadas en tres líneas de 40 semillas cada una. Dichas semillas fueron previamente esterilizadas mediante un tratamiento de 20 minutos con una solución conteniendo Tween® 20 e hipoclorito sódico, tras lo cual se limpiaron con agua destilada estéril tres veces. Una vez estériles, las semillas dentro de las placas y tapadas con papel de aluminio, fueron estratificadas, con el objeto de sincronizar su germinación para lo cual fueron sometidas a una temperatura de 4ºC en oscuridad durante dos días, tras lo cual, las placas de colocaron en soportes verticales y se germinaron y crecieron, hasta 21 días, en cámara de crecimiento controlado en ciclos de 23ºC durante 16 horas de luz y 20ºC durante 8 horas de oscuridad, con una humedad relativa constante de 60% y bajo una intensidad de luz de entre 100-150 mE/m^2 utilizando como iluminación tubos fluorescentes de tipo Growlux®. Se tomaron a diferentes tiempos los valores de la longitud de la raíz principal de cada planta. Se estimó el incremento del peso fresco de las plantas tratadas y no tratadas con el producto así como con la misma mezcla del producto sin tratar. Se estimó un incremento en el crecimiento de la raíz principal de las plantas tratadas que oscilaba entre el 5 y el 25% respecto a las plantas control dependiendo del experimento y la variabilidad vegetal (Figura 4). También se observó un incremento en el desarrollo de raíces laterales en las plantas control, no tratadas con el producto, respecto a las plantas tratadas, síntoma que suele ir asociado a la falta de nutrientes del medio y no fue observado en las plantas tratadas con el producto, debe destacarse que el medio sin producto contiene la mitad de nitrógeno utilizado habitualmente y que esta respuesta de estrés no fue observada en las plantas tratadas con el producto.

Ejemplo 3. Determinación del contenido de Nitrógeno y Carbono en plantas *Arabidopsis thaliana*.

Se aplicó el producto obtenido en el ejemplo 1 a una concentración de 50 y 100 mg/l, sobre el medio de crecimiento descrito en el ejemplo 2 en las placas descritas en el ejemplo 2. Se depositaron 300 semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo *Columbia*, por cada placa. Dichas semillas fueron esterilizadas previamente y estratificadas tal y como se ha indicado en el ejemplo 2, tras lo cual, las placas de colocaron en vertical y se germinaron y crecieron, hasta un máximo de 21 días, en cámara de crecimiento controlado en ciclos de 23ºC durante 16 horas de luz y 20ºC durante 8 horas de oscuridad, con una humedad relativa constante de

60% y bajo una intensidad de luz de entre 100-150 mE/m^2 utilizando como iluminación tubos fluorescentes de tipo Growlux®. Tras los diferentes tiempos de crecimiento elegidos se tomó el tejido de cada placa y se dejó secar en un horno entre 65-70ºC durante al menos 48 horas. Los tejidos fueron finamente molidos y homogeneizados. La concentración de N y C se determinó usando un analizador de masas (LECO CHN-600) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada bloque (3 cuadras), fueron recogidos y agrupados en una muestra de 12 plantas por tratamiento.

Se comparó el contenido de Nitrógeno y Carbono total en las plantas tratadas respecto a las no tratadas detectando un incremento de entre un 8 y hasta un 15% tras los primeros 14 días de crecimiento, en las plantas suplementadas con el producto respecto a las no suplementadas, este valor pudo variar, dependiendo del peso molecular de la mezcla del tratamiento (CHL: Mezcla de quitina de bajo peso molecular obtenida mediante el protocolo descrito en el ejemplo 1 o CHH: Quitina ultrapura comercial de alto peso molecular, procedente de cáscara de gamba de alto peso molecular Sigma#C9752 con un 99% de pureza y al menos un 95% de grado de acetilación).

Tras 20 días de crecimiento no se observaron diferencias ni en el contenido de nitrógeno ni en el de carbono en las plantas suplementadas, determinándose que en el intervalo de concentraciones utilizadas y bajo esas condiciones, las plantas han consumido prácticamente todo el producto que han podido captar en el medio de crecimiento.

Ejemplo 4. Ensayos de crecimiento de plantas de *Populus tricocarpa*.

Se transfirieron explantos de *Populus tricocarpa* crecidos durante 45 días en un medio estándar, no suplementado, al medio utilizado utilizando en el ejemplo 1 suplementado con el producto obtenido en el ejemplo 1 tal y como se ha descrito en el ejemplo 2. Cada explanto medía entre tres y cuatro centímetros de longitud y contenía una hoja.

Los árboles fueron trasplantados a tubos de cristal de 2,7 cm de ancho por 14cm de alto, conteniendo el medio descrito en el ejemplo 2. Se realizó un seguimiento de los parámetros de crecimiento midiendo la raíz principal y el tallo a lo largo de distintas semanas, hasta un máximo de tres meses, observándose un incremento del crecimiento radicular de hasta un 8% en plantas suplementadas con el producto respecto a las plantas control no suplementadas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de oligosacáridos compuestos de N-acetilglucosamina y glucosamina como fertilizante para plantas, caracterizado por que el porcentaje de N-acetilglucosamina en dichos oligosacáridos es de entre 60 y 100% y por que la longitud de dichos oligosacáridos es de entre 1 y 6 monosacáridos.

2. Procedimiento de obtención de un fertilizante para plantas compuesto por oligosacáridos de N-acetilglucosamina y glucosamina, caracterizado por que el porcentaje de N-acetilglucosamina en dichos oligosacáridos es de entre un 60 y 100%, por que la longitud de dichos oligosacáridos es entre 1 y 6 monosacáridos y por que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

   (a) resuspender quitina con un porcentaje de N-acetilglucosamina entre un 85% y un 100% en agua,

   (b) calentar la composición resultante de la etapa (a) a una temperatura entre 120 y 180ºC durante un tiempo entre 20 y 40 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente y

   (c) sonicar la composición resultante de la etapa (b) a una potencia entre 50 y 60 Hz durante un tiempo entre 5 y 120 minutos a una temperatura entre 20 y 25ºC.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que en la etapa (a) la quitina se resuspende a una concentración entre 0,04 a 4 g/l.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado por que la composición resultante de la etapa (c) se somete a un proceso de secado.

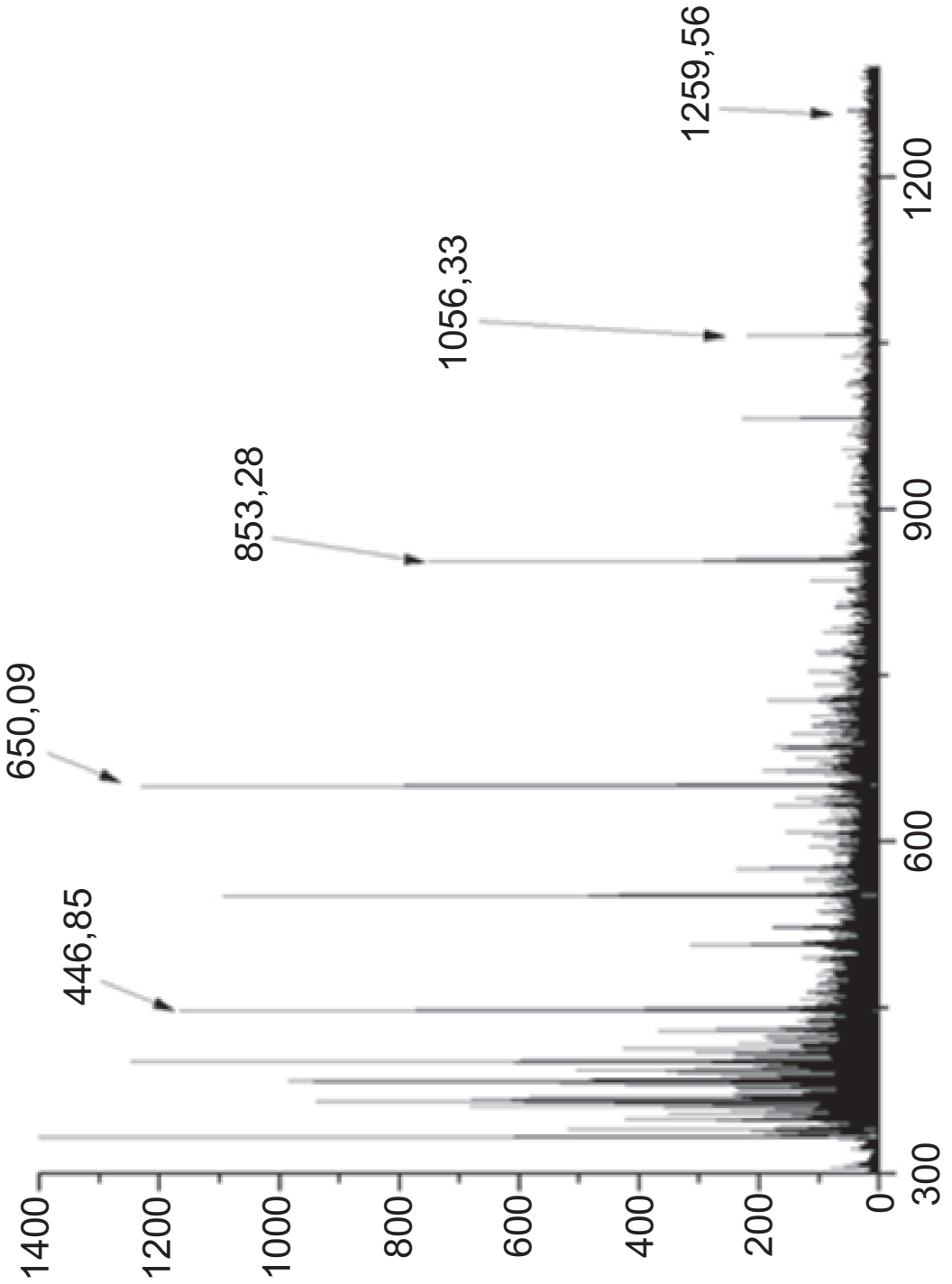
1259,56
1056,33
853,28
650,09
446,85
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
300
600
900
1200

Fig. 1

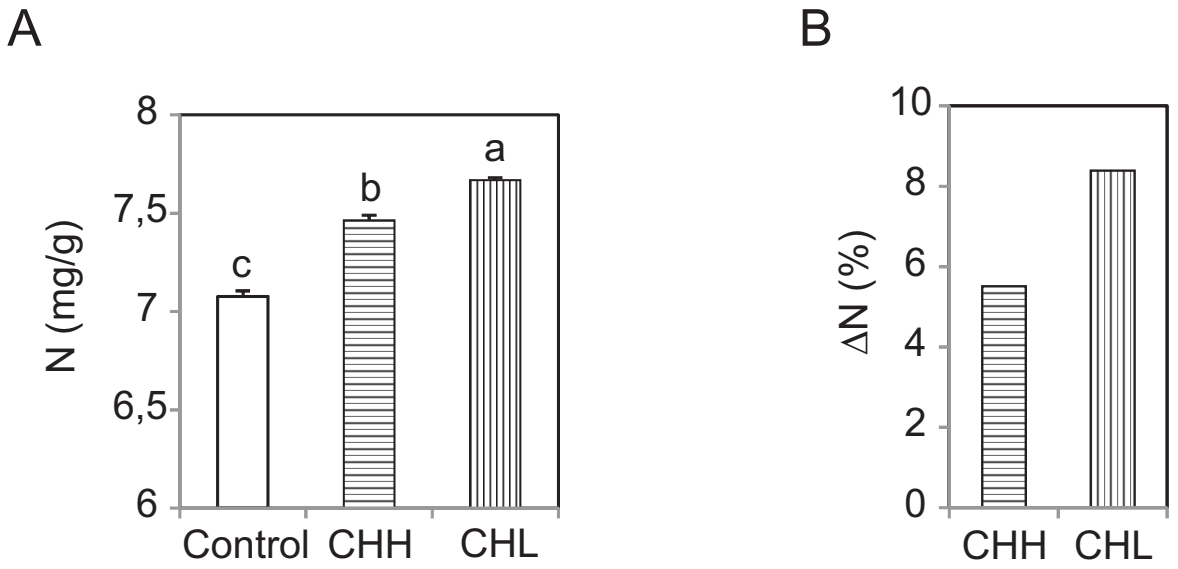
A
B
8
7,5
7
6,5
6
N (mg/g)
c
b
a
Control
CHH
CHL
10
8
6
4
2
0
ΔN (%)
CHH
CHL

Fig. 2

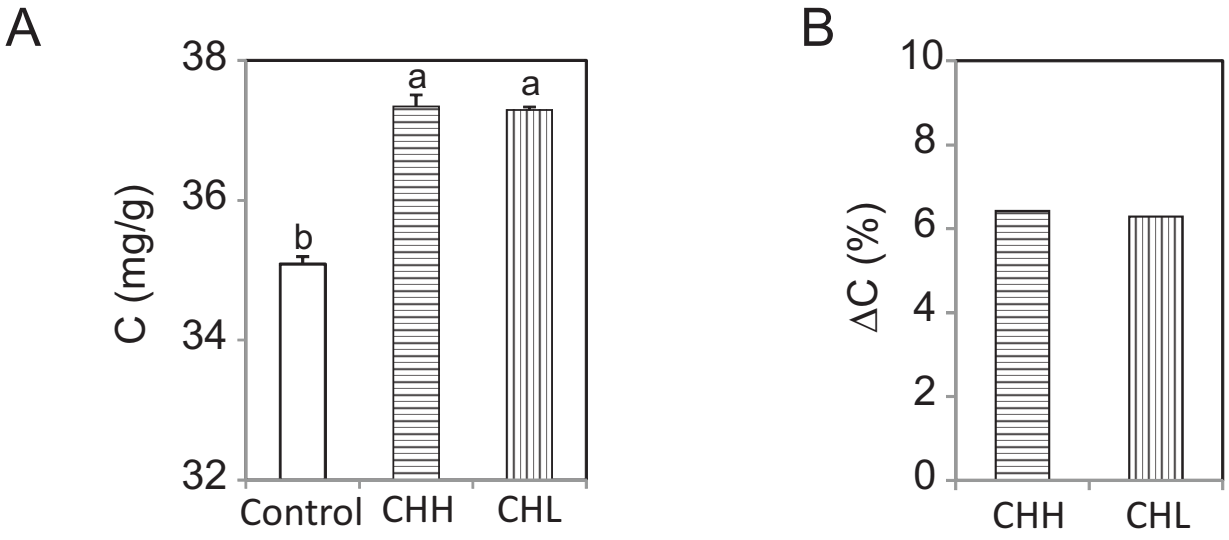
A
B
38
36
34
32
C (mg/g)
b
a
a
Control
CHH
CHL
10
8
6
4
2
0
ΔC (%)
CHH
CHL

Fig. 3

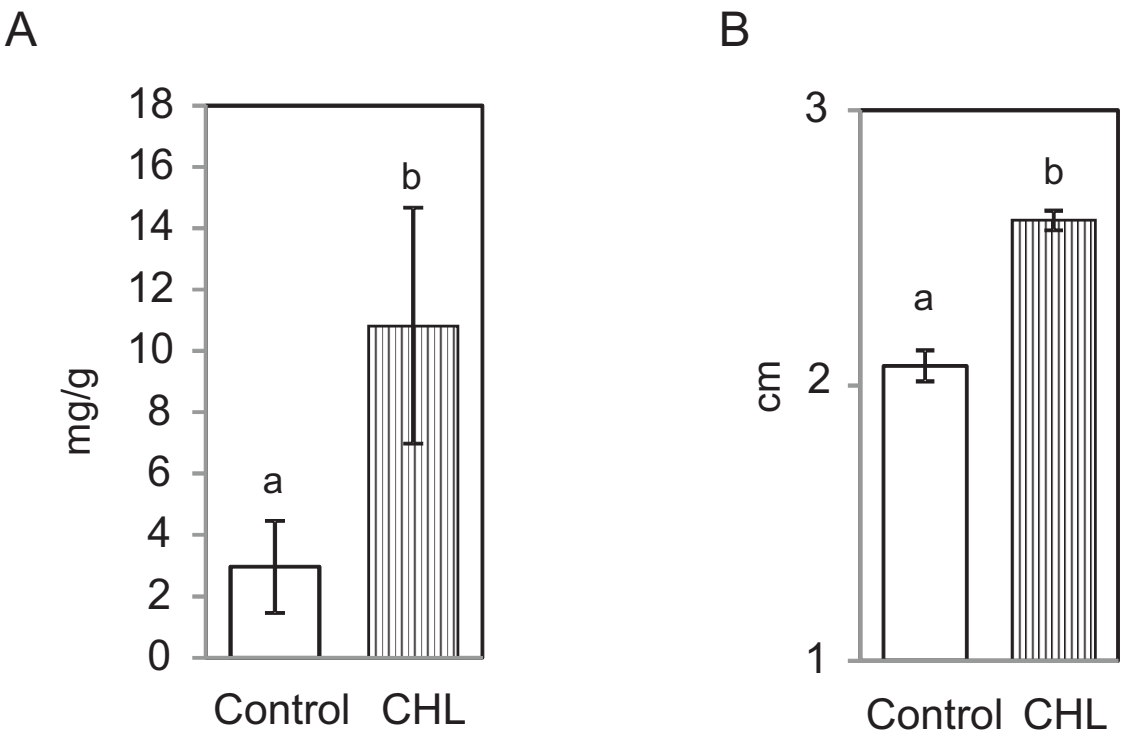

Fig. 4

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201530657

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 14.05.2015

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A01N43/16*** (2006.01)
C07H15/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	JP 6333310 A (IHARA CHEMICAL) 13.02.1988, resumen en inglés.	1
X	JP 07258007 A (NIPPON STEEL CORP) 09.10.1995, resumen en inglés.	1
X	JP 03198702 A (LION CORP) 29.08.1991, resumen en inglés.	1
A	US 20110114472 A1 (WU et al.) 19.05.2011, resumen; reivindicaciones.	2-4

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
06.07.2015	M.P. Fernández Fernández	1/4

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

A01N, C07H

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

INVENES, EPODOC, WPI, ESPACENET, CAS, AGRICOLA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.07.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-4	**SI**
	Reivindicaciones	1	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	2-4	**SI**
	Reivindicaciones	1	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JP 6333310 A (IHARA CHEMICAL)	13.02.1988
D02	JP 07258007 A (NIPPON STEEL CORP)	09.10.1995
D03	JP 03198702 A (LION CORP)	29.08.1991
D04	US 20110114472 A1 (WU et al.)	19.05.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere (reivindicación 1) al uso de oligosacáridos compuestos de N-acetilglucosamina y glucosamina como fertilizante para plantas, se caracteriza porque la longitud de los oligosacáridos es entre 1 y 6 monosacáridos y porque el porcentaje de N-acetilglucosamina es entre 60 y 100%.
Las reivindicaciones 2-4 se refieren a un procedimiento de obtención del fertilizante que comprende las etapas:
suspender quitina en agua
calentar la suspensión anterior
sonicar la composición resultante
secar la composición.

El documento D1 divulga (ver resumen en inglés) un fertilizante para plantas que puede comprender quitina, quitosano, N-acetilglucosamina y glucosamina.

El documento D2 (ver resumen en inglés) divulga una composición para controlar los daños producidos por infecciones en plantas que contiene un oligosacárido o monosacárido, entre otros glucosamina y N-acetilglucosamina.

El documento D3 divulga (ver resumen en inglés) un fertilizante de quitina o quitosano que contiene 4 o más unidades de N-acetilglucosamina o glucosamina en un soporte convencional.

El documento D4 divulga un procedimiento para la producción de glucosamina y acetilglucosamina por adición de ácido clorhídrico y utilización de microondas para hidrolizar la quitina o quitosano.

El estado de la técnica divulgado en D1, D2 y D3 establece que la utilización de oligosacáridos de N-acetilglucosamina y glucosamina como fertilizante para plantas es conocido, en D3 además se utilizan oligosacáridos que contienen 4 o más monosacáridos, luego estos documentos afectan a la novedad de la reivindicación 1 de la solicitud.
Respecto a las reivindicaciones 2-4 no se ha encontrado divulgado el procedimiento de la reivindicación 2 de la solicitud, se considera nuevo e inventivo pues un técnico en la materia no podría deducir de forma evidente que la técnica de sonicación sea un método efectivo para hidrolizar quitina, sería necesaria una experimentación para confirmarlo.

En consecuencia se considera que la reivindicación 1 carece de novedad y las reivindicaciones 2-4 son nuevas e inventivas, de acuerdo a lo dispuesto en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.