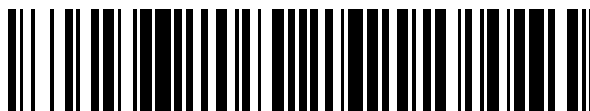


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 006**

51 Int. Cl.:

A01N 37/46 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2006** **E 06253565 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 1886562**

54 Título: **Método para potenciar el crecimiento de cultivos, plantas o semillas y supresión de enfermedades de las plantas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2015

73 Titular/es:
**TUNG HAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION
(100.0%)
NO. 18-3, DATUNG STREET, SHALU CHEN
TAICHUNG HSIEN, TW**

72 Inventor/es:
**HO, GUAN-HUEI;
YANG, JENG y
YANG, TOU-HSIUNG**

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 547 006 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para potenciar el crecimiento de cultivos, plantas o semillas y supresión de enfermedades de las plantas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a los efectos combinados y concertados de la hidratación del suelo, la retención de agua, la solubilización de calcio y magnesio, la estimulación del crecimiento de cultivos, plantas y semillas, y / o las funciones antifitopatógenas y antivirales del ácido γ -poliglutámico (" γ -PGA", forma H), su sal (un γ -poliglutamato), un
10 hidrogel de γ -poliglutamato y / o un caldo de fermentación que comprende γ -PGA, su sal y / o hidrogel de γ -poliglutamato.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

15 En el control práctico de enfermedades de las plantas, los compuestos antifúngicos sintéticos están siendo los principales fungicidas en uso. Fungicidas sintéticos en aplicaciones de amplio espectro se imponen disminuyendo el control biológico natural y el peligro para la vida silvestre, los trabajadores agrícolas y los consumidores. Para muchas enfermedades de las plantas, especialmente las relacionadas con el suelo, puede estar implicado un complejo de patógenos, tal como la podredumbre de la raíz de la judía, que implica a *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*
20 y *Fusarium solani*.

En la actualidad y en el futuro inmediato, el uso selectivo de fungicidas convencionales parece ser la forma principal en el control práctico de enfermedades de las plantas. En general, los fungicidas se pueden utilizar selectivamente con respecto a la cantidad o la frecuencia de aplicación. La posibilidad de utilizar procedimientos tanto químicos
25 como biológicos para lograr un control fiable y selectivo es intrigante.

Las enfermedades de los cultivos van desde las que se producen con poca frecuencia a aquellas que alcanzan proporciones epidémicas. El oidio de los cereales es frecuente y grave. La Sigatoka Negra es una enfermedad frecuente y devastadora asociado con los plátanos. La frecuencia de la mancha ocular aguda (*Rhizoctonia solani*) en
30 los cereales de clima templado y los cultivos de alto valor a nivel mundial sugieren que los agentes diseñados para su control pueden ser un éxito comercial. En general se acepta que *Septoria* y las enfermedades del oidio están asociadas con los patógenos de cereales más importantes actualmente controlados mediante fungicidas. Hay varios patógenos para los que no existe un control fungicida eficaz, pero que están asociados con intensas pérdidas de cosechas. Ejemplos son *Sclerotinia* en las legumbres, *Gaeumannomyces* en los cereales y *Fusarium* en el maíz.
35 Otros patógenos importantes incluyen *Pyricularia grisea* en el arroz, *Erysiphe graminis* y *Septoria tritici* en los cereales de clima templado, *Venturia inaequalis* en la fruta principal, *Sclerotinia sclerotiorum* en las legumbres.

Los agentes antifúngicos naturales más ampliamente estudiados son las fitoalexinas. Sin embargo, las quitinasas, glucanos, lectinas de unión a quitina, zeamatinas, tioninas y proteínas inactivadoras de ribosomas están ahora
40 reconocidos como importantes reguladores de la invasión de hongos. Los patógenos biotróficos invaden las células vivas, mientras que los necrótrofos colonizan el tejido invadido.

Se han encontrado D-aminoácidos como constituyentes de las paredes celulares microbianas (véase Schleifer K. H. y Kandler O., 1972, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, Bacteriolo. Rev.
45 36:407 - 477), lipopéptidos (véase Asselineau J., 1966, The bacterial lipids, Hermann, Paris), antibióticos (véase Bycroft B. W., 1969, Structural relationships in microbial peptides, Nature (London), 224:595 - 597), cápsulas y toxinas (véase Hatfield G. M., 1975, Toxins of higher fungi, Lloydia, 38:36 - 55). Se ha postulado que los D-aminoácidos en los antibióticos se forman a partir de L-aminoácidos después de la incorporación de este último en intermedios estereoquímicamente lábiles, tales como dipéptidos cíclicos. Una forma combinada de un ácido deshidroamino derivado del correspondiente L-aminoácido podría convertirse estereoespecíficamente *in vivo* en el
50 D-isómero durante la formación del antibiótico. La racemización de los aminoácidos puede proceder a través de un mecanismo análogo.

La mayoría de los antibióticos peptídicos producidos por bacilos son activos contra bacterias grampositivas. Sin embargo, algunos compuestos exhiben actividad casi exclusivamente contra formas gramnegativas, mientras que algunos otros, como bacilomicina y micobacilina, son agentes eficaces contra mohos y levaduras. La micobacilina es un antibiótico peptídico cíclico que contiene 13 residuos de 7 aminoácidos diferentes (véase Sengupta S., Banerjee A. B., y Bose S. K., 1971, γ -Glutamyl and D- or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic, Biochem. J., 121:839 - 846). Hay seis de los D-aminoácidos, incluyendo dos de ácidos D-glutámico y cuatro de
60 ácidos D-aspartico, y otros siete L-aminoácidos en la estructura molecular.

Generalmente, los fungicidas no sistémicos son inhibidores de múltiples sitios, que provocan una respuesta a través de la interrupción de varios procesos bioquímicos. Esto se logra a través de su capacidad para unirse con los grupos químicos, tales como restos tiol, comunes a muchas enzimas. Los materiales que inhiben la biosíntesis de esteroides son agentes muy eficaces de control de enfermedades de los cultivos. Son sistémicos y proporcionan un control
65 protestante, curativo y de erradicación. Los esteroides son componentes funcionales importantes en el mantenimiento

de la integridad de la membrana celular y están presentes en todos los eucariotas. En los hongos, la biosíntesis de esteroides se lleva a cabo *de novo* a partir de acetil-CoA para producir el esteroide principal en la mayoría de los hongos. La ruta sintética hacia el ergosterol es una característica de la mayoría de los hongos (por ejemplo, Ascomycetos, Deuteromycetos y Basidiomycetos). En los oídios de cereales, el esteroide principal es 24 metilcolesterol.

5 El ergosterol desempeña un papel único en el mantenimiento de la función de la membrana y una reducción en la disponibilidad del ergosterol tiene como resultado la interrupción de la membrana y la fuga de electrolitos.

Las surfactinas (véase Arima K., Kakinuma A., y Tamura, G., 1968, Surfactin, a Crystalline Peptidolipid Surfactant Produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, Characterization and Its Inhibition of Fibrin Clot Formation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31:488 - 494) son depsipéptidos cíclicos producidos por *Bacillus subtilis* y *Bacillus subtilis natto*, que contienen ácidos grasos β -hidroxilados y siete aminoácidos, incluyendo 2 de la D-leucinas. Muestran potentes actividades antifúngicas, actividades antitumorales, contra células de carcinoma de ascitis de Ehrlich e inhiben la formación de coágulos de fibrina. Las interacciones fisicoquímicas de las surfactinas de lipopéptidos anfifílicos con la capa externa de la membrana bicapa lipídica causan graves cambios en la permeabilidad de los canales iónicos y conducen a la interrupción del sistema de membranas. Las surfactinas también inhiben las actividades de enzimas virales de la ATPasa de protones, que son necesarias para la entrada de algunos virus en las células (véase Carrasco L., 1994, Entry of animal viruses and macromolecules into cells, FEBS Lett. 350:151 - 154), como se demuestra para la H^+, K^+ -ATPasa gástrica para la surfactina análogo pumilacidina (véase Naruse N., Tenmyo O., y Kobaru S., 1990, Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, J. Antibiot. Japan, 43:267 - 280). La actividad antiviral de la surfactina se ha determinado para un amplio espectro de diferentes virus (véase Vollenbroich D., Paul G., Ozel M. y Vater J., 1997, Antimycoplasmal properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, Appl. Environ. Microbiol. 63:44 - 49), incluyendo el virus del bosque de Semski, el virus del herpes simple, el virus del herpes suido, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la inmunodeficiencia en simios, el calicivirus felino, el virus de la encefalomiocartitis murina, virus con cubierta retrovirus, etc.

Las iturinas (véase Peypoux F., Guinand M., Michel G., Delcambe L., Das B. C. y Lederer E., 1978, Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*, Biochemistry, 17:3992 - 3996) son lipopéptidos antifúngicos, producidos por una cepa de *Bacillus subtilis*, que contienen un heptapéptido cíclico que incluye tres de D- y cuatro L- α -aminoácidos y un β -aminoácido lipofílico con una cadena lateral alifática de 14 a 16 átomos de carbono. Las iturinas exhiben una amplia gama de espectro de supresión de diversos hongos fitopatógenos, levaduras y bacterias, tanto *in vitro* como *in vivo* (véase, Namai T., Hatakeda K. y Asano T., 1985, Identification of a bacterium which produces substances having antifungal activity against many important phytopathogenic fungi, Tohoku J. Agric. Res., 36:1 - 7 y Guedner R. C., Reiley C. C., Pusey P. L., Costello C. E., Arrendale R. F., Cox R. H., Himmelsbach D. S., Crumley F. G. y Cutler H. G., 1987, Isolation and identification of iturin as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*, J. Agric. Food Chem., 36:366 - 370). El resto peptídico polar imparte propiedades anfipáticas a la iturina y el modo de acción implica interacciones con la membrana diana. La existencia de fuertes interacciones entre la iturina y el colesterol conduce a la formación de un complejo equimolecular. La iturina también reacciona con ergosterol. Estas interacciones entre iturina y esteroides de la membrana celular de células fitopatógenas modifican eficazmente la permeabilidad de la membrana y la composición de los lípidos, por lo tanto, conduce a la ampliación del canal de liberación de iones K^+ y la pérdida de varios compuestos celulares, lo que da como resultado la descomposición del filamento celular y la inhibición de la gemación de nuevas esporas celulares.

45 Según la FDA de EE.UU., las especies de *Bacillus subtilis* se clasifican en la lista de GRAS de microorganismos para la producción de enzimas digestivas de calidad para alimentación de animales, incluyendo proteasas, hidratos de carbono y lipasas.

50 Hoppensack et al describen el uso de *Bacillus licheniformis* para convertir el amonio del estiércol líquido en la biomasa y una pequeña cantidad de poli (ácido γ -glutámico) (FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 218, no.1, páginas 39 - 45 [2003]).

La mayoría de los fungicidas utilizados en todo el mundo se utilizan para controlar enfermedades causadas por solo por 12 hongos. Aunque la mayoría de los fungicidas son relativamente no tóxicos para los mamíferos, algunos, como los compuestos que contienen mercurio, son muy tóxicos y se producen desastres humanos cuando se utilizan incorrectamente. Las aplicaciones de algunos fungicidas han dado lugar a una mayor cantidad de enfermedades causadas por otros patógenos no controlados. Por ejemplo, algunos fungicidas utilizados para el control de la mancha foliar del cacahuate aumentaron la cantidad de podredumbre del tallo (*Sclerotium rolfsii*) y aplicaciones de benomilo dieron como resultado una mayor incidencia de la enfermedad de la mancha ocular aguda del centeno causada por *Rhizoctonia solani*, podredumbre de la fruta de la fresa (especie de *Rhizopus*), y la podredumbre del tallo húmedo de la alubia de ojo negro (*Aphanidermatium Pythium*). El uso de dos o tres fungicidas de diversas especificidades se aproxima a los efectos como se consigue mediante un amplio espectro de sustancias tóxicas. Las hormonas del crecimiento de las plantas son bien conocidas como antagonistas de la enfermedad fúngica. Las auxinas, por sus efectos sobre la estructura de la pared celular, son particularmente activas contra las enfermedades de marchitamiento. Otros reguladores del crecimiento, por ejemplo los inhibidores del transporte de auxina y los inhibidores de la biosíntesis de giberelinas, también reducen la gravedad de las enfermedades del marchitamiento por

Fusarium y Verticillium en el tomate y el algodón. La actividad antagonista del inhibidor de la biosíntesis cloruro de cloromequat contra Pherpotrichoides se debe probablemente a la fuerza potenciada del tallo que resulta de la aplicación de este retardante del crecimiento, en lugar de un efecto directo sobre la actividad fúngica. La citoquinina kinetina tiene un espectro de actividad antagonista contra patógenos fúngicos, incluidos *Alternaria spp.* y miembros de *Erysiphales*, probablemente a través de una disminución de la velocidad de la degradación de la proteína y el ácido nucleico inducida por patógenos.

El documento JP 2002 305975 A describe el uso de un cuerpo de retención de agua en gel producido utilizando un cuerpo reticulado por radiación de ácido γ -poliglutámico como un suplemento de la planta.

Resumen de la invención

Los estudios de los inventores muestran que γ -PGA, sus sales, es decir, γ -poliglutamatos (en las formas Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++}), los hidrogeles de γ -poliglutamato (preparados a partir de γ -poliglutamatos en las formas Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++}), y / o un caldo de fermentación que comprende γ -PGA, su sal y / o hidrogel de γ -poliglutamato poseen, además de su no toxicidad para el cuerpo humano, biodegradabilidad y los productos finales degradados ecológicos, ácidos glutámico, los mismos, múltiples funcionalidades como: alta absorción y retención de agua; buena capacidad de liberación controlada para una eficacia duradera; iones metálicos pesados tóxicos quelantes y de encapsulación para destoxificación; formación de complejos iónicos coordinados con calcio y magnesio para una mejor biodisponibilidad nutricional; y buena actividad antifitopatógenos. Con todas estas funcionalidades combinadas y concertadas, el γ -PGA, su sal y / o hidrogel de γ -poliglutamato parecen ser excelentes ingredientes para su uso en la renovación de la calidad del suelo para la estimulación del crecimiento y la protección de los cultivos agrícolas y otras plantas y semillas de efectos fitopatógenos. El enfoque para la integración de los efectos de la nutrición de las plantas, el pH del suelo, la actividad de agua en el suelo, y el complejo de fungicidas para la prevención de los síntomas y las enfermedades de las plantas causadas por fitopatógenos transmitidos por el suelo parece ser la dirección correcta y una mejor opción.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura química de γ -PGA (forma H) (A), γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de Na^+ forma, y γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ (B), y γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} y γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} (C). $\text{M(I)} = \text{K}^+$, Na^+ , o NH_4^+ $\text{M(II)} = \text{Ca}^{++}$ o Mg^{++} .

La Figura 2 muestra los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz de γ -poliglutamato en forma de Na^+ (A), γ -poliglutamato en forma de K^+ (B), y γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ (C) en D_2O a pH neutro y a una temperatura de 30 °C. El desplazamiento químico se midió en unidades ppm a partir del patrón interno. X indica pico de impureza.

La Figura 3 muestra los espectros de RMN de ^{13}C a de γ -poliglutamato en forma de K^+ (A), γ -poliglutamato en forma de Na^+ (B), y γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} (C) y γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} (D) en D_2O a pH neutro y a una temperatura de 30 °C. El desplazamiento químico se midió en unidades ppm a partir del patrón interno.

La figura 4 muestra los espectros de absorción en el infrarrojo (FT-IR) de γ -poliglutamato en forma de Na^+ (A) y γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ (B) en gránulo de KBr.

La Figura 5 muestra las curvas de titulación del pH del 10 % de γ -PGA con NaOH 0,2 N (A), 2 % de γ -PGA con Ca(OH)_2 y 4 % de γ -PGA con NH_4OH 5N (C) a 25 °C.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para mejorar el crecimiento de cultivos, plantas o semillas, el fortalecimiento simultáneamente del tallo de la planta y los troncos, el aumento de los rendimientos de los cultivos, y la mejora de la supresión de enfermedades fitopatógenas, que comprende un material que contiene γ -PGA, y / o su sal (en forma de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} o Mg^{++}), un hidrogel de γ -poliglutamato, un caldo de fermentación que comprende γ -PGA, su sal y / o hidrogel de γ -poliglutamato, o una mezcla de los mismos a los cultivos, plantas o semillas, o a los campos para el cultivo de los cosechas, plantas o semillas.

El γ -PGA, los γ -poliglutamatos (en forma de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++}) y los hidrogeles de γ -poliglutamato (preparados a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++}) poseen una excepcional capacidad de absorción de agua y de unión, y pueden retener de manera eficaz y liberar lentamente el agua retenida para un efecto de larga duración, que son importantes para el sector agrícola y en especial para las tierras secas o las áreas en condiciones de clima seco templado / caliente. La alta retención de agua puede mejorar en gran medida la actividad del agua en el suelo para la proliferación de microbios y también facilitar el transporte de los nutrientes hacia las semillas o raíces de las plantas, necesarios para el crecimiento.

Además, el γ -PGA y los γ -poliglutamatos (en forma de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++}) se pueden producir a partir de ácido L-glutámico mediante un proceso de fermentación sumergido (véase Kubota H. et al., 1993, Production of poly γ -glutamic acid) por *Bacillus subtilis* F-2-01, Biosci. Biotech. Biochem, 57 (7), 1212 - 1213 y Ogata Y. et al., 1997, Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermentation, Biosci. Biotech. Biochem., 61 (10), 1684 - 1687). El γ -PGA y los γ -poliglutamatos poseen excelentes propiedades de absorción del agua y sus propiedades polianiónicas se están explorando para aplicaciones en la solubilización y estabilización de los iones metálicos de Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Se^{++++} y Cr^{+++} en sistemas acuosos. Particularmente, el γ -PGA y los γ -poliglutamatos (en forma de Na^+ , K^+ y NH_4^+) reaccionan fácilmente con una sal de calcio o sal de magnesio, en condiciones neutras (véase Ho, G. H., 2005, γ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* var. natto Structural characteristics and its industrial application, Bioindustry, Vol. 16, No. 3, 172 – 182) para formar agua γ -poliglutamato de calcio o γ -poliglutamato de magnesio hidrosoluble y estable. Los complejos iónicos de γ -poliglutamato de calcio o γ -poliglutamato de magnesio proporcionan el ion Ca^{++} y el ion Mg^{++} fácilmente disponible para la necesidad nutricional para el crecimiento de las semillas e incluso son transportados de manera más efectiva a las raíces de la planta en crecimiento lo que resulta en una mejora total del crecimiento de las semillas de las plantas, raíces de las plantas, cultivos y otras plantas.

La adsorción de metales sobre γ -PGA implica dos posibles mecanismos: 1) la interacción directa de los iones metálicos con los sitios carboxílicos y (2) la retención de contraiones de metales pesados en forma móvil por el campo de potencial electrostático creado por los grupos COO^- . Además de las interacciones con los grupos carboxilato, las uniones amida también pueden proporcionar sitios de interacción débiles. Además de la estructura conformacional y la ionización del γ -PGA, es también importante conocer los tipos de especies metálicas hidrolizadas, que están presentes en solución acuosa. La formación de diversas especies diferentes puede llevar a diferentes capacidades de adsorción de iones metálicos.

Las estructuras moleculares del γ -PGA y los γ -poliglutamatos (en forma de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) se muestran en la Figura 1, los típicos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C y FT-IR se muestran en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Los datos de espectros y analíticos se resumen en la Tabla 1. Las curvas de titulación del pH se muestran en la Figura 5.

Tabla 1

ELEMENTO	H	Na^+	K^+	NH_4^+	Ca^{++}	Mg^{++}
a. RMN de ^1H (400MHz, D_2O , 30 °C) Desplazamiento químico en ppm: α CH β CH_2 γ CH_2		3,98 1,98, 1,80 2,19	4,00 1,99, 1,80 2,19	3,68 1,68, 1,48 1,93	4,18 2,16, 1,93 2,38	4,08 2,05, 1,88 2,31
b. RMN de ^{13}C (67,9 MHz, D_2O , 30 °C) Desplazamiento químico en ppm: α CH β CH_2 γ CH_2 CO COO^-		56,43 31,61 34,01 182,21 182,69	62,21 35,16 39,74 182,11 185,46		6 2,21 36,17 39,68 182,16 185,82	62,10 35,11 39,60 182,12 185,16
a. Absorción en FT-IR (KBr), cm^{-1} C=O, estiramiento Amida I, flexión N-H Amida II, estiramiento C=O, estiramiento simétrico C-N, estiramiento N-H, flexión oop O-H, estiramiento	1739	1643 1585 1454 1162 698 3449	1643 1585 1402 1131 707 3436	1643 1395 1139 685 3443	1622 1412 1116 669 3415	1654 1411 1089 616 3402
b. Análisis térmico: Agua hidratada Temperatura de deshidratación, °C T_m , °C T_d , °C	0	10 % 109. 206 209,8	42 % 139. 193.238 341	219 223	20 % 110 335,7	40 % 122 160. 331,8

El γ -PGA es un polímero de ácido glutámico con un grado de polimerización que varía desde 1.000 hasta 20.000 y está formado sólo en el enlace γ -peptídico entre los restos de glutámico. El γ -PGA contiene una amina terminal y múltiples grupos de ácido alfa-carboxílico. El polímero generalmente existe en varios estados conformacionales: α -hélice, bucle aleatorio, lámina β , región de transición hélice-bucle y agregación con cubierta, dependiendo de las condiciones ambientales tales como el pH, la fuerza iónica y otras especies catiónicas. Con dicroísmo circular

("DC"), la cantidad de forma helicoidal presente se mide normalmente en función de la magnitud de los espectros a 222 nm. La transición hélice-bucle tiene lugar desde aproximadamente un pH 3-5 para la forma libre del γ -PGA en solución acuosa homogénea, y cambia a un pH mayor, de 5-7, para una forma unida. La transición del bucle aleatorio a la agregación con envoltura se produce cuando se quelan con ciertos iones metálicos divalentes y algunos superiores a través del cambio conformacional drástico de γ -PGA.

El γ -PGA puede formar cuatro tipos de enlaces de hidrógeno en cada tres restos de glutámico consecutivos (véase Rydon H. N., 1964, Polypeptides, Part X, The optical rotary dispersion of poly γ -D-glutamic acid, J. Chem. Soc., 1928 - 1933), en comparación con sólo 1 de enlaces de hidrógeno en cada 3,6 unidades de los residuos de aminoácidos que se encuentran en la mayoría de las proteínas, y, por lo tanto, posee una hidrofiliidad fuerte excepcional. Sus estados conformacionales también desempeñan papeles importantes como vehículos y estimulantes para muchas otras funciones biológicas, incluyendo actividades contra fitopatógenos. La combinación de todas las propiedades anteriormente mencionadas, el γ -PGA y su sal y / o hidrogel γ -poliglutamato se pueden usar en el acondicionamiento del suelo o la renovación del suelo para facilitar el crecimiento de los cultivos agrícolas y como biocidas agrícolas en el control de fitopatógenos, simultáneamente.

En una realización de la presente invención, el hidrogel de γ -poliglutamato se prepara a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} , γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} , o una mezcla de los mismos reticulados con poliglicidiléter de diglicerol, poliglicidiléter de poliglicerol, poliglicidiléter de sorbitol, poliglicidiléter de polioxietilensorbitol, poliglicidiléter de polisorbitol, o diglicidiléter de polietilenglicol, o una mezcla de los mismos. En otra realización de la presente invención, el hidrogel de γ -poliglutamato se prepara a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} , γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} , o una mezcla de los mismos reticulados mediante irradiación con haces de rayos gamma o electrones.

De acuerdo con la presente invención, el material que contiene γ -PGA y / o su sal, un hidrogel de γ -poliglutamato, un calo de fermentación que comprende γ -PGA, su sal y / o el hidrogel de γ -poliglutamato, o una mezcla de los mismos se utiliza como un biocida, un hidratante para el acondicionamiento y la renovación del suelo, un estimulante del crecimiento para la pulverización sobre las hojas de la planta, un agente quelante para eliminar un metal pesado presente en el campo para el cultivo de las cosechas, las plantas, o semillas, y / o un agente de formación de complejos para formar calcio y / o magnesio soluble. Cuando el material de la presente invención mencionado anteriormente se aplica a las semillas, recubre las semillas.

Además, el material antes mencionado se puede disolver en un disolvente polar, tal como etanol o metanol, o agua y se ajusta el pH en un intervalo de 5,0 a 8,0. La concentración de γ -PGA y / o su sal en los intervalos del disolvente polar o agua varía de 0,001 % en peso a 15 % en peso. Además, el material anteriormente mencionado tiene una relación de D- a partir de ácido y / o glutamato glutámico a la forma L del ácido glutámico y / o glutamato de 90 %: 10 % a 10 %: 90 %, preferiblemente de 65 %: 35 % a 35 %: 65%.

Métodos experimentales de la invención

Una cantidad comercial de γ -PGA y sus sales, γ -poliglutamatos (en las formas de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) pueden producirse en un proceso de fermentación en inmersión *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. natto (véase Naruse N., Tenmyo O. and Kobaru S., 1990, Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, J. Antibiot. Japan, 43:267 - 280) o *Bacillus licheniformis* (véase Vollenbroich D., Paul G., Ozel M. y Vater J., 1997, Antimycoplasma properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, Appl. Environ. Microbiol., 63:44 - 49) usando ácido L-glutámico y glucosa como reservas principales de alimentos. Los medios de cultivo microbianos contienen una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales inorgánicos y otros nutrientes en una cantidad adecuada. Por lo general, la cantidad de ácido L-glutámico se utiliza a una concentración que varía de 3 a 12 %. La glucosa a una concentración de 5-12 % y ácido cítrico a una concentración de 0,2 a 2 % se utilizan como fuente de carbono parcial. Se utilizan peptona y sulfato amónico (o urea o NH_3) como fuentes de nitrógeno. Se usan extracto de levadura y biotina como fuentes de nutrientes. Se usan Mn^{++} , Mg^{++} y NaCl como fuentes minerales. Con aireación y agitación adecuadas, el cultivo se mantiene a una temperatura de 30 a 40 °C, y el pH se mantiene a 6-7,5 mediante el uso de una solución de urea, NH_3 , o una solución de hidróxido sódico. El tiempo de cultivo se continúa normalmente durante un período de 48 a 84 horas. El γ -PGA y sus sales, γ -poliglutamatos se acumulan extracelularmente.

El γ -PGA y sus sales, γ -poliglutamatos (en las formas de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) normalmente se extraen del caldo de fermentación mediante una serie de procedimientos, incluyendo ultracentrifugación, o filtración a presión para separar las células, añadiendo después de 3 a 4 veces de etanol para precipitar el γ -PGA y sus sales. Los precipitados se vuelven a disolver en agua y otra porción de etanol se utiliza para precipitar γ -PGA y sus sales. Las etapas de disolución-precipitación se repiten varias veces con el fin de recuperar el γ -PGA puro y sus sales.

El γ -PGA y sus sales, γ -poliglutamatos (en las formas de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) normalmente se disuelven en un disolvente adecuado tal como agua, etanol o metanol y el pH se ajusta de 5,0 a 7,5. Los múltiples agentes de reticulación químicos funcionales adecuadamente seleccionados, tales como poliglicidiléteres de poliglicerol,

poliglicidiléteres basados en sorbitol, diglicidiléter de polietilenglicol o triacrilato de trimetilolpropano se añaden a la solución con agitación constante, a una tasa de dosis que varía desde 0,01 a 20 % del peso del γ -PGA y sus sales, dependiendo del tipo de agentes de reticulación y la calidad de los hidrogeles requeridos. La reacción de gelificación se completa normalmente en 1 a 4 horas a una temperatura de reacción desde 50 a 120 °C dependiendo del equipo

utilizado y las condiciones. Los hidrogeles formados se liofilizan después para producir γ -PGA reticulado seco y sus sales, hidrogeles de γ -poliglutamato (preparados a partir de γ -poliglutamatos en las formas de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}), que poseen la capacidad de absorción de agua excepcional, no son solubles en agua y forman hidrogeles incoloros, transparentes y biodegradables cuando se hinchan completamente en agua.

El γ -PGA y sus sales, γ -poliglutamatos (en las formas de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) con peso molecular que varía de 5.000 a 900.000 pueden producirse mediante la hidrólisis ácida controlada en condiciones de reacción seleccionadas específicas de pH, temperatura, tiempo de reacción y concentración de γ -PGA. El pH se puede ajustar de 2,5 a 6,5 con un acidulante adecuado, tal como HCl, H_2SO_4 , u otros ácidos orgánicos, la temperatura de hidrólisis puede controlarse en el intervalo de 50 a 100 °C, el tiempo de reacción es de 0,5 a 5 horas, y la concentración de γ -PGA con un peso molecular de 1×10^6 y mayor puede ser cualquier concentración tan conveniente como sea necesario. Después de completar la reacción, otra purificación con diálisis o filtración de membrana y secado son necesarios para producir γ -PGA de pureza alta y de peso molecular pequeño y mediano, y sus sales, γ -poliglutamatos (en las formas de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) de elección. La velocidad de hidrólisis ácida es más rápida a pH más bajo, una temperatura más alta, y una mayor concentración de γ -PGA. Las sales de γ -poliglutamato se pueden producir mediante la reacción de γ -PGA seleccionado con solución de hidróxido básico u óxido básico de iones metálicos (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) de elección, y el pH se ajusta a la condición deseada desde 5,0 a 7,2 según se requiera.

Ejemplos experimentales

A fin de explicar adicionalmente la invención sujeto con detalle, a continuación se presentan ejemplos experimentales para demostrar que la presente invención puede usarse para lograr el presente propósito.

Ejemplo experimental 1

Se prepararon 300 l de caldo de cultivo que contiene extracto de levadura al 0,5 %, 1,5 % de peptona, 0,3 % de urea, 0,2 % de K_2HPO_4 , 10 % de ácido L-glutámico monosódico, 8 % de glucosa, a pH 6,8, y se añadió a un fermentador de 600 l, y después esterilizó con vapor siguiendo el procedimiento estándar. Después se inoculó *Bacillus subtilis* y la solución de NaOH al 10 % se utiliza para controlar el pH. La fermentación se continuó a 37 °C durante 96 horas. El contenido de γ -PGA en el caldo de cultivo alcanzó 40 g / l. Se extrajeron alícuotas de 15 gramos de caldo de cultivo y se transfirieron a cada una de las tres botellas con tapa de 50 ml de la muestra. Después se extrajo una cantidad de 600 μl de los poliglicidiléteres de glicerol o sorbitol y se transfirieron a las botellas para muestras que contienen caldo de cultivo, y se taparon. Después se dejó que las mezclas de reacción reaccionaran a 60 °C durante 24 horas en un incubador con agitador, girando a una velocidad media. Las mezclas reaccionadas se extrajeron de las botellas de muestra de 20 ml y se sumergieron en agua suficiente a 4 °C durante la noche. Los hidrogeles se formaron después de la hidratación e inflado. Después, los hidrogeles se filtraron con un tamiz metálico de malla 80, y se drenaron para secar. Se midieron y registraron los pesos de los hidrogeles hinchados sin agua libre obvia. Los geles se volvieron a empaquetar con suficiente agua a 4 °C en el mismo vaso de precipitados durante la noche. El mismo procedimiento se repitió durante 5 días consecutivos. Las tasas de absorción de agua se determinaron como se muestra en la Tabla 2.

Determinación de la tasa de absorción de agua de los hidrogeles de γ -poliglutamato:

Las muestras pesadas (W_1) de los hidrogeles secos se impregnaron en una cantidad excesiva de agua, y se dejaron en el agua durante el inflado durante la noche para lograr la hidratación más alta. Se usó un tamiz metálico de malla 80 para filtrar los hidrogeles hidratados para eliminar el agua libre y se drenaron hasta sequedad. A continuación se pesó el hidrogel seco (W_2). La cantidad de agua absorbida (W) se define como la diferencia: $W = W_2 - W_1$.

$$\text{La tasa de absorción de agua, } X = W / W_1 = (W_2 - W_1) / W_1$$

Tabla 2: La tasa de absorción de agua del hidrogel de γ -poliglutamato (Na^+) hecho de caldo de fermentación con diferentes agentes de reticulación

Agente de reticulación	Tiempo de reacción, horas	Tasa de absorción, X	Observación
Poliglicidiléter de di-glicerol	24	4450	Tridimensional
Poliglicidiléter de poliglicerol	24	4560	Tridimensional
Poliglicidiléter de polioxietilensorbitol	24	4480	Tridimensional

Ejemplo experimental 2

De acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo Experimental 1, se utilizaron muestras de soluciones de γ -PGA con 5 % de sodio y poliglicidiléter de diglicerol como el compuesto de poliglicidilo de reticulación en otro conjunto de experimentos. El pH se ajustó adicionalmente a aquellos como se muestra en la Tabla 3. Las mezclas de reacción se introdujeron un agitador de cultivo, con rotación a una velocidad media. La reacción se dejó continuar a 60 °C durante 24 horas. Después de completada la reacción, las tasas de absorción de agua se determinaron y los resultados se mostraron en la Tabla 3.

10 Tabla 3: Tasa de absorción de agua de los hidrogeles de γ -poliglutamato (forma de Na^+) producidos a diferentes valores de pH

pH	Tasa de absorción de agua (X)	Observación
4	435	Tridimensional
5	610	Tridimensional
6	3450	Tridimensional
7	4550	Tridimensional

Ejemplo experimental 3

15 De acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo Experimental 1, se utilizó una muestra de soluciones de γ -PGA con 5 % de sodio y poliglicidiléter de diglicerol como tal en otro conjunto de experimentos. Las soluciones se ajustaron a pH 6,0. Se usaron varias cantidades de poliglicidiléter de diglicerol para las reacciones de reticulación. La reacción se dejó continuar a 60 °C durante 24 horas. Las tasas de absorción de agua para las muestras en diversos momentos determinados de hidratación y los resultados se muestran en la Tabla 4.

20 Tabla 4: Tasa de hidratación e inflado diferente de los hidrogeles de γ -poliglutamato (en forma de Na^+) a 4 °C

Poliglicidiléter de diglicerol, %	Tasa de absorción, X				
	Tiempo de inflado/hidratación, horas				
	24	48	72	96	120
2	450	1250	2350	4050	4150
3	459	1103	2200	4100	4280
4	-----	-----	2090	4010	4120

Ejemplo experimental 4

25 De acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo Experimental 1, se inoculó *Bacillus subtilis* y el crecimiento del cultivo fue de la misma manera que se muestra en el Ejemplo Experimental 1. Las muestras del caldo de cultivo en un momento de crecimiento diferente se retiraron del fermentador para su uso en este conjunto de experimento. Se usó poliglicidiléter de diglicerol fue como el agente de reticulación. Las soluciones se ajustaron a pH 6,0. La reacción se dejó continuar a 60 °C durante 24 horas. Siguiendo el mismo método llevado a cabo en el Ejemplo Experimental

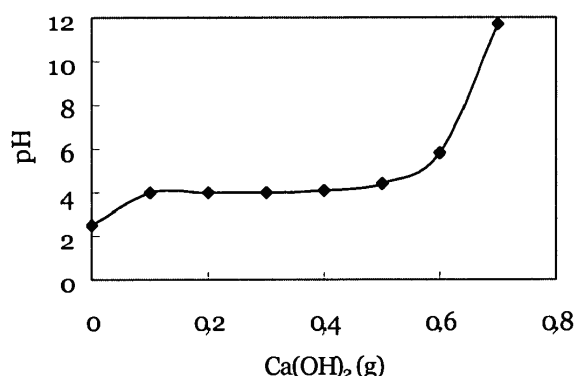
30 1. Los resultados de las tasas de adsorción de agua a diferentes tiempos de cultivo se mostraron en la Tabla 5.

Tabla 5: Las tasas de absorción de agua del hidrogel de γ -poliglutamato (en forma de Na^+) a 4 °C formado a partir del cultivo microbiano a diferentes tiempos de fermentación

Tiempo de cultivo, horas	Tasa de absorción de agua, X	Observación
48	2600	Tridimensional
72	3050	Tridimensional
84	3000	Tridimensional
96	3550	Tridimensional

Ejemplo experimental 5

La alta solubilidad del γ -poliglutamato de calcio a y cerca del pH neutro, y una buena capacidad de tamponamiento del pH (en el intervalo de pH 4 a 7.0) como se muestra en la curva de titulación del pH en la figura siguiente (es decir, la Figura 5, B) son beneficiosos en el acondicionamiento del suelo para facilitar el crecimiento de las semillas, las raíces y las plantas.



Ejemplo experimental 6

- 5 Se investigó la eficacia de γ -poliglutamato (en forma de Na^+) y del hidrogel de γ -poliglutamato (preparado a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+) contra el crecimiento o la inhibición de la población de patógenos agrícolas. Se siguió el método del Agar de dextrosa de patata estándar (disco de PDA). Se midió la inhibición del crecimiento de patógenos. Se usaron las concentraciones de γ -poliglutamato (en forma de Na^+) y del hidrogel de γ -poliglutamato (preparado a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+) en el intervalo de 1 % a 5 % en el estudio de inhibición.
- 10 **Preparación de la solución de muestra patógeno:**

- Se inocularon determinadas muestras de patógenos en el centro de un disco simple de agar de dextrosa de patata ("PDA"), a continuación se incubaron a 25 °C durante un período de 3 a 9 días antes de su uso, dependiendo de la clase de patógenos. Una muestra de 4 mm de diámetro de disco de PDA de patógeno completamente cultivado se obtuvo con un perforador esterilizado de 4 mm y se depositó sobre el centro de un nuevo disco de PDA y se almacenó en una incubadora a 25 °C como fuente de la muestra de reserva.
- 15

Preparación de muestras de solución de γ -poliglutamato al 10 % (en forma de Na^+):

- 20 Tres gramos de la muestra de γ -poliglutamato (en forma de Na^+) se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 200 ml y se añadieron 27 ml de agua estéril para hacer una solución de muestra diluida 10 veces. Después, el matraz de la muestra se agitó con un agitador recíproco a 200 rpm, 30 °C durante 1 hora. El matraz se incubó adicionalmente en un baño de agua a 60 °C y se mantuvo durante otros 30 minutos una vez que la temperatura ha alcanzado los 60 °C antes de usar.
- 25

Preparación de muestras de caldo de fermentación de γ -poliglutamato al 50 % (en forma de Na^+):

- 50 ml de las muestras del caldo de fermentación frescas se transfirieron a un matraz estéril y se añadieron 50 ml de agua estéril, se mezclaron bien y se ultracentrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos para separar las células. A continuación, la solución transparente superior se pasó a través de una membrana de microfiltración de 0,4 μm para su uso como una solución de caldo de fermentación al 50 %.
- 30

- Para probar la eficacia de cada concentración de la muestra, se prepararon 100 ml de los medios de PDA que contienen 100 ppm de sulfato de neomicina para evitar cualquier contaminación de la microflora del medio ambiente. El disco de los medios de PDA que contienen solo 100 ppm de sulfato de neomicina se utilizó como control. Los 100 ml de medio de PDA se dispensaron igualmente en 5 discos de Petri de 9 cm de diámetro. Después de la solidificación, una pieza de muestras de patógenos de 4 mm se inoculó en el centro de cada disco de Petri de PDA. A continuación, se incubó a 25 °C con la muestra de patógenos hacia abajo. Se utilizaron cinco conjuntos multiplicados. Hasta que el disco de control creció completamente con el patógeno, se registró el diámetro del crecimiento, mm, de cada concentración de la muestra.
- 35
- 40

Cultivo doble con agar nutriente ("NA") para el experimento de inhibición de bacterias patógenas:

- Las bacterias patógenas se prepararon de modo que tuvieran una concentración de 10^{7-8} ufc / ml, se transfirieron 0,1 ml en cada disco de Petri NA y se extendieron de forma uniforme. A continuación, se depositaron 2 piezas de 1,0 cm de diámetro de papel de filtro que contiene la muestra de ensayo de diferentes concentraciones. Se utilizaron conjuntos por triplicado de la prueba. El papel de filtro que no contenía las muestras de ensayo se utilizó como control. El disco de NA Petri se incubó a 25 °C durante 2-4 días.
- 45

- 50 Se registraron los diámetros de las áreas de crecimiento.

Después, los patógenos agrícolas se analizaron para determinar su inhibición del crecimiento por γ -poliglutamato (en

forma de Na⁺), hidrogel de γ -poliglutamato (preparado a partir de γ -poliglutamato en la forma de Na⁺) y caldo de fermentación de γ -poliglutamato (en forma de Na⁺), respectivamente. Los resultados se muestran en las Tablas 6, 7, 8, 9, y 10, respectivamente.

5 Tabla 6: La inhibición del crecimiento de patógenos por γ -poliglutamato (en forma de Na⁺)

Patógenos analizados	Inhibición del crecimiento miceliar en 48 horas, cultivado en PDA	Concentración de γ -poliglutamato (en forma de Na ⁺) Mol. en peso. = 500k Dalton
Especies fúngicas:		
<i>Sclerotium rolfsii</i>	0 %	0,5 %
<i>Sclerotium rolfsii</i>	0 %	1,0 %
<i>Rhizoctonia solani</i>	15 - 25 %	0,5 %
<i>Rhizoctonia solani</i>	30 - 50 %	1,0 %
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Anocctochilum</i>	15 - 25 %	0,5 %
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Anocctochilum</i>	15 - 25 %	1,0 %
<i>Phytophthora capsici</i>	0 %	1,0 %
<i>Pythium aphanidermatum</i>	0 %	1,0 %
<i>Pythium myriotylum</i>	0 %	1,0 %
Especies de bacterias:		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	> 50 %	0,5 %
<i>Erwinia carotovora</i>	15 - 25 %	0,5 %
<i>Erwinia carotovora</i>	30 - 50 %	1,0 %

Tabla 7: La inhibición del crecimiento de patógenos por caldo de fermentación de γ -poliglutamato (en forma de Na⁺)

Patógenos analizados	Inhibición del crecimiento miceliar en 48 horas, cultivado en PDA	Concentración del caldo de fermentación de γ -poliglutamato (en forma de Na ⁺)
Especies fúngicas:		
<i>Sclerotium rolfsii</i>		1 %
<i>Sclerotium rolfsii</i>	15 - 25 %	5 %
<i>Rhizoctonia solani</i>	0 %	1 %
<i>Rhizoctonia solani</i>	15 - 25 %	5 %
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Fsp. Niveum</i>	10 - 20 %	5 %
<i>Phytophthora capsici</i>	0 %	5 %
<i>Pythium aphanidermatum</i>	0 %	5 %
<i>Pythium myriotylum</i>	0 %	5 %
Especies de bacterias:		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	0 %	1 %
<i>Ralstonia solanacearum</i>	30 - 50 %	5 %
<i>Erwinia carotovora</i>	0 %	5 %

10 Tabla 8: La inhibición del crecimiento de patógenos por caldo de fermentación de γ -poliglutamato (en forma de Na⁺) (cultivo doble con disco de papel en agar de nutrientes)

Patógenos analizados	Inhibición en la zona de crecimiento en 48 horas	Concentración del caldo de fermentación de γ -poliglutamato (en forma de Na ⁺)
Especies de bacterias:		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	0,6 - 1,0 cm	5 %
<i>Erwinia carotovora</i>	0,0	5 %

Tabla 9: La inhibición del crecimiento de patógenos por hidrogeles de γ -poliglutamato (preparados a partir de γ -poliglutamato en forma de Na⁺)

Patógenos analizados	Inhibición del crecimiento miceliar en 48 horas, cultivado en PDA	Concentración del hidrogel de γ -poliglutamato (Na ⁺)
Especies fúngicas:		
<i>Sclerotium rolfsii</i>	51 - 75 %	1 %
<i>Rhizoctonia solani</i>	25 - 50 %	1 %
<i>Fusarium oxysporum</i>	10 - 25 %	1 %
<i>Phytophthora capsici</i>	25 - 50 %	1 %
<i>Pythium aphanidermatum</i>	25 - 50 %	1 %
<i>Pythium myriotylum</i>	25 - 50 %	1 %

Tabla 10: La inhibición del crecimiento de patógenos por hidrogel de γ -poliglutamato (preparados a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+)

Patógenos analizados	Inhibición sobre el crecimiento en 48 horas, cultivo doble en la zona de inhibición del agar de nutrientes* (radio)	Concentración del hidrogel de γ -poliglutamato (en forma de Na^+)
Especies de bacteria:		
Ralstonia solanacearum	> 15 mm	1 %
Erwinia carotovora	10 - 15 mm	1 %
Nota: Zona de inhibición* = (zona de disco de papel tratado) – (zona del disco del tamaño de papel blanco o disco de PGA, 0,5 cm)		

Ejemplo experimental 7

Estudio sobre el crecimiento de sandía Diana en un campo de granja abierto en una granja agrícola de Silo:

Un campo de granja abierto de 1.000 m² de área (10 m x 10 0m) se dividió en 2 lotes iguales de 5M x 100M mediante un canal de 20 cm de anchura x 25 cm de altura. Los lotes se diseñaron como el lote A y el lote B. El lote A se utiliza para el conjunto de control, y el lote B es para el grupo experimental. 2 piezas de plantas jóvenes de 1 semana de edad de sandía Diana se plantaron a una distancia de 1 m separados para ambos lotes. Los fertilizantes regulares y de riego siguen el programa y los procedimientos estándar, se utilizó Taiwán Fertilizante Orgánico N° 39 (12/18/12) y se aplicó irrigación 3 veces al lote A y los fluidos de irrigación enriquecidos con el caldo de fermentación de γ -PGA que contienen 3,5 % de γ -PGA (forma de Na^+) a una tasa de dosis de 0,75 kg / por 500 M² se aplicaron para el lote B, el caldo de fermentación de γ -PGA se diluyó aproximadamente 300 veces. Las irrigaciones se aplicaron tres veces en un intervalo de 20 días entremedias. La irrigación se realizó al mismo tiempo tanto para el Lote A como para el Lote B, con la bomba de agua controlada automáticamente, y se aplicaron cantidades iguales de fluidos tanto al Lote A como al Lote B. Las sandías Diana sandías se cosecharon al final de 60 días, y los resultados se evaluaron y mostraron en la Tabla 11.

Tabla 11. El efecto del caldo de fermentación de γ -PGA que contiene 3,5 % de γ -PGA (en forma de Na^+) sobre el crecimiento de sandías Diana.

	Días del periodo de recolección	Tamaño promedio* en el diámetro horizontal cm	Rendimiento relativo en el mismo periodo, %	Calidad del aspecto
Lote A (control)	15	21	100 %	Liso/brillante
Lote B (ensayo)	25	26	125 %	Liso/brillante
% de incremento, 100 % x(B-A)/A	66,7 %	30 %	25 %	
Nota: * --- el tamaño promedio de 10 muestras al azar de sandía Diana				

Ejemplo experimental 8

Estudio sobre el crecimiento de pimiento dulce en un campo agrícola abierto en una granja de Chia-Yi:

En un estudio de campo abierto similar al mostrado en el Ejemplo Experimental 7, usando plantas de pimiento dulce de 1 semana de edad en lugar de sandías Diana. Los pimientos dulces se recogieron al final de los 60 días después de la plantación. Los resultados se evaluaron y se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. El efecto del caldo de fermentación de γ -PGA que contiene 3,5 % de γ -PGA (en forma de Na^+) sobre el crecimiento de pimiento dulce.

	Aspecto	Tamaño promedio* en el diámetro horizontal en cm	Dulzor medio de los zumos Brix°	Rendimiento promedio por 100 m ² , %
Lote A (control)	Liso/brillante	8,3 cm	9,3	100 %
Lote B (ensayo)	Liso/brillante	10,2 cm	10,7	122 %
% de incremento, 100 % x(B-A)/A		23,8 %	15,1 %	22 %
Nota: * --- Tamaño promedio de 10 muestras aleatorias de pimientos dulces.				

Ejemplo experimental 9

Estudio sobre el crecimiento de Astragalus Membranaceus en un campo agrícola abierto en una estación agrícola de Taichung

En un estudio de campo abierto similar al mostrado en el Ejemplo Experimental 7, se usó la antigua hierba medicinal a oriental Astragalus Membranaceus en lugar de sandías Diana. Se usaron plantas jóvenes de Astragalus

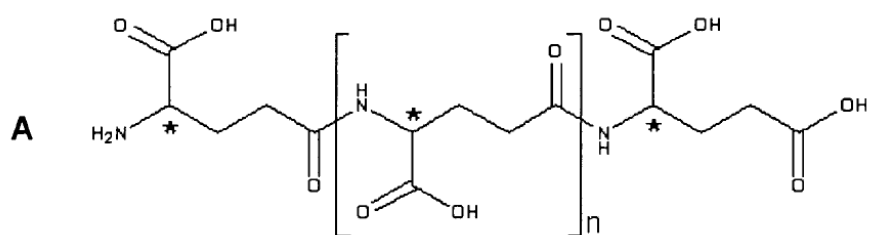
Membranaceus de 1 semana. El suelo se fertilizó primero con un fertilizante orgánico Champion 280 (12 - 8-10) enriquecido con 2 % de magnesio soluble. Después de sembrar las plantas jóvenes, 2 agujeros con un diámetro de 1,5 pulgadas y 10 cm de profundidad se perforaron alrededor de los lados de las plantas a 20 cm de distancia de las plantas para la adición posterior de fertilizante adicional y el caldo de fermentación de γ -PGA que contiene 3,5% de γ -PGA (en forma de Na^+). Los 2 agujeros se localizaron en los lados de las plantas opuestos. Se añadieron dos fertilizantes adicionales a intervalos de 24 días después de plantar las plantas jóvenes. Para cada adición de los fertilizantes, se usó fertilizante orgánico Taiwán N° 39 (12/18/12a 60 g / por agujero junto con 500 ml del caldo de fermentación de γ -PGA diluido 300 veces que contiene 3,5 % de γ PGA (en forma de Na^+). Al final de 96 días, se recogieron los árboles de Astragalus Membranaceus y se recogieron las raíces y se lavaron Las raíces y las hojas frescas se evaluaron y los resultados se mostraron en la Tabla 13.

Tabla 13.El efecto del caldo de fermentación de γ -PGA que contiene 3,5 % de γ -PGA (en forma de Na^+) sobre el crecimiento de Astragalus Membranaceus.

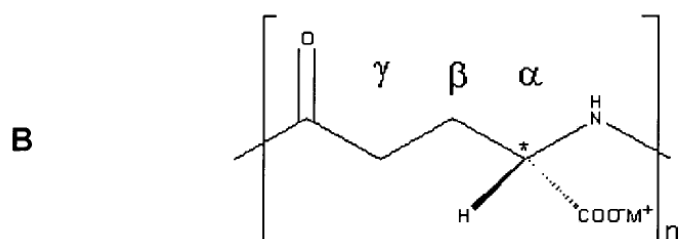
	Longitud promedio de la hoja* en cm	Longitud promedio de la raíz* en cm	Diámetro promedio de la raíz principal* en cm	Número promedio de raíces pequeñas	Color de la raíz principal
Lote A (control)	11,5	18,5	1,45	10	Blanco brillante
Lote B (ensayo)	16,6	26,8	2,17	15	Blanco brillante
% de incremento, $100 \times (B-A)/A$	44,3 %	44,8 %	49,6 %	50 %	

REIVINDICACIONES

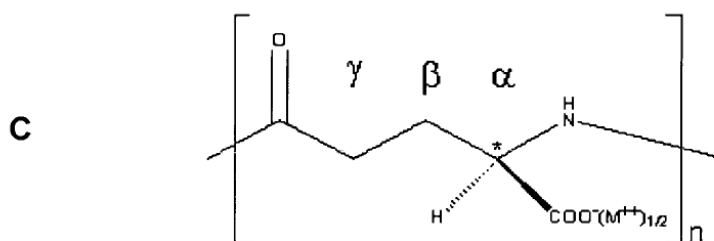
1. Un método para mejorar la supresión de una enfermedad fitopatogénica, donde el método comprende aplicar un material que comprende ácido γ -poliglutámico (" γ -PGA," forma H) y / o su sal, un hidrogel de γ -poliglutamato, un
5 caldo de fermentación que comprende γ -PGA, su sal y / o un hidrogel de γ -poliglutamato, o una mezcla de los mismos, a los cultivos, plantas o semillas, o a un campo para el cultivo de la cosecha, planta o semilla.
2. Un método de la reivindicación 1, donde la sal es γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} o γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} .
10
3. Un método de la reivindicación 1, donde el hidrogel de γ -poliglutamato se prepara a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} , γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} , o una mezcla de los mismos reticulados con poliglicidiléter de diglicerol, poliglicidiléter de poliglicerol, poliglicidiléter de sorbitol, poliglicidiléter de polioxietilensorbitol, poliglicidiléter de polisorbitol o diglicidiléter de polietilenglicol, o una mezcla de los mismos.
15
4. Un método de la reivindicación 1, donde el hidrogel de γ -poliglutamato se prepara a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} , γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} , o una mezcla de los mismos reticulados mediante irradiación con haces de rayos gamma o electrones.
20
5. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el material se utiliza como un biocida, un hidratante para el acondicionamiento y renovación del suelo, un estimulante del crecimiento para la pulverización sobre la hoja de la planta, o para irrigar el cultivo o el campo de cultivo o de la planta, un agente quelante para la
25 eliminación de un metal pesado presente en el campo para el cultivo de la cosecha, planta o semilla, y / o un agente de formación de complejos para formar calcio y / o magnesio soluble.
6. Un método de la reivindicación 5, donde el material recubre la semilla.
7. Un método para mejorar el crecimiento de un cultivo, una planta, o una semilla, reforzando de forma simultánea el fortalecimiento un tallo y / o el tronco de la planta, y / o aumentando el rendimiento de un cultivo, donde el procedimiento que comprende aplicar un material que comprende un hidrogel de γ -poliglutamato, un caldo de fermentación que comprende un hidrogel de γ -poliglutamato, o una mezcla de los mismos a los cultivos, plantas o
30 semillas, o a un campo para el cultivo de la cosecha, planta o semilla, donde el hidrogel de γ -poliglutamato se prepara a partir de γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} o γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} , o una mezcla de los mismos, se reticula con poliglicidiléter de diglicerol, poliglicidiléter de poliglicerol, poliglicidiléter de sorbitol, poliglicidiléter de polioxietilensorbitol, poliglicidiléter de polisorbitol, o diglicidiléter de polietilenglicol, o una mezcla de los mismos.
35
8. Un método de la reivindicación 7, donde el material comprende además γ -PGA y / o su sal.
9. Un método de la reivindicación 8, donde la sal es γ -poliglutamato en forma de Na^+ , γ -poliglutamato en forma de K^+ , γ -poliglutamato en forma de NH_4^+ , γ -poliglutamato en forma de Mg^{++} o γ -poliglutamato en forma de Ca^{++} .
10. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde los materiales se utilizan como un hidratante para el acondicionamiento y renovación del suelo, un estimulante del crecimiento para la pulverización sobre la hoja de la planta, o para irrigar el cultivo o el campo de cultivo o de la planta, un agente quelante para la eliminación de un metal pesado presente en el campo para el cultivo de la cosecha, planta o semilla, y / o un agente de formación de complejos para formar calcio y / o magnesio soluble.
45
11. Un método de la reivindicación 10, donde el material recubre la semilla.
12. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8 a 11, donde el material se disuelve en un disolvente polar o agua y el pH se ajusta a un valor en el intervalo de 5,0 a 8.
50
13. Un método de la reivindicación 12, donde la concentración de γ -PGA y / o su sal está en el intervalo de 0,001 % a 15 %.
14. Un método de la reivindicación 12, donde la concentración del hidrogel de γ -poliglutamato en el intervalo de 0,001 % a 10 %.
60
15. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el material tiene una relación de la forma D de ácido glutámico y / o glutamato y la forma L de ácido glutámico y / o glutamato de 90 %: 10 % a 10 %: 90 %.
65
16. Un método de la reivindicación 15, donde la relación es de 65 %: 35 % a 35 %: 65 %.



ácido γ -poliglutámico (o γ -PGA)



Unidad de repetición de M(I) γ -poli-(L)-glutamato
 $[M(I) \gamma - (L) - PGA]$



Unidad de repetición de M(II)_{1/2} γ -poli-(D)-glutamato
 $[M(II)_{1/2} \gamma - (D) - PGA]$

Figura 1. Estructura química del ácido γ -poliglutámico (γ -PGA) y las sales de γ -PGA.
 A- la forma acidificada de γ -PGA, B – el M(I) γ -PGA, C – el M(II)_{1/2} γ -PGA,
 donde M(I)=K⁺, Na⁺, o NH₄⁺ M(II)=Ca⁺⁺ o Mg.

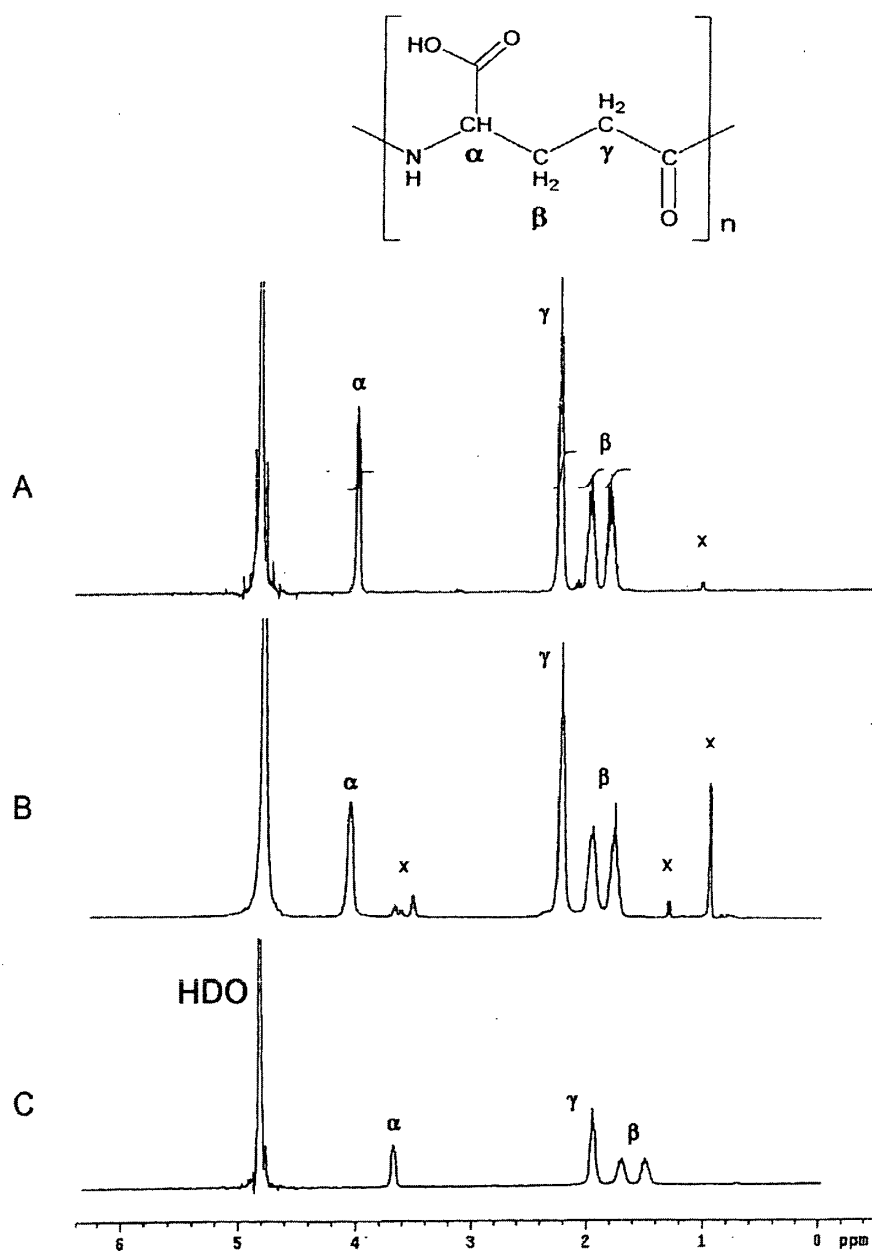


Figura 2: Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de M^+ γ -poliglutamato en D_2O a pH neutro y a temperatura de 30 °C. El desplazamiento químico se midió en unidades ppm con respecto al patrón interno. A – γ -poliglutamato sódico, B – γ -poliglutamato potásico, C – γ -poliglutamato amónico. X indica pico de impureza.

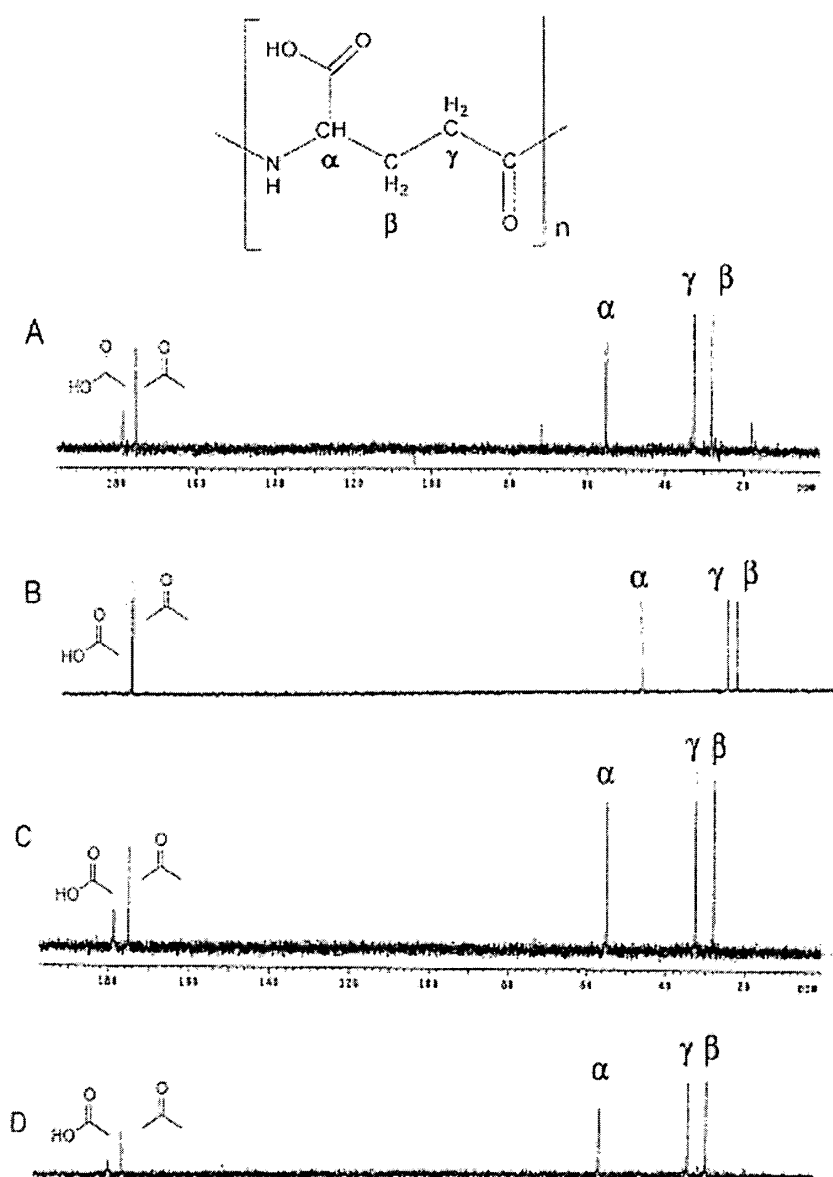


Figura 3: Espectro de RMN de ^{13}C (67,9 MHz) de γ -poliglutamatos en D_2O a pH neutro y a temperatura de 30 °C. El desplazamiento químico se midió en unidades ppm con respecto al patrón interno. A – γ -poliglutamato potásico, B – γ -poliglutamato sódico, C – γ -poliglutamato cálcico, D- γ -poliglutamato de magnesio.

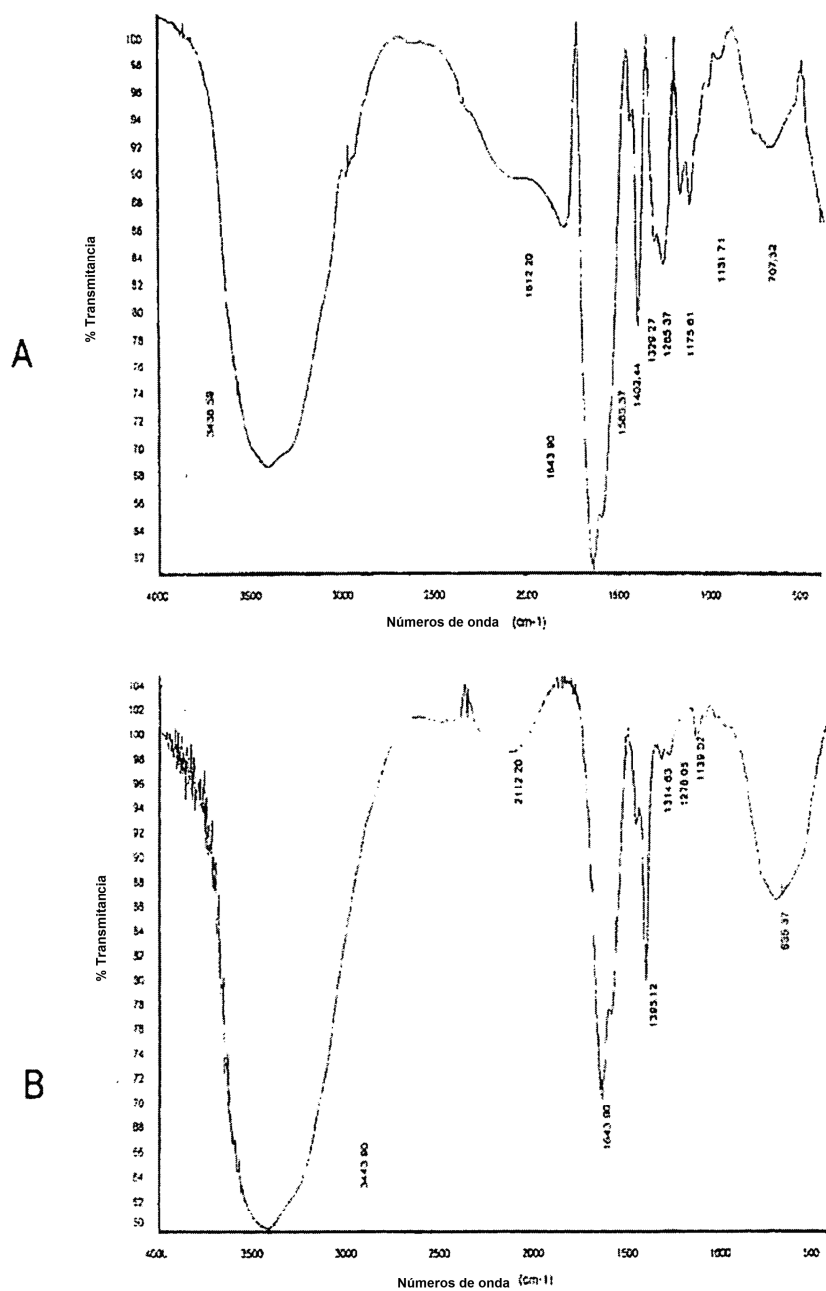


Figura 4: Espectros de absorción en el infrarrojo (FT-IR) de γ -poliglutamato en el sedimento de KBr.
(A) γ -poliglutamato sódico, (A) γ -poliglutamato amónico.

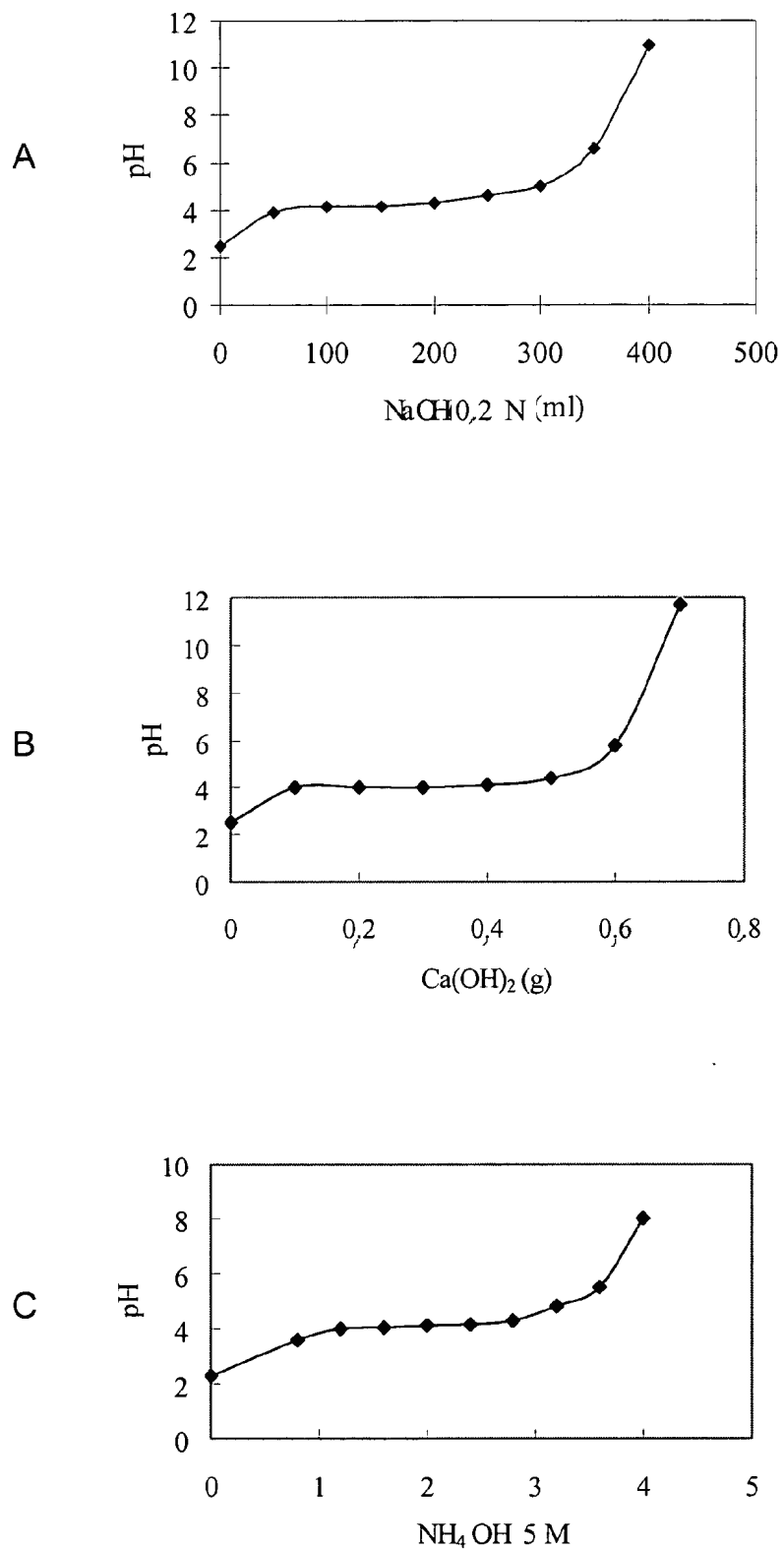


Figura 5. Curva de titulación del pH de γ -(D,L)-PGA a 25 °C
 A – 10 % de γ -PGA con NaOH 0,2 N , B – 2 % de γ -PGA con $\text{Ca}(\text{OH})_2$,
 C – 4 % de γ -PGA con NH_4OH 5 N