

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 250**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A23B 7/154 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2010 PCT/IN2010/000458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11004398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2010 E 10796821 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2451845**

54 Título: **Conservantes a partir de derivados de quitina**

30 Prioridad:

07.07.2009 IN MU16052009
28.05.2010 IN MU16432010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2017

73 Titular/es:

CAMLIN FINE SCIENCES LIMITED (100.0%)
Camlin Fine House Plot No F/11&F/12 Wicel,
Midc, Marol Central Road Andheri (East)
Mumbai 400 093, IN

72 Inventor/es:

SHENDYE, ABHAY PARASHURAM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 626 250 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

Conservantes a partir de derivados de quitina

Campo técnico

5 La invención se refiere a composiciones, a procedimientos para la producción de composiciones de quitosano que actúan como controladores de la respiración, antimicrobianos, microbiostáticos, eliminadores eficaces de microbios y antioxidantes para mantener la frescura de frutas, verduras, flores cortadas, carne, pescado y otros productos alimentarios procesados, y a procedimientos/procesos para aplicarlas y a aplicadores para estas.

Antecedentes de la invención

10 En el pasado, el quitosano se ha empleado como conservante tras la recolección de frutas y verduras frescas. El quitosano empleado se aísla a partir de cáscaras de gambas, cáscaras de cangrejos, cáscaras de dafnias (pulgas de agua), calamares o cualquier otro recubrimiento de crustáceo, hongo e insecto, y se trata para obtener un grado variable de acetilación y se disuelve en ácido acético al 1-2%.

15 El quitosano se ha empleado para mejorar la caducidad de diversas frutas y verduras, tales como cítricos [Magnetic Resonance Imaging, 22 (2004), 27-37], zanahorias [Food Control, 17 (2006), 336-41], lechuga y fresas [Food Microbiology, 21(2004), 703-714], y lichis [Postharvest Biology and Technology, 38 (2005), 128-36], en donde el quitosano empleado tiene un tamaño mayor que kD (kilodaltons) y está 93% desacetilado. La propiedad antioxidante del quitosano se ha estudiado en el salmón [Food Chem., 101 (2007), 308-311], en donde se ha empleado quitosano con tres pesos moleculares diferentes. Una disolución (al 1%) de quitosano 30 kD mostró unos resultados equivalentes al antioxidante químico BHT, y estos resultados fueron mejores empleando quitosano de peso molecular 90 kD y 120 kD. Se ha indicado una actividad de conservación útil del quitosano obtenido de cáscaras de gambas en diversos alimentos, tales como huevo, carne, salchichas, marisco, tofu, zumos, mayonesa, kimchi, fideos, torta de arroz, germinado de soja, gelatina de almidón, etc. En el caso de la leche, se ha descrito la conservación con quitosano con un peso molecular que varía de 0,2-30 kD [Korean J. Food Sci. Tech., 32 (2000), 806-813]. En el caso del pan, se ha empleado con éxito el quitosano con tres pesos moleculares diferentes, 2 kD [J. Chitin Chitosan, 7 (2002), 214-218], 120 kD [Korean J. Food Nutrition, 11 (2003), 309-315] y 493 kD [J. Chitin Chitosan, 7 (2002), 208-213] para extender su caducidad, mantener el peso y retrasar la degradación del almidón. Se ha indicado la actividad antimicrobiana del quitosano contra diversas bacterias, levaduras y mohos, tales como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escerechia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, etc. y esta ha sido publicada [J. Food Sci., 72 (2007), R87-R100]. Excepto por los pocos ejemplos mencionados específicamente, todos los procedimientos de la técnica anterior han empleado quitosano de alto peso molecular obtenido a partir de cáscaras de gamba con pesos moleculares y grados de desacetilación variables y no definidos.

35 La patente de EE. UU. n.º 5.374.627 describe un procedimiento para controlar enfermedades de plantas y daños provocados por ciertas plagas en plantas agrícolas con composiciones que contienen 1 parte en peso de hidrolizado de quitosano con un peso molecular promedio de 10.000 a 50.000, obtenido mediante la hidrólisis ácida o la hidrólisis enzimática del quitosano.

40 La solicitud de patente WO 03070008 desvela compuestos antimicrobianos y sus procedimientos de aplicación, en los que el producto para el uso es un líquido obtenido empleando ácidos orgánicos de 3-30 átomos de carbono, y el producto reivindicado es útil solo para la conservación de alimentos ácidos. En uno de los ejemplos se emplea la enzima quitosanasa para la degradación del quitosano.

45 Aunque en la bibliografía se conocen diversas modificaciones del quitosano que conducen a la solubilización del quitosano a un pH de neutro a alcalino, las aplicaciones del quitosano a los alimentos solo emplean disoluciones de quitosano en un ácido orgánico, preferentemente ácido acético. La disolución obtenida de este modo tiene un pH bajo (2,0-4,0) dependiendo de la concentración del ácido usado. El ácido usado en dicha formulación añade sabor al producto que se va a tratar y/o afecta de modo adverso a su caducidad. En el caso del plátano, se sabe que el ácido acético provoca manchas senescentes [coloración negra de la piel] que no son deseadas. Los ácidos empleados en la formulación del quitosano son responsables de que la leche y los productos lácteos se cuajen. La carga neta positiva desarrollada en la molécula de quitosano debido al pH bajo es responsable de la separación de los componentes aniónicos del producto que se va a tratar [tales como las sales inorgánicas, los ácidos grasos], que se adsorben sobre el quitosano cargado positivamente. Todas estas reacciones son indeseables y pueden evitarse fabricando la formulación tal como se describe en la presente invención.

55 Una clase de quitosano hidrosoluble que se describe en la bibliografía está formado por complejos de quitosano con los respectivos ácidos orgánicos que generalmente se describen como acetato de quitosano, lactato de

quitosano, etc. Son polvos secos del complejo de quitosano-ácido, que se obtienen simplemente mezclando, seguido de la retirada del ácido sin reaccionar y un secado. Estos complejos tienen una baja definición química, son bastante inestables y siguen presentando los problemas asociados con un pH bajo, como los de las disoluciones de quitosano.

5 Se sabe que los productos de la degradación parcial de quito-oligosacáridos similares al quitosano son hidrosolubles. Sin embargo, estas moléculas tienen un grado variable de actividades biológicas, tales como control de la respiración, microbiostasis, características de revestimiento, etc. En general son muy débiles a los niveles deseados de actividades, comparado con los productos desarrollados empleando el procedimiento o procedimientos reivindicados en la presente invención.

10 **Sumario de la invención**

La invención comprende un procedimiento para producir un derivado de quitosano, y un producto preparado con este, mediante la activación de quitosano suspendiendo dicho quitosano en alcohol que contiene agua del 0% hasta un máximo de aproximadamente 30%, agitando con calentamiento durante un periodo de tiempo para obtener el quitosano activado, y después haciendo reaccionar dicho quitosano activado con un reactivo capaz de formar complejos por medio de fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Los derivados del quitosano desvelados por la presente invención y el procedimiento para su preparación producen derivados que tienen una gama de propiedades que comprenden, sin limitación, una propiedad antimicrobiana, o microbiostática, o antitranspirante, o antifúngica, o de conservación de la fruta, o sus combinaciones. Dichas fuerzas físicas incluyen la adsorción, y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

15 20 Se ilustran aproximadamente 8 realizaciones del procedimiento y los productos resultantes y se describen como una segunda y cuarta a décima composición, y los procedimientos para fabricarlas. Los productos de la presente invención pueden derivatizarse aún más para modificar o añadir propiedades a cada uno para cubrir un ámbito de aplicación más amplio o diferente.

25 La adición de quitosano a alcohol, la adición de agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol para preparar una mezcla y la adición posterior de ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla, la agitación a una temperatura de aproximadamente menor que 30 °C, más preferentemente a aproximadamente 25 °C, conduce a la formación de una primera composición en suspensión, que es un derivado de ácido que puede utilizarse tal cual o después de secarse o puede derivatizarse aún más.

30 La adición de quitosano a alcohol, la adición de agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol para preparar una mezcla y el calentamiento de dicha mezcla hasta aproximadamente 70 °C, la adición de anhídrido succínico a esta mezcla, la agitación y el mantenimiento de la temperatura a aproximadamente 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, conduce a la formación de una segunda composición en suspensión.

35 La preparación de la primera composición y la succinilación de esta proporcionan la tercera composición. Así, la adición de quitosano a alcohol, la adición de agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol para preparar una mezcla y la adición de ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla a una proporción de aproximadamente una quinta o una décima parte del peso de la materia prima empleada y la agitación durante 2 horas o durante un periodo de tiempo suficiente para mantener una temperatura de reacción menor que 30 °C, más preferentemente a aproximadamente 25 °C, para obtener un derivado de ácido láctico u otro derivado de ácido en suspensión el aislamiento del derivado de ácido láctico/otro ácido, el sometimiento del derivado aislado, después de una filtración, a una reacción posterior mediante su suspensión en una mezcla de agua:alcohol, preferentemente una mezcla 20:80, la adición de anhídrido succínico en una cantidad en peso de hasta una décima parte del peso seco de dicho derivado de ácido láctico/otro ácido produce una tercera composición en suspensión que puede aislarse.

45 La preparación de la segunda composición y la preparación de su derivado de ácido con un ácido, preferentemente con ácido láctico, proporciona la cuarta composición de la presente invención. Así, la adición de quitosano a alcohol, la adición de agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol para preparar una mezcla y el calentamiento de dicha mezcla hasta aproximadamente 70 °C, la adición de anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso seco de la materia prima a esta mezcla, la agitación durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para mantener la reacción a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, para obtener un derivado succínico en suspensión, el permitir que la suspensión se enfríe hasta por debajo de 30 °C, el sometimiento de dicho derivado succínico a otra reacción con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% al 20% del peso seco del derivado succínico, la agitación de la mezcla durante aproximadamente 1 hora, la filtración y el secado de los sólidos conduce a la formación de una cuarta composición en suspensión que puede aislarse.

55 La preparación de la segunda composición, su desacetilación con la enzima xilano acil transferasa o cualquier otra

enzima acetilante durante un periodo de tiempo, preferentemente de aproximadamente 6 a 7 horas, seguido de una quitinolisis mediante una enzima quitinolítica o, preferentemente, una enzima proteolítica además de quitinolítica que además preferentemente sea termoestable y más preferentemente producida por *Aspergillus niger* MTCC 5572 (depositado en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) durante un periodo de tiempo preferentemente durante aproximadamente una hora, proporciona la quinta composición de la presente invención en suspensión que puede recuperarse. Así, la suspensión de quitosano en una mezcla de agua:alcohol 20:80, el mezclado a fondo de la suspensión mediante agitación preferentemente a 100 rpm durante un periodo suficiente para obtener una buena activación, preferentemente durante 30 minutos, el calentamiento y el mantenimiento de dicha mezcla a aproximadamente 70°C, la adición de anhídrido succínico a esta mezcla, la agitación durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para mantener la reacción a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, el permitir que la suspensión se enfríe hasta obtener un derivado succínico, el sometimiento de dicho derivado succínico a otra reacción con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso seco del derivado succínico, la adición, por cada 5 gramos de peso seco del derivado succínico empleado, de aproximadamente 4000 U.I. de una enzima para la desacetilación, la agitación de la mezcla durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 7 horas, y la adición posterior de una enzima quitinolítica, preferentemente a aproximadamente 500 U.I. por 5 g de peso seco del derivado succínico, la reanudación de la agitación durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora, y el permitir que la suspensión se enfríe proporciona una quinta composición en suspensión, que puede recuperarse y emplearse.

La reacción de la quinta composición en alcohol con un azúcar y después con formaldehído proporciona la sexta composición de la presente invención. Así, la adición de quitosano a alcohol, la adición de agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol para preparar una mezcla, el calentamiento y el mantenimiento de dicha mezcla a aproximadamente 70°C, la adición de anhídrido succínico a esta mezcla, la agitación durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para mantener la reacción a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, el permitir que la suspensión se enfríe hasta obtener un derivado succínico, el sometimiento de dicho derivado succínico a otra reacción con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso seco del derivado succínico, la adición, por cada 5 gramos de peso seco del derivado succínico empleado, de aproximadamente 4000 U.I. de una enzima para la desacetilación, la agitación de la mezcla durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 7 horas, y la adición posterior de una enzima quitinolítica, preferentemente a aproximadamente 500 U.I. por 5 g de peso seco del derivado succínico, la reanudación de la agitación durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora, el permitir que la suspensión se enfríe para proporcionar una quinta composición en suspensión, la suspensión del polvo seco de dicha quinta composición en alcohol puro, la mezcla a fondo de la suspensión mediante agitación a 100 rpm durante 30 min, el calentamiento y el mantenimiento de la temperatura a lo largo del procedimiento a 60 °C, la adición de un azúcar disuelto en agua en aproximadamente 10% en volumen al volumen del alcohol, la agitación de la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o a lo largo de un periodo de tiempo necesario para el mezclado, la adición de formaldehído gota a gota a lo largo de aproximadamente 30 minutos o a lo largo de un periodo de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante, el mantenimiento de la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante el periodo necesario hasta que la reacción se complete, el permitir después que la mezcla de reacción se enfríe hasta la temperatura ambiente, la recuperación del producto, el lavado de los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso, proporciona la sexta composición en suspensión que pueden recuperarse, lavarse con 100 ml de metanol al 90% y secarse al aire.

La suspensión del quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, el mezclado a fondo con agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, el calentamiento de dicha mezcla hasta aproximadamente 60 °C, la adición de ácido fosforoso (H_3PO_3) disuelto en agua y la adición gota a gota de esta mezcla con agitación, la adición de formaldehído a un peso aproximadamente igual al peso seco del quitosano activado, o su derivado, gota a gota, el mantenimiento de la temperatura entre aproximadamente 60-65 °C, preferentemente a 63 °C, durante un periodo de tiempo de preferentemente 2-6 horas después de completar la adición, y el permitir que la suspensión se enfríe proporciona la séptima composición en suspensión, que puede recuperarse. Dicha séptima composición puede ser soluble en un amplio intervalo de pH 7 a 10 y produce disoluciones de ligeramente turbias a transparentes.

La suspensión del quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, el mezclado a fondo con agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, el calentamiento de la mezcla hasta aproximadamente 60 °C, la adición de 750 ml de formaldehído a lo largo de un periodo de unos pocos minutos, la adición de aproximadamente 10% de un ácido inorgánico o ácido fosforoso (H_3PO_3) disuelto en agua y la adición gota a gota de esta mezcla con agitación durante aproximadamente una hora o a lo largo de un periodo de tiempo necesario para que la mezcla sea eficaz, el mantenimiento de la temperatura entre aproximadamente 60-65 °C, preferentemente a 63 °C durante aproximadamente seis horas o durante un periodo de tiempo necesario para que la reacción se complete, y el permitir que la suspensión se enfríe después de completar la adición proporciona la octava composición en suspensión, que puede recuperarse.

La suspensión del quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, el mezclado a fondo con agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, el calentamiento de la mezcla hasta 60 °C, la adición de formaldehído a lo largo de un periodo de unos pocos minutos, la adición de aproximadamente 10% de un ácido inorgánico o ácido fosforoso (H₃PO₃) disuelto en agua y la adición gota a gota de esta mezcla con agitación durante aproximadamente una hora o a lo largo de un periodo de tiempo necesario para que la mezcla sea eficaz, el mantenimiento de la temperatura entre aproximadamente 60-65 °C, y preferentemente a 63 °C durante aproximadamente seis horas o durante un periodo de tiempo necesario para que la reacción se complete después de completar la adición, el permitir que la suspensión se enfríe, la recuperación de la suspensión como un polvo seco, la resuspensión en 20 volúmenes de metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o inorgánico, la agitación de la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un periodo de tiempo necesario para obtener una buena mezcla, la filtración, y el lavado con 20 volúmenes de metanol al 90% proporciona la novena composición que puede recuperarse.

El mezclado de la quinta composición en suspensión con una molécula cargada en disolución y la coprecipitación de la misma, preferentemente en pH alcalino, proporciona la décima composición de la presente invención. Así, la adición de quitosano a alcohol, la adición de agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol para preparar una mezcla, el calentamiento y el mantenimiento de dicha mezcla a aproximadamente 70°C, la adición de anhídrido succínico a esta mezcla, la agitación durante 1 hora o durante un periodo de tiempo necesario para un mezclado a fondo, el mantenimiento de la temperatura entre 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para la reacción, el permitir que la suspensión se enfríe hasta obtener un derivado succínico, la adición de ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso seco del derivado succínico, la adición, por cada 5 gramos de peso seco del derivado succínico empleado, de aproximadamente 4000 U.I. de una enzima para la desacetilación, la agitación de la mezcla durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 7 horas, la adición posterior de una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 g de peso seco del derivado succínico empleado, y la reanudación de la agitación durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora, el permitir que la suspensión se enfríe para proporcionar una quinta composición sólida, la recuperación y el secado al aire de la quinta composición, la disolución de la quinta composición para obtener una disolución al 1% en agua, la adición de una disolución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada capaz de adsorberse sobre la quinta composición en un pH alcalino, en forma de una disolución, la adición de dicha disolución de sulfato de cobre o la molécula cargada que puede estar al 1% con respecto al agua en una pequeña cantidad, a aproximadamente 1% del volumen de agua empleada para disolver la quinta composición y el mezclado durante unos pocos minutos, y la adición de amoniaco líquido para precipitar el quitosano con el sulfato de cobre unido, u otra partícula cargada unida, proporciona un derivado de la décima composición.

La presente invención también comprende una composición que comprende al menos una de las composiciones de la segunda y cuarta a décima composición, y sus derivados, que se emplea como ingrediente fundamental. Las composiciones pueden prepararse en un ácido orgánico diluido, habitualmente ácido acético, o en agua. Dicha composición puede ser una composición para la conservación de frutas, verduras, alimentos y piensos ingeribles, para retrasar la maduración, para retrasar el envejecimiento y para retrasar la senescencia de productos naturales, que incluyen frutas, verduras y flores, o puede actuar como un vehículo para el transporte de una molécula activa o un grupo funcional a su sitio de acción. Dicha composición puede tener una concentración eficaz de aproximadamente 0,1%, y dicho ácido acético puede estar aproximadamente al 2% cuando se emplea.

La enzima quitinolítica empleada en la presente invención puede ser una enzima proteolítica además de quitinolítica. La realización ilustrada de esta enzima tiene un peso molecular de 50 kilodaltons en una electroforesis de tipo SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C. En una realización de la presente invención, se ha identificado a *Aspergillus niger* como fuente de este tipo de enzima, aunque también pueden estar presentes otras fuentes y estas se incluyen dentro del ámbito de la presente invención. Se ha identificado a *Aspergillus niger* MTCC 5572 como el organismo capaz de producir esta enzima en una buena cantidad. También es posible que los mutantes derivados de esta cepa posean también una capacidad para producir la proteo-quitinasa útil para producir los productos de la presente invención. La enzima se precipitó a partir de un filtrado de cultivo bruto mediante su saturación con sulfato de amonio y su fraccionamiento en Sephadex®, recuperándose la enzima proteo-quitinasa bruta mediante precipitación con sulfato de amonio.

La presente invención también comprende un procedimiento para mejorar la caducidad de frutas, carne, pescado, flores, verduras, que comprende un tratamiento de aplicación mediante inmersión, pulverización, nebulización u otro procedimiento de aplicación externa, así como la adición a un producto alimentario, de una composición que comprende una o más de la segunda y cuarta composición a la décima composición. Dicho procedimiento también puede ser un procedimiento para retrasar la maduración y/o la descomposición microbiana, que puede aplicarse a productos naturales que pueden incluir, sin limitación, plátanos, mangos, manzanas, fresas, naranjas, limas y similares, y las aplicaciones pueden incluir una aplicación externa mediante revestimiento o una "aplicación interna" para detener los procesos en las frutas o para detener los procesos en productos naturales.

La enzima desacetilante, la xilano acil transferasa, de la presente invención se aisló de *Bacillus sp.* MTCC 5571. Sin embargo, cualquier otra enzima desacetilante de cualquier otro microbio puede producir los mismos resultados.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona nuevas composiciones de quitosano para tratamientos como antirrespiratorio, antimicrobiano y antioxidante para mantener la frescura de productos naturales, procedimientos para la producción de dichas nuevas composiciones, nuevos procedimientos/procesos para dicho tratamiento de dichos productos naturales para potenciar o mejorar su caducidad o estabilidad durante el almacenamiento. La presente invención proporciona además una nueva enzima microbiana proteolítica termoestable que tiene una acción quitinasa incluso en presencia de un disolvente orgánico, y su uso para desarrollar nuevas composiciones de quitosano de la presente invención. La presente invención proporciona además el uso de una enzima para la desacetilación del quitosano.

10 La invención también proporciona procedimientos/procesos para mantener la frescura de productos naturales durante más tiempo. La invención proporciona además procedimientos/procesos para la aplicación de dichas composiciones y el equipo útil para aplicar dichas composiciones a los productos naturales que comprenden, sin limitación, frutas, verduras, carne, pescado y otros productos alimentarios. Una lista ilustrativa de productos naturales incluidos en el ámbito de la presente invención incluye productos alimentarios y productos vivos o no vivos naturales no alimentarios que incluyen, sin limitación, frutas, verduras, carne, pescado, flores cortadas, leche y productos alimentarios en general.

15 Puesto que el quitosano está formado por moléculas polidispersas con una amplia diversidad de posibilidades de desacetilación, sustitución, sitios de hidrólisis, composición del hidrolizado, etc., las propiedades que determinan sus propiedades antimicrobianas, antimaduración, conservantes, de solubilidad, su capacidad como molécula vehículo, etc., serán diferentes según la composición final del quitosano tratado. La eficacia y el grado de cambio en la molécula de quitosano obtenidos por un tratamiento concreto también dependerán en gran medida del grado en que los sitios vulnerables a un cambio químico o físico (adsorción) se encuentren disponibles, que son distintos según el tratamiento suministrado para la "activación" de la molécula de quitosano antes de iniciar cualquier tratamiento para su derivatización. Puesto que el efecto de cualquier tratamiento de sustitución o modificación dependerá de la composición de grupos funcionales de la materia prima de quitosano, por ejemplo, una hidrólisis enzimática del quitosano no tratado y activado producirá una composición diferente de hidrolizado enzimático que una hidrólisis realizada sobre una molécula de quitosano que ya está modificada mediante una sustitución y del grado en que está modificada por una sustitución, puesto que las enzimas son vulnerables a cambios en el entorno de sus sitios activos. Las propiedades de un quitosano sustituido con respecto a las propiedades antimicrobianas, conservantes, propiedades que afectan a procesos fisiológicos, etc., dependen del tratamiento que se le haya dado, de la distribución del peso molecular del producto, de la combinación de grupos funcionales que porta y del grado de sustitución global, lo cual abre innumerables posibilidades de propiedades de los productos y de los propios productos, que pocas veces pueden predecirse a menos que se descubran de modo experimental. El trabajo de lograr el objetivo de mejorar mediante una experimentación constante es desalentador, puesto que las permutaciones y las combinaciones que deben determinarse son infinitas, y quizás esta es la razón por la cual el alcance completo de esta explicación aún no ha sido cubierto.

20 Aunque es habitual activar el quitosano mediante su tratamiento con un ácido, en la presente invención se descubrió, de modo sorprendente, que el quitosano se activa con el fin de obtener un derivado simplemente calentando una suspensión de este en alcohol que contiene agua del 0% hasta un máximo de aproximadamente 30%, agua según sea necesaria, y una agitación durante un periodo de tiempo para obtener el quitosano activado, y después hacer reaccionar dicho quitosano activado con un reactivo capaz formar complejos por medio de fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Una composición de quitosano preparada de esta manera, mediante un posterior tratamiento y derivatización, ofrece una serie de vehículos que pueden unirse por medio de enlaces físicos o químicos con grupos funcionales/moléculas activas para mejorar su eficacia.

25 Los derivados de quitosano, cuando están completamente sustituidos, no muestran actividad antimicrobiana. El quitosano de peso molecular grande tiene una baja solubilidad. El quitosano de bajo peso molecular no sustituido muestra propiedades antimicrobianas y solubilidad. Por tanto, en general se cree que el quitosano de bajo peso molecular es más útil como conservante. Sin embargo, las composiciones de quitosano de bajo peso molecular no tienen una buena propiedad de revestimiento cuando se aplican a frutas frescas y objetos similares para una acción conservante. Un descubrimiento sorprendente de la presente invención es que incluso el quitosano de alto peso molecular, cuando se derivatiza tal como se describe en la presente invención, es un conservante eficaz y, además de propiedades antimicrobianas, también protege a las frutas del etileno y la pérdida de agua debido a su mejor propiedad de revestimiento. Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, la actual interpretación de la presente invención es que las deseadas propiedades antimicrobianas, conservantes y que afectan a procesos fisiológicos son óptimas solo en cierto intervalo de distribución de peso molecular, combinado con un perfil de solubilidad y los grupos funcionales o las moléculas activas portados por los derivados del quitosano. Los procedimientos/procesos

de producción de derivados de quitina de la presente invención están dirigidos a lograr este equilibrio estrecho e intrincado.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva, si no se mencionado por separado, a menos que el contexto no lo permita, en cualquier contexto de un tratamiento de derivatización, el quitosano es un producto que está del 50 al 70% desacetilado y es de malla 60-100, aunque también pueden emplearse otros grados de desacetilación y/o de tamaño de malla dentro de unos límites razonables para obtener los mismos resultados. El quitosano siempre se activa antes de aplicar dicho tratamiento suspendiendo dicho quitosano en alcohol absoluto o con agua añadida que puede estar hasta aproximadamente 30% o menos, agitando durante un periodo tiempo para obtener el 10 quitosano activado, y después haciendo reaccionar dicho quitosano activado con un reactivo capaz de formar un derivado mediante la formación de complejos por medio de fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Por tanto, el procedimiento/proceso de activación de la presente invención nunca se ha empleado en la técnica anterior, y abre una plataforma completamente nueva para cualquier derivado de quitosano, que incluye derivados de ácidos, derivados de succinilo, así como hidrolizados enzimáticos procedentes de un quitosano activado mediante el procedimiento/proceso de la presente invención.

15 Cuando se menciona el término "alcohol" en la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto no lo permita, el alcohol preferido es un alcohol polar en el que el quitosano, o sus derivados, preparados en el transcurso del procedimiento de la presente invención, son insolubles. El alcohol más preferido es el metanol, aunque, dentro de las anteriores limitaciones, también pueden emplearse otros alcoholes.

20 Cuando se emplea el ácido láctico, aunque es el ácido más preferido para ser empleado en estas reacciones, también puede emplearse cualquier otro ácido, tanto inorgánico como orgánico, aunque el ácido orgánico es más preferido y el ácido láctico es el más preferido.

La solubilidad de las composiciones en la presente memoria descriptiva se comprobó añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agitó de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprobó visualmente. En una de las 25 realizaciones, que produce la primera composición de la presente invención, el quitosano se disuelve en ácido y la disolución resultante muestra actividad antimicrobiana. La cantidad de ácido empleada en relación con el quitosano, así como la elección del ácido, resultan fundamentales para exhibir actividad. El ácido útil para este objetivo puede ser cualquier ácido orgánico, aunque es preferible el ácido láctico. De modo similar, en lugar del ácido láctico, una opción menos preferida podría ser cualquier ácido inorgánico. Sin pretender quedar limitado por 30 teoría alguna, la actuación particularmente buena del ácido láctico en estos procedimientos quizá pueda ser debida a la solubilidad limitada del quitosano en ácido láctico a menos de una parte de ácido láctico por cada parte de quitosano, que produce un fluido que presenta algo de viscosidad y que no es una disolución totalmente acuosa, lo cual otorga al derivado una mezcla óptima de carga sobre la partícula y el grupo funcional de modo que se logra una solubilidad suficiente sin perder sus propiedades antimicrobianas. Se descubrió, de modo sorprendente, que 35 bajo las condiciones de reacción de la presente invención, en las que el quitosano se disuelve en ácido a aproximadamente 10% en peso de quitosano, no se produjo solubilidad del derivado de ácido (la primera composición) en agua, y cuando se aumenta la proporción de ácido láctico, la primera composición sí es soluble en agua, pero se forman muchos aglomerados que hacen que el producto sea difícil de utilizar y, además, no tenga actividad antimicrobiana. También resultó sorprendente descubrir que, por el contrario, empleando una proporción de ácido láctico menor que 10% en peso de quitosano se obtiene un producto hidrosoluble que tiene actividad 40 antimicrobiana. Puesto que el ácido láctico por debajo de 0,5 ml produce la disolución completa sin la formación de aglomerados durante la reacción, esto se convirtió en la realización preferida que se empleó en los posteriores trabajos. Unos principios similares se aplican a otros ácidos, y la cantidad real del ácido empleada dependerá de las propiedades del ácido.

45 En otra realización de la presente invención, que representa la segunda composición, el quitosano activado se trata con anhídrido succínico para obtener un derivado succínico. El anhídrido succínico se añade en diferentes proporciones manteniendo la temperatura a aproximadamente 60-70 °C, preferentemente a 65 °C. Cuando la mezcla de alcohol y agua utilizada para la activación tiene una proporción de 20:80, el derivado succínico resultante es soluble en agua solo cuando más de 0,5 g de anhídrido succínico se añade a 5 g de quitosano en dicha 50 reacción. Sin embargo, de forma sorprendente se descubrió que cambiando la proporción de los disolventes empleados a 10 ml de agua por cada 90 ml de metanol, es posible obtener un producto hidrosoluble empleando el anhídrido succínico a una cantidad menor que 0,5 g hasta 0,05 g. Para objetivos prácticos, se descubrió que una cantidad 0,1 g resulta preferible. Esta observación también apoya el descubrimiento de que el tratamiento de activación es crucial para determinar las propiedades de los productos, y el nuevo procedimiento/proceso de 55 activación de la presente invención hará que todos los productos tengan propiedades diferentes de los productos de la técnica anterior con el mismo reactivo, si la activación del quitosano se produce mediante un procedimiento/proceso sustancialmente diferente.

Otra realización de la presente invención comprende la tercera composición, en la que, en la primera etapa, se prepara la primera composición empleando un ácido, preferentemente ácido láctico a una proporción del 10 al 20% del peso seco del quitosano activado, y dicha primera composición se toma como material de partida y se hace reaccionar con anhídrido succínico añadido a una proporción de aproximadamente 10% del peso seco de la primera composición empleada. Esta composición en un material de grano grueso que es soluble en agua.

Otra realización de la presente invención comprende la cuarta composición, en la que se prepara un derivado succínico del quitosano activado de la segunda composición empleando anhídrido succínico a aproximadamente 10% del peso seco del quitosano activado y, después de finalizar la reacción, se añade un ácido, preferentemente ácido láctico del 10 al 20% del peso seco del quitosano. No se forman aglomerados. El polvo seco es completamente soluble en agua a los 5 min bajo las condiciones de ensayo descritas.

En otra realización de la presente invención, se ha descubierto que una clase de enzimas electroforéticamente homogéneas aisladas a partir de microorganismos tienen actividad proteolítica, así como actividad quitinasa, las cuales pueden denominarse proteo-quitinasas. En una realización de la presente invención, se emplean dichas proteo-quitinasas y enzimas capaces de una desacetilación del quitosano para hidrolizar el quitosano, en un procedimiento para fabricar los productos de la presente invención. Aunque las proteo-quitinasas y desacetilasas de la presente invención se aíslan de microbios, esta clase de enzimas, obtenidas de cualquier fuente, realizarán la misma función de hidrólisis del quitosano, y la presente invención extiende su uso también para el objetivo de la hidrólisis del quitosano y también para desarrollar los productos de la presente invención.

Se recogen muestras de suelo en Pune, India, y en territorios adyacentes, de diversos recursos naturales ricos en materia orgánica y se enriquecieron con el sustrato deseado, que incluye caseína, quitosano, salvado de trigo lavado, celulosa. El enriquecimiento continuó durante 3 semanas, y las muestras se extendieron en estrías sobre un medio sólido que contenía el sustrato empleado para el enriquecimiento como única fuente de carbono. Las colonias aisladas mostraron, en general, una zona aclarada, lo cual indica una fuerte producción de la respectiva enzima degradativa.

Se aislaron aproximadamente 700 cultivos de diversas bacterias y hongos. Para descubrir los cultivos que tienen la actividad deseada, estos se cultivaron mediante el procedimiento de matraces de agitación. El filtrado del cultivo microbiano bruto se concentró mediante una precipitación con sulfato de amonio. Las fracciones de las proteínas se separaron mediante una electroforesis en SDS-PAGE desnaturizante. Las fracciones de las proteínas se separaron sobre estos geles como bandas independientes homogéneas. Se seleccionó un cultivo de *Aspergillus niger* MTCC 5572 como cultivo prometedor.

La banda electroforéticamente homogénea aislada del filtrado del cultivo de *Aspergillus niger* MTCC (depositado en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) que demostró actividad proteínica, así como quitinasa, es una nueva enzima (una proteo-quitinasa) con un peso molecular de 50 kD, según se determina por medio de marcadores de peso molecular en una SDS-PAGE, y tiene una actividad enzimática óptima a pH 2 y 80 °C. Aunque esta banda se empleó para hidrolizar enzimáticamente la segunda composición desacilada de quitosano para desarrollar el producto de la presente invención, cualquier otra proteo-quitinasa puede producir un hidrolizado con unas propiedades muy similares.

En otra realización de la presente invención se obtiene un hidrolizado de quitosano empleando enzimas purificadas o una forma bruta de enzimas o una forma activa de un extracto de células microbianas. Dicho hidrolizado muestra una actividad antimicrobiana mejorada hasta un cierto límite de disminución en el peso molecular promedio y dentro de un intervalo específico de grado de sustitución del grupo amino libre por acetilo o por cualquier otro grupo aniónico. En otra realización de la presente invención, los derivados enzimáticamente hidrolizados del quitosano muestran una actividad antimicrobiana mejor que el producto obtenido solo por medios químicos. El hidrolizado que se modifica aún más, concretamente se desacetila, empleando la xilano acil transferasa, muestra una propiedad antimicrobiana antioxidante aún mejor y actúa también como agente antirrespiración. Los hidrolizados obtenidos por medios químicos que tienen un peso molecular en el intervalo inferior de 8-100 kD son más eficaces que los hidrolizados de mayor y/o menor peso molecular. Sin embargo, de modo sorprendente, después de la desacetilación enzimática, los derivados de peso molecular aún mayor muestran una actividad antimicrobiana equivalente a la de los productos de 8-100 kD obtenidos por medio de un procedimiento químico. El procedimiento/proceso preferido de obtener las xilano acil transferasa en la presente invención es a partir de microorganismos. Puede preverse que estas enzimas, aisladas como un extracto bruto o purificado a partir de cualquier otra fuente, tendrán las mismas propiedades desacilantes y producirán los mismos productos que los preparados en las realizaciones preferidas de la presente invención a partir de microorganismos. Esta realización de la invención que comprende hidrolizados enzimáticos comprende la quinta composición que es útil como conservante tras la cosecha. Dicha quinta composición se prepara preparando, en primer lugar, un derivado succínico de la segunda composición al cual se le añade anhídrido succínico, el derivado se desacila por la enzima en presencia de un ácido, preferentemente ácido láctico, añadido a aproximadamente 10% en peso seco de la segunda composición succinilada durante un periodo de tiempo para lograr una desacetilación limitada,

preferentemente durante un periodo de 7 horas, y después se somete durante aproximadamente una hora a un tratamiento con la enzima quitinolítica. El polvo de la quinta composición es soluble en agua cuando se añaden más de 0,5 g de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción, y muestra actividad antimicrobiana. La quinta composición muestra de tres a cuatro veces menos consumo por per kg de plátano y tomate que la disolución de quitosano en ácido acético, muestra una mayor actividad antimicrobiana, así como microbiostática, comparado con una disolución de quitosano en ácido acético y la primera, segunda y cuarta composición. La quinta composición también es útil para mejorar la caducidad de frutas. Plátanos verdes recién recolectados (<30 h de la recolección) pueden tratarse utilizando una disolución al 0,1% de la quinta composición. El tratamiento también puede administrarse sumergiendo los plátanos en dicha disolución durante nominalmente 10-15 s, o mediante pulverización directa de la disolución sobre los plátanos con un dispositivo adecuado para que la superficie de los plátanos se humedezca, o haciendo pasar los plátanos a través de una cámara cerrada que está saturada con una nebulización de dicha disolución (nebulización indirecta). Los plátanos tratados se secan al aire. Estos plátanos se almacenan a temperatura ambiente (20-32 °C) y una humedad relativa del 40-60%. En los experimentos, los plátanos tratados mantuvieron el color verde y el peso, mientras que los plátanos sin tratar perdieron peso y desarrollaron decoloración. Los plátanos tratados mostraron una mejor condición fisiológica, ensayados por medios químicos, mediante la determinación de su contenido en sólidos totales (contenidos BRIX), azúcares reductores y pérdida de peso al menos hasta 12 días después de la inmersión (véase la figura 1). Otra realización de la invención consiste en que, después del almacenamiento durante 8-15 días, cuando se maduran mediante la aplicación de etileno, los plátanos tratados maduran con normalidad, mientras que los plátanos control no tratados se pusieron duros y no maduraron o se volvieron negros y blandos y no fueron adecuados para el consumo humano.

Se trataron tomates enteros y manzanas cortadas con el producto del ejemplo 10, exactamente como se describe en el ejemplo 14 para los plátanos. Los tomates tratados mantuvieron su peso, textura y frescura durante 30 días frente a los tomates control sin tratar, que se arrugaron en 12-15 días, dando como resultado una pérdida de peso. Los cambios fisiológicos en los tomates tratados y control se controlaron en el 7° día de almacenamiento empleando una técnica de escaneado de MRI. La piel pulposa de los tomates tratados era más uniforme en su densidad de color. La piel pulposa de los tomates no tratados mostraba manchas oscuras que son indicativas de un secado no uniforme y mayor. El escaneado de MRI de los tomates representativos se incluye en la figura 2.

La quinta composición también es eficaz para la "aplicación interna", es decir, para la aplicación para la conservación y para mejorar la caducidad o para un tratamiento antimicrobiano o un tratamiento microbiostático a las partes "internas" de las frutas o productos naturales, tales como fruta cortada, fruta procesada, productos de verduras procesadas y similares. Los trozos de manzanas cortadas se envasaron en una bolsa de polietileno o un recipiente de plástico transparente y se almacenaron en la nevera a una temperatura de 4-9 °C. Las manzanas cortadas del control comenzaron a tomar un color marrón desde el día 2 y se volvieron blandas para el día 3, mientras que las manzanas cortadas tratadas mantuvieron el color, el gusto y la textura dura durante 6 días. La fotografía (figura 3) muestra la diferencia en el aspecto de las manzanas cortadas tratadas y no tratadas en el día 4.

Los trozos de manzanas cortadas tratadas y no tratadas se envasaron en un recipiente de plástico transparente y se almacenaron como se describió anteriormente durante hasta 25 días. Las manzanas cortadas no tratadas desarrollaron un crecimiento fúngico [manchas negras en la fotografía de la figura 4], mientras que las manzanas cortadas tratadas no desarrollaron crecimiento fúngico ni microbiano. Los resultados se muestran en la siguiente fotografía.

En otra realización de la presente invención, la quinta composición actúa como vehículo para grupos funcionales o moléculas para mejorar la eficacia a concentraciones más bajas y/o como vehículo para su transporte al sitio activo. Se proporcionan ilustraciones de esta realización con la sexta y décima composición.

Manteniendo el mismo principio, son posibles varias realizaciones más de la quinta composición como vehículo variando los grupos funcionales o las moléculas activas que son transportadas por la quinta composición mediante enlaces físicos o enlaces químicos.

La sexta composición comprende un derivado de azúcar de succinato de quitosano que muestra una solubilidad variable en agua y también muestra una propiedad antimicrobiana variable. El azúcar puede ser de caña de azúcar o cualquier otro azúcar. El procedimiento/proceso de la presente invención para preparar la sexta composición comprende fabricar un derivado de azúcar de la quinta composición, que después se hace reaccionar con formaldehído durante un periodo de tiempo variable, habitualmente de una a seis horas, para obtener dicha sexta composición que tiene una hidrosolubilidad excelente y una actividad antimicrobiana que es mejor que la quinta composición cuando la disolución de azúcar utilizada para la derivatización contiene 0,4 g por cada 100 g de peso seco de succinato de quitosano o menos. Una observación sorprendente fue que si el azúcar se emplea a más de este nivel, el derivado de azúcar de succinato de quitosano no es más hidrosoluble. Esto apoya aún más la noción de que los derivados de quitosano, para ser útiles para aplicaciones, deben mostrar un control delicado del grado

de sustitución y de los grupos funcionales que se van a emplear para la sustitución. Todos los productos hidrosolubles de la sexta composición tienen un grado variable de actividad antimicrobiana a diversas concentraciones, que es constantemente mejor que los grados de actividad antimicrobiana del material de partida, la quinta composición. Cuando el azúcar empleado en el procedimiento/proceso anterior es glucosa o lactosa a una proporción de 0,4 g por 100 g de succinato de quitosano y el periodo de reacción con el formaldehído es de aproximadamente 3 horas, los productos de estas reacciones son solubles en agua y muestran una actividad antimicrobiana del 100% contra *E. coli* mediante el procedimiento/proceso descrito en el ejemplo 11.

En otra realización de la presente invención, el quitosano incluye los derivados preparados a partir de un ácido inorgánico. Esto es ejemplificado por la séptima composición, en la que se emplea el ácido fosforoso para obtener un derivado, y comprende suspender el quitosano en alcohol (aproximadamente 99%), mezclar la suspensión a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla y mantener la temperatura a aproximadamente 60 °C, añadir a esta mezcla gota a gota ácido fosforoso (H_3PO_3) disuelto en agua a un volumen que es aproximadamente cuatro veces el peso del quitosano, acompañado de una agitación durante aproximadamente 1 hora, añadir además 5 ml de formaldehído gota a gota y, después de completar la adición, mantener la temperatura entre 60-65 °C y preferentemente a 63 °C durante 2-6 horas. En lugar del formaldehído puede emplearse cualquier otro aldehído. Las condiciones de temperatura, agitación, etc., pueden variar para obtener un producto final con el nivel deseado de actividad antimicrobiana. La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. La solubilidad también se comprueba a pH 8, 9, y 10, ajustado empleando NaOH diluido, o tampón Tris. Los productos formados empleando quitosano y ácido fosforoso en una proporción de 1:1 y 1:2 mostraron solubilidad en un amplio intervalo de pH (7-10), y formaron disoluciones de ligeramente turbias a transparentes. Mientras que las composiciones antimicrobianas de quitosano, o sus derivados, de la técnica anterior tienen un pH en el lado ácido y precipitan a un pH cercano a 7 o en el intervalo alcalino, la séptima composición es soluble de pH 7 a 10 en el lado alcalino. Estas disoluciones muestran un grado variable de actividad antimicrobiana. Los productos de hasta 0,01% muestran un poco de actividad antimicrobiana, mientras que los productos por encima de esta concentración muestran una inhibición microbiana total. Es evidente que la séptima composición, siendo soluble y teniendo también una actividad microbiocida total a unas concentraciones razonablemente bajas y a un pH 7 y por encima hasta 10, proporciona nuevos ámbitos de uso como conservante y antimicrobiano.

Otra realización de la presente invención comprende la octava y novena composición. El procedimiento/proceso para su preparación comprende hacer reaccionar el quitosano suspendido en alcohol mínimo al 99%, mezclar la suspensión a fondo mediante agitación durante un periodo de tiempo suficiente para obtener una humectación y activación eficaces con el alcohol, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar y mantener la temperatura de la mezcla a aproximadamente 60 °C, añadir formaldehído a una proporción de aproximadamente 5% del volumen de alcohol empleado, añadir gota a gota una disolución al 10% de ácido fosforoso (H_3PO_3) en agua, siendo el peso del ácido fosfórico de aproximadamente 5% del volumen de alcohol empleado, y agitar después durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60-65 °C y preferentemente a 63 °C durante 6 horas después de completar la adición. Se deja enfriar la suspensión y se filtra, los sólidos se recuperan y se secan. La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. La solubilidad también se comprueba a pH 8, 9, y 10, ajustado empleando NaOH diluido, o tampón Tris. El producto se disuelve en agua, pero precipita cuando el pH aumenta hasta 7,0.

La novena composición se obtuvo sometiendo el producto de la octava composición a un tratamiento con HCl. Aunque en este caso se ha empleado HCl, este puede ser sustituido por cualquier otro ácido orgánico o inorgánico. El polvo seco obtenido en esta reacción se resuspendió en 20 volúmenes de metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado para obtener la novena composición en suspensión en la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El polvo se retiró mediante filtración, se lavó con 20 vol de metanol al 90% 3 veces y se secó como se describió anteriormente. El producto resultante es soluble de pH 3 a 12. Esta solubilidad a través de un intervalo amplio expande aún más el ámbito de aplicación de este producto. Resulta pertinente indicar en este punto que el tratamiento con ácido fosfórico resulta fundamental para cebar el producto para la solubilidad a través de un amplio intervalo de pH. Esto se ha demostrado por el hecho de que otras composiciones, en particular la quinta composición y la séptima composición, cuando se tratan con HCl tal como se describe en este ejemplo, no alteraron su perfil de pH de solubilidad hasta el intervalo de pH 3 a 12.

La décima composición es una realización más ilustrativa de la quinta composición, que actúa como vehículo para una molécula activa. En este caso, la molécula activa es sulfato de cobre y probablemente el mecanismo de formación de los complejos es mediante adsorción. El procedimiento/proceso para preparar la décima composición comprende preparar una disolución al 1% de la quinta composición en agua, añadir aproximadamente 10% de su

volumen a una disolución (al 1%) de sulfato de cobre, mezclar las dos disoluciones durante algún tiempo, añadir amoníaco líquido a una proporción de una parte a cien partes del agua empleada, lo cual provoca la precipitación del quitosano con el sulfato de cobre unido. El sulfato de cobre es soluble en amoníaco líquido y la disolución resultante tiene un color azul oscuro. El cálculo del cobre se realiza mediante colorimetría y empleando una gráfica patrón de 0,02-0,1%. A partir de esto, se calculó que el quitosano unido al cobre era 90%. Este es un ejemplo del uso posible del derivado como vehículo para todas las moléculas cargadas.

Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, los inventores creen que el quitosano tiene una carga positiva, y cualquier ácido orgánico o inorgánico formará un enlace coordinado con el grupo amino cargado sobre el quitosano. Estos complejos se han nombrado como las sales respectivas del quitosano, por ejemplo, clorhidrato de quitosano, acetato de quitosano, etc. Estas sales se disuelven en agua, y el pH de la disolución en general es ácido. Además, las sales no poseen actividad antimicrobiana. Cuando se intentó aumentar al pH de estas disoluciones mediante la adición de un álcali, generalmente NaOH, el quitosano precipita antes de que el pH alcance la neutralidad. Esto se debe a que la sal no es estable a dicho pH. En los procedimientos de la presente invención, se realizan dos tipos de modificaciones que son exclusivas:

(1) La reacción del quitosano se realiza en alcohol con agua al 0-30% que proporciona una hidratación limitada y, por tanto, es importante para lograr la sustitución controlada/limitada de los grupos laterales.

(2) Una reacción mediada por formaldehído y una reacción mediada por anhídrido. Ambos productos de la reacción en general son estables a pH alcalino. En este caso, la solubilidad del producto a pH alcalino es una función de las cargas netas sobre la molécula. Estas pueden añadirse en cualquiera de dichas 2 reacciones o mediante una simple interacción iónica (formación de sales) con cualquier ácido. Generalmente se prefieren los ácidos inorgánicos, porque las sales son más estables.

(3) Los derivados de quitosano solubles desarrollados por medio de los diversos procedimientos/procesos descritos en el presente documento presentan una sustitución parcial y conservan tanto cargas positivas como negativas. Así, diferentes moléculas cargadas se unen a la molécula de quitosano, haciendo que sea útil como molécula vehículo para grupos activos, tales como grupos antimicrobianos, o cualquier otro grupo activo que tenga algún fin funcional. El resultado es que la eficacia de un grupo funcional que está unido a dicha molécula mejora a una concentración muy pequeña. En el presente documento, las composiciones de quitosano hidrosolubles, preparadas por medio de los procedimientos/procesos de la invención, han demostrado ser vehículos eficaces de restos de n-acetil cisteína y sulfato de cobre, habiéndose demostrado esto último en el ejemplo 19. Se espera que se produzca la misma actuación para cualquier otro grupo funcional cuyo resto pueda ser tan eficaz como cuando está en un estado no unido cuando no es portado por la molécula de quitosano hidrosoluble. La molécula de quitosano hidrosoluble empleada en el presente documento se prepara mediante los procedimientos/procesos de la presente invención. Sin embargo, la molécula de quitosano hidrosoluble preparada mediante cualquier otro procedimiento/proceso existente o de la presente invención será equivalente a esta molécula para los objetivos de su aplicación como molécula vehículo y se considera que está dentro del ámbito de la presente invención a menos que exista cualquier razón para que no pueda portar cualquier otro principio activo por alguna razón.

Otra realización de la presente invención describe un procedimiento/proceso para potenciar la estabilidad durante el almacenamiento de productos naturales mediante un tratamiento con derivados de quitina. Una realización de este aspecto de la invención describe un procedimiento/proceso para potenciar la estabilidad durante el almacenamiento de productos naturales mediante un tratamiento con derivados de quitina que retrasa las actividades vitales que son responsables de reducir la estabilidad durante el almacenamiento o que conducen al envejecimiento, mediante el freno o la detención de dichas actividades. Una lista ilustrativa de dichas actividades vitales incluye, sin limitación, la respiración, la oxidación, la formación de etileno, la transpiración, así como la detención del envejecimiento de frutas frescas, verduras, carne, pescado, preparaciones de alimentos procesados y no procesados y similares. Los expertos en la técnica podrán extender esta lista a muchas otras actividades vitales que reducen la estabilidad durante el almacenamiento. Para lograr el anterior objetivo, los productos naturales pueden revestirse con las composiciones de la presente invención mediante procedimientos que son muy conocidos por los expertos en la técnica. Dicho revestimiento puede ser total o parcial y puede obtenerse mediante el uso de un procedimiento/proceso de aplicación. Dicho procedimiento de aplicación incluye, sin limitación, la pulverización, la inmersión, la micropulverización o el uso de nanopartículas, la nebulización indirecta y similares. En el caso de alimentos procesados, tales como pan, fideos, etc., dicha formulación puede añadirse en la masa y/o aplicarse a la superficie del alimento procesado por medio de uno de los procedimientos listados anteriormente.

Cuando los plátanos se almacenan durante un largo tiempo, la corona del racimo comienza a secarse. El tallo que une el fruto del plátano a la corona se denomina pedicelo. Empieza a marchitarse. La marchitación del pedicelo es el mejor indicador del secado. Una menor marchitación significa la conservación de la frescura. Se realizó un ensayo con 1000 kg de plátano mediante el procedimiento convencional (control) de inmersión en 0,1% del producto de los inventores, y la pulverización del producto de los inventores. Esto se repitió en 2 granjas (total de

6000 kg de plátanos). El porcentaje muy bajo de marchitación del pedicelo tras la inmersión y también tras la pulverización de la composición de ensayo demuestra su buena eficacia para retrasar el secado y, en último término, para retrasar el envejecimiento y la senescencia y para mejorar la capacidad de almacenamiento.

5 Los resultados se presentan a continuación en la tabla 6. Mediante el procedimiento de inmersión se observó una mejora significativa en la marchitación (pérdida de peso, o conservación de la frescura).

10 A continuación se describen experimentos realizados que sirven como ilustraciones no limitantes de la forma en que se realiza la invención. Cualquier modificación o variación en los parámetros, que incluyen, pero no se limitan a procedimientos para producir hidrolizados y posteriores modificaciones, procedimientos/procesos de uso de los productos y sus diversas etapas empleadas, son solo ilustrativas y cualquiera de sus equivalentes que serán obvios para los expertos en la técnica y que sean capaces de lograr el mismo objetivo pueden utilizarse en su lugar y aún se consideran incluidas en el ámbito de la presente memoria descriptiva.

Figuras y su descripción

Figura 1: Fotografía de plátanos no tratados (izquierda) y tratados (derecha) en el 12º día de almacenamiento.

Figura 2: Escaneado de MRI de los tomates representativos.

15 Figura 3: Fotografía de la diferencia en el aspecto de manzanas cortadas tratadas y no tratadas en el día 4.

Figura 4: Las manzanas cortadas no tratadas (control) desarrollaron un crecimiento fúngico visible en forma de manchas negras de crecimiento fúngico en la fotografía, mientras que las manzanas cortadas tratadas (ensayo) permanecieron sin crecimiento fúngico después de 25 días de almacenamiento en una bolsa de polietileno.

Figura 5: Purificación de proteo-quitinasa. Filtración en gel en Sephadex G-100.

20 Figura 6: Determinación del peso molecular de la proteo-quitinasa.

Figura 7: pH óptimo de la proteo-quitinasa. El eje X muestra el pH y el eje Y muestra la actividad enzimática (unidades/ml) de una unidad de volumen de una única formulación de enzima. La actividad máxima de 160 unidades/ml se observa a pH 2.

25 Figura 8: Temperatura óptima de la proteo-quitinasa. El eje X muestra la temperatura y el eje Y muestra la actividad enzimática (unidades/ml) de una unidad de cantidad de una única formulación de enzima. La actividad máxima se obtiene a una temperatura de 80 °C.

30 Figura 9: Acción de enzimas seleccionadas sobre el quitosano. Carril 1: Patrón de glucosamina. Carril 2: Xilano acil transferasa (bruta), Carril 3: Proteasa y xilano acil transferasa (ambas puras). Carril 4: Xilano acil transferasa (pura). Carril 5: Quitosano sin enzima. Las manchas de acetato (resultado de la desacetilación) están marcadas con un círculo.

Ejemplo 1: Producción de lactato de quitosano hidrosoluble e hidrosoluble

35 Se introducen 5 g de quitosano [70 DDA ("Degree of desacylation", grado de desacetilación), malla 100] en un matraz de fondo redondo y se añaden 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (al 99%). En este caso puede utilizarse quitosano de cualquier otra calidad. La suspensión se mezcla a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 min. Se añade un ácido, inorgánico u orgánico, preferentemente ácido láctico, en diferentes cantidades a esta mezcla y se continúa la agitación durante 2 horas. La temperatura se mantiene por debajo de 30 °C y preferentemente a 25 °C. La suspensión se filtra y el sólido se seca al aire. El polvo fluido y los aglomerados (si existen) se separan mediante tamizado. El polvo fluido después se seca aún más en una estufa de aire caliente [70 °C durante 3-6 horas]. Los aglomerados son partículas elásticas que no se descomponen en partículas fluidas de tamiz 100 o más pequeño. La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. Los efectos de las diferentes concentraciones de ácido láctico se indican en la tabla 1.

Tabla 1 - Efecto de diferentes cantidades de ácido láctico empleadas con 5 g de quitosano

Ácido láctico (ml)	Formación de aglomerados durante la reacción	Solubilidad en agua
6,5	+++	Se disuelve completamente
5,0	++	Se disuelve completamente
3,5	+	Se disuelve completamente

2,0	-	Se disuelve completamente
1,0	-	Forma aglomerados que se disuelven después de 30 min
0,5	-	Forma aglomerados que no se disuelven hasta 60 min
0,1	-	Se disuelve completamente cuando la reacción se realiza en metanol:agua 90:10
+++ indica 60% o más de formación de aglomerados ++ 35% de formación de aglomerados + aproximadamente 15% de formación de aglomerados y tamaño pequeño de los aglomerados - no se forman aglomerados		

Puesto que el ácido láctico por debajo de 0,5 ml produce la disolución completa sin la formación de aglomerados durante la reacción, esto se convirtió en la realización preferida que se empleó en los posteriores trabajos.

Ejemplo 2: Adición del grupo succinato al quitosano

5 Se introducen 5 g de quitosano [70 DDA, malla 60] en un matraz de fondo redondo y se añaden 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (al 99%). En este caso puede utilizarse quitosano de cualquier otra calidad. La suspensión se mezcla a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 min. La mezcla se calienta hasta 65 °C. Se añade anhídrido succínico en diferentes proporciones que varían de 15 g a 0,1 g a esta mezcla y se continúa la agitación durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60-70 °C y preferentemente a 65 °C durante aproximadamente 1 hora.

10 La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. El polvo fluido se forma disgregando los aglomerados sueltos de modo mecánico y tamizando con una malla 100. No se observó formación de aglomerados. El polvo fluido después se seca aún más en una estufa de aire caliente a 85 °C durante 3-6 horas. La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 15 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. El polvo es soluble en agua cuando se añaden 0,5 g o más de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción.

Ejemplo 3: Derivatización en dos etapas con un ácido y anhídrido succínico

20 La reacción se realiza exactamente como se describe en el ejemplo 2, en la que el quitosano se sustituye por el producto de la reacción obtenido en la reacción descrita en el ejemplo 1 en el que se emplean 1,0 g o 0,5 g de ácido láctico. En lugar del ácido láctico podría utilizarse cualquier otro ácido inorgánico u orgánico. Se emplean 0,5 g más de anhídrido succínico para cada 5 g del producto de la primera composición. Se formó un material de grano grueso que era soluble en agua cuando se ensaya como se describió en el ejemplo 1.

Ejemplo 4: Adición secuencial de succinato y lactato al quitosano

25 La reacción se realizó como en el ejemplo 2, en la que se hacen reaccionar 5 g de quitosano con 0,5 g de anhídrido succínico. Después de completar la reacción y de enfriar la mezcla de reacción hasta 30 °C se añaden 0,5 o 1,0 ml de ácido láctico. El ácido láctico puede ser reemplazado por cualquier otro ácido inorgánico u orgánico. La mezcla se agitó durante una hora, se filtró y se procesó como se describió en el ejemplo 1. No se formaron aglomerados. El polvo seco fue completamente soluble en agua en 5 min bajo las condiciones de ensayo descritas.

30 Ejemplo 5: Identificación de la enzima que tiene actividad proteinasa principal y reactividad cruzada con la quitinasa

35 Se recogieron muestras de suelo en Pune, India, y en territorios adyacentes, de diversos recursos naturales ricos en materia orgánica. Las muestras de suelo, 10 g, se enriquecieron con el sustrato deseado (1 g), concretamente caseína, quitosano, salvado de trigo lavado, celulosa, individualmente en distintos matraces de 250 ml que contenían 100 ml de agua destilada estéril. El enriquecimiento continuó durante 3 semanas, y las muestras se extendieron en estrías sobre un medio sólido que contenía el sustrato empleado para el enriquecimiento como única fuente de carbono. Las colonias aisladas mostraron, en general, una zona aclarada, lo cual indica una fuerte producción de la respectiva enzima degradativa. Se aislaron aproximadamente 700 cultivos de diversas bacterias y hongos.

40 Para descubrir los cultivos que tienen la actividad deseada, estos se cultivaron en matraces de 1 litro que contenían 200 ml de medio mediante el procedimiento de matraces de agitación. El filtrado del cultivo microbiano bruto se

concentró mediante una precipitación con sulfato de amonio disuelto en SDS al 0,1%. Las fracciones de las proteínas se separaron mediante una electroforesis en SDS-PAGE desnaturalizante. Las fracciones de las proteínas se separaron sobre estos geles como bandas independientes homogéneas.

5 Estas bandas se caracterizaron según su actividad por medio de tres procedimientos/procesos diferentes: tinción con azul de Coomassie para la detección de proteína, ensayo de eliminación de caseína para la actividad
 10 proteínica y ensayo de eliminación de quitina con azul brillante de ramezol para la actividad quitinasa. Se detectó una banda electroforéticamente homogénea que mostraba actividad proteínica así como quitinasa, una proteo-quitinasa. Esta banda se empleó para desarrollar un hidrolizado de quitina para desarrollar el producto de la presente invención. Se determinó que el peso molecular total de la proteo-quitinasa seleccionada, purificada de
 15 *Aspergillus sp.*, era de 50 kD empleando un patrón de peso molecular en una SDS-PAGE. El seguimiento del patrón de la electroforesis en gel se muestra en la figura 6. Basándose en el ensayo, se seleccionó *Aspergillus niger* MTCC 5572 (depositado en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) por su actividad proteo-quitinasa, y se seleccionó *Bacillus sp.* MTCC 5571 (depositado en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) por su actividad de desacetilación, y se tomaron para la producción y el aislamiento de la enzima a gran escala.

Ejemplo 6: Producción de una proteasa capaz de romper la quitina y el quitosano

Se identificaron cultivos microbianos que eran capaces de producir proteasas ácidas o neutras y endoquitinasa. La fracción enzimática aislada a partir de los respectivos cultivos microbianos que tenía actividad proteínica, así como
 20 quitinasa (proteo-quitinasa), se incubó con una disolución de quitosano al 1% en ácido acético al 1%. La proteasa degradada al quitosano parcialmente, dando como resultado una reducción en la viscosidad del sustrato. Los cultivos identificados por mostrar una reacción proteínica, así como endoquitinasa (proteo-quitinasa) prometedora se cultivaron a gran escala para la producción de enzimas. Se seleccionó específicamente *Aspergillus niger* MTCC 5572, que se cultivó en condiciones de matraces de agitación en medio de extracto de levadura y caseína. El filtrado del cultivo se caracterizó para la actividad enzimática, y la enzima proteo-quitinasa bruta se recuperó
 25 mediante precipitación en sulfato de amonio [90% de saturación]. Se determinó la actividad enzimática del precipitado de sulfato de amonio mediante la determinación de proteínas por medio del procedimiento colorimétrico, y se añadió una cantidad conocida de enzima proteo-quitinasa al quitosano para su modificación. La enzima bruta procedente de *Aspergillus niger* MTCC 5572 se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio en tampón fosfato, pH 7,0. Esto se sometió a una filtración en gel empleando Sephadex® G-100. Las
 30 diferentes fracciones se recogieron y fueron ensayadas para el contenido en proteínas y la actividad enzimática.

Las fracciones n.^{os} 89 a 104 se corresponden con un pico de una única proteína (véase la figura 5). Este procedimiento/proceso se empleó para la purificación de la enzima a partir de 3-12 l de caldo de cultivo en un único lote. Se determinó el pH óptimo y la temperatura óptima para la proteo-quitinasa a lo largo de un intervalo de pH de
 35 1-9 y un intervalo de temperatura de 30-100 °C. La enzima mostraba una actividad óptima a pH 2 (figura 7) y 80 °C (figura 8).

Se identificaron los cultivos de *Bacillus sp.* que eran capaces de producir xilano transferasa ácida, es decir, una enzima desacetilante, y se incubaron con una disolución de quitosano al 1% en ácido acético al 1%. Los cultivos
 40 identificados por mostrar una actividad de desacetilación prometedora se cultivaron a gran escala para la producción de enzimas. Se seleccionó específicamente *Bacillus sp.* MTCC 5571, que se cultivó en condiciones de matraces de agitación en medio de extracto de levadura y caseína. El filtrado del cultivo se caracterizó para la actividad enzimática, y la enzima proteo-quitinasa bruta se recuperó mediante precipitación en sulfato de amonio [90% de saturación]. Se determinó la actividad enzimática del precipitado de sulfato de amonio mediante la detección de una mancha de acetato en una TLC mediante el tratamiento de la quitina con la fracción enzimática, y se añadió una cantidad conocida de enzima desacetilante al quitosano para su modificación. La enzima bruta
 45 procedente de *Bacillus sp.* MTCC 5571 se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio y se disolvió en tampón fosfato, pH 7,0. Esto se sometió a una filtración en gel empleando Sephadex® G-100. Las diferentes fracciones se recogieron y fueron ensayadas para el contenido en proteínas y la actividad enzimática. Este procedimiento/proceso se empleó para la purificación de la enzima a partir de 3-12 l de caldo de cultivo en un único lote.

50 Ejemplo 7: Producción de una xilano acil transferasa capaz de desacetilar la quitina y el quitosano

Se identificaron y aislaron cultivos microbianos que son capaces de producir xilano acil transferasa. Estas enzimas realizan la desacetilación del quitosano bajo las condiciones de ensayo. La mezcla de reacción mostró una solubilización de la quitina a medida que aumenta la viscosidad de la disolución. La aparición de grupos acetilo
 55 libres se detectó mediante TLC. Los cultivos identificados por poseer una propiedad de desacetilación de la quitina se cultivaron a gran escala para la producción de enzimas. Los cultivos seleccionados fueron de *Bacillus sp.* MTCC 5571 y se cultivaron en condiciones de matraces de agitación en medio de extracto de levadura y salvado de trigo. El filtrado del cultivo se caracterizó para la actividad enzimática, y la enzima bruta se recuperó mediante

precipitación en sulfato de amonio [90% de saturación]. Se determinó la actividad enzimática del precipitado de sulfato de amonio, y se añadió una cantidad conocida de enzima al quitosano para su modificación.

Ejemplo 8: Hidrólisis enzimática del quitosano

5 Se añadieron 5 g de quitosano a 70 ml de metanol y 30 ml de agua destilada. La mezcla se agitó de modo continuo a 100 rpm. Se añadió una enzima capaz de romper la quitina [descrita en el ejemplo 5] a 10-1000 U.I. por g de concentración de quitosano. La reacción se realizó a unas temperaturas que varían de 25-95 °C durante 30 min a 5 horas. Las condiciones preferidas fueron de 100 U.I. de enzima por g de quitosano, una temperatura de 50 °C y un periodo de incubación de 2 horas. El producto de la reacción se recuperó mediante filtración y se secó como se describió en el ejemplo 2. El quitosano no modificado [1 g], cuando se disolvió en 100 ml de agua destilada acidificada empleando 2 ml de una disolución de ácido acético, mostró una viscosidad de 80-100 cps. El quitosano modificado enzimáticamente [1 g], cuando se disuelve en 100 ml de agua destilada acidificada empleando 2 ml de una disolución de ácido acético, mostró una viscosidad de 20-30 cps. Para demostrar que dicha enzima actúa sobre el quitosano, se añadió la enzima purificada (al 0,1% en p/vol) a una disolución de quitosano al 0,5% (preparada en ácido acético al 0,5% acuoso), y se incubó a 50 °C durante 16 h. La suspensión se centrifugó, y el sobrenadante transparente se analizó mediante TLC (sistema disolvente de n-propanol:agua:amoníaco 7:2:1) empleando glucosamina como patrón. La enzima que mostró actividad proteo-quitinasa produjo quitooligosacáridos que se revelaron como manchas en la TLC de movimiento lento cuando se compara con la glucosamina. Las proteasas de diferentes organismos que no muestran actividad cruzada de quitinasa no produjeron manchas que se moviesen por la placa de TLC (figura 9).

20 Ejemplo 9: Desacetilación enzimática de la quitina

Se añadieron 5 g de quitina a 100 ml de agua destilada. Esta mezcla se agitó de modo continuo a 100 rpm. Se añadió una enzima capaz de desacetilar la quitina [ejemplo 6] a 500-1000 U.I. por g de concentración de quitina. La reacción se realizó a unas temperaturas que varían de 25-95 °C durante 8 a 24 horas. Las condiciones preferidas fueron de 800 U.I. de enzima por g de quitina, una temperatura de 50 °C y un periodo de incubación de 8 horas.

25 El producto de la reacción se recuperó mediante filtración y se secó como se describió en el ejemplo 2. La quitina no modificada era completamente insoluble en agua. La quitina modificada enzimáticamente [10 g], cuando se agitó en 100 ml de agua destilada acidificada empleando 2 ml de una disolución de ácido acético, mostró una viscosidad de 30-50 cps, lo cual indica una solubilización parcial de la quitina como resultado de la desacetilación.

30 Ejemplo 10: Composición de quitosano conservante de la cosecha y procedimiento preferido para su fabricación

Se introducen 5 g de quitosano [50-70 DDA, malla 60] en un matraz de fondo redondo y se añaden 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (al 99%). En este caso puede utilizarse quitosano de cualquier otra calidad. La suspensión se mezcla a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 min. La mezcla se calienta hasta 65 °C. Se añade anhídrido succínico en diferentes proporciones que varían de 15 g a 0,1 g a la mezcla y se continúa la agitación durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60-70 °C y preferentemente a 65 °C. Se deja que la suspensión se enfríe. Se añaden 0,5 ml de ácido láctico y 4000 U.I. de la enzima de desacetilación producida a partir de *Bacillus sp.* MTCC 5571 y la mezcla se agitó durante 7 horas. El ácido láctico puede ser reemplazado por cualquier otro ácido inorgánico u orgánico.

40 Se añadió 500 U.I. de la enzima quitinolítica producida a partir de *Aspergillus niger* MTCC descrita en el ejemplo 5 y se continuó con la agitación durante 1 hora. La suspensión se dejó enfriar y se filtró, y el sólido se secó al aire. El polvo fluido se forma disgregando los aglomerados sueltos de modo mecánico y tamizando con una malla 100. No se observó formación de aglomerados. El polvo fluido después se seca aún más en una estufa de aire caliente a 70 °C durante 3-6 horas. La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. El polvo succinalado es soluble en agua cuando se añaden más de 0,5 g de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción.

Ejemplo 11: Producción de un derivado de azúcar-succinato de quitosano hidrosoluble e hidroinsoluble que porta restos formaldehído

50 Se introducen 5 g de succinato de quitosano, según se describe en el ejemplo 10, en un matraz de fondo redondo y se añaden 100 ml de metanol (99%). La suspensión se mezcla a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 min. La mezcla se calienta hasta 60 °C. La temperatura se mantiene a lo largo de la reacción. Se disuelve sacarosa en el intervalo de 1 g a 0,02 g (véase la tabla n.º 3) en 10 ml de agua, y esto se añade a la suspensión.

La mezcla se agitó durante 15 min. Se añadieron 5 ml de formaldehído a esta mezcla gota a gota a lo largo de 30 min. La reacción continuó a 60 °C con agitación constante durante 1 a 6 horas más. Esto se denomina el tiempo de

reacción en la tabla n.º 3. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Después, el producto se recuperó mediante filtración. Los sólidos se lavaron con 100 ml de metanol al 90% y se secaron al aire. El producto se caracterizó como polvo fluido o aglomerados. Se determinó la solubilidad del polvo al 0,5% en agua destilada (pH 6,5) y ácido acético al 1%. Los resultados de estos experimentos se resumen a continuación:

5

Tabla 3

Sacarosa en g	Tiempo de reacción en h	Forma del producto	Solubilidad en agua	Solubilidad en ácido acético al 1%
1	6	polvo	insoluble	insoluble
0,5	6	polvo	insoluble	insoluble
0,1	6	aglomerados/gel	soluble	insoluble
0,02	6	aglomerados/gel	soluble	insoluble
0,02	3	aglomerados/gel	soluble	soluble
0,02	1	polvo	soluble	soluble

Todos los productos hidrosolubles tenían un grado variable de actividad antimicrobiana que es constantemente mejor que la actividad antimicrobiana del material de partida (producto del ejemplo 10).

La actividad antimicrobiana de estos productos se ensayó empleando *E. coli*, y el protocolo descrito en el ejemplo 14. Los resultados del ensayo son los siguientes:

10

Tabla 4 - El recuento inicial de *E. coli* fue de 4×10^7

Producto/concentración	al 1%	al 0,5%	al 0,1%	al 0,033%
Producto del ejemplo 10	2×10^3	2×10^3	4×10^3	1×10^4
Producto 10 con 0,1 g de sacarosa	7×10^2	4×10^2	4×10^2	1×10^3
Producto 10 con 0,02 g de sacarosa, 6 h	5×10^2	2×10^2	4×10^2	90
Producto 10 con 0,02 g de sacarosa, 1 h	2×10^2	2×10^2	4×10^2	109

Las reacciones se realizaron como se describió anteriormente, pero reemplazando la sacarosa por glucosa o lactosa a 0,02 g cada una durante 3 horas. Los productos de estas reacciones fueron solubles en agua y mostraron una actividad antimicrobiana del 100% contra *E. coli* cuando se ensayan mediante el procedimiento/proceso descrito anteriormente.

15

Ejemplo 12: Composición de quitosano preparada empleando ácido fosforoso y que porta restos formaldehído

Se introducen 5 g de quitosano [50-70 DDA, malla 60] en un matraz de fondo redondo y se añaden 100 ml de metanol (al 99%). En este caso puede utilizarse quitosano de cualquier otra calidad. La suspensión se mezcla a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 min. La mezcla se calienta hasta 60 °C. Se disuelve ácido fosforoso (H_3PO_3) en diferentes proporciones que varían de 0,5 g a 15 g en 20 ml de agua y esto se añade gota a gota a la mezcla con agitación durante 1 hora. Después se añaden 5 ml de formaldehído gota a gota. La temperatura se mantiene entre 60-65 °C y preferentemente a 63 °C durante 2-6 horas después de completar la adición. La suspensión se dejó enfriar y se filtró, y el sólido se secó al aire. El polvo fluido se forma disgregando los aglomerados sueltos de modo mecánico y tamizando con una malla 100. No se observó formación de aglomerados. El polvo fluido después se seca aún más en una estufa de aire caliente a 70 °C durante 3-6 horas.

20

25

La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. La solubilidad también se comprueba a pH 8, 9, y 10, ajustado empleando NaOH diluido, o tampón Tris.

30

Los productos formados empleando quitosano y ácido fosforoso en una proporción de 1:1 y 1:2 mostraron solubilidad en un amplio intervalo de pH (7-10), y formaron disoluciones de ligeramente turbias a transparentes.

35

Estas disoluciones muestran un grado variable de actividad antimicrobiana. Los estudios antimicrobianos se realizaron empleando *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2200 (ATCC 9027) capaz de crecer en un amplio intervalo de pH. Un cultivo realizado durante la noche en caldo de cultivo nutriente se inoculó (100 microlitros) de nuevo en

caldo de cultivo nutriente (10 ml) con pH variable (véase la tabla) sin adición (control) y con adición del producto de quitina-ácido fosforoso. Los cultivos se incuban en un agitador a 25 °C durante 8 h, y el crecimiento se registra como la densidad óptica (DO) del caldo de cultivo a 600 nm. Una densidad óptica baja (más baja que el control) indica menos crecimiento y algo de actividad antimicrobiana. Cuando no se produce crecimiento (DO de cero), esto significa una inhibición del 100% de los microbios.

Tabla 5 - Inhibición de *Pseudomonas* a pH 8,5

	C:P 1:1	C:P 1:2
pH 7		
Control	1,74	
0,01%	1,56	1,53
0,05%	0	0
0,10%	0	0
pH 8		
Control	1,73	
0,01%	1,39	0
0,05%	0	0
0,10%	0	0
pH 9		
Control	1,74	
0,01%	1,39	1,68
0,05%	0	0
0,10%	0	0

Cuando los plátanos se almacenan durante un largo tiempo, la corona del racimo comienza a secarse. El tallo que une el fruto del plátano a la corona se denomina pedicelo. Empieza a marchitarse.

10 La marchitación del pedicelo es el mejor indicador del secado. Una menor marchitación significa la conservación de la frescura. Se realizó un ensayo con 1000 kg de plátano mediante el procedimiento convencional (control) de inmersión en 0,1% del producto de los inventores, y la pulverización del producto de los inventores. Esto se repitió en 2 granjas (total de 6000 kg de plátanos). El porcentaje muy bajo de marchitación del pedicelo tras la inmersión y también tras la pulverización de la composición de ensayo demuestra su buena eficacia para retrasar el secado y, en último término, para retrasar el envejecimiento y la senescencia y para mejorar la capacidad de almacenamiento.

Los resultados se presentan a continuación en la tabla 6.

Tabla 6 - Eficacia del producto C:P 1:1 en la conservación de frutas

% de marchitación del pedicelo/granja empleando el producto del ejemplo 12		
n.º de granja	Granja n.º 1	Granja n.º 2
Inmersión	2,4	1,9
Pulverización	3,2	2,8
Control	2,7	2,4

20 Mediante el procedimiento de inmersión se observó una mejora significativa en la marchitación (pérdida de peso, o conservación de la frescura).

Ejemplo 13: Aplicación de la composición conservante

25 Se prepararon disoluciones de 10 gramos de quitosano y su producto descrito en los ejemplos 1, 2, 4 y 10 disolviendo el quitosano en ácido acético al 2% y todos los demás derivados en agua para obtener un volumen de 1000 ml de disolución en un recipiente con una capacidad de 15 l. Se sumergieron 3 kg de tomates o 2 kg de plátanos en la disolución durante 15 s. Cuando el material se extrajo del recipiente, se dejó que el exceso de disolución escurriese hacia el mismo recipiente durante 1 min. Esta acción de escurrir se repitió con los siguientes

cinco lotes de fruta fresca. Así, se sumergieron un total de 15 kg de tomates o 10 kg de plátanos en 10 l de disolución.

Después la disolución remanente en el recipiente se midió con precisión y se registró la pérdida de líquido como la diferencia entre el volumen inicial y final. Esto se dividió entre la cantidad total de fruta sumergida para obtener el consumo de disolución por kg de fruta sumergida. Los resultados de este experimento se indican en la tabla 7.

Tabla 7

Producto	Consumo en ml por kg de tomate	Consumo en ml por kg de plátano
Quitosano	12	19
Quitosano:ácido láctico 1:0,4 como en el ejemplo 1	9	10
Quitosano:anhídrido succínico 1:0,1 como en el ejemplo 2	8	8
Producto del ejemplo 4	3	5
Producto del ejemplo 10	3	3

La quinta composición mostró de tres a cuatro veces menos consumo por kg de plátanos y tomates que la disolución de quitosano en ácido acético.

10 **Ejemplo 14: Actividad antimicrobiana de las composiciones de quitosano**

Se disolvió quitosano en ácido acético al 2% y sus productos descritos anteriormente se disolvieron en agua. Se emplearon 300 mg del producto para preparar 10 ml de disolución. Se cultivaron durante la noche *E. coli* NCIM 2065 y *Bacillus subtilis* NCIM 2063 (10^9 células/ml de densidad), se diluyeron en 100 veces con caldo de cultivo líquido estéril y se emplearon para el ensayo antimicrobiano. El ensayo se puso en marcha mezclando los cultivos diluidos con una disolución madre de quitosano o producto como sigue:

Vol. del cultivo en ml	7	8,5	9,7	9,9
Vol. de quitosano/producto en ml	3	1,5	0,3	0,1
Concentración del producto (%)	1	0,5	0,1	0,033

La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 min. Se determinó el recuento viable total de la mezcla. Esto, cuando se compara con el recuento inicial del cultivo, indica la eficacia microbicida del producto. Los datos para *E. coli* y *Bacillus subtilis* se indican en la tabla 8 y 9.

La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 min. Se determinó el recuento viable total de la mezcla. Esto, cuando se compara con el recuento inicial del cultivo, indica la eficacia microbicida del producto. Los datos para *E. coli* y *Bacillus subtilis* se indican en la tabla 8 y 9.

Tabla 8 - El recuento inicial de *E. coli* fue de 4×10^7

Producto/concentración	1%	0,5%	0,1%	0,033%
Quitosano	2×10^7	4×10^7	4×10^7	4×10^7
Quitosano:ácido láctico 1:0,4	6×10^5	1×10^6	2×10^7	2×10^7
Quitosano:anhídrido succínico 1:0,1	8×10^6	2×10^7	2×10^7	2×10^7
Producto del ejemplo 4	9×10^5	2×10^6	9×10^6	3×10^7
Producto del ejemplo 9	3×10^7	9×10^6	3×10^6	7×10^5
Producto del ejemplo 10	2×10^3	2×10^3	4×10^3	1×10^4

Tabla 9 - El recuento inicial de *Bacillus subtilis coli* fue de 3×10^7

Producto/concentración	1%	0,5%	0,1%	0,033%
Quitosano	3×10^7	3×10^7	4×10^7	4×10^7
Quitosano:ácido láctico 1:0,4	4×10^5	3×10^6	1×10^7	7×10^6
Quitosano:anhídrido succínico 1:0,1	3×10^6	3×10^6	8×10^7	6×10^7
Producto del ejemplo 4	7×10^5	1×10^6	5×10^6	1×10^6
Producto del ejemplo 10	1×10^4	2×10^4	4×10^5	1×10^5

La mezcla (al 0,1%) se incubó en una nevera (a una temperatura de 4-10 °C) durante hasta 7 semanas. El aumento en la turbidez se detectó de modo visual y se puntuó como +. Si no se produce aumento en la turbidez (-), esto indica una actividad microbiostática.

5 Tabla 10 - Actividad microbiostática contra *E. coli* (NCIM 2065) y *B. subtilis* (NCIM 2063)

Producto/cultivo microbiano	Semanas :	<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>		
		3	5	7	3	5	7
Quitosano		+	+	+	+	+	+
Quitosano:ácido láctico 1:0,4		-	+	+	-	-	+
Quitosano:anhídrido succínico 1:0,1		+	+	+	-	+	+
Producto del ejemplo 4		-	-	+	-	-	+
Producto del ejemplo 9		-	-	-	-	-	+

La quinta composición muestra una alta actividad antimicrobiana, así como una actividad microbiostática, comparado con la disolución de quitosano en ácido acético y la primera, segunda y cuarta composición.

Ejemplo 15: Efecto de las composiciones conservantes sobre la estabilidad durante el almacenamiento

10 Con la disolución de quitosano, el quitosano procesado mediante los ejemplos 6 y 7 se empleó para revestir plátanos y fresas (100 frutas en cada lote), observándose el número más bajo de descomposiciones microbianas (22 y 9 para las frutas respectivas) después de 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente, y de 25 para el quitosano procesado mediante el procedimiento/proceso del ejemplo 6.

Ejemplo 16: Mejora en la caducidad por el producto del ejemplo 10 (quinta composición)

15 Se trataron plátanos verdes recién recolectados (<30 h de la recolección) utilizando una disolución al 0,1% del producto del ejemplo 10 en agua. El tratamiento puede administrarse sumergiendo los plátanos en dicha disolución durante nominalmente 10-15 s, o mediante pulverización directa de la disolución sobre los plátanos con un dispositivo adecuado para que la superficie de los plátanos se humedezca, o haciendo pasar los plátanos a través de una cámara cerrada que está saturada con una nebulización de dicha disolución (nebulización indirecta). Los plátanos tratados se secan al aire. Estos plátanos se almacenan a temperatura ambiente (20-32 °C) y una
20 humedad relativa del 40-60%. Los plátanos del mismo lote que son idénticos a los plátanos tratados se consideran el "control no tratado". Los plátanos tratados y no tratados se conservaron en condiciones idénticas durante hasta 15 días. Los plátanos tratados mantuvieron el color verde y el peso, mientras que los plátanos sin tratar perdieron peso y desarrollaron decoloración. La fotografía de plátanos tratados y no tratados en el 12° día muestra las
25 diferencias visuales. Los plátanos tratados mostraron una mejor condición fisiológica, ensayados por medios químicos, mediante la determinación de su contenido en sólidos totales (contenidos BRIX), azúcares reductores y pérdida de peso. Los datos se muestran en la tabla 11 y la figura 1.

Tabla 11 - Resultados de los ensayos cuantitativos realizados en plátanos tratados y no tratados control en el día 6° de almacenamiento

Parámetro	Tratado	Control
Pérdida de peso	2,6	8,7
BRIX	22-24	20-22
RS	800-1100	300-850

30 La fotografía de plátanos no tratados (izquierda) y tratados (derecha) en el 12° día de almacenamiento se muestra en la figura 1.

Después del almacenamiento durante 8-15 días, los plátanos tratados y no tratados control se trataron con etileno. Los plátanos tratados maduraron con normalidad, mientras que los plátanos no tratados control se pusieron duros y no maduraron o se volvieron negros y blandos. Ambos tipos de plátanos del lote no tratado no fueron aceptables para el consumo.

5 **Ejemplo 17: Cambios fisiológicos positivos y actividad microbiostática**

Se trataron tomates enteros y manzanas cortadas con el producto del ejemplo 10, exactamente como se describe en el ejemplo 14 para los plátanos. Los tomates tratados mantuvieron su peso, textura y frescura durante 30 días frente a los tomates control sin tratar, que se arrugaron en 12-15 días, dando como resultado una pérdida de peso. Los cambios fisiológicos en los tomates tratados y control se controlaron en el 7° día de almacenamiento empleando una técnica de escaneado de MRI.

La piel pulposa de los tomates tratados era más uniforme en su densidad de color. La piel pulposa de los tomates no tratados mostraba manchas oscuras que son indicativas de un secado no uniforme y mayor.

El escaneado de MRI de los tomates representativos se incluye en la figura 2.

15 Los trozos de manzanas cortadas se envasaron en una bolsa de polietileno o un recipiente de plástico transparente y se almacenaron en la nevera a una temperatura de 4-9 °C. Las manzanas cortadas del control comenzaron a tomar un color marrón desde el día 2 y se volvieron blandas para el día 3, mientras que las manzanas cortadas tratadas mantuvieron el color, el gusto y la textura dura durante 6 días. La fotografía (figura 3) muestra la diferencia en el aspecto de las manzanas cortadas tratadas y no tratadas en el día 4.

20 Los trozos de manzanas cortadas tratadas y no tratadas se envasaron en un recipiente de plástico transparente y se almacenaron como se describió anteriormente durante hasta 25 días. Las manzanas cortadas no tratadas desarrollaron un crecimiento fúngico [manchas negras en la fotografía de la figura 4], mientras que las manzanas cortadas tratadas no desarrollaron crecimiento fúngico ni microbiano. Los resultados se muestran en la siguiente fotografía.

Ejemplo 18: Composición de quitosano preparada empleando ácido fosforoso y ácido clorhídrico

25 Se introducen 750 g de quitosano [50-70 DDA, malla 100] en un matraz de fondo redondo y se añaden 15000 ml de metanol (99%). En este caso puede utilizarse quitosano de cualquier otra calidad. La suspensión se mezcla a fondo mediante agitación a 100 rpm durante 30 min. La mezcla se calienta hasta 60 °C. Después se añaden 750 ml de formaldehído a lo largo de 1-2 min.

30 Se disuelven 750 g de ácido fosforoso (H_3PO_3) en 7500 ml de agua y se añaden gota a gota a esta mezcla mediante agitación durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60-65 °C y preferentemente a 63 °C durante 6 horas después de completar la adición. La suspensión se dejó enfriar y se filtró, y el sólido se secó al aire. Se forma un polvo fluido con pequeños aglomerados. Estos se disgregan de modo mecánico y se tamizan empleando una malla 100. El polvo fluido después se seca aún más en una estufa de aire caliente a 70 °C durante 3-6 horas. La solubilidad de las partículas fluidas se comprueba añadiendo 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6,5) a lo largo de 5 min. La mezcla se agita de modo continuo durante la adición y durante 10 minutos más y después la solubilidad se comprueba visualmente. La solubilidad también se comprueba a pH 8, 9, y 10, ajustado empleando NaOH diluido, o tampón Tris.

40 El producto se disuelve en agua, pero precipita cuando el pH aumenta hasta 7,0. El polvo seco obtenido en esta reacción se resuspendió en 20 volúmenes de metanol al 90% y se añadieron 2 volúmenes de HCl concentrado. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El polvo se retiró mediante filtración, se lavó con 20 vol de metanol al 90% 3 veces y se secó como se describió anteriormente. El producto resultante es soluble de pH 3 a 12.

Los productos de los demás ejemplos (en particular, los ejemplos 10, 12), cuando se tratan con HCl según se describe en este ejemplo, no alteraron el pH de solubilidad máximo.

45 **Ejemplo 19: Uso de quitosano hidrosoluble como vehículo**

Se disolvió 1 g de quitosano hidrosoluble, derivado según el ejemplo 10, en 100 ml de agua. A 9 ml de esta disolución se le añadió 1 ml de una disolución de sulfato de sodio (al 1%). Esto se mezcló a mano durante 2 min. Después se añadió 1 ml de amoníaco líquido. Esto produjo la precipitación del quitosano. Junto con el quitosano también precipitó el sulfato de cobre unido. El sulfato de cobre es soluble en amoníaco líquido y la disolución resultante tiene un color azul oscuro. El cálculo del cobre se realiza mediante colorimetría y empleando una gráfica patrón de 0,02-0,1%. A partir de esto, se calculó que el quitosano unido al cobre era 90%.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un derivado de quitosano mediante la activación de quitosano, suspendiendo dicho quitosano en alcohol que contiene un porcentaje de agua de 0% hasta un máximo de aproximadamente 30%, agitando con calentamiento durante un periodo de tiempo para obtener el quitosano activado o un precursor del quitosano, y después haciendo reaccionar dicho quitosano activado o dicho precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos por medio de fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.
2. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
- dicho derivado tiene una propiedad que comprende una propiedad antimicrobiana o microbiostática o antitranspirante o antifúngica o de conservación de la fruta o microbiostática o de mejoramiento de la caducidad o una combinación de estas propiedades.
 - dichas fuerzas físicas incluyen la adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.
3. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho derivado se prepara sometiendo dicho quitosano suspendido en dicho alcohol al menos a una de las siguientes etapas:
- añadir agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol y calentar dicha mezcla hasta aproximadamente 70 °C, añadir anhídrido succínico a esta mezcla,
 - agitar durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la reacción a una temperatura de entre aproximadamente 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, para obtener una segunda composición en suspensión,
 - y bien (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someter a otra reacción con un reactivo para obtener otro derivado de dicha segunda composición,
 - añadir agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol y calentar dicha mezcla hasta aproximadamente 70 °C, añadir anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso de la materia prima a esta mezcla,
 - agitar durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para que la reacción se mantenga a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, para obtener un derivado succínico en suspensión,
 - dejar que la suspensión se enfríe hasta aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a otra reacción con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% al 20% del peso seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante 1 hora, filtrar y secar los sólidos para obtener una cuarta composición en suspensión,
 - y bien (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someter a otra reacción con un reactivo para obtener otro derivado de dicha cuarta composición, que comprende un material de grano grueso que es soluble en agua,
 - añadir agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol y calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, añadir anhídrido succínico a esta mezcla,
 - agitar durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para que la reacción se mantenga a una temperatura de entre 60 a aproximadamente 70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, durante un periodo de tiempo,
 - dejar que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a otra reacción con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso seco del derivado succínico, añadir, por cada 5 gramos de peso seco del derivado succínico empleado, una enzima para la desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 7 horas, añadir después una enzima quitinolítica, preferentemente a aproximadamente 500 U.I. por 5 g de peso seco del derivado succínico, continuar agitando durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora, dejar que la suspensión se enfríe para obtener una quinta composición en suspensión,
 - y bien (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someter a otra reacción con un reactivo para obtener otro derivado de dicha quinta composición,
 - añadir agua a aproximadamente 20% del volumen de alcohol, calentar la mezcla de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, añadir anhídrido succínico a esta mezcla,
 - agitar durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la reacción, mantener la temperatura entre 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, durante un periodo de tiempo,

- ii. dejar que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a otra reacción con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso seco del derivado succínico, y añadir, por cada 5 gramos de peso seco del derivado succínico empleado, una enzima para la desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 7 horas, añadir después una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 g de peso seco del derivado succínico empleado, y continuar agitando durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora, dejar que la suspensión se enfríe para obtener una quinta composición en suspensión, recuperar dicha quinta composición como un polvo sólido,
- iii. suspender el polvo seco de dicha quinta composición en alcohol puro, mezclar a fondo la suspensión mediante agitación a 100 rpm durante 30 min y calentar y mantener la temperatura durante el procedimiento a 60 °C, añadir un azúcar disuelto en agua en aproximadamente 10% en volumen al volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un periodo de tiempo suficiente para el mezclado, añadir formaldehído gota a gota durante aproximadamente 30 minutos o durante un periodo de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante, mantener la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante el periodo necesario hasta que la reacción se complete,
- iv. dejar después que la mezcla de reacción se enfríe hasta la temperatura ambiente,
- v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una sexta composición en suspensión,
- vi. y bien (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someter a otra reacción con un reactivo para obtener otro derivado de dicha sexta composición que puede lavarse con 100 ml de metanol al 90% y secarse al aire,
- e. suspender el quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar a fondo con agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, calentar dicha mezcla hasta aproximadamente 60 °C, añadir ácido fosforoso (H_3PO_3) disuelto en agua y añadir gota a gota a esta mezcla con agitación, añadir formaldehído a un peso aproximadamente igual al peso seco del quitosano activado, o su derivado, gota a gota, mantener la temperatura entre aproximadamente 60-65 °C, preferentemente a 63 °C, durante un periodo de tiempo de preferentemente 2-6 horas después de completar la adición, dejar que la suspensión se enfríe y recuperar la séptima composición en suspensión, y bien (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someter a otra reacción con un reactivo para obtener otro derivado de dicha séptima composición; y dicha séptima composición puede ser soluble en un amplio intervalo de pH 7 a 10 produciendo disoluciones de ligeramente turbias a transparentes,
- f. suspender el quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar a fondo con agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, calentar dicha mezcla hasta aproximadamente 60 °C, añadir 750 ml de formaldehído durante un periodo de unos pocos minutos, añadir aproximadamente 10% de un ácido inorgánico o ácido fosforoso (H_3PO_3) disuelto en agua, realizándose la adición gota a gota a esta mezcla con agitación durante aproximadamente una hora o durante un periodo de tiempo necesario para que la mezcla sea eficaz, mantener la temperatura entre aproximadamente 60-65 °C, preferentemente a 63 °C durante aproximadamente seis horas o durante un periodo de tiempo necesario para que la reacción se complete, dejar que la suspensión se enfríe después de completar la adición y recuperar la octava composición en suspensión,
- i. y bien (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someter a otra reacción con un reactivo para obtener otro derivado de dicha octava composición,
- g. suspender el quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar a fondo con agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, calentar la mezcla hasta 60 °C, añadir formaldehído durante un periodo de unos pocos minutos, añadir aproximadamente 10% de un ácido inorgánico o ácido fosforoso (H_3PO_3) disuelto en agua, realizándose la adición gota a gota a esta mezcla con agitación durante aproximadamente una hora o durante un periodo de tiempo necesario para que la mezcla sea eficaz, mantener la temperatura entre aproximadamente 60-65 °C, y preferentemente a 63 °C durante 6 horas o durante un periodo de tiempo necesario para que la reacción se complete y, después de completar la adición, dejar que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como un polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un periodo de tiempo necesarios para obtener una buena mezcla, filtrar, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar para recuperar la novena composición,
- h. suspender el quitosano en alcohol preferentemente 20 volúmenes, mezclar a fondo mediante agitación para lograr la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 min, calentar dicha mezcla hasta 70 °C,
- i. añadir anhídrido succínico a diferentes proporciones que varían de 15 g a 0,1 g a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir un buen mezclado, mantener la

- temperatura entre 60-70 °C, y preferentemente a aproximadamente 65 °C, durante 1 hora o durante un periodo de tiempo necesario para la reacción, dejar que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,
- 5 ii. añadir ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso seco del derivado succínico, añadir, por cada 5 gramos de peso seco del derivado succínico empleado, una enzima para la desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 7 horas, añadir después una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 g de peso seco del derivado succínico empleado y continuar agitando durante un periodo de tiempo, preferentemente durante 1 hora, dejar que la suspensión se enfríe para obtener una quinta composición sólida,
- 10 iii. recuperar y secar al aire la quinta composición,
- iv. disolver la quinta composición para obtener una disolución al 1% en agua, añadir una disolución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada capaz de adsorberse sobre la quinta composición a pH alcalino, como una disolución,
- 15 v. dicha disolución de sulfato de cobre o la molécula cargada pueden estar al 1% con respecto al agua,
- vi. dicha disolución de sulfato de cobre o la molécula cargada pueden suspenderse en una cantidad pequeña, de aproximadamente 1% del volumen de agua empleado para disolver la quinta composición, y
- vii. mezclar durante unos pocos minutos,
- viii. añadir amoníaco líquido para precipitar el quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula cargada para obtener un derivado de la décima composición.
- 20 4. Un derivado de quitosano producido mediante la activación del quitosano suspendiendo dicho quitosano en alcohol que contiene un porcentaje de agua de agua de 0% hasta un máximo de aproximadamente 30%, agitando con calentamiento durante un periodo de tiempo para obtener el quitosano activado, o un precursor del quitosano, y después haciendo reaccionar dicho quitosano activado o dicho precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos por medio de fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.
- 25 5. El derivado de quitosano de la reivindicación 4, en el que dicho derivado tiene una propiedad que comprende una propiedad antimicrobiana o microbiostática o antitranspirante o antifúngica o de conservación de la fruta, o una combinación de estas propiedades.
6. El derivado de quitosano de la reivindicación 4, en el que dicho derivado se prepara mediante el procedimiento de la reivindicación 3.
- 30 7. La composición que comprende, como ingrediente fundamental, al menos una de las composiciones de la reivindicación 4 o 5 o 6.
8. La composición de la reivindicación 7, que comprende un polvo o una disolución de al menos una de dichas composiciones en agua a una concentración eficaz para una acción deseada que comprende:
- 35 a. la conservación de frutas, verduras, alimentos y piensos ingeribles,
- b. retrasar la maduración, retrasar el envejecimiento y retrasar la senescencia de productos naturales que incluyen frutas, verduras y flores.
9. La composición de la reivindicación 8, que comprende al menos uno de los siguientes:
- 40 a. dicha composición comprende al menos una cualquiera de dicha segunda composición y de dicha cuarta a décima composición, o sus mezclas,
- b. dicha concentración eficaz es del 0,1 %,
- c. el ácido acético está al 2%.
10. Un procedimiento para mejorar la caducidad de frutas, que comprende un tratamiento de inmersión, pulverización, nebulización u otro procedimiento de aplicación externa o interna, o aplicaciones a frutas cortadas o procesadas y productos naturales procesados de una composición que, como ingrediente fundamental, comprende una o más de una composición de la reivindicación 4 o 5 o 6.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho tratamiento es para retrasar la maduración y/o la descomposición microbiana.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha fruta son plántanos, mangos, manzanas, fresas, naranjas, limas.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
- a. dicho alcohol es metanol o cualquier otro alcohol polar,
- b. dicha agitación se realiza durante 30 min, preferentemente a 100 revoluciones por minuto.

14. El procedimiento de la reivindicación 3, etapa c), etapa d) y etapa h), en el que dicha enzima quitinolítica que tiene actividad proteolítica, así como una acción quitinolítica, comprende una enzima que tiene al menos una de las siguientes propiedades: un peso molecular de 50 kilodaltons (kD) en una electroforesis de SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 14, que comprende dicha enzima quitinolítica aislada de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.
16. El procedimiento de la reivindicación 3, etapa c), etapa d) y etapa h), que comprende dicha enzima desacetilante aislada de *Bacillus sp.* MTCC 5571 o mutantes derivados del mismo.
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 3, etapa c), etapa d) y etapa h), en el que dicha enzima desacetilante es una xilano acil transferasa preparada a partir de *Bacillus sp.* MTCC 5571, o mutantes derivados del mismo, o cualquier otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz de producir una enzima que tenga actividad desacetilante.
18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se emplea una enzima quitinolítica termoestable que tiene actividad proteolítica, así como actividad quitinolítica, una proteo-quitinasa, para preparar un derivado hidrolizado.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha proteo-quitinasa se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o de mutantes derivados del mismo, o de cualquier otro hongo o de cualquier otro microorganismo capaz de producir una actividad proteo-quitinolítica.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha enzima quitinolítica tiene un peso molecular, según una SDS-PAGE, de 50 kilodaltons y una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y a 80 °C.

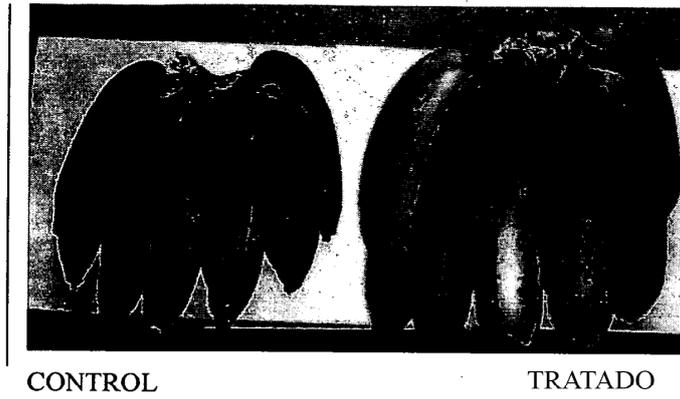


FIGURA 1

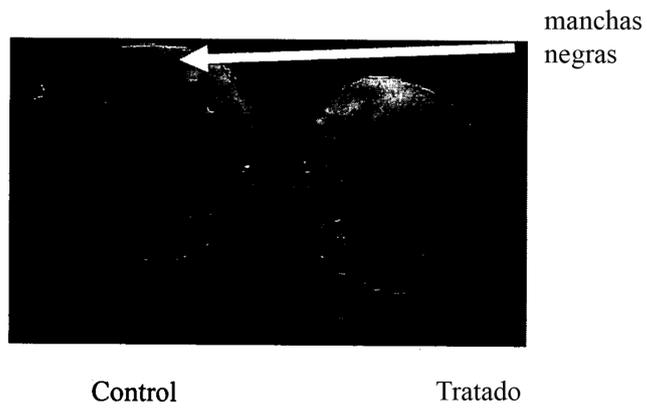
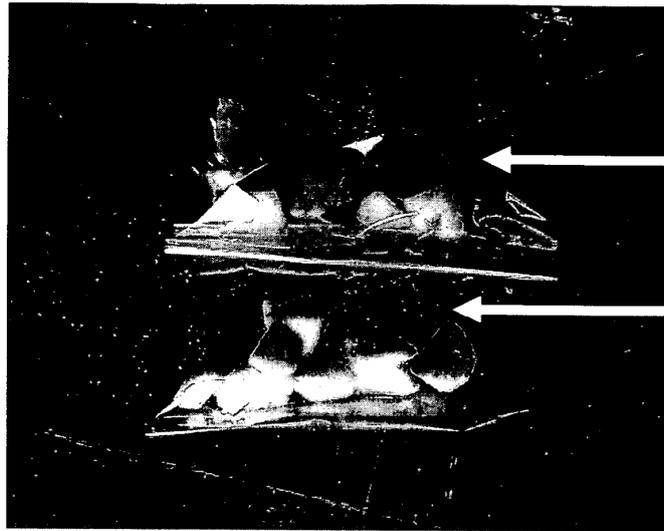


FIGURA 2



Manzana cortada
sin tratar

Manzana cortada
tratada

FIGURA 3



Ensayo

Control

FIGURA 4

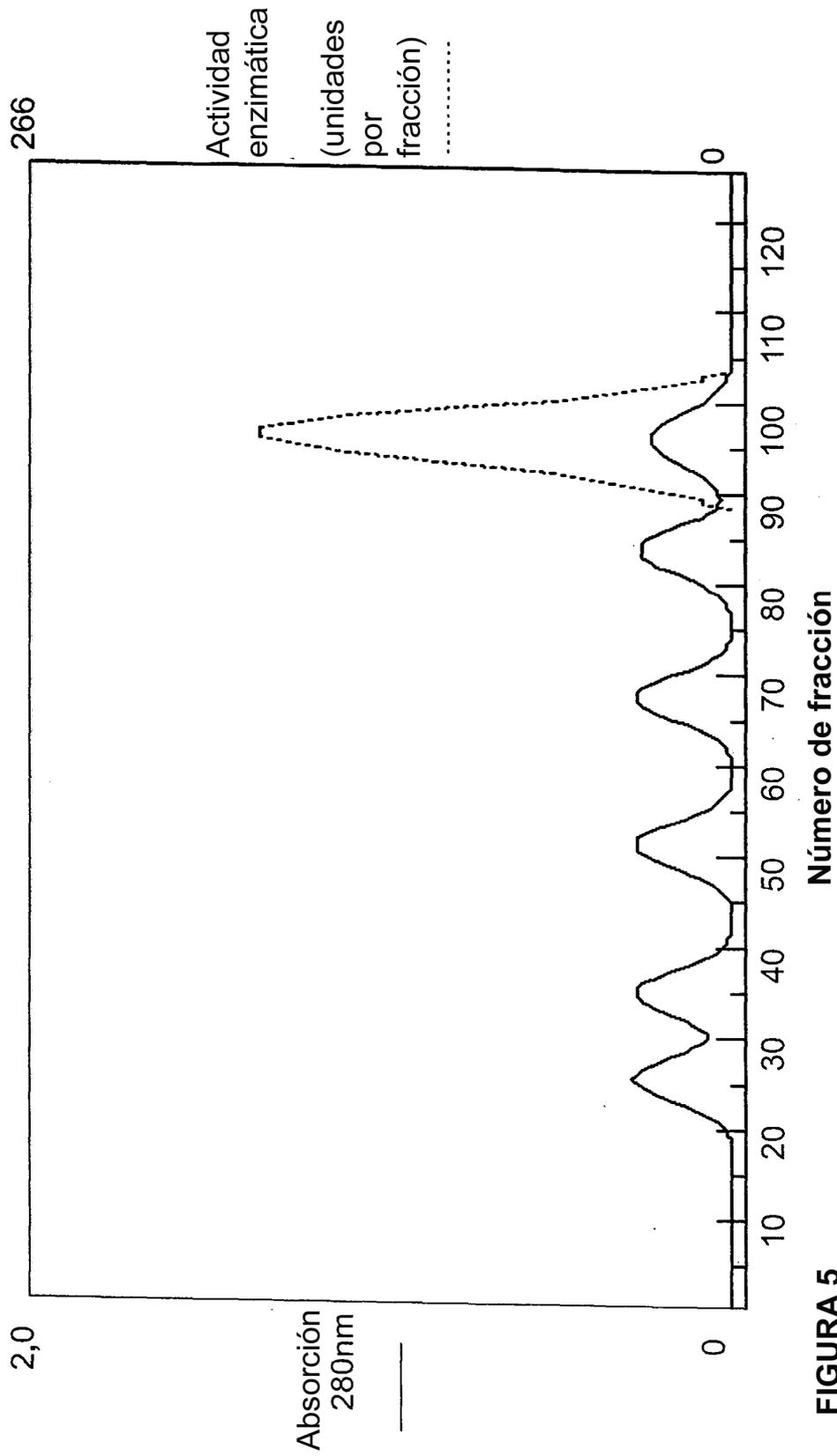


FIGURA 5

FIGURA 6

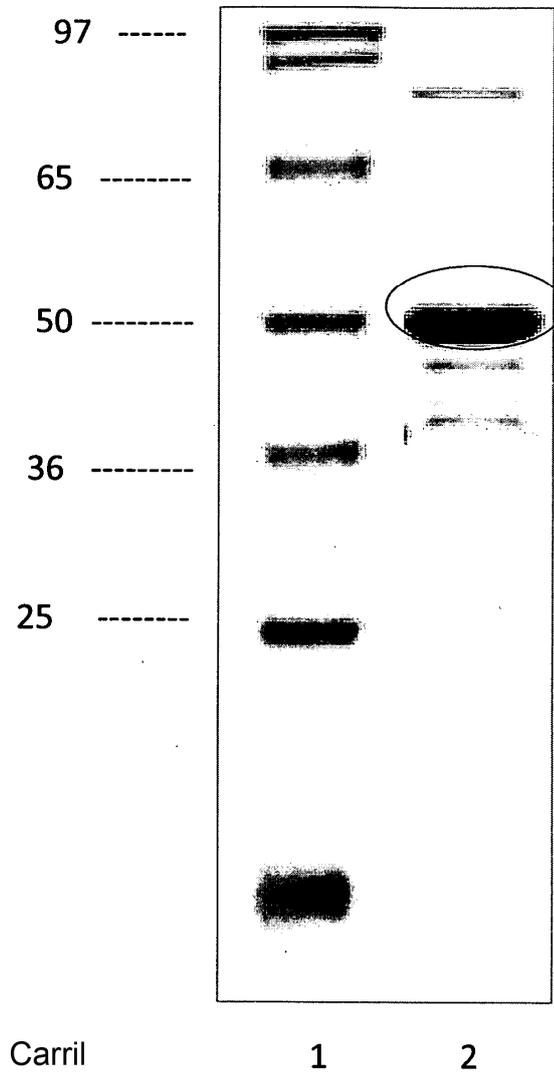


FIGURA 7

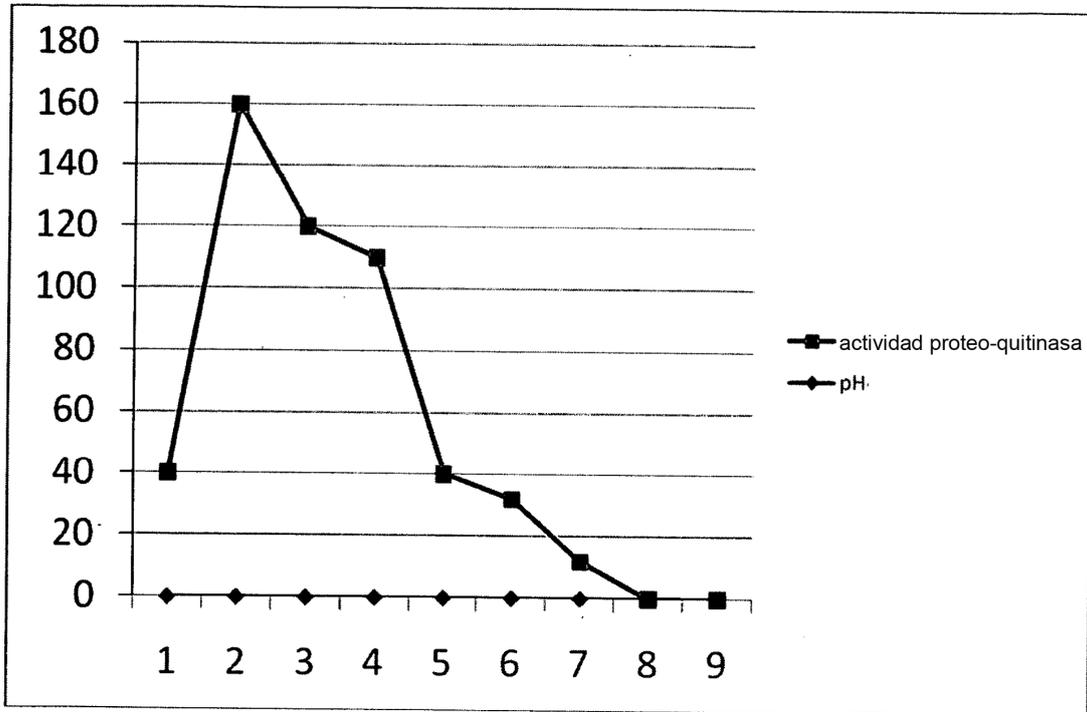


FIGURA 8

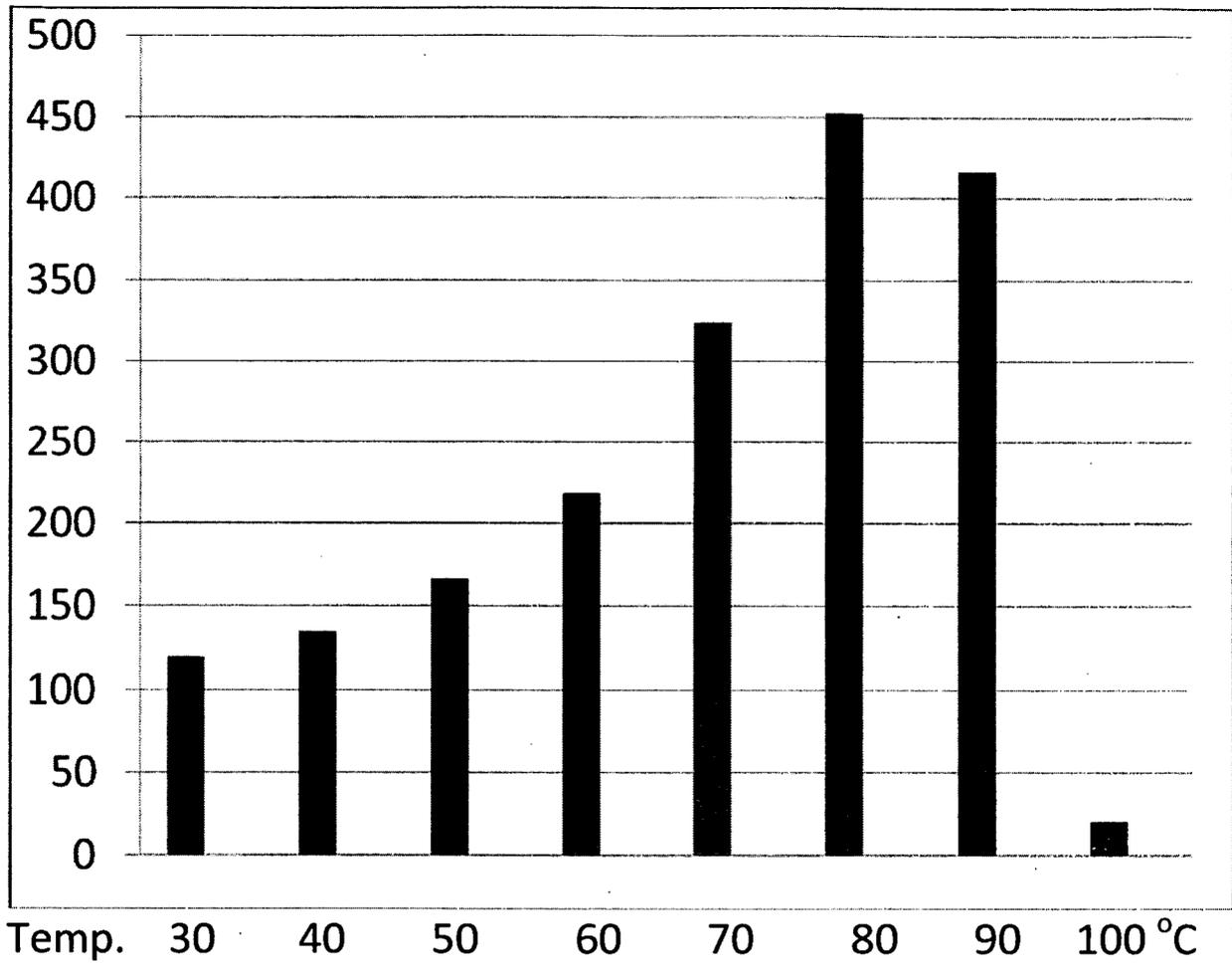


FIGURA 9

