(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 810 910**

(51) Int. Cl.:

A01N 25/08 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2014 PCT/IB2014/058629**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14118707**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2014 E 14708943 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2950657**

(54) Título: **Formulación nueva a base de quitina/ exoesqueleto de crustáceo/quitinoso desmineralizado deshidratado que, contiene microbios que generan enzimas quitinasas/proteasas**

(30) Prioridad:

30.01.2013 IN 414CH2013

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2021

(73) Titular/es:

PELICAN BIOTECH&CHEMICAL LABS PVT. LTD. (100.0%)
601-A Vayalar P.O., Cherthala
Alappuzha District, Kerala 688 536, IN

(72) Inventor/es:

NARAYANAN, MANOJ, CHUZHATTIL;
RAO, PRIYA, RAGHAVENDRA y
JACOB, THOMAS

(74) Agente/Representante:

SERRAT VIÑAS, Sara

ES 2 810 910 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

Formulación nueva a base de quitina/ exoesqueleto de crustáceo/quitinoso desmineralizado deshidratado que contiene microbios que generan enzimas quitinasas/proteasas

Campo de la invención

La invención es un nuevo producto que comprende un biopolímero de quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado y microbios que producen enzimas quitinasas/ proteasas.

La invención es un nuevo producto donde la quitina o el exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado actúa como un sustrato para los microbios y también induce la producción de enzimas quitinasas/proteasas. Las enzimas actuarán sobre el exoesqueleto quitinoso de insectos y hongos patógenos, proporcionando actividad pesticida. La quitina o el exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado poblado con microbios se usan como un agente de control biológico que puede usarse en todas las aplicaciones agrícolas.

Esta invención también presenta un producto novedoso que comprende quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado con enzimas quitinasas/proteasas junto con microbios que producen enzimas quitinasas/proteasas.

Antecedentes de la invención

La invención presenta un producto nuevo que comprende quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado con microbios que producen enzimas quitinasas/proteasas.

La técnica anterior usa la quitina como un buen producto agrícola de suelo/raíz. La técnica anterior usa quitina como un ingrediente de suelo que puede inducir la producción de enzimas quitinasas/proteasas en condiciones de campo. La limitación de la técnica anterior es que se necesita agregar microbios adicionales para inducir la quitinasa que puede no aclimatarse en el nuevo entorno. La presente invención supera esta limitación mediante el uso de quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado poblado de microbios que producen enzimas quitinasas/proteasas. No existen técnicas anteriores sobre microbios poblados en quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado.

Otra técnica anterior es usar caldo de carbón vegetal/talco/líquido como sustrato para inocular y suministrar microbios biopesticidas. La desventaja de la técnica anterior es que la matriz quitinosa adicional que ayuda en la generación de enzimas quitinasa in situ debe agregarse como un componente separado. La presente invención propone un producto en el que se permite que los microbios crezcan en quitina/exoesqueleto de crustáceo deshidratado desmineralizado que ayuda en la generación de enzimas quitinasas/proteasas, poblando de esta manera tanto las enzimas como los microbios progresivamente, a diferencia del carbón vegetal/talco donde permanecen latente.

La técnica anterior de la utilización de hongos biopesticidas como *Tri-choderma viride* y *Beauveria bassiana* consiste en proporcionar como inóculo en un sustrato sólido o líquido. La desventaja de la técnica anterior es que los microbios no son activos en la matriz inerte no reactiva y no producen enzimas biopesticidas a menos que se introduzcan en el campo, creando un retraso en la acción. La presente invención propone un nuevo producto que no solo contiene inóculo, sino que también contiene enzimas quitinasas/proteasas producidas por los microbios en el sustrato quitinoso proporcionando de esta manera un efecto instantáneo. Los microbios en el producto como se describe en la presente invención son activos debido a la presencia del biopolímero de quitina o exoesqueleto de crustáceo deshidratado desmineralizado que proporcionan los nutrientes para la proliferación microbiana en la matriz amorfa que da como resultado una actividad insecticida mejorada.

La técnica anterior incluye D GIRIDHAR ET AL, "Purification, Characterization and Antifungal Activity of Chitinase from Trichoderma Viride N9", Journal of Cell and Tissue Research, vol. 12, 1 de enero de 2012, páginas 3187-3192, XP055116564. RESUMEN: "Una quitinasa producida por *Trichoderma viride* N9 aislada de una muestra de suelo recolectada del bosque de Nallamala, India, fue purificada y caracterizada. La enzima se purificó en un procedimiento de tres pasos que implica precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel de sephadex G-100 y cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa. Mediante el proceso se obtuvo un aumento de 6 veces en la pureza con una actividad específica de 142,7 U/mg de proteínas. La SDS-PAGE descubrió que la masa molecular de la quitinasa purificada era de 46 kDa. Esta era óptimamente activa a un pH de 4 y a 40 °C. La enzima era estable desde pH 3 a 6, y hasta 50 °C. Entre los metales que se probaron, el Fe^{2+}, Hg^{2+}, Mn^{2+} y Co^{2+} inhibieron completamente la actividad enzimática. La enzima era menos sensible al Al^{3+}, Ca^{2+}, Cu^{2+} y Zn^{2+}. La quitinasa purificada mostró actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos".

La técnica anterior incluye además el documento US 5 811 095 (WILLIAMSON JOHN B [US] ET AL) 22 de septiembre de 1998. RESUMEN: "Se presenta una composición insecticida y su método de preparación. La composición comprende un caldo basal, un caldo de quitinasa y un fungicida químico. El caldo basal tiene proteínas hidrolizadas

por papaína y pancreatina, mientras que el caldo de quitinasa se prepara por fermentación de quitina y un cultivo bacteriano productor de quitinasa. La composición insecticida tiene actividad sinérgica".

La técnica anterior incluye además Jegathambigai, V., RS Wilson Wijeratnam y RLC Wijesundera, "Effect of Trichoderma sp. on Sclerotium rolfsii, the Causative Agent of Collar Rot on Zamioculcas zamiifolia and an on Farm Method to Mass Produce Trichoderma species", Plant Pathology Journal 9.2 (2010): 47-55. RESUMEN: "El efecto antagónico de tres aislados locales de *Tri-choderma viride* y un aislado local de *Trichoderma harzianum* fueron probados contra el hongo patógeno *Sclerotium rolfsii.* Este último organismo es responsable de grandes pérdidas debido a la podredumbre de cuello del cultivo ornamental *Zamioculcas zamiifolia* en Sri Lanka. La enfermedad causa pérdidas masivas. El potencial antagónico de los aislamientos locales contra los hongos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* se investigó en cultivo dual, técnica de alimentos envenenados, ensayos en macetas y ensayos de campo en plantas *Zamioculcas zamiifolia*. Todos los aislados de *Trichoderma* probados en condiciones in vitro inhibieron significativamente el crecimiento de *S. rolfsii.* De estos aislados, el aislado de *Trichoderma viride* Tv1 mostró el porcentaje de inhibición más alto y, por lo tanto, se seleccionó para ensayos de campo *in vivo*. Los datos registrados de la aplicación de campo bimensual de este organismo durante las dos estaciones de crecimiento confirmaron el éxito del tratamiento en el control de la enfermedad de la podredumbre de cuello en el nivel de umbral económico. La aplicación de campo de la prueba de aislamiento de *T. viride* Tv1 como una suspensión conidial (10^{11} ufc mL^{-1}) redujo en gran medida la incidencia de la enfermedad de las plantas de *Zamioculcas zamiifolia* en un porcentaje del 75,54 %. En la granja, la producción en masa de este aislado se desarrolló para ayudar a facilitar el establecimiento de un sistema ecológico integrado de gestión de enfermedades para los productores de *Zamioculcas zamiifolia.* También se evaluaron diferentes medios para producir en masa el aislado de *Trichoderma*. Los medios evaluados en este estudio incluyeron los sustratos sólidos de semillas de cebada, arrozal, guisantes de vaca, maíz y sorgo y sustratos líquidos semi sólidos, tales como la dextrosa de papa, extracto de arroz, extractos de arrozales, respectivamente. Aunque el crecimiento micelial fue más rápido en los medios de cebada y de arrozales. Y el mayor rendimiento de esporas del aislado de *Trichoderma* se observó 7 días después de la inoculación en los medios de cebada y de arrozales ".

La presente invención proporciona un producto donde los microbios y las enzimas quitinasas/proteasas se pueblan en el exoesqueleto de crustáceo deshidratado desmineralizados o en quitina. Estas enzimas degradarán el exoesqueleto de los insectos y hongos patógenos que proporcionan actividades pesticidas.

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización, aspecto o ejemplo de la presente descripción/divulgación que no esté dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporciona únicamente con fines ilustrativos y no forma parte de la presente invención.

Objeto de la invención actual

Un objeto de esta invención es proporcionar un agente de control biológico a base de quitina, completamente orgánico ecológico, no tóxico; para la generación in situ de enzimas quitinasas/proteasas para su uso contra insectos en el suelo/raíces de las plantas. Este producto puede usarse en todas las aplicaciones agrícolas.

Otro objeto de esta invención es usar quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado como matriz, con microbios que producen enzimas quitinasas/proteasas para su uso en la generación *in situ* de enzimas quitinasas/proteasas y, de esta manera, usarlo en aplicaciones de control biológico en la agricultura.

Incluso otro objeto de la invención es proporcionar un nuevo producto que no solo contenga inóculos; sino que también contenga enzimas quitinasas/proteasas producidas por los microbios.

Descripción de la invención

De acuerdo con esta invención, se proporciona una matriz amorfa que consiste en biopolímero versátil de quitina o exoesqueleto de crustáceo/quitinoso deshidratado desmineralizado en combinación con microbios productores de enzimas quitinasas/proteasas que incluyen hongos como *Trichoderma viride* y *Beauveria bassiana,* para ser usados como agentes de biocontrol/biopesticida para la aplicación en el campo de la agricultura.

El exoesqueleto de crustáceo/quitinoso fresco se sumerge en ácido clorhídrico al 5 % durante cuatro horas para obtener el exoesqueleto de crustáceo/quitinoso desmineralizado (DM). La cáscara desmineralizada se somete luego a extracción con disolvente mediante el uso de acetona para obtener la cáscara desmineralizada deshidratada (DM-DH). La cáscara de DM-DH, después de la extracción con acetona, se somete a desproteinización mediante el uso de hidróxido de sodio al 3-5 % y luego se lava a pH neutro y se seca para obtener quitina. La quitina o la cáscara DM-DH se pueden usar para la preparación del producto.

A 12 gramos de caldo de dextrosa de papa, agregar 500 ml de agua destilada. Esterilizar los medios en una autoclave. Permitir que se enfríe a temperatura ambiente. Inocular el cultivo puro con microbios que produzcan enzimas quitinasas/proteasas. Mantener los medios inoculados en un agitador rotativo durante 72 horas. Filtrar el caldo y mezclar. Verter el caldo mezclado en 1 kg de hojuelas de quitina/DM-DH. Secar la muestra al aire con una pérdida en el secado no menor que el 10 %.

La invención se ilustrará ahora con ejemplos de trabajo.

En una realización, la invención proporciona un producto que consiste en:

a) exoesqueleto quitinoso desmineralizado y deshidratado; y
b) el microbio productor de quitinasa seleccionado de un grupo que consiste en *Trichoderma viride* y *Beauveria bassiana,*

en donde la carga microbiana total del producto no es menor que 10^8 ufc/g (unidades formadoras de colonias/gramo), la actividad quitinasa no es menor que 1 U/gds (unidad por gramo de sustrato seco) y
dicho producto es una mezcla secada al aire con una pérdida en el secado no menor que el 15 % de una mezcla que consiste en un exoesqueleto quitinoso desmineralizado deshidratado y el caldo que contiene *Trichoderma viride* o *Beauveria bassiana* que produce quitinasa.

En otra realización, la invención proporciona un producto en donde el exoesqueleto quitinoso desmineralizado y deshidratado es un exoesqueleto de crustáceo.

En otra realización, la invención proporciona un producto en donde el exoesqueleto de crustáceo es el exoesqueleto de gamba.

Incluso en otra realización, la invención proporciona un proceso para la preparación del producto, que comprende los pasos de:

a) desmineralizar el exoesqueleto quitinoso fresco en ácido clorhídrico al 5 % durante cuatro horas;
b) extraer el exoesqueleto quitinoso desmineralizado con acetona para obtener el exoesqueleto quitinoso desmineralizado deshidratado;
c) añadir el caldo que contiene al microbio productor de quitinasa al producto de la etapa b), en donde el microbio productor de quitinasa se selecciona de un grupo que consiste en *Trichoderma viride* y *Beauveria bassiana;* y
d) secar al aire la mezcla de la etapa c), con una pérdida en el secado no menor que el 15 %.

En otra realización, la invención proporciona un proceso en donde el exoesqueleto quitinoso es un exoesqueleto de crustáceo.

En otra realización, la invención proporciona un proceso en donde el exoesqueleto de crustáceo es el exoesqueleto de gamba.

En otra realización, el producto de la presente invención puede usarse como un agente de control biológico.

Debe entenderse que el ejemplo específico se proporciona en la presente descripción a modo de ilustración y no pretende tomarse de manera restrictiva para implicar alguna limitación en el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: La cáscara de gambas frescas (15 kg) se desmineraliza mediante el uso de clorhidrato de ácido al 5 % y luego se deshidrata para obtener la cáscara desmineralizada deshidratada (DM-DH). Esta cáscara se somete a desproteinización mediante el uso de hidróxido de sodio al 3-5 %. La cáscara obtenida se lava a pH neutro y se seca para obtener quitina. Esto se usa como matriz para la formulación. A 24 gramos de caldo de dextrosa de papa se agrega 1 litro de agua destilada. Esterilizar los medios en una autoclave. Se deja enfriar a temperatura ambiente. Se agrega el inóculo fúngico de *Trichoderma viride* o *Beauveria bassiana* a los medios. Mantener en agitador rotativo durante 72 horas. Filtrar el caldo y verter 100 ml de caldo en 1 kg de hojuelas de quitina. La mezcla se seca al aire hasta obtener un contenido de LOD (pérdida por humedad de secado) no menor que el 15-20 % y se realiza un ensayo de carga microbiana de 10^8 ufc/gm y la actividad de la enzima quitinasa: no inferior a 1 U/gds

Ejemplo 2: La cáscara de gambas frescas (15 kg) se desmineraliza mediante el uso de clorhidrato de ácido al 5 % y luego se deshidrata para obtener la cáscara desmineralizada deshidratada (DM-DH). Esta cáscara de DM-DH fue la matriz en la preparación de la presente formulación. A 24 gramos de caldo de dextrosa de papa se agrega 1 litro de agua destilada. Esterilizar los medios en una autoclave. Se deja enfriar a temperatura ambiente. Se agrega el inóculo fúngico de *Trichoderma viride* o *Beauveria bassiana* a los medios. Se mantiene p en agitador rotativo durante 72 horas. Filtrar el caldo. Verter 100 ml de caldo en 1 kg de hojuelas de DM-DH. La mezcla se seca al aire hasta perder el contenido de humedad de secado LOD no menor que el 15-20 % y se realiza un ensayo de carga microbiana 10^8 ufc/g y la actividad de la enzima quitinasa no menor que 1 U/gds

REIVINDICACIONES

1. Un producto que consiste en:
   a) exoesqueleto quitinoso desmineralizado y deshidratado; y
   b) el microbio productor de quitinasa seleccionado de un grupo que consiste en *Trichoderma viride* y *Beauveria bassiana,*

   en donde la carga microbiana total del producto no es menor que 10^8 ufc/g (unidades formadoras de colonias/gramo), la actividad de quitinasa no es menor que 1 U/gds (unidad por gramo de sustrato seco) y dicho producto es una mezcla secada al aire con una pérdida en el secado no menor que el 15 % de una mezcla que consiste en un exoesqueleto quitinoso desmineralizado deshidratado y caldo que contiene *Trichoderma viride* o *Beauveria bassiana* que produce quitinasa.

2. El producto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el exoesqueleto quitinoso desmineralizado y deshidratado es un exoesqueleto de crustáceo.

3. El producto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el exoesqueleto de crustáceo es el exoesqueleto de gambas.

4. Un proceso para la preparación de un producto de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
   a) desmineralizar el exoesqueleto quitinoso fresco en ácido clorhídrico al 5 % durante cuatro horas;
   b) extraer el exoesqueleto quitinoso desmineralizado con acetona para obtener el exoesqueleto quitinoso desmineralizado deshidratado;
   c) añadir el caldo que contiene el productor de quitinasa al producto de la etapa b), en donde el microbio productor de quitinasa es *Trichoderma viride* o *Beauveria bassiana;* y
   d) secar al aire la mezcla de la etapa c), con una pérdida en el secado no menor que el 15 %.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el exoesqueleto quitinoso es un exoesqueleto de crustáceo.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el exoesqueleto de crustáceo es el exoesqueleto de gambas.

7. El producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como agente de control biológico.