



No. 12-021203- -00000-0000

Fecha: 2012-02-07 15:21:55
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 259

Act. 411 PRESENTACION Folios 258

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: CONSERVANTES DE DERIVADOS DE QUITINA

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C04B 28/04

71. SOLICITANTE: CAMLIN FINE SCIENCES LIMITED

DOMICILIO: MAHARASHTRA, MUMBAI, INDIA

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C., 6 de enero de 2012



No. 12-021203- -00000-0000

Fecha: 2012-02-07 15:21:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

Act. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 258

FORMULARIO ÚNICO DE S
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: CAMLIN FINE SCIENCES LIMITED

Dirección: Camlin Fine House, Plot No. F/11 &
F/12, Wicel, Mide, Marol, Central Road, Andheri
(East), Maharashtra, Mumbai 400 093, India.

Nacionalidad o domicilio: Mumbai, India

Lugar de Constitución: India

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

41.654.882

TP

20824 CSJ

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: SHENDYE, Abhay, Parashuram

Dirección: 4, Rajashree Co-Op., Housing Society 138A, Narayan Peth, Pune
411 030, Maharashtra, India

Nacionalidad o domicilio: Hindú

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IN2010/000458 Fecha 07 de julio de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/004398 A4 Fecha 13 de enero de 2011

Título (54) CONSERVANTES DE DERIVADOS DE QUITINA

Clasificación Internacional (51) C04B 28/04

8 Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

India

07 de julio de 2009

1605/MUM/2009

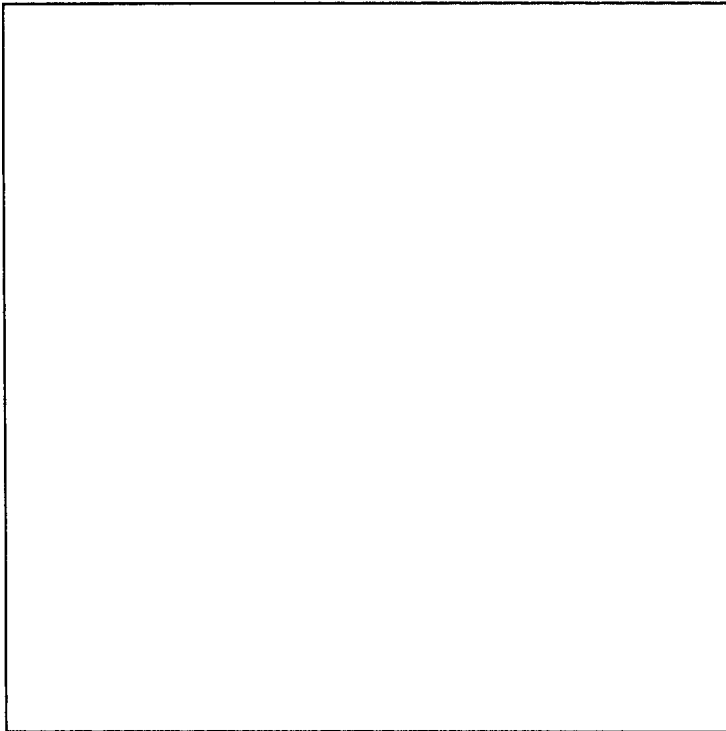
India

28 de mayo de 2010

1643/MUM/2010

Comprobante de pago No. 12-000996, 12-000641, 12-000642, 12-000935,

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuese el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de examen preliminar (IPER)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros .

11 FIGURA CARACTERISTICA**12 Solicito la concesión de la patente,****NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN****FIRMA:**
C.C. 41.654.882 T.P. 20824**As. P-3192**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 000996

Bogotá D.C., Enero 03 de 2012 - 16:38:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426526122	03/01/2012	102.665.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99	OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			50.000.00	50.000.00
				\$50.000.00

SON: **CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-021203- -00000-0000

Fecha: 2012-02-07 15:21:55
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 259

TRA. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Folios: 258

100000

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 3 de 2012 - 17:21:13

3192

0001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000641
		Bogotá D.C., Enero 03 de 2012 - 16:38:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426526122	03/01/2012	102.665.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	1609 S.DISTINTIVOS PRORROGA DE TERMINOS O PLAZO ADICIONAL	100.000.00
				100.000.00
				\$100.000.00
=====				

SON: **CIEN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-021203- -00000-0000

Fecha: 2012-02-07 15:21:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

~~Ita. 11 PATENTEIYII~~
~~Act. 411 PRESENTACION~~ Folios: 258

000002

2 / 4

Enero 3 de 2012 - 16:40:08

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000935
		Bogotá D.C., Enero 03 de 2012 - 16:38:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426526122	03/01/2012	102.665.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	820.000.00 820.000.00
			\$820.000.00
=====			

SON: **OCHOCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENT

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-021203- -00000-0000

Fecha: 2012-02-07 15:21:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

Act. 411 PRESENTACION Folios: 258

000004

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención comprende un proceso para producir un derivado de quitosano, y un producto preparado mediante el mismo, al activar quitosano o una quitina como precursor de
5 quitosano en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30% y preparar derivados mediante reacción con un reactivo para obtener derivados que tienen varios usos, con inclusión de uso como antimicrobicidas, microbiostáticos,
10 antitranspirantes, antifúngicos, o conservantes de frutas, o como portadores de moléculas activas o grupos funcionales etc., o una combinación de los mismos. Los derivados ilustrados incluyen derivados de ácidos, succínicos, desacetilados a nivel enzimático, hidrolizados a nivel
15 enzimático, azúcar, formaldehído, ácido fosfórico, ácido clorhídrico y sulfato de cobre que son obtenidos mediante reacción individual o en combinación con reacciones consecutivas. También se revela una clase novedosa de proteo-
quitinasa termoestable preparada a partir de *Aspergillus*
20 *niger* MTCC 5572 que tiene un peso molecular sobre SDS-PAGE de aproximadamente 50 kD y actividad hidrolítica óptima a pH 2 y 80 °C. También se revelan composiciones para tratamientos de productos naturales y métodos para retardar el añejamiento, mejorar la vida útil y retardar la putrefacción

000305

microbiológica de plátanos y otras frutas.

090306

CONSERVANTES DE DERIVADOS DE QUITINA

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a composiciones, proceso para la producción de composiciones de quitina y quitosano que actúan como controladores de la respiración, antimicrobiano, microbistáticos, removedores eficientes de microbios y antioxidantes para mantener la frescura de frutas, vegetales, flores cortadas, carne, pescado y otros productos alimenticios procesados, y métodos/procesos para aplicar las mismas así como los aplicadores para las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La quitina y el quitosano se han usado en el pasado como conservantes post-cosecha de frutas y vegetales frescos. El quitosano usado es aislado del caparazón del langostino, el caparazón del cangrejo, la coraza de dafnias, las plumas de calamar, o cualquier otro crustáceo, hongos y piel de insecto, y es tratado para diversos grados de acetilación y disuelto en ácido acético (1 a 2%).

El quitosano ha sido utilizado para mejorar la vida útil de varias frutas y vegetales tales como cítricos [Magnetic Resonance Imaging 22 (2004) 27 - 37], zanahoria [Food Control 17 (2006) 336 - 41], lechuga y fresa [Food Microbiology 21(2004)703-14], y lichi [Postharvest Biology and Technology 38 (2005) 128 - 36] en donde el quitosano

000007

usado tiene un tamaño de más de 43 kD (kilo Dalton) y es desacetilado al 93%. La propiedad antioxidante del quitosano ha sido estudiada en el salmón [*Food Chem* 101 (2007) 308-11] donde se usó quitosano de tres pesos moleculares diferentes.

5 Una solución (1%) de quitosano de 30 kD mostró resultados equivalentes al antioxidante químico BHT, y superiores a los obtenidos usando quitosano de 90 kD y 120 kD de peso molecular. Se ha informado actividad conservante útil del quitosano obtenido del caparazón del langostino para varios

10 alimentos tales como huevos, carne, salchicha, mariscos, tofu, jugos, mayonesa, kimchi, fideos, pastel de arroz, brotes de soja, jalea de almidón, etc. En el caso de la conservación de la leche, se ha descrito un quitosano de peso molecular que oscila entre 0.2 y 30 kD [*Korean J. Food Sci. Tech.* 32 (2000) 806 - 13]. En el caso del pan, se han usado

15 con éxito tres pesos moleculares diferentes de quitosano: 2 kD [*J Chitin Chitosan* 7 (2002) 214 - 8], 120 kD [*Korean J Food Nutrition* 11 (2003) 309 - 15] y 493 kD [*J Chitin Chitosan* 7 (2002) 208 - 13] para extender su vida útil,

20 sostener el peso, y retardar la degradación del almidón. La actividad antimicrobiana del quitosano contra varias bacterias, levaduras y hongos tales como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escerechia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*,

800000

Micrococcus, Pediococcus, Photobacterium, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Vibrio, Candida, Cryptococcus, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Aspergillus, Botrytis, Cladosporium, Penicillium, Rhizopus, etc., ha sido informada y revisada [J Food Sci 72 (2007) R 87 - R100]. Salvo por los pocos ejemplos mencionados en forma específica, todos los métodos del arte previo han usado el quitosano de alto peso molecular obtenido del caparazón del langostino con pesos moleculares y grado de desacetilación diversos e indefinidos.

La patente estadounidense No. 5.374.627 describe un método de control de las enfermedades y el daño producido por ciertas plagas en plantas agrícolas mediante composiciones que contienen 1 parte en peso de un hidrolizado de quitosano con un peso molecular promedio de 10.000 a 50.000, obtenido mediante hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática de quitosano.

La solicitud de patente WO 03070008 revela compuestos antimicrobianos y sus métodos de aplicación, en donde el producto de uso es un líquido obtenido al utilizar ácidos orgánicos de 3 a 30 carbonos, y el producto reivindicado es útil para la conservación solamente de los alimentos ácidos. En uno de los ejemplos se utiliza enzima quitosanasa para la degradación del quitosano.

000009

Si bien en la bibliografía existente se conocen varias modificaciones químicas del quitosano, que generan la solubilización del quitosano a pH neutro a alcalino, las aplicaciones de quitosano en los alimentos solamente están
5 usando solución de quitosano en ácido orgánico; preferentemente, ácido acético. La solución obtenida de esta manera tiene un pH bajo (2.0 a 4.0) según la concentración del ácido usado. El ácido usado en dicha formulación añade sabor al producto a ser tratado y/o afecta de manera adversa
10 la vida útil. En el caso del plátano, se conoce que el ácido acético desarrolla manchas senescentes [decoloración negra de la cáscara] que son indeseables. Los ácidos usados en la formulación de quitosano son responsables del cuajo de la leche y de los productos lácteos. La carga positiva neta
15 desarrollada en la molécula de quitosano a causa del pH bajo es responsable de la separación de los componentes aniónicos del producto a ser tratado [tales como sales inorgánicas, ácidos grasos], que se adsorben en el quitosano de carga positiva. Todas estas reacciones no son deseadas y se pueden
20 evitar al preparar la formulación según se describe en la presente invención.

Una clase de quitosano soluble en agua como se describe en la bibliografía existente pertenece a los complejos de quitosano con respectivos ácidos orgánicos que se describen

000010

típicamente como "acetato de quitosano", "lactato de quitosano", etc. Estos son polvos secos de complejos de ácido y quitosano, derivados mediante el simple mezclado seguido de la extracción del ácido sin reaccionar y del secado. Dichos
5 complejos son de pobre definición química, bastante inestables, y conservan los problemas asociados con un pH bajo, como sucede con la solución de quitosano.

Se conoce que los productos de quitina y quitosano de degradación parcial, como los quito-oligosacáridos, son
10 solubles en agua. No obstante, estas moléculas tienen un grado diverso de actividades biológicas tales como control de la respiración, microbiostasis, características de recubrimiento, etc. Por lo general, son muy débiles para los niveles de actividad deseados en comparación con los
15 productos desarrollados usando el(los) método(s) reivindicado(s) en la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención comprende un proceso para producir un derivado de quitosano, y un producto preparado mediante el
20 mismo. Dicho proceso comprende activar quitosano o una quitina como precursor de quitosano al suspender dicho quitosano o dicha quitina en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar durante un período de tiempo para que el

000011

quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

- 5 Los derivados de quitina / quitosano revelados por esta invención así como el método para prepararlos generan derivados que tienen un rango de propiedades que comprenden, sin limitación: propiedades antimicrobianas, microbiostáticas, antitranspirantes, antifúngicas, o
- 10 conservantes de frutas, o una combinación de las mismas. Dichas fuerzas físicas incluyen adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

- Se ilustran aproximadamente 10 formas de realización del proceso y de los productos resultantes de esta invención
- 15 que se describen como Primera a Décima Composición y procesos para preparar las mismas. Los productos de esta invención pueden ser derivados, además, para modificar o para agregar propiedades a cada uno de ellos con el objeto de cubrir un alcance de aplicación diferente o más amplio.

- 20 Los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla y además agregar ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla, agitando a una temperatura aproximadamente inferior a 30 °C -

000012

más preferentemente, de aproximadamente 25 °C- generan la formación de una Primera Composición en suspensión, que es un derivado de ácido que se puede usar como tal o después del secado o la derivación adicionales.

- 5 Los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar y mantener a una temperatura que oscila entre aproximadamente 60 y 70 °C
- 10 -con preferencia a aproximadamente 65 °C- generan la formación de una Segunda Composición en suspensión.

- Los pasos de preparar la Primera Composición y someter la misma a succinilación forman la Tercera Composición de esta invención. Por ende, los pasos de agregar quitosano a
- 15 alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla y agregar ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla a una proporción de aproximadamente una quinta o décima parte del peso del material en crudo
- 20 tomado y agitar durante 2 horas o durante un período de tiempo suficiente para que la reacción mantenga una temperatura inferior a 30 °C (con mayor preferencia de aproximadamente 25 °C), para obtener un derivado de ácido láctico u otro ácido en suspensión, aislar el derivado de

000012

ácido láctico/otro ácido, someter el derivado aislado - después de filtrarlo- a otra reacción al suspender el mismo en una mezcla de agua:alcohol, preferentemente una mezcla 20:80, y agregar anhídrido succínico tomado en peso hasta una
5 décima parte del peso en seco de dicho derivado de ácido láctico/otro ácido, forman una Tercera Composición en suspensión que se puede aislar.

Los pasos de formar la Segunda Composición y formar su derivado de ácido con un ácido -preferentemente un ácido
10 láctico- generan la Cuarta Composición de esta invención. Por ende, los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a una proporción de
15 aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia de aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en
20 suspensión, permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% a 20% del peso en seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora,

000014

filtrar y secar los sólidos, forman una Cuarta Composición en suspensión que se puede aislar.

Los pasos de preparar la Segunda Composición, desacetilar la misma con enzima xilán acil transferasa o cualquier otra enzima de acetilación durante un período de tiempo -con preferencia de aproximadamente 6 a 7 horas- seguido de quitinolisis mediante una enzima quitinolítica o preferentemente una enzima proteolítica así como también una enzima quitinolítica que además es preferentemente termoestable, y además es preferentemente producida a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 (depositado ante la Autoridad de Depósito Internacional, The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) durante un período de tiempo - preferentemente durante aproximadamente una hora- forman la Quinta Composición en suspensión de esta invención, que puede ser recuperada. Por ende, los pasos de suspender el quitosano en una mezcla de agua:alcohol 20:80, mezclar la suspensión bien mediante agitación preferentemente a 100 rpm durante un período suficiente para obtener buena activación - preferentemente durante 30 minutos- calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura

000015

entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción
5 adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por cada 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo -
10 preferentemente durante 7 horas- agregar además una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco del derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo -preferentemente durante 1 hora- y permitir que la suspensión se enfríe,
15 forman una Quinta Composición en suspensión, que se puede recuperar y usar.

Los pasos de hacer reaccionar la Quinta Composición en alcohol con azúcar y luego con formaldehído forman la Sexta Composición de esta invención. Por ende, agregar quitosano a
20 alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla, calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura

000016

entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción

5 adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo -

10 preferentemente durante 7 horas- agregar además una enzima quitinolítica, preferentemente a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco de derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo - preferentemente durante 1 hora- y permitir que la suspensión se enfríe forman la Quinta

15 Composición en suspensión. Los pasos de suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, calentar y mantener la temperatura durante todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua en un

20 volumen de aproximadamente 10% respecto del volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario para la adición gradual con

000017

agitación constante manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período hasta que se complete la reacción, permitiendo posteriormente que la mezcla de reacción se
5 enfrie a temperatura ambiente, recuperar el producto, y lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso, forman la Sexta Composición en suspensión que puede recuperarse, lavarse con 100 ml del metanol al 90% y secarse al aire.

10 El paso de hacer reaccionar quitosano en alcohol con ácido de fósforo seguido de reacción con formaldehído forma la Séptima Composición de esta invención. Por ende, los pasos de suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante de agitación para alcanzar
15 la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a aproximadamente 60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco
20 del quitosano activado o su derivado a modo de gotas manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, y permitir que la suspensión se enfrie, forman la Séptima

000018

Composición en suspensión que puede ser recuperada. Dicha Séptima Composición puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10, formando soluciones ligeramente turbias a transparentes.

- 5 El paso de hacer reaccionar quitosano en alcohol con formaldehído primero, y luego con ácido de fósforo o un ácido inorgánico, forma la Octava Composición de esta invención. Por ende, los pasos de suspender el quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante
- 10 agitación para alcanzar la activación del quitosano - preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar 750 ml de formaldehído en un período de unos pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y
- 15 agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para
- 20 completar la reacción, y permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición, forman la Octava Composición en suspensión que puede ser recuperada.

El paso de hacer reaccionar quitosano en alcohol con formaldehído primero, y luego con ácido fosfórico y luego con

000019

ácido clorhídrico, forma la Novena Composición de esta invención. Por ende, los pasos de suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano

5 -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1

10 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe,

15 recuperar la suspensión como 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 período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio,

20 separar por filtración, y lavar con 20 volúmenes de metanol al 90%, forman la Novena Composición que puede ser recuperada.

Los pasos de mezclar la Quinta Composición en solución con una molécula cargada en solución y co-precipitar la

000020

misma, preferentemente a pH alcalino, forman la Décima Composición de esta invención. Por ende, los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla, calentar y
5 mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C - con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o
10 durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para formar un derivado succínico, agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado,
15 agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar la agitación durante un
20 período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, y permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida, recuperar y secar al aire la Quinta Composición, disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de

000021

sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición a pH alcalino, como una solución, agregar dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada que puede ser del 1% con respecto al agua en una
5 cantidad pequeña -aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver la Quinta Composición- mezclar durante pocos minutos, y agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula cargada, forman un derivado de la Décima Composición.

10 Esta invención también incluye una composición que comprende al menos una de las composiciones desde la Primera hasta la Décima Composición y derivados de las mismas que se usan como ingrediente esencial. Las composiciones se pueden formar en ácido orgánico diluido -usualmente ácido acético- o
15 en agua. Dicha composición puede ser una composición para conservar frutas, vegetales, productos comestibles y alimentos, retrasar la maduración, retrasar el añejamiento y retrasar la senescencia de productos naturales con inclusión de frutas, vegetales y flores, o que funciona como portador
20 para llevar una molécula activa o un grupo funcional a su sitio de acción. Dicha composición puede tener una concentración efectiva de aproximadamente 0.1 %, y dicho ácido acético se puede encontrar al 2%, cuando se usa.

La enzima quitinolítica usada en esta invención puede

000022

ser una enzima proteolítica así como también una enzima quitinolítica. La forma de realización ilustrada de esta enzima tiene un peso molecular de 50 kD en electroforesis SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y una
5 actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C. En una forma de realización de esta invención, se ha identificado *Aspergillus niger* como fuente de este tipo de enzima, si bien otras fuentes también pueden estar presentes y se incluyen dentro del alcance de esta invención. Se ha
10 identificado a *Aspergillus niger* MTCC 5572 como el organismo capaz de producir esta enzima en buena cantidad. También es posible que los mutantes derivados de esta cepa también puedan poseer capacidad de producir la proteo-quitinasa útil para producir los productos de esta invención. La enzima se
15 precipitó a partir de un filtrado de cultivo crudo mediante su saturación con sulfato de amonio y fraccionamiento en Sephadex®, recuperando la enzima proteo-quitinasa cruda mediante precipitación con sulfato de amonio.

Esta invención también comprende un proceso para
20 mejorar la vida útil de frutas, carne, pescado, flores, vegetales, en donde dicho proceso comprende un tratamiento de inmersión, aspersión, nebulización u otro proceso de aplicación externa así como también la adición en el producto alimenticio de una composición que comprende una o más entre

000023

la Primera Composición y la Décima Composición. Dicho proceso también puede ser un proceso para ralentizar la maduración y/o putrefacción microbiana. Dicho proceso se puede aplicar a productos naturales que pueden incluir, sin limitación:

5 plátanos, mangos, manzanas, fresas, naranjas, limas y similares, y las aplicaciones pueden incluir aplicación externa por recubrimiento o una "aplicación interna" a frutas en trozos o procesadas o productos naturales en trozos o procesados.

10 La enzima de desacetilación, la xilán acil transferasa, de esta invención se aisló de *Bacillus* sp MTCC 5571. No obstante, cualquier otra enzima de desacetilación a otros microbios puede brindar los mismos resultados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Esta invención abarca composiciones novedosas de quitina/quitosano para tratamiento como antirrespiratorio, antimicrobiano y antioxidante para mantener la frescura de los productos naturales; procesos para la producción de dichas composiciones novedosas; métodos/procesos novedosos

20 para dicho tratamiento para dichos productos naturales con el objeto de reforzar o mejorar su vida útil o estabilidad bajo almacenamiento. Esta invención además comprende una enzima microbiana proteolítica termoestable novedosa que tiene acción como quitinasa incluso en presencia de solvente

000024

orgánico y su uso para desarrollar las composiciones de quitosano novedosas de esta invención. Esta invención también comprende el uso de enzima para la desacetilación del quitosano.

5 La invención también comprende métodos/procesos para mantener la frescura de los productos naturales por más tiempo. La invención además comprende métodos/procesos de aplicación de dichas composiciones y equipo útil con el fin de aplicar dichas composiciones a los productos naturales que
10 incluyen, sin limitación: frutas, vegetales, carne, pescado y otros productos alimenticios. Una lista ilustrativa de los productos naturales cubiertos por el alcance de esta invención incluye productos alimenticios y productos vivos o no vivos naturales no alimenticios, y además incluye, sin
15 limitación: frutas, vegetales, carne, pescado, flores cortadas, leche y productos alimenticios en general.

Debido a las moléculas polidispersas de la quitina y el quitosano -con posibilidades ampliamente diversas de desacetilación, sustituciones, sitios de hidrólisis,
20 composición del hidrolizado etc.- sus propiedades antimicrobianas, antimadurativas, conservantes, de solubilidad, de capacidad como moléculas portadoras etc., diferirán de acuerdo con la composición final de la quitina o quitosano tratados. La eficacia y el alcance del cambio en la

000025

molécula de quitina o quitosano generado por un determinado tratamiento dependerá también, en gran medida, del grado al cual se expongan los sitios vulnerables a un cambio químico o físico (adsorción), lo que diferirá según el tratamiento dado para la "activación" de la molécula de quitina o quitosano antes de que se inicie cualquier tratamiento para su derivación. Como el efecto de cualquier tratamiento de sustitución o modificación dependerá de la composición del grupo funcional de la quitina o el quitosano como materia prima; por ejemplo, la hidrólisis enzimática de la quitina o el quitosano activados o sin tratar formará una composición diferente de hidrolizado enzimático de aquella donde la molécula de quitina o quitosano ya está modificada por una sustitución y el grado al cual se modificó mediante sustitución, ya que las enzimas son vulnerables a los cambios en el entorno de sus sitios activos. Las propiedades de una quitina o quitosano con respecto a las propiedades antimicrobianas, conservantes y fisiológicas, etc., afectadas por un proceso, dependen del tratamiento dado a los mismos, la distribución del peso molecular del producto, la combinación de los grupos funcionales que portan y el grado de distribución general, lo que presenta innumerables posibilidades de propiedades de los productos y productos propiamente dichos, lo que rara vez puede ser predicho, a

000026

menos que se averigüe en forma experimental. La tarea por alcanzar el objetivo de una mejora mediante experimentación de rutina es desalentadora, ya que las permutaciones y combinaciones necesarias a ser llevadas a cabo son infinitas, y es quizás una razón por la cual el alcance total de esta explicación todavía no ha sido cubierto.

Si bien es habitual activar quitina o quitosano mediante un tratamiento con un ácido, se encontró sorprendentemente en esta invención que la quitina/el quitosano se activan a los efectos de preparar un derivado simplemente al calentar su suspensión en alcohol con un contenido de agua que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, según lo requerido, y agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano (quitina) se active, y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Una composición de quitosano/quitina preparada de esta manera - mediante tratamiento y derivación adicionales- ofrece una serie de portadores que se pueden unir mediante enlaces físicos o químicos con grupos funcionales/moléculas activas para mejorar su eficacia.

Los derivados de quitosano, cuando están completamente

000027

sustituidos, no muestran actividad antimicrobiana. El quitosano de alto peso molecular tiene solubilidad deficiente. El quitosano de bajo peso molecular no sustituido muestra tanto propiedad antimicrobiana como solubilidad. En
5 consecuencia, por lo general se cree que el quitosano de bajo peso molecular es más útil como conservante. No obstante, las composiciones de quitosano de bajo peso molecular no tienen una buena propiedad de recubrimiento cuando se aplican a frutas frescas y objetos similares por su acción conservante.
10 Es un hallazgo sorprendente de esta invención que incluso el quitosano de alto peso molecular, cuando se deriva tal como se revela en esta invención, es un conservante efectivo y, además de su propiedad antimicrobiana, también protege las frutas del etileno y la pérdida de agua debido a su mejor
15 propiedad de recubrimiento. Sin supeditarse al aspecto teórico, una interpretación actual de esta invención es que las propiedades antimicrobianas, conservantes y fisiológicas afectadas por el proceso son óptimas solamente en cierto rango de distribución de peso molecular según se combinan
20 adicionalmente con el perfil de solubilidad y los grupos funcionales o moléculas activas portados por los derivados de quitosano. Los métodos/procesos de producción del derivado de quitina de esta invención tienen como objetivo alcanzar este equilibrio estrecho e intrincado.

000028

En toda esta memoria descriptiva, si no se ha mencionado por separado, a menos que se establezca lo contrario, en cualquier contexto de un tratamiento de derivación, el quitosano es un producto que está del 50 al 5 70% desacetilado y en concordancia con un tamaño de malla de 60 a 100, si bien se pueden usar otros grados de desacetilación y/o tamaño de malla dentro de los límites razonables para obtener los mismos resultados. El quitosano es siempre activado, antes de brindar dicho tratamiento, al 10 suspender dicho quitosano o dicha quitina en alcohol absoluto o con agua agregada que puede ser de hasta aproximadamente 30% o menos, agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor 15 activado con un reactivo capaz de formar un derivado al formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Como el método/proceso de activación de esta invención no se usó nunca en el arte previo, presenta una plataforma enteramente nueva para 20 cualquier derivado de quitosano con inclusión de derivado de ácido, derivado de succinilo, así como también hidrolizados enzimáticos derivados de quitosano activado por el método/proceso de esta invención.

Cualquier referencia al "precursor de quitosano" en

000029

esta memoria descriptiva incluye quitina y cualquiera de sus transformaciones tales como partículas, gránulos, etc.

Siempre que se mencione el término "alcohol" en esta memoria descriptiva -a menos que el contexto establezca lo contrario- el alcohol preferente es un alcohol polar en el cual la quitina o el quitosano, o sus derivados, según se prepararon en el curso del proceso de esta invención, son insolubles. El alcohol más preferente es metanol, si bien se pueden utilizar otros alcoholes dentro de las limitaciones anteriormente dadas.

Siempre que se use ácido láctico, si bien es el ácido más preferente a ser usado para estas reacciones, se puede usar cualquier ácido, ya sea orgánico o inorgánico, aunque se prefiere el ácido orgánico, y el ácido láctico es aún más preferente.

La solubilidad de las composiciones en esta memoria descriptiva se chequeó al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en el transcurso de 5 minutos. La mezcla se agitó en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más, y luego la solubilidad se chequeó visualmente. En una de las formas de realización, que generó la Primera Composición de esta invención, se disolvió quitina/quitosano en ácido y la solución resultante mostró actividad antimicrobiana. La cantidad de ácido usado en

000030

relación con quitina/quitosano así como también la elección del ácido son cruciales para exhibir la actividad. El ácido útil para este fin puede ser cualquier ácido orgánico, si bien el ácido láctico es preferente. En forma similar, en 5 lugar del ácido láctico, la opción menos preferida podría ser cualquier ácido inorgánico. Sin supeditarse a este entendimiento, el funcionamiento particularmente bueno del ácido láctico para estos procesos se podría deber quizás a la solubilidad limitada del quitosano en ácido láctico a menos 10 de una parte de ácido láctico por parte de quitosano que forma un fluido que tiene cierta viscosidad y no es una solución completamente acuosa, dando al derivado una combinación óptima de carga sobre la partícula y el grupo funcional de tal manera que se alcance suficiente solubilidad 15 sin perder sus propiedades antimicrobianas. En forma sorprendente, se encontró que, bajo las condiciones de reacción de esta invención, en donde se disuelve quitina/quitosano en ácido a aproximadamente 10% en peso de quitina/quitosano, no hubo solubilidad del derivado de ácido 20 (la Primera Composición) en agua, y cuando se incrementó la proporción del ácido láctico, la Primera Composición fue soluble en agua, pero hubo un alta cantidad de formación de grumos que hicieron que el producto fuera difícil de usar, y tampoco tuvo actividad antimicrobiana. También fue un

000331

hallazgo importante el hecho de que, por el contrario, usar una proporción de ácido láctico inferior al 10% en peso de quitina/quitosano generó un producto soluble en agua que tenía actividad antimicrobiana. Como el ácido láctico en
5 menos de 0.5 ml brindó una disolución completa sin formación de grumos durante la reacción, conformó la forma de realización preferida para uso para trabajo adicional. Principios similares funcionarían para otros ácidos, y la cantidad real del ácido usado dependerá de las propiedades
10 del ácido.

En otra forma de realización de esta invención, que abarca la Segunda Composición, el quitosano activado fue tratado con anhídrido succínico para obtener un derivado succínico. El anhídrido succínico se agrega en diferentes
15 proporciones manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C, preferentemente a 65 °C. Cuando la mezcla de agua y alcohol usada para la activación se encontraba a una relación de 20:80, el derivado succínico resultante fue soluble en agua solamente cuando se agregó más de 0.5 g de
20 anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción. No obstante, se encontró sorprendentemente que al cambiar la relación de los solventes usados a 10 ml de agua respecto de 90 ml de metanol, fue posible obtener un producto soluble en agua al usar anhídrido de succinilo a una cantidad menor a

000032

0.5 g hasta 0.05 g. Con fines prácticos, se encuentra que la cantidad de 0.1 g es preferible. Esta observación además sustenta el hallazgo de que el tratamiento de activación es muy crítico para determinar las propiedades de los productos y el método/proceso de activación novedoso de esta invención conducirá a productos con propiedades distintas de las de los productos del arte previo del mismo reactivo si la activación de quitina o quitosano se realizara mediante un método/proceso sustancialmente diferente.

10 Otra forma de realización de esta invención comprende la Tercera Composición en donde, en un primer paso, la Primera Composición se prepara usando un ácido - preferentemente, ácido láctico- a una proporción del 10 al 20% del peso en seco del quitosano o la quitina activados y 15 dicha Primera Composición se toma como un material de inicio y se hace reaccionar con anhídrido succínico agregado a una proporción de aproximadamente 10% del peso en seco de la Primera Composición tomada. Esta composición es un material granular grueso, soluble en agua.

20 Otra forma de realización más de esta invención comprende la Cuarta Composición, en donde un derivado succínico de quitosano activado de la Segunda Composición se prepara usando anhídrido succínico a aproximadamente 10% del peso en seco de quitosano activado y, una vez finalizada la

000033

reacción, se agrega un ácido -preferentemente, ácido láctico- del 10 al 20% del peso en seco de quitosano. No se produce formación de grumos. El polvo seco es completamente soluble en agua dentro de los 5 minutos bajo las condiciones de
5 ensayo descritas.

En otra forma de realización de esta invención, se encontró que una clase de enzimas homogéneas a nivel electroforético, aisladas de microorganismos, tienen actividad proteolítica así como también actividad como
10 quitinasas, las cuales se pueden designar como proteo-quitinasas. En una forma de realización de esta invención, dichas proteo-quitinasas y enzimas capaces de la desacetilación del quitosano se usan para hidrolizar quitina/quitosano, en un proceso para formar los productos de
15 esta invención. Si bien las proteo-quitinasas y desacetilasas de esta invención se aíslan de microbios, esta clase de enzimas, derivadas de cualquier fuente, realizarán la misma función de hidrólisis de la quitina o el quitosano, y esta invención se extiende a su uso también a los efectos de la
20 hidrólisis de la quitina/el quitosano y además para desarrollar los productos de esta invención.

Se recolectaron muestras de suelo, en Pune, India, y alrededores, de varios recursos naturales ricos en materia orgánica, y se enriquecieron con el substrato deseado, con

000034

inclusión de caseína, quitosano, trigo lavado, celulosa. El enriquecimiento continuó durante 3 semanas, y las muestras se vetearon en medio sólido que contenía el substrato usado para enriquecimiento como única fuente de carbono. Las colonias

5 aisladas en general mostraron una zona de aclaramiento que indicaba la fuerte producción de la respectiva enzima degradante. Se aislaron aproximadamente 700 cultivos para varios hongos y bacterias. Para descubrir cultivos que tenían la actividad deseada, se cultivaron mediante un método de

10 agitación en matraz. Se concentró el filtrado de cultivo microbiano crudo mediante precipitación con sulfato de amonio. Las fracciones de proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante. Las fracciones de proteínas se separaron sobre estos geles como bandas

15 independientes homogéneas. Se seleccionó un cultivo de *Aspergillus niger* MTCC 5572 como cultivo promisorio.

La banda homogénea a nivel electroforético aislada del filtrado de cultivo de *Aspergillus niger* MTCC (depositado en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of

20 Microbial Technology, Chandigarh, India) mostró una enzima con actividad de proteinasa así como también actividad de quitinasa (una enzima proteo-quitinasa) que es novedosa, con un peso molecular de 50 kD según lo determinado por los marcadores de peso molecular en SDS-PAGE, y actividad

000035

enzimática óptima a pH 2 y 80 °C. Si bien esta banda se usó para hidrolizar a nivel enzimático la Segunda Composición de quitosano/quitina desacetilados para desarrollar el producto de esta invención, cualquier otra proteo-quitinasa puede
5 formar hidrolizado con propiedades muy similares.

En otra forma de realización de esta invención, se obtiene hidrolizado de quitina/quitosano usando enzimas purificadas, o formas crudas de enzimas, o formas activas de extractos celulares microbianos. Dicho hidrolizado muestra
10 actividad antimicrobiana mejorada hasta cierto límite de disminución en el peso molecular promedio, y dentro del rango específico de grado de sustitución del grupo amino libre ya sea por grupo acetilo o cualquier otro grupo aniónico. En otra forma de realización de la invención, los derivados
15 hidrolizados a nivel enzimático de quitosano muestran mejor actividad antimicrobiana que el producto derivado solamente en forma química. El hidrolizado modificado de manera adicional -es decir, desacetilado usando xilán acil transferasa- muestra una mejora adicional en la propiedad
20 antimicrobiana y antioxidante, y también actúa como un agente anti-respiración. Los hidrolizados químicamente derivados que tienen un peso molecular en un menor rango de 8 a 100 kD son más efectivos que los hidrolizados de mayor y/o menor peso molecular. No obstante, en forma sorprendente, después de la

000036

desacetilación enzimática, hasta los derivados de alto peso molecular muestran actividad antimicrobiana equivalente a la de los productos de 8 a 100 kD derivados por el proceso químico. El método/proceso preferido para obtener xilán acil

5 transferasa en esta invención es a partir de microorganismos. Se puede predecir que estas enzimas -aisladas como extracto crudo o purificado de cualquier otra fuente- tienen las mismas propiedades de desacetilación y forman los mismos productos que los preparados en las formas de realización

10 preferentes de esta invención a partir de microorganismos. Esta forma de realización de esta invención, que incluye hidrolizados enzimáticos, comprende la Quinta Composición que es útil como conservante post-cosecha. Dicha Quinta Composición se obtuvo primero al preparar un derivado

15 succínico de la Segunda Composición a la cual se agregó anhídrido succínico; el derivado es desacetilado por una enzima en presencia de un ácido -preferentemente, un ácido láctico- que se agrega a aproximadamente 10% en peso del peso en seco de la Segunda Composición succinilada durante un

20 período de tiempo suficiente para alcanzar la desacetilación limitada, preferentemente durante un período de 7 horas, y luego se somete a un tratamiento de aproximadamente una hora de enzima quitinolítica. El polvo de la Quinta Composición es soluble en agua cuando se agrega más de 0.5 g de anhídrido

000037

succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción y despliega actividad antimicrobiana. La Quinta composición mostró tres a cuatro veces menor consumo por kg de plátanos y tomates que la solución de quitosano en ácido acético, mostró mayor actividad antimicrobiana así como también microbiostática en comparación con la solución de quitosano en ácido acético y la Primera, Segunda y Cuarta Composiciones. La Quinta Composición también sirvió para mejorar la vida útil de las frutas. Se trataron plátanos verdes cosechados en forma reciente (<30 horas de la cosecha) usando una solución al 0.1% de la Quinta Composición. El tratamiento también se puede suministrar mediante la inmersión de los plátanos en dicha solución durante 10 a 15 segundos, o mediante aspersión directa de la solución sobre los plátanos con un dispositivo adecuado a fin de humedecer la superficie de los plátanos, o al atravesar los plátanos por una cámara cerrada saturada con la bruma de dicha solución (nebulización indirecta). Los plátanos tratados se secan al aire. Estos plátanos se almacenan a temperatura ambiente (entre 20 y 32 °C) y a una humedad relativa de 40 a 60%. En los experimentos, los plátanos tratados mantuvieron su color verde y su peso, mientras que los plátanos no tratados perdieron peso y desarrollaron decoloración. Los plátanos tratados mostraron mejor condición fisiológica según se evaluaron a nivel

000038

químico mediante la determinación de su contenido total de sólidos (contenido BRIX), azúcares reductores, y pérdida de peso al menos hasta 12 días después de la inmersión (ver la Fig. 1). En otra forma de realización de la invención, además
5 del almacenamiento durante 8 a 15 días, cuando maduran por la aplicación de etileno, los plátanos tratados maduraron normalmente, mientras que los plátanos de control no tratados se endurecieron y no maduraron o bien se oscurecieron y ablandaron, y no permanecieron aptos para consumo humano.

10 Se trataron tomates enteros y manzanas trozadas con el producto del ejemplo 10, exactamente como se describió en el ejemplo 14 para los plátanos. Los tomates tratados retuvieron su peso, textura y frescura durante 30 días a diferencia de los tomates de control no tratados, que se arrugaron en un
15 lapso de 12 a 15 días, lo que provocó la pérdida de su peso. Se monitorearon los cambios fisiológicos en los tomates tratados y en los de control al séptimo día de almacenamiento usando técnica de barrido por IRM. La piel carnosa de los tomates tratados era más uniforme en su densidad de color. La
20 piel carnosa de los tomates de control no tratados tenía parches oscuros que indicaban sequedad superior y falta de uniformidad. El barrido por IRM de los tomates representativos se incluye en la Figura 2

La Quinta Composición es efectiva también para

000039

aplicación "interna"; es decir, para la aplicación a los fines de la conservación y para la mejora de la vida útil o para el tratamiento antimicrobiano o tratamiento microbiostático en partes "internas" de frutas o productos naturales tales como frutas trozadas, frutas procesadas, productos vegetales procesados y similares. Las manzanas trozadas se envasaron en bolsas de polietileno o recipientes de plástico transparentes y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4 a 9 °C. Las manzanas trozadas de control comenzaron a tornarse marrones a partir del día 2 y se ablandaron hacia el día 3, mientras que las manzanas trozadas tratadas retuvieron su color, sabor y textura dura durante 6 días. La fotografía (Figura 3) ilustra la diferencia en la apariencia entre las manzanas en trozos tratadas y las no tratadas en el día 4.

Los trozos de manzana tratados y no tratados se envasaron en recipientes de plástico transparentes y se almacenaron tal como se describió con anterioridad durante un período de hasta 25 días. Los trozos de manzana no tratados desarrollaron crecimiento de hongos [parches negros en la fotografía de la Figura 4], mientras que las manzanas en trozos tratadas no desarrollaron ningún crecimiento de hongos ni de microbios. Los resultados se exhiben en la fotografía.

En otra forma de realización de esta invención, la

000040

Quinta Composición sirve como portador para grupos funcionales o moléculas para mejorar la eficacia en menores concentraciones y/o portador para su dirección al sitio activo. Las ilustraciones de esta forma de realización son
5 provistas por la Sexta y la Décima Composiciones.

Siguiendo el mismo principio, son posibles varias formas de realización más para la Quinta Composición como portador al variar los grupos funcionales o moléculas activas que son portados por la Quinta Composición mediante enlace
10 físico o enlace químico.

La Sexta Composición comprende un derivado de azúcar-succinato de quitosano que muestra solubilidad variable en agua y también muestra una propiedad antimicrobiana variante. El azúcar puede ser azúcar de caña o cualquier otro azúcar.
15 El método/proceso de esta invención para preparar la Sexta Composición comprende formar un derivado de azúcar de la Quinta Composición, que se sometió a reacción adicional con formaldehído durante un período de tiempo diverso -usualmente de una a seis horas- para obtener dicha Sexta Composición que
20 tuvo excelente solubilidad en agua y actividad antimicrobiana y fue mejor que la Quinta Composición cuando la solución de azúcar usada para la derivación comprendió 0.4 g por cada 100 g en peso en seco de succinato de quitosano o menos. Fue sorprendente observar que, si se utilizaba azúcar a un mayor

000341

nivel, el derivado de azúcar-succinato de quitosano ya no era soluble en agua. Esto sustenta en forma adicional el concepto de que, para que los derivados de quitosano sean útiles las para aplicaciones, debería tenerse especial control sobre el

5 grado de sustitución y los grupos funcionales a ser usados para la sustitución. Todos los productos solubles en agua de la Sexta Composición tuvieron diverso grado de actividad antimicrobiana a varias concentraciones, que fue consistentemente mejor que la actividad antimicrobiana de la

10 Quinta Composición como material de inicio. Cuando el azúcar que se usó en el método/proceso anteriormente mencionado era glucosa o lactosa tomada a una proporción de 0.4 g por 100 g de succinato de quitosano, y el período de reacción con formaldehído era de aproximadamente 3 horas, los productos de

15 estas reacciones fueron solubles en agua y mostraron una actividad antimicrobiana del 100% contra *E coli* mediante el método/proceso descrito en el Ejemplo 11.

En otra forma de realización de esta invención, la quitina o el quitosano incluyen derivados preparados a partir

20 de un ácido inorgánico. Esto se ejemplifica mediante la Séptima Composición, donde se usa ácido de fósforo para formar un derivado, que comprende suspender el quitosano en alcohol (aproximadamente 99%), mezclar bien la suspensión agitando a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla

000042

manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua -a un volumen que es aproximadamente cuatro veces mayor al peso del quitosano- en gotas a esta mezcla, junto con agitación durante 5 aproximadamente 1 hora, agregar además 5 ml de formaldehído en gotas y, una vez completa la adición, mantener la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 2 a 6 horas. En lugar de formaldehído, se puede usar cualquier otro aldehído. Las condiciones de temperatura, 10 agitación, etc., pueden variar para obtener un producto final con un nivel deseado de actividad antimicrobiana. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua 15 durante la adición y durante 10 minutos más y luego se chequea la solubilidad visualmente. La solubilidad también se chequea a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris. Los productos formados usando quitosano y ácido de fósforo en una relación de 1:1 y 1:2 mostraron solubilidad 20 a un amplio rango de pH (7 a 10), formando soluciones ligeramente turbias a transparentes. Si bien las composiciones antimicrobianas de quitina/quitosano o sus derivados en el arte previo tienen un pH tendiente a ser ácido, y el precipitado tiene un pH próximo a 7 o dentro del

000043

rango alcalino, la Séptima Composición es soluble a un pH alcalino de 7 a 10. Estas soluciones mostraron diverso grado de actividad antimicrobiana. Los productos de hasta 0.01% mostraron cierta actividad antimicrobiana mientras que los
5 productos por encima de esta concentración mostraron inhibición microbiana total. Es claro que la Séptima Composición -que es soluble y también presenta actividad microbicida total a concentraciones razonablemente bajas y a un pH de 7 hasta 10- provee un alcance nuevo para su uso como
10 conservante y antimicrobiano.

Otra forma de realización de esta invención comprende la Octava Composición y la Novena Composición. El método/proceso de su preparación comprende hacer reaccionar quitosano suspendido en alcohol al 99% como mínimo, mezclar
15 bien la suspensión agitando durante un período de tiempo suficiente para obtener humedecimiento eficiente y activación con alcohol -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar y mantener la temperatura de la mezcla a alrededor de 60 °C, agregar formaldehído a una proporción de
20 aproximadamente 5% del volumen del alcohol tomado, agregar a gotas a una solución al 10% de ácido de fósforo (H_3PO_3) en agua -donde el peso del ácido fosfórico es de aproximadamente el 5% del volumen del alcohol tomado- y agitar adicionalmente durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora.

000044

La temperatura se mantiene entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas una vez completa la adición. Se deja enfriar la suspensión y se la filtra; los sólidos se recuperan y se secan. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. La solubilidad se chequea también a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris. El producto se disolvió en agua, pero se precipitó cuando el pH se elevó a 7.0.

La Novena Composición se obtuvo al someter el producto de la Octava Composición a tratamiento con HCl. Si bien aquí se usó HCl, se puede reemplazar 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 formar la Novena Composición en suspensión en la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El polvo se separó por filtración, se lavó con 20 volúmenes de metanol al 90% tres veces, y se secó tal como se describió con anterioridad. El producto resultante fue soluble a un pH de 3 a 12. Esta solubilidad a un amplio rango expande adicionalmente el alcance de la aplicación de este producto.

000045

Es pertinente notar aquí que el tratamiento con ácido fosfórico es crítico para preparar el producto en cuanto a la solubilidad a un amplio rango de pH. Esto fue comprobado por el hecho de que otras composiciones, particularmente la
5 Quinta Composición y la Séptima Composición -cuando se trataron con HCl tal como se describió en este ejemplo- no alteraron su perfil de pH en relación con la solubilidad en el rango de pH 3 a 12.

La Décima Composición es una forma de realización
10 ilustrativa más de la Quinta Composición que actúa como portador para una molécula activa. En este caso, la molécula activa es sulfato de cobre y presumiblemente el mecanismo de formación de complejos ocurre mediante adsorción. El método/proceso para preparar la Décima Composición comprende
15 formar una solución al 1% de la Quinta Composición en agua, agregar aproximadamente 10% de su volumen de una solución (1%) de sulfato de cobre, mezclar las dos soluciones durante cierto tiempo, agregar amoníaco líquido a una proporción de una parte a cien partes de agua tomada, generando la
20 precipitación de quitosano con el sulfato de cobre unido. El sulfato de cobre es libremente soluble en amoníaco líquido y la solución resultante es de color azul profundo. La estimación del cobre se realiza mediante colorimetría, y usando un gráfico estándar de 0.02 - 0.1%. A partir de esto,

000046

se estimó que el cobre unido al quitosano era del 90%. Éste es un ejemplo del posible uso del derivado como portador para todas las moléculas cargadas.

Sin supeditarse a ninguna teoría, es nuestro
5 entendimiento que el quitosano tiene carga positiva, y que cualquier ácido -ya sea orgánico o inorgánico- formará un enlace coordinado con el grupo amino en el quitosano. Estos complejos han sido denominados como las respectivas sales de quitosano, por ejemplo: clorhidrato de quitosano, acetato de
10 quitosano etc. Estas sales se disuelven en agua, y el pH de la solución por lo general es ácido. Además, las sales no poseen actividad antimicrobiana. Cuando tratamos de incrementar el pH de estas soluciones mediante la adición de cualquier álcali -típicamente NaOH- el quitosano se precipita
15 antes de que el pH se torne neutro. Esto es porque la sal no es estable a dicho pH. En nuestros procesos, tenemos dos tipos de modificaciones que son únicas:

(1) Reacción de quitosano llevada a cabo en alcohol, con 0 - 30% de agua, lo que brinda hidratación limitada y,
20 por ende, es importante para alcanzar la sustitución controlada/limitada de los grupos laterales.

(2) Reacción mediada por formaldehído y reacción mediada por anhídrido. Ambos productos de reacción por lo general son estables a pH alcalino. Ahora la solubilidad del

000047

producto a pH alcalino es una función de cargas netas sobre la molécula, que se pueden agregar en cualquiera de dichas 2 reacciones, o mediante simple interacción iónica (formación de sal) con cualquier ácido. Típicamente, se prefieren los
5 ácidos inorgánicos ya que las sales son más estables.

(3) Los derivados de quitosano solubles desarrollados mediante los varios métodos/procesos descritos en la presente tienen sustitución parcial y retienen cargas tanto positivas como negativas. Por ende, diferentes moléculas cargadas se
10 unen a la molécula de quitosano, lo que la torna útil como molécula portadora para grupos activos, tales como grupos antimicrobianos, o cualquier otro grupo activo que tenga cierto propósito funcional. El resultado es que la eficacia de un grupo funcional que se une a dicha molécula mejora a
15 una concentración muy pequeña. En la presente, se ha observado que las composiciones de quitosano solubles en agua preparadas mediante los métodos/procesos de la invención son efectivas como portadores de N-acetilcisteína y residuos de sulfato de cobre, esto último ha sido demostrado en el
20 ejemplo 19. Se espera que ocurra el mismo rendimiento para cualquier grupo funcional cuyo residuo pueda ser tan efectivo que cuando se encuentra en estado no unido, no portado por la molécula de quitosano soluble en agua. La molécula de quitosano soluble en agua aquí es preparada mediante los

000048

métodos/procesos de esta invención. No obstante, la molécula de quitosano soluble en agua preparada por cualquier otro método/proceso existente o inventivo será equivalente a esta molécula a los efectos de su aplicación como molécula portadora y será considerada parte del alcance de esta invención a menos que exista una razón por la cual no pueda portar otro activo.

Otra forma de realización más de esta invención revela un método/proceso para reforzar la estabilidad bajo almacenamiento de productos naturales mediante tratamiento con derivados de quitina. Una forma de realización de este aspecto de la invención revela un método/proceso para reforzar la estabilidad bajo almacenamiento de productos naturales mediante tratamiento con derivados de quitina que retardan las actividades relacionadas con la vida del producto que son responsables de reducir la estabilidad bajo almacenamiento o generar el añejamiento al ralentizar o arrestar dichas actividades. La lista ilustrativa de dichas actividades relacionadas con la vida del producto incluyen, sin limitación: respiración, oxidación, formación de etileno, transpiración, así como también arresto del añejamiento de las frutas frescas, vegetales, carne, pescado, preparaciones de alimentos procesados y no procesados, y similares. Una persona medianamente versada en el arte podrá extender esta

000049

lista a muchas otras actividades que reducen la estabilidad en almacenamiento. Para alcanzar este objetivo, los productos naturales se pueden recubrir con las composiciones de esta invención mediante los métodos que son ampliamente conocidos para la persona versada en el arte. Dicho recubrimiento puede ser total o parcial, y puede obtenerse mediante el uso de un método/proceso de aplicación. Dicho método de aplicación incluye, sin limitaciones: aspersión, inmersión, micro-aspersión o uso de nano-partículas, nebulización indirecta, y similares. En el caso de alimentos procesados tales como pan, fideos, etc., dicha formulación se puede agregar al bollo y/o aplicarse a la superficie del alimento procesado mediante uno de los varios métodos de la lista anterior.

Cuando se almacenan plátanos durante un largo período de tiempo, la corona del racimo comienza a secarse. El tallo que une el cabo del plátano a la corona se llama "pedicelo". Éste comienza a marchitarse. El marchitamiento del pedicelo es el mejor indicador de que se está secando. Menor marchitamiento indica conservación de la frescura. Se realizó un ensayo sobre 1000 kg de plátanos, cada uno mediante el método estándar (control) de inmersión en 0.1% de nuestro producto y aspersión de nuestro producto. Esto se repitió en 2 tandas (un total de 6000 kg de plátanos). Un porcentaje muy bajo de marchitamiento del pedicelo mediante inmersión así

000050

como también aspersión de la composición de ensayo muestra su eficacia satisfactoria para retrasar el secado y, por último, para retrasar el añejamiento y la senescencia y mejorar la capacidad de almacenamiento. Los resultados se brindan en la

5 Tabla 6 con posterioridad. Mediante el método de inmersión se observó una mejora significativa en el marchitamiento (pérdida de peso, o conservación de frescura).

A continuación se describen experimentos que se llevaron a cabo y sirven como ilustraciones no limitativas de

10 cómo se realiza la invención. Cualesquiera modificaciones y variaciones en los parámetros -que incluyen mas no se limitan al proceso para producir hidrolizados, y modificaciones adicionales, así como también el método/proceso de uso de los productos y sus varios pasos usados- son meramente

15 ilustrativas y cualesquiera equivalentes de las mismas que sean obvias para una persona versada en el arte y sea capaz de alcanzar el mismo objetivo, se pueden usar en su lugar y, aún así, serán consideradas como incluidas dentro del alcance de esta memoria descriptiva.

20

FIGURAS Y SU DESCRIPCIÓN

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

Figura 2: Barrido por IRM de tomates representativos.

000051

Figura 3: Fotografía de la diferencia en la apariencia de manzanas en trozos tratadas y no tratadas el día 4.

Figura 4: Las manzanas en trozos no tratadas (control) desarrollaron crecimiento visible de hongos como manchas
5 negras de crecimiento de hongos en la fotografía mientras que las manzanas en trozos tratadas (ensayo) permanecieron libres de crecimiento de hongos después de 25 días de almacenamiento en bolsas de polietileno.

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

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
15 (unidades/ml) de un volumen por unidad de una formulación enzimática individual. Se observa actividad máxima de 160 unidades/ml a pH 2.

Figura 8: Temperatura óptima de la proteo-quitinasa. El eje X muestra el pH y el eje Y muestra la actividad
20 enzimática (unidades/ml) de una cantidad por unidad de una formulación enzimática individual. Se observa actividad máxima a una temperatura de 80 °C.

Figura 9: Acción de enzimas seleccionadas sobre quitosano. Corrida 1: Estándar de glucosamina. Corrida 2:

000052

Xilán Acil Transferasa (cruda), Corrida 3: Proteasa y Xilán Acil Transferasa (ambas puras). Corrida 4: Xilán Acil Transferasa (pura). Corrida 5: Quitosano sin enzima. Los manchas de acetato (Resultados de acetilación) están marcadas
5 por un círculo.

EJEMPLO 1

PRODUCCIÓN DE LACTATO DE QUITOSANO SOLUBLE E INSOLUBLE EN AGUA

Se toman 5 g de quitosano [DDA (*Degree of Deacylation* o
10 grado de desacetilación) 70, malla 100] en un matraz de fondo redondo y se agregan 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien agitando a 100 rpm durante 30 minutos. Se agrega a esta mezcla un ácido,
15 orgánico o inorgánico -preferentemente, ácido láctico- en diferentes cantidades, y la agitación continúa 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. Se separan el polvo de flujo libre y los
20 grumos (de haberlos) mediante tamizado. El polvo de flujo libre luego se seca adicionalmente en horno de aire caliente [70 °C durante 3 a 6 horas]. Los grumos son partículas elásticas que no se rompen en partículas de flujo libre de malla 100 o más pequeñas. La solubilidad de las partículas de

000053

flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y adicionalmente durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. Los efectos de las diferentes concentraciones de ácido láctico se brindan en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de diferentes cantidades de ácido láctico usadas con 5 g de quitosano.

10	Ácido láctico (ml)	Formación de grumos durante la reacción	Solubilidad en agua
	6.5	+++	Se disuelve completamente
	5.0	++	Se disuelve completamente
	3.5	+	Se disuelve completamente
15	2.0	-	Se disuelve completamente
	1.0	-	Forma grumos que se disuelven después de 30 minutos
	0.5	-	Forma grumos que no se disuelven hasta los 60 minutos
20	0.1	-	Se disuelve completamente cuando la reacción se realiza en 90:10 metanol:agua

+++ indica 60% o más de formación de grumos

000054

++ 35% de formación de grumos

+ aproximadamente 15% de formación de grumos y tamaño de grumo pequeño

- sin formación de grumos

- 5 Como el ácido láctico en una cantidad inferior a 0.5 ml arrojó una disolución completa sin formación de grumos durante la reacción, conformó la forma de realización preferida para uso en trabajo adicional.

EJEMPLO 2

10 ADICIÓN DE GRUPO SUCCINATO A QUITOSANO

- Se toman 5 g de quitosano [DDA 70, malla 60] en un matraz de fondo redondo y se agregan 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien agitando a 15 100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 65 °C. Se agrega anhídrido succínico en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g a esta mezcla y la agitación continúa durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60 y 70 °C, y preferentemente a 65 °C, durante aproximadamente 1 20 hora. La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. El polvo de flujo libre se forma al romper los grumos sueltos en forma mecánica y pasarlos por un tamiz de malla 100. No se observó formación de grumos. El polvo de flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire

000055

caliente a 85 °C durante 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la
5 adición y durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. El polvo es soluble en agua cuando se agregan 0.5 g o más de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción.

EJEMPLO 3

10 DERIVACIÓN EN DOS PASOS CON UN ÁCIDO Y ANHÍDRIDO SUCCÍNICO

La reacción se lleva a cabo exactamente como se describe en el ejemplo 2 en donde el quitosano se reemplaza por el producto de reacción obtenido en una reacción descrita
15 en el ejemplo 1 donde se usan 1.0 g ó 0.5 g de ácido láctico. En lugar de ácido láctico, se podría haber usado cualquier otro ácido orgánico o inorgánico. Se usaron otros 0.5 g de anhídrido succínico para 5 g del producto de la Primera Composición. Se formó material granular grueso, que era
20 soluble en agua cuando se evaluó tal como se describió en el ejemplo 1.

EJEMPLO 4

ADICIÓN SECUENCIAL DE SUCCINATO Y LACTATO A QUITOSANO

La reacción se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo

000056

2, en donde se hace reaccionar 5 g de quitosano con 0.5 g de anhídrido succínico. Una vez completa la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a 30 °C y se agregaron 0.5 ó 1.0 ml de ácido láctico. El ácido láctico se podría haber reemplazado por cualquier otro ácido orgánico o inorgánico. La mezcla se agitó durante 1 hora, se filtró y se procesó adicionalmente como se describe en el ejemplo 1. No hubo formación de grumos. El polvo seco fue completamente soluble en agua dentro de los 5 minutos bajo las condiciones de ensayo descritas.

EJEMPLO 5

IDENTIFICACIÓN DE ENZIMA QUE TIENE ACTIVIDAD COMO PROTEINASA PRIMARIA Y REACTIVIDAD CRUZADA DE QUITINASA

Se recolectaron muestras de suelo, en Pune, India, y alrededores, de varios recursos naturales ricos en materia orgánica. La muestra de 10 g se enriqueció con el substrato deseado (1 g) -a saber: caseína, quitosano, trigo lavado, celulosa- en forma individual en un matraz de 250 ml separado que contenía 100 ml de agua destilada. El enriquecimiento continuó durante 3 semanas, y las muestras se vetearon en medio sólido que contenía el substrato usado para enriquecimiento como única fuente de carbono. Las colonias aisladas en general mostraron una zona de aclaramiento que indicaba la fuerte producción de la respectiva enzima

000057

degradante. Se aislaron aproximadamente 700 cultivos para varias bacterias y hongos. Para averiguar los cultivos que tenían la actividad deseada, se cultivaron en matraces de 1 litro -que contenían 200 ml de medio- a través del método de
5 agitación en matraz. El filtrado del cultivo microbiano crudo se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio disuelto en SDS al 0.1%. Las fracciones de proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante. Las fracciones de proteínas se separaron sobre estos geles
10 como bandas independientes homogéneas. Estas bandas se caracterizaron en cuanto a su actividad mediante tres métodos/procesos diferentes: tinción con azul de Coumassie para detección de proteínas, ensayo de aclaramiento de caseína para la actividad de proteinasa y ensayo de
15 aclaramiento con azul brillante de Ramezol de quitina para la actividad de quitinasa. Se detectó una banda homogénea a nivel electroforético que mostró actividad de proteinasa así como también actividad de quitinasa, proteo-quitinasa. Esta banda se usó para desarrollar hidrolizado de quitina a fin de
20 desarrollar el producto de esta invención. Se determinó que el peso molecular de la proteo-quitinasa purificada de *Aspergillus sp.* seleccionada era de 50 kD usando estándar de peso molecular sobre SDS-PAGE. El trazado del patrón de electroforesis en gel se ilustra en la figura 6. Sobre la

000058

base de este ensayo, se seleccionaron *Aspergillus niger* MTCC 5572 (depósito en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) por su actividad de proteo-quitinasa y *Bacillus sp.* MTCC 5571
5 (depósito 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 a gran escala.

EJEMPLO 6

10 PRODUCCIÓN DE PROTEASA CAPAZ DE ESCINDIR QUITINA Y QUITOSANO

Se identificaron cultivos microbianos capaces de producir proteasa(s) ácida(s) o neutra(s) y endo-quitinasa. La fracción enzimática aislada de los respectivos cultivos
15 microbianos que tuvieron actividad de proteinasa así como también de quitinasa (proteo-quitinasa) se incubó con solución de quitosano al 1% en ácido acético al 1%. La proteasa degradó el quitosano, lo que generó parcialmente la reducción de la viscosidad del substrato. Los cultivos
20 identificados por poseer proteinasa promisorio así como también reacción de endo-quitinasa (proteo-quitinasas) se cultivaron a gran escala para la producción enzimática. Se seleccionó específicamente *Aspergillus niger* MTCC 5572, que se cultivó bajo condiciones de agitación en un matraz en

000059

medio de extracto de levadura y caseína. El filtrado del cultivo se caracterizó por actividad enzimática, y la enzima proteo-quitinasa cruda se recuperó mediante precipitación con sulfato de amonio [90% de saturación]. La actividad enzimática del precipitado de sulfato de amonio se determinó mediante determinación proteica a través de método colorimétrico, y se agregó una cantidad conocida de enzima proteo-quitinasa al quitosano para su modificación. La enzima cruda de *Aspergillus niger* MTCC 5572 concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio se disolvió en tampón de fosfato pH 7.0. Se sometió a filtración en gel usando Sephadex® G-100. Se recolectaron diferentes reacciones que se sometieron a evaluación en cuanto a su contenido proteico y actividad enzimática. Las fracciones No. 89 a 104 correspondieron con el pico de proteína único (ver figura 5). Este método/proceso se usó para la purificación de la enzima a partir de un caldo de 3 a 12 L en un único lote. Se determinaron el pH óptimo y la temperatura óptima para la proteo-quitinasa en un rango de pH de 1 a 9 y un rango de temperatura de 30 a 100 °C. La enzima mostró actividad óptima a un pH de 2 (Figura 7), y a 80 °C (Figura 8).

Se identificaron cultivo(s) de *Bacillus sp* que son capaces de producir Xilán acil transferasa; es decir, una enzima de desacetilación, y se incubaron con solución de

000060

quitosano al 1% en ácido acético al 1%. Los cultivos que poseían actividad de desacetilación promisorio, según lo identificado, se cultivaron a gran escala para la producción enzimática. Se seleccionó específicamente *Bacillus sp* MTCC 5571, que se cultivó bajo condiciones de agitación en matraz, en medio de extracto de levadura y caseína. El filtrado del cultivo se caracterizó por actividad enzimática, y la enzima proteo-quitinasa cruda se recuperó mediante precipitación con sulfato de amonio [90% de saturación]. La actividad enzimática del precipitado del sulfato de amonio se determinó mediante la detección de la mancha de acetato por TLC a través del tratamiento de quitina con la fracción enzimática, y se agregó una cantidad conocida de enzima de desacetilación al quitosano para su modificación. La enzima cruda de *Bacillus sp* MTCC 5571 concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio se disolvió en tampón de fosfato a un pH de 7.0. Se sometió a filtración en gel usando Sephadex® G-100. Se recolectaron diferentes fracciones que se sometieron a ensayo en cuanto al contenido de proteína y la actividad enzimática. Este método/proceso se usó para la purificación de la enzima a partir de un caldo de 3 a 12 L en un único lote.

EJEMPLO 7

PRODUCCIÓN DE XILÁN ACIL TRANSFERASA CAPAZ DE

000061

DESACETILAR QUITINA Y QUITOSANO

Se identificaron y aislaron cultivo(s) microbiano(s) que eran capaces de producir xilán acil transferasa. La desacetilación del quitosano bajo las condiciones de ensayo
5 fue realizada por esta(s) enzima(s). La mezcla de reacción mostró solubilización de quitina a medida que la viscosidad de la solución se incrementaba. La aparición del grupo acetilo libre fue detectada por TLC. Los cultivos que poseían propiedad de desacetilación de quitina, según lo
10 identificado, se cultivaron a gran escala para la producción enzimática. Los cultivos seleccionados derivaron de *Bacillus* sp. MTCC 5571 y se cultivaron bajo condiciones de agitación en matraz, en medio de extracto de levadura y salvado de trigo. El filtrado del cultivo se caracterizó por actividad
15 enzimática, y la enzima cruda se recuperó mediante precipitación con sulfato de amonio [90% de saturación]. Se determinó la actividad enzimática del precipitado del sulfato de amonio, y se agregó una cantidad conocida de enzima al quitosano para su modificación.

20

EJEMPLO 8HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE QUITOSANO

Se agregaron 5 g de quitosano a 70 ml de metanol y 30 ml de agua destilada. Esta mezcla se agitó continuamente a 100 rpm. Se agregó enzima capaz de escindir quitina [descrita

000062

en el ejemplo 5] a 10 - 1000 U.I. por g de concentración de quitosano. La reacción se llevó a cabo a temperaturas comprendidas entre 25 y 95 °C durante un lapso de 30 minutos a 5 horas. Las condiciones preferidas fueron: 100 U.I. de
5 enzima por g de quitosano, temperatura de 50 °C, y período de incubación de 2 horas. El producto de reacción se recuperó por filtración y secado tal como se describió en el ejemplo 2. El quitosano sin modificar [1 g], cuando se disolvió en 100 ml de agua destilada acidificada usando 2 ml de solución
10 de ácido acético, mostró viscosidad de 80 a 100 cps. El quitosano modificado a nivel enzimático [1 g], cuando se disolvió en 100 ml de agua destilada acidificada usando 2 ml de solución de ácido acético, mostró viscosidad de 20 a 30 cps. A fin de comprobar que dicha enzima funciona sobre el
15 quitosano, se agregó enzima purificada (0.1% p/vol) a solución de quitosano al 0.5% (que se preparó en ácido acético acuoso al 0.5%), y se incubó a 50 °C durante 16 horas. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante transparente se analizó mediante TLC (sistema solvente
20 propanol:agua:amoníaco 7:2:1) usando glucosamina como estándar. La enzima que mostró actividad de proteo-quitinasa produjo quito-oligosacáridos que se desarrollaron como manchas de acuerdo con TLC, de movimiento lento en comparación con la glucosamina. Las proteasas de diferentes

000063

organismos que no mostraron actividad cruzada de quitinasa no tuvieron manchas que se movieron sobre la placa de TLC (figura 9).

EJEMPLO 9

5 DESACETILACIÓN ENZIMÁTICA DE QUITINA

Se agregaron 5 g de quitina a 100 ml de agua destilada. Esta mezcla se agitó continuamente a 100 rpm. Se agregó enzima capaz de desacetilar quitina [ejemplo 6] a 500 - 1000 U.I. por g de concentración de quitina. La reacción se llevó
10 a cabo a temperaturas que oscilaban entre 25 a 95 °C durante un lapso de 8 a 24 horas. Las condiciones preferidas fueron: 800 U.I. de enzimas por g de quitina, temperatura de 50 °C y período de incubación de 8 horas. El producto de reacción se recuperó mediante filtración y secado tal como se describió
15 en el ejemplo 2. La quitina sin modificar fue completamente insoluble en agua. La quitina modificada a nivel enzimático [10 g], cuando se agitó en 100 ml de agua destilada acidificada usando 2 ml de solución de ácido acético, mostró viscosidad de 30 a 50 cps, lo que indicó la solubilización
20 parcial de la quitina como resultado de la desacetilación.

EJEMPLO 10

COMPOSICIÓN CONSERVANTE DE QUITINA/QUITOSANO POST-COSECHA Y PROCESO PREFERENTE DE FABRICACIÓN DE LA MISMA

Se toman de 5 g de quitosano [DDA 50 - 70, malla 60] en

000064

un matraz de fondo redondo y se agregan al mismo 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos. La
5 mezcla se calienta a 65 °C. Se agrega anhídrido succínico en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g a esta mezcla y la agitación continúa durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60 y 70 °C, y preferentemente a 65 °C. La suspensión se deja enfriar. Se agregan 0.5 ml de
10 ácido láctico, y la enzima para desacetilación a 4000 U.I. producida a partir de *Bacillus sp* MTCC 5571, y la mezcla se agita durante 7 horas. El ácido láctico se podría haber reemplazado por cualquier otro ácido orgánico o inorgánico. Se agrega la enzima quitinolítica a 500 U.I. producida a
15 partir de *Aspergillus niger* MTCC (tal como se describió en el ejemplo 5) y la agitación continúa durante 1 hora. La suspensión se deja enfriar y se filtra y el sólido se seca al aire. El polvo de flujo libre se forma al romper los grumos sueltos en forma mecánica y pasarlos por un tamiz usando
20 malla 100. No se observa formación de grumos. El polvo de flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 70 °C durante 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5

000065

minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. El polvo succinilado es soluble en agua cuando se agregan más de 0.5 g de anhídrido a 5 g de
5 quitosano en dicha reacción.

EJEMPLO 11

PRODUCCIÓN DE DERIVADO DE AZÚCAR - SUCCINATO DE QUITOSANO SOLUBLE E INSOLUBLE EN AGUA QUE PORTA RESIDUOS DE FORMALDEHÍDO

10 Se toman 5 g del derivado de succinato de quitosano, según lo descrito en el ejemplo 10, en un matraz de fondo redondo y se agregan al mismo 100 ml de metanol (99%). La suspensión se mezcla bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos y se calienta a 60 °C. La temperatura se
15 mantiene a través de toda la reacción. Se disuelve sucrosa en el rango de 1 g a 0.02 g (ver Tabla No. 3) en 10 ml de agua, y la misma se agrega a la suspensión. La mezcla se agita durante 15 minutos. Se agregan 5 ml de formaldehído a esta mezcla a gotas en 30 minutos. La reacción continúa a 60 °C
20 con agitación constante en forma adicional durante 1 a 6 horas. Esto se menciona como "tiempo de reacción" en la Tabla No. 3. La mezcla de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, el producto se recupera por filtración. Los sólidos se lavan con 100 ml de metanol al 90%

000066

y se secan al aire. El producto se caracteriza como polvo de flujo libre o con grumos. Se determina 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

5 continuación:

Tabla. No. 3

Sucrosa en g	Tiempo de reacción en horas	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	Grumos/Gel	Soluble	Insoluble
0.02	6	Grumos/Gel	Soluble	Insoluble
0.02	3	Grumos/Gel	Soluble	Soluble
0.02	1	Polvo	Soluble	Soluble

Todos los productos solubles en agua tuvieron diverso grado de actividad antimicrobiana, que fue consistentemente

20 mejor que el de la actividad antimicrobiana del material de inicio (producto del ejemplo 10).

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

000067

Tabla 4: conteo inicial de E coli de 4X 10⁷

Producto/ concentración	1 %	0.5%	0.1%	0.033%
Producto del ejemplo 10	2X 10 ³	2X 10 ³	4X 10 ³	1X 10 ⁴
Producto 10 con sucrosa 0.1 g	7X 10 ²	4X 10 ²	4X 10 ²	1X 10 ³
Producto 10 con sucrosa 0.02 g 6h	5X 10 ²	2X 10 ²	4X 10 ²	90
Producto 10 con sucrosa 0.02 g 1h	2X 10 ²	2X 10 ²	4X 10 ²	109

Las reacciones se llevaron a cabo tal como se describió con anterioridad pero reemplazando sucrosa con glucosa o lactosa (0.02 g) cada una durante 3 horas. Los productos de estas reacciones fueron solubles en agua y mostraron 100% de actividad antimicrobiana contra *E coli* cuando se evaluaron mediante el método/proceso descrito con anterioridad.

EJEMPLO 12

COMPOSICIÓN DE QUITINA/QUITOSANO PREPARADA AL USAR ÁCIDO DE FÓSFORO Y QUE PORTA RESIDUOS DE FORMALDEHÍDO

Se toman 5 g de quitosano [DDA 50 - 70, malla 60] en un matraz de fondo redondo, y se agregan al mismo 100 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 60 °C. Se

000068

disuelve ácido de fósforo (H_3PO_3) en diferentes proporciones que abarcan desde 0.5 g hasta 15 g en 20 ml de agua y se agrega a gotas a esta mezcla mediante agitación durante 1 hora. Luego se agregan 5 ml de formaldehído en forma de 5 gotas. La temperatura se mantiene entre 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante 2 a 6 horas, una vez completa la adición. La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. El polvo de flujo libre se forma al romper los grumos sueltos en forma mecánica y 10 pasarlos por un tamiz usando malla 100. No se observa formación de grumos. El polvo de flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 70 °C durante 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de 15 agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y adicionalmente durante 10 minutos más, y luego la solubilidad se chequea visualmente. La solubilidad se chequea también a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris.

20 Los productos formados usando quitosano y ácido de fósforo en una relación de 1:1 y 1:2 mostraron solubilidad en el amplio rango de pH (7 a 10), formando soluciones ligeramente turbias a transparentes. Estas soluciones mostraron diverso grado de actividad antimicrobiana. Se

000069

realizaron estudios antimicrobianos usando *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2200 (ATCC 9027) capaz de crecer a un amplio rango de pH. Se inoculó el cultivo desarrollado durante toda la noche en el caldo de nutrientes (100 micro L) nuevamente en caldo de nutrientes (10 ml) de diverso pH (ver la tabla) sin ninguna adición (control) y con el producto de quitina-ácido de fósforo. Los cultivos se incubaron en un agitador a 25 °C durante 8 horas, y se registró el crecimiento como densidad óptica (OD, del inglés *Optical Density*) del caldo a 600 nm. Una baja densidad óptica (en comparación con el control) indica menor crecimiento, y cierta actividad antimicrobiana. Sin crecimiento - cero OD - significa inhibición de microbios del 100%.

Tabla 5: Inhibición de *Pseudomonas* a un pH de 8.5

		C:P1:1	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

000070

0.10%		0	0
pH 9			
Control	1.69		
0.01%		1.39	1.68
0.05%		0	0
0.10%		0	0

Cuando los plátanos se almacenan durante un tiempo prolongado, la corona del racimo comienza a secarse. El tallo que une el cabo del plátano a la corona se llama "pedicelo". El pedicelo comienza a marchitarse. El marchitamiento del pedicelo es el mejor indicador del secado. Menos marchitamiento significa conservación de la frescura. El ensayo se realizó sobre 1000 kg de plátanos, cada uno mediante el método estándar (control) de inmersión en 0.1% de nuestro producto y aspersión de nuestro producto. Esto se repitió en 2 tandas (un total de 6000 kg de plátanos). Un muy bajo porcentaje de marchitamiento del pedicelo mediante inmersión así como también aspersión de la composición de ensayo muestra su eficacia satisfactoria para retrasar el secado y, en última instancia, retardar el añejamiento y la senescencia, y mejorar la capacidad de almacenamiento. Los resultados se brindan en la Tabla 6 que sigue.

Tabla 6: Efectividad de producto c:p 1:1 para conservar

000071

frutas

5

% Marchitamiento del pedicelo / tanda usando el producto del Ejemplo 12		
Número de tanda	Tanda no. 1	Tanda no. 2
Inmersión	2.4	1.9
Aspersión	3.2	2.8
Control	2.7	2.4

10

Mediante el método de inmersión se observó una mejora significativa en el marchitamiento (pérdida de peso o conservación de frescura).

EJEMPLO 13

APLICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CONSERVANTE

15

Se prepararon soluciones a partir de 10 gramos de quitosano y su producto descrito en los ejemplos 1, 2, 4 y 10 al disolver quitosano en ácido acético al 2% y todos los otros derivados en agua para formar un volumen de 1000 ml de solución en un recipiente con una capacidad de 15 L. Se sumergieron 3 kg de tomates o 2 kg de plátanos en la solución durante 15 segundos. Cuando se retiró el material del recipiente, se dejó drenar el exceso de solución en el mismo recipiente durante 1 minuto. Esta acción de inmersión se repitió con los cinco lotes siguientes de fruta fresca. Por

20

000072

ende, se sumergió un total de 15 kg de tomates o 10 kg de plátanos en la solución de 10 L. Luego la solución remanente en el recipiente se midió con precisión y se registró la pérdida de líquido como la diferencia entre el volumen inicial y el final. Esto se dividió por la cantidad total de fruta sumergida, arrojando el consumo de solución por kg de fruta sumergida. Los resultados de este experimento se brindan en la tabla 7

Tabla 7:

10	Producto	Consumo en ml por Kg de tomates	Consumo en ml por kg de plátanos
	Quitosano	12	19
15	Quitosano: Ácido láctico 1:0.4 de acuerdo con el ejemplo 1	9	10
	Quitosano: anhídrido succínico 1:0.1 de acuerdo con el ejemplo 2	8	8
	Producto del ejemplo 4	3	5
20	Producto del ejemplo 10	3	3

La Quinta composición mostró tres a cuatro veces menos -o incluso menos- consumo por kg de plátanos y tomates que la

000073

solución de quitosano en ácido acético.

EJEMPLO 14

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPOSICIONES DE QUITOSANO

Se disolvió quitosano en ácido acético al 2%, y sus
 5 productos descritos anteriormente se disolvieron en agua. Se
 usaron 300 mg del producto para formar una solución de 10 ml.
 Se cultivaron cultivos de *E.coli* NCIM 2065 y *Bacillus*
subtilis NCIM 2063 toda la noche (10^9 células/ml de densidad)
 diluidos 100 veces con caldo líquido estéril y se usaron para
 10 ensayo antimicrobiano. El ensayo se estableció al mezclar
 cultivos diluidos con solución madre de quitosano o producto
 de la siguiente manera:

Cultivo vol. en ml	7	8.5	9.7	9.9
Quitosano/producto vol. en ml	3	1.5	0.3	0.1
Concentración de producto (%)	1	0.5	0.1	0.033

La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Se
 20 determinó el conteo viable total de la mezcla. Cuando se
 compara con el conteo inicial del cultivo, se obtiene la
 efectividad microbiciada del producto. Los datos para *E coli* y
Bacillus subtilis se brindan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8: Conteo inicial de *E coli* de 4×10^7

000074

Producto/ concentración	1 %	0.5%	0.1%	0.033%
Quitosano	2X 10 ⁷	4X 10 ⁷	4X 10 ⁷	4X 10 ⁷
Quitosano: Ácido láctico 1:0.4	6X 10 ⁵	1X 10 ⁶	2X 10 ⁷	2X 10 ⁷
Quitosano: anhídrido succínico 1:0.1	8X 10 ⁶	2X 10 ⁷	2X 10 ⁷	2X 10 ⁷
Producto del ejemplo 4	9X 10 ⁵	2X 10 ⁶	9X 10 ⁶	3X 10 ⁷
Producto del ejemplo 9	3X10 ⁷	9X 10 ⁶	3 X 10 ⁶	7X 10 ⁵
Producto del ejemplo 10	2X10 ³	2X10 ³	4X10 ³	1X10 ⁴

Tabla 9: Conteo inicial de *Bacillus subtilis* de 3X 10⁷

Producto/concentración	1 %	0.5%	0.1%	0.033%
Quitosano	3X 10 ⁷	3X 10 ⁷	4X 10 ⁷	4X 10 ⁷
Quitosano: Ácido láctico 1:0.4	4X 10 ⁵	3X 10 ⁶	1X 10 ⁷	7X 10 ⁶
Quitosano: anhídrido succínico 1:0.1	3X 10 ⁶	2X 10 ⁶	8X 10 ⁷	6X 10 ⁷
Producto del ejemplo 4	7X 10 ⁵	1X 10 ⁶	5X 10 ⁶	1X 10 ⁶
Producto del ejemplo 10	1X10 ⁴	2X10 ⁴	4X10 ⁵	1X10 ⁵

La mezcla (0.1%) se incubó en refrigerador (a una temperatura de 4 a 10 °C) hasta 7 semanas. El incremento en la turbidez se detectó visualmente y se puntuó como +. La falta de incremento en la turbidez (-) indica actividad

000075

microbiostática.

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

5

Producto/cultivo microbiano	<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	-	-	-	-	-	+

10

La Quinta composición mostró alta actividad antimicrobiana así como también microbiostática en comparación con la solución de quitosano en ácido acético y la Primera, Segunda y Cuarta Composiciones.

EJEMPLO 15

EFEECTO DE COMPOSICIONES CONSERVANTES SOBRE LA ESTABILIDAD BAJO ALMACENAMIENTO

20

Cuando se usó la solución de quitosano y quitosano procesado mediante los ejemplos 6 y 7 para recubrir plátanos y fresas -100 frutas por cada conjunto- el número menor de putrefacción microbiana (22 y 9 para las respectivas frutas) se observó después de 5 días de almacenamiento a temperatura

000076

ambiente y 25 días para el quitosano procesado mediante el método/proceso del ejemplo 6.

EJEMPLO 16

MEJORA EN LA VIDA ÚTIL MEDIANTE EL PRODUCTO DEL EJEMPLO

5 10 (Quinta Composición)

Se trataron plátanos verdes cosechados en forma reciente (<30 h de la cosecha) usando una solución al 0.1% del producto del ejemplo 10 en agua. El tratamiento se puede realizar mediante inmersión del plátano en dicha solución
10 durante 10 a 15 segundos, o mediante aspersión directa de la solución sobre el plátano con un dispositivo adecuado a fin de humedecer la superficie del plátano, o al atravesar el plátano por una cámara cerrada que se satura con la bruma de dicha solución (nebulización indirecta). Los plátanos
15 tratados se secan al aire. Estos plátanos se almacenan a temperatura ambiente (20 a 32 °C y una humedad relativa de 40 - 60%). Los plátanos del mismo lote que son idénticos a los plátanos tratados se mantienen como "control no tratado". Tanto los plátanos tratados como los no tratados se almacenan
20 bajo condiciones idénticas hasta 15 días. Los plátanos tratados mantuvieron su color verde y su peso, mientras que los plátanos no tratados perdieron peso y desarrollaron decoloración. La fotografía de los plátanos tratados y no tratados tomada al día 12 muestra las diferencias visuales.

000077

Los plátanos tratados tuvieron mejor condición fisiológica según se evaluó a nivel químico al determinar sus sólidos totales (contenido BRIX), azúcares reductores y pérdida de peso. Los datos se ilustran en la tabla 11 y la figura 1.

5 Tabla 11: Resultados de los ensayos cuantitativos realizados sobre los plátanos tratados y los plátanos de control no tratados al día 6 del almacenamiento.

10

Parámetro	Tratados	Control
Pérdida de peso	2.6	8.7
BRIX	22-24	20-22
RS	800 - 1100	300 - 850

15

La fotografía de los plátanos no tratados (izquierda) y de los tratados (derecha) al día 12 del almacenamiento se ilustra en la Figura 1.

20

Además del almacenamiento durante 8 a 15 días, tanto los plátanos tratados como los plátanos de control no tratados se trataron con etileno. Los plátanos tratados maduraron en forma normal, mientras que los plátanos de control no tratados se endurecieron y no maduraron o bien se oscurecieron y ablandaron. Ambos tipos de plátanos del lote no tratado no fueron aptos para el consumo.

EJEMPLO 17

CAMBIOS FISIOLÓGICOS POSITIVOS Y ACTIVIDAD

000378

MICROBIOSTÁTICA

Se trataron tomates enteros y manzanas trozadas con el producto del ejemplo 10, exactamente como se describió en el ejemplo 14 para los plátanos. Los tomates tratados retuvieron su peso, textura y frescura durante 30 días en comparación con los tomates no tratados de control, que se arrugaron en un lapso de 12 a 15 días, lo que generó la pérdida de peso. Los cambios fisiológicos en los tomates tratados y en los tomates de control se monitorizaron el día 7 de almacenamiento usando técnica de barrido por IRM. La piel carnosa de los tomates tratados fue más uniforme en su densidad de color. La piel carnosa de los tomates de control no tratados tenía parches oscuros que indicaban falta de uniformidad y más secado.

El barrido por IRM de los tomates representativos se incluye en la Figura 2.

Los trozos de manzana se envasaron en bolsa de polietileno o recipiente plástico transparente y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4 a 9 °C. Las manzanas trozadas de control comenzaron a adquirir un color marrón a partir del día 2 y se volvieron blandas hacia el día 3, mientras que las manzanas en trozos tratadas retuvieron su color, sabor y textura durante 6 días. La fotografía (Figura 3) muestra la diferencia en la apariencia

000079

de las manzanas en trozos tratadas y las no tratadas en el día 4.

Los trozos de manzanas tratadas y no tratadas se envasaron en recipientes plásticos transparentes y se
5 almacenaron tal como se describió con anterioridad durante hasta 25 días. Las manzanas en trozos no tratadas desarrollaron crecimiento de hongos [parches negros en la fotografía en la Figura 4], mientras que las manzanas en trozos tratadas no desarrollaron ningún crecimiento de hongos
10 ni de microbios. Los resultados se ilustran en la fotografía que sigue con posterioridad.

EJEMPLO 18

COMPOSICIÓN DE QUITINA/QUITOSANO USANDO ÁCIDO DE FÓSFORO Y ÁCIDO CLORHÍDRICO

15 Se toman 750 g de quitosano [DDA 50 - 70, malla 100] en un matraz de fondo redondo y se agregan al mismo 15000 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 60 °C.
20 Luego se agrega formaldehído 750 ml en 1-2 minutos. Se disuelven 750 g de ácido de fósforo (H_3PO_3) en 7500 ml de agua y luego se agregan a gotas a esta mezcla mediante agitación durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas, una vez

000080

completa la adición. La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. Se forman polvo de flujo libre y pequeños grumos. Dichos grumos se rompen en forma mecánica y se pasan por un tamiz de malla 100. El polvo de
5 flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 70 °C durante un lapso de 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua
10 durante la adición y durante 10 minutos más, y luego la solubilidad se chequea visualmente. La solubilidad se chequea también a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris.

El producto se disolvió en agua, pero se precipitó
15 cuando el pH se elevó a 7.0. El polvo seco obtenido en esta reacción se resuspendió en 20 volúmenes de metanol al 90%, y se agregaron 2 volúmenes de HCl concentrado. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El polvo se separó por filtración, se lavó con volúmenes de metanol al
20 90% tres veces y se secó tal como se describió con anterioridad. El producto resultante fue soluble a un pH de 3 a 12.

Los productos de todos los otros ejemplos - particularmente el ejemplo 10 y el 12- cuando se trataron con

000081

HCl según se describe en este ejemplo, no alteraron el pH máximo de solubilidad.

EJEMPLO 19

USO DE QUITOSANO SOLUBLE EN AGUA COMO PORTADOR

5 Se disolvió 1 g de quitosano soluble en agua, según se
obtuvo a partir del ejemplo 10, en 100 ml de agua. A 9 ml de
esta solución se agregó 1 ml de solución de sulfato de cobre
(1%). Esto se mezcló a mano durante 2 minutos. Luego se
agregó 1 ml de amoníaco líquido. Esto generó la precipitación
10 del quitosano. Junto con el quitosano, el sulfato de cobre
unido también se precipitó. El sulfato de cobre es libremente
soluble en amoníaco líquido, y la solución resultante es de
color azul profundo. La estimación del cobre se realiza por
colorimetría, y usando un gráfico estándar de 0.02 a 0.1%. A
15 partir de esto, se estimó que el cobre unido al quitosano era
del 90%.

000082

NOVEDAD DE LA INVENCIÓN

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un derivado de quitosano al activar quitosano, o una quitina como precursor de quitosano, CARACTERIZADO porque comprende: suspender dicho quitosano o dicha quitina en alcohol que contiene agua en una
10 cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante
15 fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

a. dicho derivado tiene una propiedad que comprende: propiedad antimicrobiana, o microbiostática, o
20 antitranspirante, o antifúngica, o propiedad como conservante de frutas o microbiostático, o propiedad que mejora la vida útil, o una combinación de las mismas; y

b. dichas fuerzas físicas incluyen adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

000083

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicha quitina activada o quitosano activado suspendidos en dicho alcohol a al menos uno de los siguientes pasos:

5 a. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla, y

10 i. agitar durante 2 horas o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura inferior a 30 °C -con mayor preferencia, a aproximadamente 25 °C- para obtener la Primera Composición en suspensión, y

15 ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Primera Composición;

 b. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, y agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

20 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

 ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un

000086

reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición;

c. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla a una proporción
5 de aproximadamente cinco o diez partes del peso del material en crudo tomado, y

i. agitar 2 horas o durante un periodo de tiempo suficiente para la reacción, manteniendo una temperatura
10 inferior a 30 °C -con mayor preferencia, de aproximadamente 25 °C- para obtener un derivado de ácido láctico u otro ácido en suspensión, aislar el derivado de ácido láctico/otro ácido, y

ii. someter el derivado aislado, después de la
15 filtración, a una reacción adicional al suspender el mismo en una mezcla agua:alcohol -preferentemente, una mezcla 20:80- y agregar anhídrido succínico tomado en peso de hasta diez partes el peso en seco de dicho derivado de ácido láctico/otro ácido para obtener una Tercera Composición en
20 suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Tercera Composición, que comprende un material granular grueso que es

000085

soluble en agua;

d. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a una proporción de 5 aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia 10 de aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a 15 aproximadamente 10% a 20% del peso en seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora, filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o 20 sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es soluble en agua;

e. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de

000086

alcohol, calentar manteniendo dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura
5 entre aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro
10 ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo -preferentemente durante 7 horas- agregar
15 además una enzima quitinolítica, preferentemente a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco del derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo -preferentemente durante 1 hora- permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

20 iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

f. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de

000087

alcohol, calentar la mezcla a una temperatura entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

5 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

10 ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a 15 período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo -preferentemente durante 1 hora- permitir que la suspensión se enfríe para 20 obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, calentar y

000088

mantener la temperatura en todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua en aproximadamente un volumen del 10% con respecto al volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo
5 suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante, manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período hasta que la
10 reacción esté completa,

iv. posteriormente, dejar que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una
15 Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y
20 secarse al aire;

g. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a aproximadamente

000089

60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco del quitosano activado o su derivado en forma de gotas
5 manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha
10 composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 generando soluciones ligeramente turbias o transparentes;

15 h. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar 750 ml de formaldehído en un período de pocos minutos, agregar
20 aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente

000090

a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

5 i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

10 i. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo
15 (H_3PO_3) disuelto en agua y agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo
20 necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de metanol al 90%, y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a

000091

temperatura ambiente durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar para recuperar la Novena Composición;

5 j. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a 70 °C, y

10 i. agregar anhídrido succínico (en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g) a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de
15 tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

 ii. agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado,
20 agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un

000092

período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

iii. recuperar y secar al aire la Quinta
5 Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición a pH alcalino, como una solución, en
10 donde

v. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada puede ser del 1% con respecto al agua,

vi. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada se toma en una cantidad pequeña,
15 aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver la Quinta Composición,

vii. mezclar durante pocos minutos, y

viii. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula
20 cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

4. Un derivado de quitosano producido al activar quitosano, o una quitina como precursor de quitosano, CARACTERIZADO porque comprende los pasos de: suspender dicho quitosano o dicha quitina en alcohol que contiene agua en una

000093

cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor
5 activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

5. Un derivado de quitosano de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dicho derivado tiene una propiedad que comprende: propiedad antimicrobiana,
10 microbiostática, antitranspirante, antifúngica o conservante de frutas, o una combinación de las mismas.

6. Un derivado de quitosano de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicha quitina activada o dicho quitosano
15 activado suspendidos en dicho alcohol a al menos uno de los siguientes pasos:

- a. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla, y
20 i. agitar durante 2 horas o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura inferior a 30 °C -con mayor preferencia a aproximadamente 25 °C- para obtener una Primera Composición en suspensión, y
ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o

000094

sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Primera Composición;

5 b. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

10 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

 ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición;

15 c. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla a una proporción de aproximadamente cinco o diez partes del peso del material en crudo tomado, y

20 i. agitar durante 2 horas o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura inferior a 30°C -con mayor preferencia a aproximadamente 25 °C- para obtener un derivado de ácido láctico u otro ácido en suspensión, aislar el derivado de

000095

ácido láctico/ otro ácido,

ii. someter el derivado aislado después de la filtración a una reacción adicional al suspender el mismo en una mezcla agua:alcohol -preferentemente una mezcla 20:80-
5 agregar anhídrido succínico tomado en peso hasta diez partes el peso en seco de dicho derivado de ácido láctico/otro ácido para obtener una Tercera Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un
10 reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Tercera Composición, que comprende un material granular grueso que es soluble en agua;

d. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C,
15 agregar anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una
20 temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia de aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una

000096

reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a
aproximadamente 10% a 20% del peso en seco del derivado
succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora,
filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta
5 Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o
sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un
reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta
Composición, que comprende un material granular grueso que es
10 soluble en agua;

e. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de
alcohol, calentar manteniendo dicha mezcla a aproximadamente
70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de
15 tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura
entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a
aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para
obtener un derivado succínico, someter dicho derivado
20 succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro
ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del
derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del
derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación
a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un

000097

período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco del derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo, 5 preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta 10 Composición;

f. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y, calentando la mezcla a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

15 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para 20 obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a

000098

aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar
5 agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe, para obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta
10 Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, calentar manteniendo la temperatura en todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua a un volumen de aproximadamente 10% respecto del volumen de alcohol, agitar
15 la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura a
20 aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período hasta que se complete la reacción,

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con

000099

metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y secar al aire;

g. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar dicha mezcla a aproximadamente 60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco del quitosano activado o su derivado en forma de gotas manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones

000100

ligeramente turbias a transparentes;

h. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar 750 ml de formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

i. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar

000101

aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un periodo de tiempo necesario para el mezclado efectivo, 5 manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un periodo de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de 10 metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un periodo de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar 15 para recuperar la Novena Composición;

j. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a 70 °C, y

20 i. agregar anhídrido succínico (en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g) a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un periodo de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a

000102

aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

ii. agregar ácido láctico u otro ácido a
5 aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima
10 quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

15 iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse
20 en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, en donde

v. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada puede ser del 1% con respecto al agua,

vi. dicha solución de sulfato de cobre o la

000103

molécula cargada se toma en una cantidad pequeña, aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver la Quinta Composición,

vii. mezclar durante pocos minutos, y

5 viii. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

7. Una composición que comprende al menos una de las composiciones de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 ó 6 como
10 ingrediente esencial o como portador de grupo funcional/molécula activa hasta su sitio de acción.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque comprende un polvo o una solución de al menos una de dichas composiciones en agua en una
15 concentración efectiva para una acción deseada que comprende:

a. conservación de, para y sobre frutas, vegetales, productos comestibles y alimentos,

b. retraso de maduración, retraso de añejamiento y retraso de senescencia de productos naturales, con inclusión
20 de frutas, vegetales y flores,

c. funcionamiento como portador para llevar una molécula activa o un grupo funcional a su sitio de acción.

9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADA porque comprende al menos una de las siguientes

000104

características:

a. dicha composición comprende al menos una entre dicha Primera Composición de acuerdo con la reivindicación a dicha Décima Composición o una mezcla de las mismas,

5 b. dicha concentración efectiva es de aproximadamente 0.1%,

c. dicho ácido acético es del 2%.

10 10. Una enzima quitinolítica CARACTERIZADA porque tiene acción proteolítica así como también quitinolítica, con un peso molecular de 50 kD sobre electroforesis SDS-PAGE.

11. Una enzima de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque tiene al menos una de las siguientes propiedades:

a. una actividad quitinolítica óptima a pH 2,

15 b. una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

12. Una enzima proteo-quitinolítica de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

20 13. Un proceso para preparar una enzima de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque comprende los pasos de:

a. cultivar *Aspergillus niger* MTCC o mutantes

000105

derivados el mismo bajo condiciones de agitación en matraz en medio de extracto de levadura y caseína,

b. recuperar la enzima proteo-quitinasa cruda mediante precipitación con sulfato de amonio.

5 14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO porque además comprende purificación de enzima cruda a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, por medio de los siguientes pasos:

10 a. disolver dicha enzima cruda concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio en tampón de fosfato a pH 7.0,

b. someter la misma a filtración en gel usando Sephadex® G-100,

c. recolectar las fracciones,

15 d. someter las fracciones a evaluación del contenido proteico y la actividad enzimática,

e. recolectar y reunir las fracciones correspondientes a un único pico de proteína.

20 15. Cultivo CARACTERIZADO porque es aislado de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

16. Un proceso que mejora la vida útil de las frutas CARACTERIZADO porque comprende un tratamiento de inmersión, aspersión, nebulización u otro proceso de aplicación o aplicaciones externas o internas a frutas trozadas o

000106

procesadas y productos naturales procesados de una composición que comprende una o más entre una composición de acuerdo con la reivindicaciones 4 ó 5 ó 6, como ingrediente esencial.

5 17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, CARACTERIZADO porque dicho tratamiento es para ralentizar la maduración y/o la putrefacción microbiana.

 18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, CARACTERIZADO porque dicha fruta es plátano, mango, manzana,
10 fresa, naranja, lima.

 19. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

 a. dicho alcohol es metanol o cualquier otro alcohol polar,

15 b. dicha agitación se realiza durante 30 minutos, preferentemente a 100 revoluciones por minuto.

 20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3e o 6e, CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica tiene acción proteolítica así como también acción quitinolítica y
20 comprende una enzima que tiene al menos una de las siguientes propiedades: un peso molecular de 50 kD (kD) sobre electroforesis SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

000107

21. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque comprende dicha enzima quitinolítica aislada de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

5 22. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3e ó 6e, CARACTERIZADO porque comprende dicha enzima de desacetilación aislada de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados del mismo.

10 23. Un proceso de acuerdo con la reivindicación, CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es xilán acil transferasa preparada a partir de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma, o cualquiera otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz de producir una enzima que tiene actividad de desacetilación.

15 24. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque una enzima quitinolítica termoestable que tiene actividad proteolítica así como también quitinolítica, la proteo-quitinasa, se usa para formar un derivado hidrolizado.

20 25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24, CARACTERIZADO porque dicha proteo-quitinasa se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, o cualquier otro hongo, o cualquier otro microorganismo capaz de producir actividad proteo-

000108

quitinolítica.

26. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 26,
CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica tiene un peso
molecular sobre SDS-PAGE de aproximadamente 50 kD, actividad
5 quitinolítica óptima a pH 2 y a 80 °C.

000109

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención comprende un proceso para producir un derivado de quitosano, y un producto preparado mediante el mismo, al activar quitosano o una quitina como precursor de quitosano
5 en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30% y preparar derivados mediante reacción con un reactivo para obtener derivados que tienen varios usos, con inclusión de uso como antimicrobicidas, microbiostáticos, antitranspirantes,
10 antifúngicos, o conservantes de frutas, o como portadores de moléculas activas o grupos funcionales etc., o una combinación de los mismos. Los derivados ilustrados incluyen derivados de ácidos, succínicos, desacetilados a nivel enzimático, hidrolizados a nivel enzimático, azúcar,
15 formaldehído, ácido fosfórico, ácido clorhídrico y sulfato de cobre que son obtenidos mediante reacción individual o en combinación con reacciones consecutivas. También se revela una clase novedosa de proteo-quitinasa termoestable preparada a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 que tiene un peso
20 molecular sobre SDS-PAGE de aproximadamente 50 kD y actividad hidrolítica óptima a pH 2 y 80 °C. También se revelan composiciones para tratamientos de productos naturales y métodos para retardar el añejamiento, mejorar la vida útil y retardar la putrefacción microbiológica de plátanos y otras

000110

frutas.

000111

TEXTO REIVINDICACIONES MODIFICADAS

CONSERVANTES DE DERIVADOS DE QUITINA

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a composiciones, proceso para
5 la producción de composiciones de quitina y quitosano que
actúan como controladores de la respiración, antimicrobiano,
microbiostáticos, removedores eficientes de microbios y
antioxidantes para mantener la frescura de frutas, vegetales,
flores cortadas, carne, pescado y otros productos
10 alimenticios procesados, y métodos/procesos para aplicar las
mismas así como los aplicadores para las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La quitina y el quitosano se han usado en el pasado
como conservantes post-cosecha de frutas y vegetales frescos.
15 El quitosano usado es aislado del caparazón del langostino,
el caparazón del cangrejo, la coraza de dafnias, las plumas
de calamar, o cualquier otro crustáceo, hongos y piel de
insecto, y es tratado para diversos grados de acetilación y
disuelto en ácido acético (1 a 2%).

20 El quitosano ha sido utilizado para mejorar la vida
útil de varias frutas y vegetales tales como cítricos
[*Magnetic Resonance Imaging* 22 (2004) 27 - 37], zanahoria
[*Food Control* 17 (2006) 336 - 41], lechuga y fresa [*Food*
Microbiology 21(2004)703-14], y lichi [*Postharvest Biology*

000112

and Technology 38 (2005) 128 - 36] en donde el quitosano usado tiene un tamaño de más de 43 kD (kilo Dalton) y es desacetilado al 93%. La propiedad antioxidante del quitosano ha sido estudiada en el salmón [*Food Chem* 101 (2007) 308-11] donde se usó quitosano de tres pesos moleculares diferentes. Una solución (1%) de quitosano de 30 kD mostró resultados equivalentes al antioxidante químico BHT, y superiores a los obtenidos usando quitosano de 90 kD y 120 kD de peso molecular. Se ha informado actividad conservante útil del quitosano obtenido del caparazón del langostino para varios alimentos tales como huevos, carne, salchicha, mariscos, tofu, jugos, mayonesa, kimchi, fideos, pastel de arroz, brotes de soja, jalea de almidón, etc. En el caso de la conservación de la leche, se ha descrito un quitosano de peso molecular que oscila entre 0.2 y 30 kD [*Korean J. Food Sci. Tech.* 32 (2000) 806 - 13]. En el caso del pan, se han usado con éxito tres pesos moleculares diferentes de quitosano: 2 kD [*J Chitin Chitosan* 7 (2002) 214 - 8], 120 kD [*Korean J Food Nutrition* 11 (2003) 309 - 15] y 493 kD [*J Chitin Chitosan* 7 (2002) 208 - 13] para extender su vida útil, sostener el peso, y retardar la degradación del almidón. La actividad antimicrobiana del quitosano contra varias bacterias, levaduras y hongos tales como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Clostridium*, *Enterococcus*,

000113

Escerechia, Lactobacillus, Leuconostoc, Listeria, Micrococcus, Pediococcus, Photobacterium, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Vibrio, Candida, Cryptococcus, Saccharomyces, Schizosaccaromyces,

5 *Zygosaccharomyces, Aspergillus, Botrytis, Cladosporium, Penicillium, Rhizopus, etc.,* ha sido informada y revisada [*J Food Sci* 72 (2007) R 87 - R100]. Salvo por los pocos ejemplos mencionados en forma específica, todos los métodos del arte previo han usado el quitosano de alto peso molecular obtenido

10 del caparazón del langostino con pesos moleculares y grado de desacetilación diversos e indefinidos.

La patente estadounidense No. 5.374.627 describe un método de control de las enfermedades y el daño producido por ciertas plagas en plantas agrícolas mediante composiciones

15 que contienen 1 parte en peso de un hidrolizado de quitosano con un peso molecular promedio de 10.000 a 50.000, obtenido mediante hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática de quitosano.

La solicitud de patente WO 03070008 revela compuestos

20 antimicrobianos y sus métodos de aplicación, en donde el producto de uso es un líquido obtenido al utilizar ácidos orgánicos de 3 a 30 carbonos, y el producto reivindicado es útil para la conservación solamente de los alimentos ácidos. En uno de los ejemplos se utiliza enzima quitosanasa para la

000114

degradación del quitosano.

Si bien en la bibliografía existente se conocen varias modificaciones químicas del quitosano, que generan la solubilización del quitosano a pH neutro a alcalino, las
5 aplicaciones de quitosano en los alimentos solamente están usando solución de quitosano en ácido orgánico; preferentemente, ácido acético. La solución obtenida de esta manera tiene un pH bajo (2.0 a 4.0) según la concentración del ácido usado. El ácido usado en dicha formulación añade
10 sabor al producto a ser tratado y/o afecta de manera adversa la vida útil. En el caso del plátano, se conoce que el ácido acético desarrolla manchas senescentes [decoloración negra de la cáscara] que son indeseables. Los ácidos usados en la formulación de quitosano son responsables del cuajo de la
15 leche y de los productos lácteos. La carga positiva neta desarrollada en la molécula de quitosano a causa del pH bajo es responsable de la separación de los componentes aniónicos del producto a ser tratado [tales como sales inorgánicas, ácidos grasos], que se adsorben en el quitosano de carga
20 positiva. Todas estas reacciones no son deseadas y se pueden evitar al preparar la formulación según se describe en la presente invención.

Una clase de quitosano soluble en agua como se describe en la bibliografía existente pertenece a los complejos de

000115

quitosano con respectivos ácidos orgánicos que se describen típicamente como "acetato de quitosano", "lactato de quitosano", etc. Estos son polvos secos de complejos de ácido y quitosano, derivados mediante el simple mezclado seguido de la extracción del ácido sin reaccionar y del secado. Dichos complejos son de pobre definición química, bastante inestables, y conservan los problemas asociados con un pH bajo, como sucede con la solución de quitosano.

Se conoce que los productos de quitina y quitosano de degradación parcial, como los quito-oligosacáridos, son solubles en agua. No obstante, estas moléculas tienen un grado diverso de actividades biológicas tales como control de la respiración, microbiostasis, características de recubrimiento, etc. Por lo general, son muy débiles para los niveles de actividad deseados en comparación con los productos desarrollados usando el(los) método(s) reivindicado(s) en la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención comprende un proceso para producir un derivado de quitosano, y un producto preparado mediante el mismo. Dicho proceso comprende activar quitosano o una quitina como precursor de quitosano al suspender dicho quitosano o dicha quitina en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el

000116

30%, agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante
5 fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Los derivados de quitina / quitosano revelados por esta invención así como el método para prepararlos generan derivados que tienen un rango de propiedades que comprenden, sin limitación: propiedades antimicrobianas,
10 microbiostáticas, antitranspirantes, antifúngicas, o conservantes de frutas, o una combinación de las mismas. Dichas fuerzas físicas incluyen adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

Se ilustran aproximadamente 10 formas de realización
15 del proceso y de los productos resultantes de esta invención que se describen como Primera a Décima Composición y procesos para preparar las mismas. Los productos de esta invención pueden ser derivados, además, para modificar o para agregar propiedades a cada uno de ellos con el objeto de cubrir un
20 alcance de aplicación diferente o más amplio.

Los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla y además agregar ácido láctico o cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido orgánico a dicha mezcla,

000117

agitando a una temperatura aproximadamente inferior a 30 °C -
más preferentemente, de aproximadamente 25 °C- generan la
formación de una Primera Composición en suspensión, que es un
derivado de ácido que se puede usar como tal o después del
5 secado o la derivación adicionales.

Los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua
a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una
mezcla y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C,
agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar y mantener
10 a una temperatura que oscila entre aproximadamente 60 y 70 °C
-con preferencia a aproximadamente 65 °C- generan la
formación de una Segunda Composición en suspensión.

Los pasos de preparar la Primera Composición y someter
la misma a succinilación forman la Tercera Composición de
15 esta invención. Por ende, los pasos de agregar quitosano a
alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de
alcohol para preparar una mezcla y agregar ácido láctico o
cualquier otro ácido inorgánico o cualquier otro ácido
orgánico a dicha mezcla a una proporción de aproximadamente
20 una quinta o décima parte del peso del material en crudo
tomado y agitar durante 2 horas o durante un período de
tiempo suficiente para que la reacción mantenga una
temperatura inferior a 30 °C (con mayor preferencia de
aproximadamente 25 °C), para obtener un derivado de ácido

000118

láctico u otro ácido en suspensión, aislar el derivado de ácido láctico/otro ácido, someter el derivado aislado - después de filtrarlo- a otra reacción al suspender el mismo en una mezcla de agua:alcohol, preferentemente una mezcla
5 20:80, y agregar anhídrido succínico tomado en peso hasta una décima parte del peso en seco de dicho derivado de ácido láctico/otro ácido, forman una Tercera Composición en suspensión que se puede aislar.

Los pasos de formar la Segunda Composición y formar su
10 derivado de ácido con un ácido -preferentemente un ácido láctico- generan la Cuarta Composición de esta invención. Por ende, los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C,
15 agregar anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia de
20 aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en suspensión, permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% a 20% del peso en seco del derivado

000119

succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora, filtrar y secar los sólidos, forman una Cuarta Composición en suspensión que se puede aislar.

Los pasos de preparar la Segunda Composición,
5 desacetilar la misma con enzima xilán acil transferasa o cualquier otra enzima de acetilación durante un período de tiempo -con preferencia de aproximadamente 6 a 7 horas- seguido de quitinolisis mediante una enzima quitinolítica o preferentemente una enzima proteolítica así como también una
10 enzima quitinolítica que además es preferentemente termoestable, y además es preferentemente producida a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 (depositado ante la Autoridad de Depósito Internacional, The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology,
15 Chandigarh, India) durante un período de tiempo -preferentemente durante aproximadamente una hora- forman la Quinta Composición en suspensión de esta invención, que puede ser recuperada. Por ende, los pasos de suspender el quitosano en una mezcla de agua:alcohol 20:80, mezclar la suspensión
20 bien mediante agitación preferentemente a 100 rpm durante un período suficiente para obtener buena activación -preferentemente durante 30 minutos- calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante 1 hora o durante un período de

000120

tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado
5 succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por cada 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000
10 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo -preferentemente durante 7 horas- agregar además una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco del derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo -preferentemente
15 durante 1 hora- y permitir que la suspensión se enfríe, forman una Quinta Composición en suspensión, que se puede recuperar y usar.

Los pasos de hacer reaccionar la Quinta Composición en alcohol con azúcar y luego con formaldehído forman la Sexta
20 Composición de esta invención. Por ende, agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla, calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante 1 hora o durante un período de

000121

tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado

5 succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I.,

10 agitar la mezcla durante un período de tiempo - preferentemente durante 7 horas- agregar además una enzima quitinolítica, preferentemente a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco de derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo - preferentemente durante 1

15 hora- y permitir que la suspensión se enfríe forman la Quinta Composición en suspensión. Los pasos de suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, calentar y mantener la temperatura durante todo el

20 proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua en un volumen de aproximadamente 10% respecto del volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o

000122

en un período de tiempo necesario para la adición gradual con
agitación constante manteniendo la temperatura a
aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o
durante un período hasta que se complete la reacción,
5 permitiendo posteriormente que la mezcla de reacción se
enfrie a temperatura ambiente, recuperar el producto, y lavar
los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso,
forman la Sexta Composición en suspensión que puede
recuperarse, lavarse con 100 ml del metanol al 90% y secarse
10 al aire.

El paso de hacer reaccionar quitosano en alcohol con
ácido de fósforo seguido de reacción con formaldehído forma
la Séptima Composición de esta invención. Por ende, los pasos
de suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20
15 volúmenes, mezclar bien mediante de agitación para alcanzar
la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm
durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a aproximadamente
60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y
agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar
20 formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco
del quitosano activado o su derivado a modo de gotas
manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C -
preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo
preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, y

000123

permitir que la suspensión se enfríe, forman la Séptima Composición en suspensión que puede ser recuperada. Dicha Séptima Composición puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10, formando soluciones ligeramente turbias a
5 transparentes.

El paso de hacer reaccionar quitosano en alcohol con formaldehído primero, y luego con ácido de fósforo o un ácido inorgánico, forma la Octava Composición de esta invención. Por ende, los pasos de suspender el quitosano en alcohol
10 preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano - preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar 750 ml de formaldehído en un período de unos pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido
15 inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante aproximadamente
20 seis horas o durante un período de tiempo necesario para completar la reacción, y permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición, forman la Octava Composición en suspensión que puede ser recuperada.

El paso de hacer reaccionar quitosano en alcohol con

000124

formaldehído primero, y luego con ácido fosfórico y luego con ácido clorhídrico, forma la Novena Composición de esta invención. Por ende, los pasos de suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien
5 mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas
10 a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez
15 finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como 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
20 período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, y lavar con 20 volúmenes de metanol al 90%, forman la Novena Composición que puede ser recuperada.

Los pasos de mezclar la Quinta Composición en solución

000125

con una molécula cargada en solución y co-precipitar la misma, preferentemente a pH alcalino, forman la Décima Composición de esta invención. Por ende, los pasos de agregar quitosano a alcohol, agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol para preparar una mezcla, calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C - con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para formar un derivado succínico, agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar la agitación durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, y permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida, recuperar y secar al aire la Quinta Composición, disolver la Quinta Composición para formar una

000126

solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición a pH alcalino, como una solución, agregar dicha solución de sulfato de cobre o la molécula
5 cargada que puede ser del 1% con respecto al agua en una cantidad pequeña -aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver la Quinta Composición- mezclar durante pocos minutos, y agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula
10 cargada, forman un derivado de la Décima Composición.

Esta invención también incluye una composición que comprende al menos una de las composiciones desde la Primera hasta la Décima Composición y derivados de las mismas que se usan como ingrediente esencial. Las composiciones se pueden
15 formar en ácido orgánico diluido -usualmente ácido acético- o en agua. Dicha composición puede ser una composición para conservar frutas, vegetales, productos comestibles y alimentos, retrasar la maduración, retrasar el añejamiento y retrasar la senescencia de productos naturales con inclusión
20 de frutas, vegetales y flores, o que funciona como portador para llevar una molécula activa o un grupo funcional a su sitio de acción. Dicha composición puede tener una concentración efectiva de aproximadamente 0.1 %, y dicho ácido acético se puede encontrar al 2%, cuando se usa.

000127

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

Esta invención también comprende un proceso para mejorar la vida útil de frutas, carne, pescado, flores, vegetales, en donde dicho proceso comprende un tratamiento de inmersión, aspersión, nebulización u otro proceso de aplicación externa así como también la adición en el producto

000128

alimenticio de una composición que comprende una o más entre la Primera Composición y la Décima Composición. Dicho proceso también puede ser un proceso para ralentizar la maduración y/o putrefacción microbiana. Dicho proceso se puede aplicar a
5 productos naturales que pueden incluir, sin limitación: plátanos, mangos, manzanas, fresas, naranjas, limas y similares, y las aplicaciones pueden incluir aplicación externa por recubrimiento o una "aplicación interna" a frutas en trozos o procesadas o productos naturales en trozos o
10 procesados.

La enzima de desacetilación, la xilán acil transferasa, de esta invención se aisló de *Bacillus* sp MTCC 5571. No obstante, cualquier otra enzima de desacetilación a otros microbios puede brindar los mismos resultados.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Esta invención abarca composiciones novedosas de quitina/quitosano para tratamiento como antirrespiratorio, antimicrobiano y antioxidante para mantener la frescura de los productos naturales; procesos para la producción de
20 dichas composiciones novedosas; métodos/procesos novedosos para dicho tratamiento para dichos productos naturales con el objeto de reforzar o mejorar su vida útil o estabilidad bajo almacenamiento. Esta invención además comprende una enzima microbiana proteolítica termoestable novedosa que tiene

000129

acción como quitinasa incluso en presencia de solvente orgánico y su uso para desarrollar las composiciones de quitosano novedosas de esta invención. Esta invención también comprende el uso de enzima para la desacetilación del
5 quitosano.

La invención también comprende métodos/procesos para mantener la frescura de los productos naturales por más tiempo. La invención además comprende métodos/procesos de aplicación de dichas composiciones y equipo útil con el fin
10 de aplicar dichas composiciones a los productos naturales que incluyen, sin limitación: frutas, vegetales, carne, pescado y otros productos alimenticios. Una lista ilustrativa de los productos naturales cubiertos por el alcance de esta invención incluye productos alimenticios y productos vivos o
15 no vivos naturales no alimenticios, y además incluye, sin limitación: frutas, vegetales, carne, pescado, flores cortadas, leche y productos alimenticios en general.

Debido a las moléculas polidispersas de la quitina y el quitosano -con posibilidades ampliamente diversas de
20 desacetilación, sustituciones, sitios de hidrólisis, composición del hidrolizado etc.- sus propiedades antimicrobianas, antimadurativas, conservantes, de solubilidad, de capacidad como moléculas portadoras etc., diferirán de acuerdo con la composición final de la quitina o

000130

quitosano tratados. La eficacia y el alcance del cambio en la molécula de quitina o quitosano generado por un determinado tratamiento dependerá también, en gran medida, del grado al cual se expongan los sitios vulnerables a un cambio químico o físico (adsorción), lo que diferirá según el tratamiento dado para la "activación" de la molécula de quitina o quitosano antes de que se inicie cualquier tratamiento para su derivación. Como el efecto de cualquier tratamiento de sustitución o modificación dependerá de la composición del grupo funcional de la quitina o el quitosano como materia prima; por ejemplo, la hidrólisis enzimática de la quitina o el quitosano activados o sin tratar formará una composición diferente de hidrolizado enzimático de aquella donde la molécula de quitina o quitosano ya está modificada por una sustitución y el grado al cual se modificó mediante sustitución, ya que las enzimas son vulnerables a los cambios en el entorno de sus sitios activos. Las propiedades de una quitina o quitosano con respecto a las propiedades antimicrobianas, conservantes y fisiológicas, etc., afectadas por un proceso, dependen del tratamiento dado a los mismos, la distribución del peso molecular del producto, la combinación de los grupos funcionales que portan y el grado de distribución general, lo que presenta innumerables posibilidades de propiedades de los productos y productos

000131

propiamente dichos, lo que rara vez puede ser predicho, a menos que se averigüe en forma experimental. La tarea por alcanzar el objetivo de una mejora mediante experimentación de rutina es desalentadora, ya que las permutaciones y combinaciones necesarias a ser llevadas a cabo son infinitas, y es quizás una razón por la cual el alcance total de esta explicación todavía no ha sido cubierto.

Si bien es habitual activar quitina o quitosano mediante un tratamiento con un ácido, se encontró sorprendentemente en esta invención que la quitina/el quitosano se activan a los efectos de preparar un derivado simplemente al calentar su suspensión en alcohol con un contenido de agua que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, según lo requerido, y agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano (quitina) se active, y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Una composición de quitosano/quitina preparada de esta manera - mediante tratamiento y derivación adicionales- ofrece una serie de portadores que se pueden unir mediante enlaces físicos o químicos con grupos funcionales/moléculas activas para mejorar su eficacia.

000132

Los derivados de quitosano, cuando están completamente sustituidos, no muestran actividad antimicrobiana. El quitosano de alto peso molecular tiene solubilidad deficiente. El quitosano de bajo peso molecular no sustituido muestra tanto propiedad antimicrobiana como solubilidad. En consecuencia, por lo general se cree que el quitosano de bajo peso molecular es más útil como conservante. No obstante, las composiciones de quitosano de bajo peso molecular no tienen una buena propiedad de recubrimiento cuando se aplican a frutas frescas y objetos similares por su acción conservante. Es un hallazgo sorprendente de esta invención que incluso el quitosano de alto peso molecular, cuando se deriva tal como se revela en esta invención, es un conservante efectivo y, además de su propiedad antimicrobiana, también protege las frutas del etileno y la pérdida de agua debido a su mejor propiedad de recubrimiento. Sin supeditarse al aspecto teórico, una interpretación actual de esta invención es que las propiedades antimicrobianas, conservantes y fisiológicas afectadas por el proceso son óptimas solamente en cierto rango de distribución de peso molecular según se combinan adicionalmente con el perfil de solubilidad y los grupos funcionales o moléculas activas portados por los derivados de quitosano. Los métodos/procesos de producción del derivado de quitina de esta invención tienen como objetivo alcanzar este

000133

equilibrio estrecho e intrincado.

En toda esta memoria descriptiva, si no se ha mencionado por separado, a menos que se establezca lo contrario, en cualquier contexto de un tratamiento de derivación, el quitosano es un producto que está del 50 al 70% desacetilado y en concordancia con un tamaño de malla de 60 a 100, si bien se pueden usar otros grados de desacetilación y/o tamaño de malla dentro de los límites razonables para obtener los mismos resultados. El quitosano es siempre activado, antes de brindar dicho tratamiento, al suspender dicho quitosano o dicha quitina en alcohol absoluto o con agua agregada que puede ser de hasta aproximadamente 30% o menos, agitar durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar un derivado al formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado. Como el método/proceso de activación de esta invención no se usó nunca en el arte previo, presenta una plataforma enteramente nueva para cualquier derivado de quitosano con inclusión de derivado de ácido, derivado de succinilo, así como también hidrolizados enzimáticos derivados de quitosano activado por el método/proceso de esta invención.

000134

Cualquier referencia al "precursor de quitosano" en esta memoria descriptiva incluye quitina y cualquiera de sus transformaciones tales como partículas, gránulos, etc.

Siempre que se mencione el término "alcohol" en esta
5 memoria descriptiva -a menos que el contexto establezca lo contrario- el alcohol preferente es un alcohol polar en el cual la quitina o el quitosano, o sus derivados, según se prepararon en el curso del proceso de esta invención, son insolubles. El alcohol más preferente es metanol, si bien se
10 pueden utilizar otros alcoholes dentro de las limitaciones anteriormente dadas.

Siempre que se use ácido láctico, si bien es el ácido más preferente a ser usado para estas reacciones, se puede usar cualquier ácido, ya sea orgánico o inorgánico, aunque se
15 prefiere el ácido orgánico, y el ácido láctico es aún más preferente.

La solubilidad de las composiciones en esta memoria descriptiva se chequeó al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en el transcurso de 5
20 minutos. La mezcla se agitó en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más, y luego la solubilidad se chequeó visualmente. En una de las formas de realización, que generó la Primera Composición de esta invención, se disolvió quitina/quitosano en ácido y la solución resultante mostró

000135

actividad antimicrobiana. La cantidad de ácido usado en relación con quitina/quitosano así como también la elección del ácido son cruciales para exhibir la actividad. El ácido útil para este fin puede ser cualquier ácido orgánico, si bien el ácido láctico es preferente. En forma similar, en lugar del ácido láctico, la opción menos preferida podría ser cualquier ácido inorgánico. Sin supeditarse a este entendimiento, el funcionamiento particularmente bueno del ácido láctico para estos procesos se podría deber quizás a la solubilidad limitada del quitosano en ácido láctico a menos de una parte de ácido láctico por parte de quitosano que forma un fluido que tiene cierta viscosidad y no es una solución completamente acuosa, dando al derivado una combinación óptima de carga sobre la partícula y el grupo funcional de tal manera que se alcance suficiente solubilidad sin perder sus propiedades antimicrobianas. En forma sorprendente, se encontró que, bajo las condiciones de reacción de esta invención, en donde se disuelve quitina/quitosano en ácido a aproximadamente 10% en peso de quitina/quitosano, no hubo solubilidad del derivado de ácido (la Primera Composición) en agua, y cuando se incrementó la proporción del ácido láctico, la Primera Composición fue soluble en agua, pero hubo una alta cantidad de formación de grumos que hicieron que el producto fuera difícil de usar, y

000136

tampoco tuvo actividad antimicrobiana. También fue un hallazgo importante el hecho de que, por el contrario, usar una proporción de ácido láctico inferior al 10% en peso de quitina/quitosano generó un producto soluble en agua que
5 tenía actividad antimicrobiana. Como el ácido láctico en menos de 0.5 ml brindó una disolución completa sin formación de grumos durante la reacción, conformó la forma de realización preferida para uso para trabajo adicional. Principios similares funcionarían para otros ácidos, y la
10 cantidad real del ácido usado dependerá de las propiedades del ácido.

En otra forma de realización de esta invención, que abarca la Segunda Composición, el quitosano activado fue tratado con anhídrido succínico para obtener un derivado
15 succínico. El anhídrido succínico se agrega en diferentes proporciones manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C, preferentemente a 65 °C. Cuando la mezcla de agua y alcohol usada para la activación se encontraba a una relación de 20:80, el derivado succínico resultante fue
20 soluble en agua solamente cuando se agregó más de 0.5 g de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción. No obstante, se encontró sorprendentemente que al cambiar la relación de los solventes usados a 10 ml de agua respecto de 90 ml de metanol, fue posible obtener un producto soluble en

000137

agua al usar anhídrido de succinilo a una cantidad menor a 0.5 g hasta 0.05 g. Con fines prácticos, se encuentra que la cantidad de 0.1 g es preferible. Esta observación además sustenta el hallazgo de que el tratamiento de activación es
5 muy crítico para determinar las propiedades de los productos y el método/proceso de activación novedoso de esta invención conducirá a productos con propiedades distintas de las de los productos del arte previo del mismo reactivo si la activación de quitina o quitosano se realizara mediante un
10 método/proceso sustancialmente diferente.

Otra forma de realización de esta invención comprende la Tercera Composición en donde, en un primer paso, la Primera Composición se prepara usando un ácido - preferentemente, ácido láctico- a una proporción del 10 al
15 20% del peso en seco del quitosano o la quitina activados y dicha Primera Composición se toma como un material de inicio y se hace reaccionar con anhídrido succínico agregado a una proporción de aproximadamente 10% del peso en seco de la Primera Composición tomada. Esta composición es un material
20 granular grueso, soluble en agua.

Otra forma de realización más de esta invención comprende la Cuarta Composición, en donde un derivado succínico de quitosano activado de la Segunda Composición se prepara usando anhídrido succínico a aproximadamente 10% del

000138

peso en seco de quitosano activado y, una vez finalizada la reacción, se agrega un ácido -preferentemente, ácido láctico- del 10 al 20% del peso en seco de quitosano. No se produce formación de grumos. El polvo seco es completamente soluble
5 en agua dentro de los 5 minutos bajo las condiciones de ensayo descritas.

En otra forma de realización de esta invención, se encontró que una clase de enzimas homogéneas a nivel electroforético, aisladas de microorganismos, tienen
10 actividad proteolítica así como también actividad como quitinasas, las cuales se pueden designar como proteo-quitinasas. En una forma de realización de esta invención, dichas proteo-quitinasas y enzimas capaces de la desacetilación del quitosano se usan para hidrolizar
15 quitina/quitosano, en un proceso para formar los productos de esta invención. Si bien las proteo-quitinasas y desacetilasas de esta invención se aíslan de microbios, esta clase de enzimas, derivadas de cualquier fuente, realizarán la misma función de hidrólisis de la quitina o el quitosano, y esta
20 invención se extiende a su uso también a los efectos de la hidrólisis de la quitina/el quitosano y además para desarrollar los productos de esta invención.

Se recolectaron muestras de suelo, en Pune, India, y alrededores, de varios recursos naturales ricos en materia

000139

orgánica, y se enriquecieron con el substrato deseado, con inclusión de caseína, quitosano, trigo lavado, celulosa. El enriquecimiento continuó durante 3 semanas, y las muestras se vetearon en medio sólido que contenía el substrato usado para enriquecimiento como única fuente de carbono. Las colonias aisladas en general mostraron una zona de aclaramiento que indicaba la fuerte producción de la respectiva enzima degradante. Se aislaron aproximadamente 700 cultivos para varios hongos y bacterias. Para descubrir cultivos que tenían la actividad deseada, se cultivaron mediante un método de agitación en matraz. Se concentró el filtrado de cultivo microbiano crudo mediante precipitación con sulfato de amonio. Las fracciones de proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante. Las fracciones de proteínas se separaron sobre estos geles como bandas independientes homogéneas. Se seleccionó un cultivo de *Aspergillus niger* MTCC 5572 como cultivo promisorio.

La banda homogénea a nivel electroforético aislada del filtrado de cultivo de *Aspergillus niger* MTCC (depositado en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) mostró una enzima con actividad de proteinasa así como también actividad de quitinasa (una enzima proteo-quitinasa) que es novedosa, con un peso molecular de 50 kD según lo determinado por los

000140

marcadores de peso molecular en SDS-PAGE, y actividad enzimática óptima a pH 2 y 80 °C. Si bien esta banda se usó para hidrolizar a nivel enzimático la Segunda Composición de quitosano/quitina desacetilados para desarrollar el producto
5 de esta invención, cualquier otra proteo-quitinasa puede formar hidrolizado con propiedades muy similares.

En otra forma de realización de esta invención, se obtiene hidrolizado de quitina/quitosano usando enzimas purificadas, o formas crudas de enzimas, o formas activas de
10 extractos celulares microbianos. Dicho hidrolizado muestra actividad antimicrobiana mejorada hasta cierto límite de disminución en el peso molecular promedio, y dentro del rango específico de grado de sustitución del grupo amino libre ya sea por grupo acetilo o cualquier otro grupo aniónico. En
15 otra forma de realización de la invención, los derivados hidrolizados a nivel enzimático de quitosano muestran mejor actividad antimicrobiana que el producto derivado solamente en forma química. El hidrolizado modificado de manera adicional -es decir, desacetilado usando xilán acil
20 transferasa- muestra una mejora adicional en la propiedad antimicrobiana y antioxidante, y también actúa como un agente anti-respiración. Los hidrolizados químicamente derivados que tienen un peso molecular en un menor rango de 8 a 100 kD son más efectivos que los hidrolizados de mayor y/o menor peso

molecular. No obstante, en forma sorprendente, después de la desacetilación enzimática, hasta los derivados de alto peso molecular muestran actividad antimicrobiana equivalente a la de los productos de 8 a 100 kD derivados por el proceso químico. El método/proceso preferido para obtener xilán acil transferasa en esta invención es a partir de microorganismos. Se puede predecir que estas enzimas -aisladas como extracto crudo o purificado de cualquier otra fuente- tienen las mismas propiedades de desacetilación y forman los mismos productos que los preparados en las formas de realización preferentes de esta invención a partir de microorganismos. Esta forma de realización de esta invención, que incluye hidrolizados enzimáticos, comprende la Quinta Composición que es útil como conservante post-cosecha. Dicha Quinta Composición se obtuvo primero al preparar un derivado succínico de la Segunda Composición a la cual se agregó anhídrido succínico; el derivado es desacetilado por una enzima en presencia de un ácido -preferentemente, un ácido láctico- que se agrega a aproximadamente 10% en peso del peso en seco de la Segunda Composición succinilada durante un período de tiempo suficiente para alcanzar la desacetilación limitada, preferentemente durante un período de 7 horas, y luego se somete a un tratamiento de aproximadamente una hora de enzima quitinolítica. El polvo de la Quinta Composición es

000142

soluble en agua cuando se agrega más de 0.5 g de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción y despliega actividad antimicrobiana. La Quinta composición mostró tres a cuatro veces menor consumo por kg de plátanos y tomates que la solución de quitosano en ácido acético, mostró mayor actividad antimicrobiana así como también microbiostática en comparación con la solución de quitosano en ácido acético y la Primera, Segunda y Cuarta Composiciones. La Quinta Composición también sirvió para mejorar la vida útil de las frutas. Se trataron plátanos verdes cosechados en forma reciente (<30 horas de la cosecha) usando una solución al 0.1% de la Quinta Composición. El tratamiento también se puede suministrar mediante la inmersión de los plátanos en dicha solución durante 10 a 15 segundos, o mediante aspersión directa de la solución sobre los plátanos con un dispositivo adecuado a fin de humedecer la superficie de los plátanos, o al atravesar los plátanos por una cámara cerrada saturada con la bruma de dicha solución (nebulización indirecta). Los plátanos tratados se secan al aire. Estos plátanos se almacenan a temperatura ambiente (entre 20 y 32 °C) y a una humedad relativa de 40 a 60%. En los experimentos, los plátanos tratados mantuvieron su color verde y su peso, mientras que los plátanos no tratados perdieron peso y desarrollaron decoloración. Los plátanos tratados mostraron

000143

mejor condición fisiológica según se evaluaron a nivel químico mediante la determinación de su contenido total de sólidos (contenido BRIX), azúcares reductores, y pérdida de peso al menos hasta 12 días después de la inmersión (ver la Fig. 1). En otra forma de realización de la invención, además del almacenamiento durante 8 a 15 días, cuando maduran por la aplicación de etileno, los plátanos tratados maduraron normalmente, mientras que los plátanos de control no tratados se endurecieron y no maduraron o bien se oscurecieron y ablandaron, y no permanecieron aptos para consumo humano.

Se trataron tomates enteros y manzanas trozadas con el producto del ejemplo 10, exactamente como se describió en el ejemplo 14 para los plátanos. Los tomates tratados retuvieron su peso, textura y frescura durante 30 días a diferencia de los tomates de control no tratados, que se arrugaron en un lapso de 12 a 15 días, lo que provocó la pérdida de su peso. Se monitorearon los cambios fisiológicos en los tomates tratados y en los de control al séptimo día de almacenamiento usando técnica de barrido por IRM. La piel carnosa de los tomates tratados era más uniforme en su densidad de color. La piel carnosa de los tomates de control no tratados tenía parches oscuros que indicaban sequedad superior y falta de uniformidad. El barrido por IRM de los tomates representativos se incluye en la Figura 2

000144

La Quinta Composición es efectiva también para aplicación "interna"; es decir, para la aplicación a los fines de la conservación y para la mejora de la vida útil o para el tratamiento antimicrobiano o tratamiento microbiostático en partes "internas" de frutas o productos naturales tales como frutas trozadas, frutas procesadas, productos vegetales procesados y similares. Las manzanas trozadas se envasaron en bolsas de polietileno o recipientes de plástico transparentes y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4 a 9 °C. Las manzanas trozadas de control comenzaron a tornarse marrones a partir del día 2 y se ablandaron hacia el día 3, mientras que las manzanas trozadas tratadas retuvieron su color, sabor y textura dura durante 6 días. La fotografía (Figura 3) ilustra la diferencia en la apariencia entre las manzanas en trozos tratadas y las no tratadas en el día 4.

Los trozos de manzana tratados y no tratados se envasaron en recipientes de plástico transparentes y se almacenaron tal como se describió con anterioridad durante un periodo de hasta 25 días. Los trozos de manzana no tratados desarrollaron crecimiento de hongos [parches negros en la fotografía de la Figura 4], mientras que las manzanas en trozos tratadas no desarrollaron ningún crecimiento de hongos ni de microbios. Los resultados se exhiben en la fotografía.

000145

En otra forma de realización de esta invención, la Quinta Composición sirve como portador para grupos funcionales o moléculas para mejorar la eficacia en menores concentraciones y/o portador para su dirección al sitio
5 activo. Las ilustraciones de esta forma de realización son provistas por la Sexta y la Décima Composiciones.

Siguiendo el mismo principio, son posibles varias formas de realización más para la Quinta Composición como portador al variar los grupos funcionales o moléculas activas
10 que son portados por la Quinta Composición mediante enlace físico o enlace químico.

La Sexta Composición comprende un derivado de azúcar-succinato de quitosano que muestra solubilidad variable en agua y también muestra una propiedad antimicrobiana variante.
15 El azúcar puede ser azúcar de caña o cualquier otro azúcar. El método/proceso de esta invención para preparar la Sexta Composición comprende formar un derivado de azúcar de la Quinta Composición, que se sometió a reacción adicional con formaldehído durante un período de tiempo diverso -usualmente
20 de una a seis horas- para obtener dicha Sexta Composición que tuvo excelente solubilidad en agua y actividad antimicrobiana y fue mejor que la Quinta Composición cuando la solución de azúcar usada para la derivación comprendió 0.4 g por cada 100 g en peso en seco de succinato de quitosano o menos. Fue

000146

sorprendente observar que, si se utilizaba azúcar a un mayor nivel, el derivado de azúcar-succinato de quitosano ya no era soluble en agua. Esto sustenta en forma adicional el concepto de que, para que los derivados de quitosano sean útiles las
5 para aplicaciones, debería tenerse especial control sobre el grado de sustitución y los grupos funcionales a ser usados para la sustitución. Todos los productos solubles en agua de la Sexta Composición tuvieron diverso grado de actividad antimicrobiana a varias concentraciones, que fue
10 consistentemente mejor que la actividad antimicrobiana de la Quinta Composición como material de inicio. Cuando el azúcar que se usó en el método/proceso anteriormente mencionado era glucosa o lactosa tomada a una proporción de 0.4 g por 100 g de succinato de quitosano, y el período de reacción con
15 formaldehído era de aproximadamente 3 horas, los productos de estas reacciones fueron solubles en agua y mostraron una actividad antimicrobiana del 100% contra *E coli* mediante el método/proceso descrito en el Ejemplo 11.

En otra forma de realización de esta invención, la
20 quitina o el quitosano incluyen derivados preparados a partir de un ácido inorgánico. Esto se ejemplifica mediante la Séptima Composición, donde se usa ácido de fósforo para formar un derivado, que comprende suspender el quitosano en alcohol (aproximadamente 99%), mezclar bien la suspensión

000147

agitando a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua -a un volumen que es aproximadamente cuatro veces mayor al peso del quitosano-
5 en gotas a esta mezcla, junto con agitación durante aproximadamente 1 hora, agregar además 5 ml de formaldehído en gotas y, una vez completa la adición, mantener la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 2 a 6 horas. En lugar de formaldehído, se puede usar
10 cualquier otro aldehído. Las condiciones de temperatura, agitación, etc., pueden variar para obtener un producto final con un nivel deseado de actividad antimicrobiana. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada
15 (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más y luego se chequea la solubilidad visualmente. La solubilidad también se chequea a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris. Los productos formados usando quitosano y ácido
20 de fósforo en una relación de 1:1 y 1:2 mostraron solubilidad a un amplio rango de pH (7 a 10), formando soluciones ligeramente turbias a transparentes. Si bien las composiciones antimicrobianas de quitina/quitosano o sus derivados en el arte previo tienen un pH tendiente a ser

ácido, y el precipitado tiene un pH próximo a 7 o dentro del rango alcalino, la Séptima Composición es soluble a un pH alcalino de 7 a 10. Estas soluciones mostraron diverso grado de actividad antimicrobiana. Los productos de hasta 0.01% mostraron cierta actividad antimicrobiana mientras que los productos por encima de esta concentración mostraron inhibición microbiana total. Es claro que la Séptima Composición -que es soluble y también presenta actividad microbicida total a concentraciones razonablemente bajas y a un pH de 7 hasta 10- provee un alcance nuevo para su uso como conservante y antimicrobiano.

Otra forma de realización de esta invención comprende la Octava Composición y la Novena Composición. El método/proceso de su preparación comprende hacer reaccionar quitosano suspendido en alcohol al 99% como mínimo, mezclar bien la suspensión agitando durante un período de tiempo suficiente para obtener humedecimiento eficiente y activación con alcohol -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar y mantener la temperatura de la mezcla a alrededor de 60 °C, agregar formaldehído a una proporción de aproximadamente 5% del volumen del alcohol tomado, agregar a gotas a una solución al 10% de ácido de fósforo (H_3PO_3) en agua -donde el peso del ácido fosfórico es de aproximadamente el 5% del volumen del alcohol tomado- y agitar adicionalmente

000149

durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas una vez completa la adición. Se deja enfriar la suspensión y se la filtra; los sólidos se recuperan y se secan. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. La solubilidad se chequea también a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris. El producto se disolvió en agua, pero se precipitó cuando el pH se elevó a 7.0.

La Novena Composición se obtuvo al someter el producto de la Octava Composición a tratamiento con HCl. Si bien aquí se usó HCl, se puede reemplazar 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 formar la Novena Composición en suspensión en la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El polvo se separó por filtración, se lavó con 20 volúmenes de metanol al 90% tres veces, y se secó tal como se describió con anterioridad. El producto resultante fue soluble a un pH de 3 a 12. Esta solubilidad a un amplio rango expande

000150

adicionalmente el alcance de la aplicación de este producto. Es pertinente notar aquí que el tratamiento con ácido fosfórico es crítico para preparar el producto en cuanto a la solubilidad a un amplio rango de pH. Esto fue comprobado por
5 el hecho de que otras composiciones, particularmente la Quinta Composición y la Séptima Composición -cuando se trataron con HCl tal como se describió en este ejemplo- no alteraron su perfil de pH en relación con la solubilidad en el rango de pH 3 a 12.

10 La Décima Composición es una forma de realización ilustrativa más de la Quinta Composición que actúa como portador para una molécula activa. En este caso, la molécula activa es sulfato de cobre y presumiblemente el mecanismo de formación de complejos ocurre mediante adsorción. El
15 método/proceso para preparar la Décima Composición comprende formar una solución al 1% de la Quinta Composición en agua, agregar aproximadamente 10% de su volumen de una solución (1%) de sulfato de cobre, mezclar las dos soluciones durante cierto tiempo, agregar amoníaco líquido a una proporción de
20 una parte a cien partes de agua tomada, generando la precipitación de quitosano con el sulfato de cobre unido. El sulfato de cobre es libremente soluble en amoníaco líquido y la solución resultante es de color azul profundo. La estimación del cobre se realiza mediante colorimetría, y

000151

usando un gráfico estándar de 0.02 - 0.1%. A partir de esto, se estimó que el cobre unido al quitosano era del 90%. Éste es un ejemplo del posible uso del derivado como portador para todas las moléculas cargadas.

5 Sin supeditarse a ninguna teoría, es nuestro entendimiento que el quitosano tiene carga positiva, y que cualquier ácido -ya sea orgánico o inorgánico- formará un enlace coordinado con el grupo amino en el quitosano. Estos complejos han sido denominados como las respectivas sales de
10 quitosano, por ejemplo: clorhidrato de quitosano, acetato de quitosano etc. Estas sales se disuelven en agua, y el pH de la solución por lo general es ácido. Además, las sales no poseen actividad antimicrobiana. Cuando tratamos de incrementar el pH de estas soluciones mediante la adición de
15 cualquier álcali -típicamente NaOH- el quitosano se precipita antes de que el pH se torne neutro. Esto es porque la sal no es estable a dicho pH. En nuestros procesos, tenemos dos tipos de modificaciones que son únicas:

(1) Reacción de quitosano llevada a cabo en alcohol,
20 con 0 - 30% de agua, lo que brinda hidratación limitada y, por ende, es importante para alcanzar la sustitución controlada/limitada de los grupos laterales.

(2) Reacción mediada por formaldehído y reacción mediada por anhídrido. Ambos productos de reacción por lo

000152

general son estables a pH alcalino. Ahora la solubilidad del producto a pH alcalino es una función de cargas netas sobre la molécula, que se pueden agregar en cualquiera de dichas 2 reacciones, o mediante simple interacción iónica (formación de sal) con cualquier ácido. Típicamente, se prefieren los ácidos inorgánicos ya que las sales son más estables.

(3) Los derivados de quitosano solubles desarrollados mediante los varios métodos/procesos descritos en la presente tienen sustitución parcial y retienen cargas tanto positivas como negativas. Por ende, diferentes moléculas cargadas se unen a la molécula de quitosano, lo que la torna útil como molécula portadora para grupos activos, tales como grupos antimicrobianos, o cualquier otro grupo activo que tenga cierto propósito funcional. El resultado es que la eficacia de un grupo funcional que se une a dicha molécula mejora a una concentración muy pequeña. En la presente, se ha observado que las composiciones de quitosano solubles en agua preparadas mediante los métodos/procesos de la invención son efectivas como portadores de N-acetilcisteína y residuos de sulfato de cobre, esto último ha sido demostrado en el ejemplo 19. Se espera que ocurra el mismo rendimiento para cualquier grupo funcional cuyo residuo pueda ser tan efectivo que cuando se encuentra en estado no unido, no portado por la molécula de quitosano soluble en agua. La molécula de

000153

quitosano soluble en agua aquí es preparada mediante los métodos/procesos de esta invención. No obstante, la molécula de quitosano soluble en agua preparada por cualquier otro método/proceso existente o inventivo será equivalente a esta
5 molécula a los efectos de su aplicación como molécula portadora y será considerada parte del alcance de esta invención a menos que exista una razón por la cual no pueda portar otro activo.

Otra forma de realización más de esta invención revela
10 un método/proceso para reforzar la estabilidad bajo almacenamiento de productos naturales mediante tratamiento con derivados de quitina. Una forma de realización de este aspecto de la invención revela un método/proceso para reforzar la estabilidad bajo almacenamiento de productos
15 naturales mediante tratamiento con derivados de quitina que retardan las actividades relacionadas con la vida del producto que son responsables de reducir la estabilidad bajo almacenamiento o generar el añejamiento al ralentizar o arrestar dichas actividades. La lista ilustrativa de dichas
20 actividades relacionadas con la vida del producto incluyen, sin limitación: respiración, oxidación, formación de etileno, transpiración, así como también arresto del añejamiento de las frutas frescas, vegetales, carne, pescado, preparaciones de alimentos procesados y no procesados, y similares. Una

000154

persona medianamente versada en el arte podrá extender esta lista a muchas otras actividades que reducen la estabilidad en almacenamiento. Para alcanzar este objetivo, los productos naturales se pueden recubrir con las composiciones de esta
5 invención mediante los métodos que son ampliamente conocidos para la persona versada en el arte. Dicho recubrimiento puede ser total o parcial, y puede obtenerse mediante el uso de un método/proceso de aplicación. Dicho método de aplicación incluye, sin limitaciones: aspersión, inmersión, micro-
10 aspersión o uso de nano-partículas, nebulización indirecta, y similares. En el caso de alimentos procesados tales como pan, fideos, etc., dicha formulación se puede agregar al bollo y/o aplicarse a la superficie del alimento procesado mediante uno de los varios métodos de la lista anterior.

15 Cuando se almacenan plátanos durante un largo período de tiempo, la corona del racimo comienza a secarse. El tallo que une el cabo del plátano a la corona se llama "pedicelo". Éste comienza a marchitarse. El marchitamiento del pedicelo es el mejor indicador de que se está secando. Menor
20 marchitamiento indica conservación de la frescura. Se realizó un ensayo sobre 1000 kg de plátanos, cada uno mediante el método estándar (control) de inmersión en 0.1% de nuestro producto y aspersión de nuestro producto. Esto se repitió en 2 tandas (un total de 6000 kg de plátanos). Un porcentaje muy

000155

bajo de marchitamiento del pedicelo mediante inmersión así como también aspersión de la composición de ensayo muestra su eficacia satisfactoria para retrasar el secado y, por último, para retrasar el añejamiento y la senescencia y mejorar la capacidad de almacenamiento. Los resultados se brindan en la Tabla 6 con posterioridad. Mediante el método de inmersión se observó una mejora significativa en el marchitamiento (pérdida de peso, o conservación de frescura).

A continuación se describen experimentos que se llevaron a cabo y sirven como ilustraciones no limitativas de cómo se realiza la invención. Cualesquiera modificaciones y variaciones en los parámetros -que incluyen mas no se limitan al proceso para producir hidrolizados, y modificaciones adicionales, así como también el método/proceso de uso de los productos y sus varios pasos usados- son meramente ilustrativas y cualesquiera equivalentes de las mismas que sean obvias para una persona versada en el arte y sea capaz de alcanzar el mismo objetivo, se pueden usar en su lugar y, aún así, serán consideradas como incluidas dentro del alcance de esta memoria descriptiva.

FIGURAS Y SU DESCRIPCIÓN

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

000156

Figura 2: Barrido por IRM de tomates representativos.

Figura 3: Fotografía de la diferencia en la apariencia de manzanas en trozos tratadas y no tratadas el día 4.

Figura 4: Las manzanas en trozos no tratadas (control) 5 desarrollaron crecimiento visible de hongos como manchas negras de crecimiento de hongos en la fotografía mientras que las manzanas en trozos tratadas (ensayo) permanecieron libres de crecimiento de hongos después de 25 días de almacenamiento en bolsas de polietileno.

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

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

Figura 7: pH óptimo de la proteo-quitinasa. El eje X 15 muestra el pH y el eje Y muestra la actividad enzimática (unidades/ml) de un volumen por unidad de una formulación enzimática individual. Se observa actividad máxima de 160 unidades/ml a pH 2.

Figura 8: Temperatura óptima de la proteo-quitinasa. El 20 eje X muestra el pH y el eje Y muestra la actividad enzimática (unidades/ml) de una cantidad por unidad de una formulación enzimática individual. Se observa actividad máxima a una temperatura de 80 °C.

Figura 9: Acción de enzimas seleccionadas sobre

000157

quitosano. Corrida 1: Estándar de glucosamina. Corrida 2: Xilán Acil Transferasa (cruda), Corrida 3: Proteasa y Xilán Acil Transferasa (ambas puras). Corrida 4: Xilán Acil Transferasa (pura). Corrida 5: Quitosano sin enzima. Los
5 manchas de acetato (Resultados de acetilación) están marcadas por un círculo.

EJEMPLO 1

PRODUCCIÓN DE LACTATO DE QUITOSANO SOLUBLE E INSOLUBLE EN AGUA

10 Se toman 5 g de quitosano [DDA (*Degree of Deacylation* o grado de desacetilación) 70, malla 100] en un matraz de fondo redondo y se agregan 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien agitando a 100 rpm
15 durante 30 minutos. Se agrega a esta mezcla un ácido, orgánico o inorgánico -preferentemente, ácido láctico- en diferentes cantidades, y la agitación continúa durante 2 horas. La temperatura se mantiene por debajo de 30 °C y preferentemente a 25 °C. La suspensión se filtra y el sólido
20 se seca al aire. Se separan el polvo de flujo libre y los grumos (de haberlos) mediante tamizado. El polvo de flujo libre luego se seca adicionalmente en horno de aire caliente [70 °C durante 3 a 6 horas]. Los grumos son partículas elásticas que no se rompen en partículas de flujo libre de

000158

malla 100 o más pequeñas. La solubilidad de las partículas de
 flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente
 a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla
 se agita en forma continua durante la adición y
 5 adicionalmente durante 10 minutos más y luego la solubilidad
 se chequea visualmente. Los efectos de las diferentes
 concentraciones de ácido láctico se brindan en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de diferentes cantidades de ácido
 láctico usadas con 5 g de quitosano.

10	Ácido láctico (ml)	Formación de grumos durante la reacción	Solubilidad en agua
	6.5	+++	Se disuelve completamente
	5.0	++	Se disuelve completamente
15	3.5	+	Se disuelve completamente
	2.0	-	Se disuelve completamente
	1.0	-	Forma grumos que se disuelven después de 30 minutos
	0.5	-	Forma grumos que no se disuelven hasta los 60 minutos
20	0.1	-	Se disuelve completamente cuando la reacción se realiza en 90:10 metanol:agua

000159

+++ indica 60% o más de formación de grumos

++ 35% de formación de grumos

+ aproximadamente 15% de formación de grumos y tamaño de grumo pequeño

5 - sin formación de grumos

Como el ácido láctico en una cantidad inferior a 0.5 ml arrojó una disolución completa sin formación de grumos durante la reacción, conformó la forma de realización preferida para uso en trabajo adicional.

10 EJEMPLO 2

ADICIÓN DE GRUPO SUCCINATO A QUITOSANO

Se toman 5 g de quitosano [DDA 70, malla 60] en un matraz de fondo redondo y se agregan 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro
15 grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien agitando a 100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 65 °C. Se agrega anhídrido succínico en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g a esta mezcla y la agitación continúa durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60
20 y 70 °C, y preferentemente a 65 °C, durante aproximadamente 1 hora. La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. El polvo de flujo libre se forma al romper los grumos sueltos en forma mecánica y pasarlos por un tamiz de malla 100. No se observó formación de grumos. El polvo de

000160

flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 85 °C durante 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. El polvo es soluble en agua cuando se agregan 0.5 g o más de anhídrido succínico a 5 g de quitosano en dicha reacción.

10

EJEMPLO 3DERIVACIÓN EN DOS PASOS CON UN ÁCIDO Y ANHÍDRIDO SUCCÍNICO

La reacción se lleva a cabo exactamente como se describe en el ejemplo 2 en donde el quitosano se reemplaza por el producto de reacción obtenido en una reacción descrita en el ejemplo 1 donde se usan 1.0 g ó 0.5 g de ácido láctico. En lugar de ácido láctico, se podría haber usado cualquier otro ácido orgánico o inorgánico. Se usaron otros 0.5 g de anhídrido succínico para 5 g del producto de la Primera Composición. Se formó material granular grueso, que era soluble en agua cuando se evaluó tal como se describió en el ejemplo 1.

EJEMPLO 4ADICIÓN SECUENCIAL DE SUCCINATO Y LACTATO A QUITOSANO

000161

La reacción se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 2, en donde se hace reaccionar 5 g de quitosano con 0.5 g de anhídrido succínico. Una vez completa la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a 30 °C y se agregaron 0.5 ó 1.0 ml de ácido láctico. El ácido láctico se podría haber reemplazado por cualquier otro ácido orgánico o inorgánico. La mezcla se agitó durante 1 hora, se filtró y se procesó adicionalmente como se describe en el ejemplo 1. No hubo formación de grumos. El polvo seco fue completamente soluble en agua dentro de los 5 minutos bajo las condiciones de ensayo descritas.

EJEMPLO 5

IDENTIFICACIÓN DE ENZIMA QUE TIENE ACTIVIDAD COMO PROTEINASA PRIMARIA Y REACTIVIDAD CRUZADA DE QUITINASA

Se recolectaron muestras de suelo, en Pune, India, y alrededores, de varios recursos naturales ricos en materia orgánica. La muestra de 10 g se enriqueció con el substrato deseado (1 g) -a saber: caseína, quitosano, trigo lavado, celulosa- en forma individual en un matraz de 250 ml separado que contenía 100 ml de agua destilada. El enriquecimiento continuó durante 3 semanas, y las muestras se vetearon en medio sólido que contenía el substrato usado para enriquecimiento como única fuente de carbono. Las colonias aisladas en general mostraron una zona de aclaramiento que

000162

indicaba la fuerte producción de la respectiva enzima degradante. Se aislaron aproximadamente 700 cultivos para varias bacterias y hongos. Para averiguar los cultivos que tenían la actividad deseada, se cultivaron en matraces de 1
5 litro -que contenían 200 ml de medio- a través del método de agitación en matraz. El filtrado del cultivo microbiano crudo se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio disuelto en SDS al 0.1%. Las fracciones de proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante.
10 Las fracciones de proteínas se separaron sobre estos geles como bandas independientes homogéneas. Estas bandas se caracterizaron en cuanto a su actividad mediante tres métodos/procesos diferentes: tinción con azul de Coumassie para detección de proteínas, ensayo de aclaramiento de
15 caseína para la actividad de proteinasa y ensayo de aclaramiento con azul brillante de Ramezol de quitina para la actividad de quitinasa. Se detectó una banda homogénea a nivel electroforético que mostró actividad de proteinasa así como también actividad de quitinasa, proteo-quitinasa. Esta
20 banda se usó para desarrollar hidrolizado de quitina a fin de desarrollar el producto de esta invención. Se determinó que el peso molecular de la proteo-quitinasa purificada de *Aspergillus sp.* seleccionada era de 50 kD usando estándar de peso molecular sobre SDS-PAGE. El trazado del patrón de

000163

electroforesis en gel se ilustra en la figura 6. Sobre la base de este ensayo, se seleccionaron *Aspergillus niger* MTCC 5572 (depósito en The Microbial Type Culture Collection (MTCC), Institute of Microbial Technology, Chandigarh, India) por su actividad de proteo-quitinasa y *Bacillus sp.* MTCC 5571 (depósito 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 a gran escala.

10 EJEMPLO 6

PRODUCCIÓN DE PROTEASA CAPAZ DE ESCINDIR QUITINA Y QUITOSANO

 Se identificaron cultivos microbianos capaces de producir proteasa(s) ácida(s) o neutra(s) y endo-quitinasa.

15 La fracción enzimática aislada de los respectivos cultivos microbianos que tuvieron actividad de proteinasa así como también de quitinasa (proteo-quitinasa) se incubó con solución de quitosano al 1% en ácido acético al 1%. La proteasa degradó el quitosano, lo que generó parcialmente la

20 reducción de la viscosidad del substrato. Los cultivos identificados por poseer proteinasa promisorio así como también reacción de endo-quitinasa (proteo-quitinasas) se cultivaron a gran escala para la producción enzimática. Se seleccionó específicamente *Aspergillus niger* MTCC 5572, que

000164

se cultivó bajo condiciones de agitación en un matraz en medio de extracto de levadura y caseína. El filtrado del cultivo se caracterizó por actividad enzimática, y la enzima proteo-quitinasa cruda se recuperó mediante precipitación con sulfato de amonio [90% de saturación]. La actividad enzimática del precipitado de sulfato de amonio se determinó mediante determinación proteica a través de método colorimétrico, y se agregó una cantidad conocida de enzima proteo-quitinasa al quitosano para su modificación. La enzima cruda de *Aspergillus niger* MTCC 5572 concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio se disolvió en tampón de fosfato pH 7.0. Se sometió a filtración en gel usando Sephadex® G-100. Se recolectaron diferentes reacciones que se sometieron a evaluación en cuanto a su contenido proteico y actividad enzimática. Las fracciones No. 89 a 104 correspondieron con el pico de proteína único (ver figura 5). Este método/proceso se usó para la purificación de la enzima a partir de un caldo de 3 a 12 L en un único lote. Se determinaron el pH óptimo y la temperatura óptima para la proteo-quitinasa en un rango de pH de 1 a 9 y un rango de temperatura de 30 a 100 °C. La enzima mostró actividad óptima a un pH de 2 (Figura 7), y a 80 °C (Figura 8).

Se identificaron cultivo(s) de *Bacillus sp* que son capaces de producir Xilán acil transferasa; es decir, una

000165

enzima de desacetilación, y se incubaron con solución de quitosano al 1% en ácido acético al 1%. Los cultivos que poseían actividad de desacetilación promisorio, según lo identificado, se cultivaron a gran escala para la producción 5 enzimática. Se seleccionó específicamente *Bacillus sp* MTCC 5571, que se cultivó bajo condiciones de agitación en matraz, en medio de extracto de levadura y caseína. El filtrado del cultivo se caracterizó por actividad enzimática, y la enzima proteo-quitinasa cruda se recuperó mediante precipitación con 10 sulfato de amonio [90% de saturación]. La actividad enzimática del precipitado del sulfato de amonio se determinó mediante la detección de la mancha de acetato por TLC a través del tratamiento de quitina con la fracción enzimática, y se agregó una cantidad conocida de enzima de desacetilación 15 al quitosano para su modificación. La enzima cruda de *Bacillus sp* MTCC 5571 concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio se disolvió en tampón de fosfato a un pH de 7.0. Se sometió a filtración en gel usando Sephadex® G-100. Se recolectaron diferentes fracciones que se sometieron a 20 ensayo en cuanto al contenido de proteína y la actividad enzimática. Este método/proceso se usó para la purificación de la enzima a partir de un caldo de 3 a 12 L en un único lote.

PRODUCCIÓN DE XILÁN ACIL TRANSFERASA CAPAZ DE
DESACETILAR QUITINA Y QUITOSANO

Se identificaron y aislaron cultivo(s) microbiano(s) que eran capaces de producir xilán acil transferasa. La
5 desacetilación del quitosano bajo las condiciones de ensayo fue realizada por esta(s) enzima(s). La mezcla de reacción mostró solubilización de quitina a medida que la viscosidad de la solución se incrementaba. La aparición del grupo acetilo libre fue detectada por TLC. Los cultivos que poseían
10 propiedad de desacetilación de quitina, según lo identificado, se cultivaron a gran escala para la producción enzimática. Los cultivos seleccionados derivaron de *Bacillus* sp. MTCC 5571 y se cultivaron bajo condiciones de agitación en matraz, en medio de extracto de levadura y salvado de
15 trigo. El filtrado del cultivo se caracterizó por actividad enzimática, y la enzima cruda se recuperó mediante precipitación con sulfato de amonio [90% de saturación]. Se determinó la actividad enzimática del precipitado del sulfato de amonio, y se agregó una cantidad conocida de enzima al
20 quitosano para su modificación.

EJEMPLO 8

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE QUITOSANO

Se agregaron 5 g de quitosano a 70 ml de metanol y 30 ml de agua destilada. Esta mezcla se agitó continuamente a

000167

100 rpm. Se agregó enzima capaz de escindir quitina [descrita en el ejemplo 5] a 10 - 1000 U.I. por g de concentración de quitosano. La reacción se llevó a cabo a temperaturas comprendidas entre 25 y 95 °C durante un lapso de 30 minutos a 5 horas. Las condiciones preferidas fueron: 100 U.I. de enzima por g de quitosano, temperatura de 50 °C, y período de incubación de 2 horas. El producto de reacción se recuperó por filtración y secado tal como se describió en el ejemplo 2. El quitosano sin modificar [1 g], cuando se disolvió en 100 ml de agua destilada acidificada usando 2 ml de solución de ácido acético, mostró viscosidad de 80 a 100 cps. El quitosano modificado a nivel enzimático [1 g], cuando se disolvió en 100 ml de agua destilada acidificada usando 2 ml de solución de ácido acético, mostró viscosidad de 20 a 30 cps. A fin de comprobar que dicha enzima funciona sobre el quitosano, se agregó enzima purificada (0.1% p/vol) a solución de quitosano al 0.5% (que se preparó en ácido acético acuoso al 0.5%), y se incubó a 50 °C durante 16 horas. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante transparente se analizó mediante TLC (sistema solvente propanol:agua:amoníaco 7:2:1) usando glucosamina como estándar. La enzima que mostró actividad de proteo-quitinasa produjo quito-oligosacáridos que se desarrollaron como manchas de acuerdo con TLC, de movimiento lento en

000168

comparación con la glucosamina. Las proteasas de diferentes organismos que no mostraron actividad cruzada de quitinasa no tuvieron manchas que se movieron sobre la placa de TLC (figura 9).

5 EJEMPLO 9

DESACETILACIÓN ENZIMÁTICA DE QUITINA

Se agregaron 5 g de quitina a 100 ml de agua destilada. Esta mezcla se agitó continuamente a 100 rpm. Se agregó enzima capaz de desacetilar quitina [ejemplo 6] a 500 - 1000
10 U.I. por g de concentración de quitina. La reacción se llevó a cabo a temperaturas que oscilaban entre 25 a 95 °C durante un lapso de 8 a 24 horas. Las condiciones preferidas fueron: 800 U.I. de enzimas por g de quitina, temperatura de 50 °C y período de incubación de 8 horas. El producto de reacción se
15 recuperó mediante filtración y secado tal como se describió en el ejemplo 2. La quitina sin modificar fue completamente insoluble en agua. La quitina modificada a nivel enzimático [10 g], cuando se agitó en 100 ml de agua destilada acidificada usando 2 ml de solución de ácido acético, mostró
20 viscosidad de 30 a 50 cps, lo que indicó la solubilización parcial de la quitina como resultado de la desacetilación.

EJEMPLO 10

COMPOSICIÓN CONSERVANTE DE QUITINA/QUITOSANO POST-
COSECHA Y PROCESO PREFERENTE DE FABRICACIÓN DE LA MISMA

000169

Se toman de 5 g de quitosano [DDA 50 - 70, malla 60] en un matraz de fondo redondo y se agregan al mismo 20 ml de agua destilada y 80 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 65 °C. Se agrega anhídrido succínico en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g a esta mezcla y la agitación continúa durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60 y 70 °C, y preferentemente a 65 °C. La suspensión se deja enfriar. Se agregan 0.5 ml de ácido láctico, y la enzima para desacetilación a 4000 U.I. producida a partir de *Bacillus* sp MTCC 5571, y la mezcla se agita durante 7 horas. El ácido láctico se podría haber reemplazado por cualquier otro ácido orgánico o inorgánico.

Se agrega la enzima quitinolítica a 500 U.I. producida a partir de *Aspergillus niger* MTCC (tal como se describió en el ejemplo 5) y la agitación continúa durante 1 hora. La suspensión se deja enfriar y se filtra y el sólido se seca al aire. El polvo de flujo libre se forma al romper los grumos sueltos en forma mecánica y pasarlos por un tamiz usando malla 100. No se observa formación de grumos. El polvo de flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 70 °C durante 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de

000170

polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más y luego la solubilidad se chequea visualmente. El polvo succinilado es soluble en agua cuando se agregan más de 0.5 g de anhídrido a 5 g de quitosano en dicha reacción.

EJEMPLO 11

PRODUCCIÓN DE DERIVADO DE AZÚCAR - SUCCINATO DE QUITOSANO SOLUBLE E INSOLUBLE EN AGUA QUE PORTA RESIDUOS DE FORMALDEHÍDO

Se toman 5 g del derivado de succinato de quitosano, según lo descrito en el ejemplo 10, en un matraz de fondo redondo y se agregan al mismo 100 ml de metanol (99%). La suspensión se mezcla bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos y se calienta a 60 °C. La temperatura se mantiene a través de toda la reacción. Se disuelve sucrosa en el rango de 1 g a 0.02 g (ver Tabla No. 3) en 10 ml de agua, y la misma se agrega a la suspensión. La mezcla se agita durante 15 minutos. Se agregan 5 ml de formaldehído a esta mezcla a gotas en 30 minutos. La reacción continúa a 60 °C con agitación constante en forma adicional durante 1 a 6 horas. Esto se menciona como "tiempo de reacción" en la Tabla No. 3. La mezcla de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, el producto se recupera por

000171

filtración. Los sólidos se lavan con 100 ml de metanol al 90% y se secan al aire. El producto se caracteriza como polvo de flujo libre o con grumos. Se determina 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:

Tabla. No. 3

10	Sucrosa en g	Tiempo de reacción en horas	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	Grumos/Gel	Soluble	Insoluble
15	0.02	6	Grumos/Gel	Soluble	Insoluble
	0.02	3	Grumos/Gel	Soluble	Soluble
	0.02	1	Polvo	Soluble	Soluble

Todos los productos solubles en agua tuvieron diverso grado de actividad antimicrobiana, que fue consistentemente mejor que el de la actividad antimicrobiana del material de inicio (producto del ejemplo 10).

La actividad antimicrobiana de estos productos se evaluó usando *E. coli*, y el protocolo descrito en el ejemplo

000172

14. Los resultados del ensayo son los siguientes:

Tabla 4: conteo inicial de E coli de 4×10^7

5

10

Producto/ concentración	1 %	0.5%	0.1%	0.033%
Producto del ejemplo 10	2×10^3	2×10^3	4×10^3	1×10^4
Producto 10 con sucrosa 0.1 g	7×10^2	4×10^2	4×10^2	1×10^3
Producto 10 con sucrosa 0.02 g 6h	5×10^2	2×10^2	4×10^2	90
Producto 10 con sucrosa 0.02 g 1h	2×10^2	2×10^2	4×10^2	109

15

Las reacciones se llevaron a cabo tal como se describió con anterioridad pero reemplazando sucrosa con glucosa o lactosa (0.02 g) cada una durante 3 horas. Los productos de estas reacciones fueron solubles en agua y mostraron 100% de actividad antimicrobiana contra *E coli* cuando se evaluaron mediante el método/proceso descrito con anterioridad.

EJEMPLO 12

20

COMPOSICIÓN DE QUITINA/QUITOSANO PREPARADA AL USAR
ÁCIDO DE FÓSFORO Y QUE PORTA RESIDUOS DE FORMALDEHÍDO

Se toman 5 g de quitosano [DDA 50 - 70, malla 60] en un matraz de fondo redondo, y se agregan al mismo 100 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien mediante agitación a

100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 60 °C. Se disuelve ácido de fósforo (H_3PO_3) en diferentes proporciones que abarcan desde 0.5 g hasta 15 g en 20 ml de agua y se agrega a gotas a esta mezcla mediante agitación durante 1
5 hora. Luego se agregan 5 ml de formaldehído en forma de gotas. La temperatura se mantiene entre 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante 2 a 6 horas, una vez completa la adición. La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. El polvo de flujo libre
10 se forma al romper los grumos sueltos en forma mecánica y pasarlos por un tamiz usando malla 100. No se observa formación de grumos. El polvo de flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 70 °C durante 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se
15 chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y adicionalmente durante 10 minutos más, y luego la solubilidad se chequea visualmente. La solubilidad se chequea también a un pH de 8, 9 y 10
20 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris.

Los productos formados usando quitosano y ácido de fósforo en una relación de 1:1 y 1:2 mostraron solubilidad en el amplio rango de pH (7 a 10), formando soluciones ligeramente turbias a transparentes. Estas soluciones

000174

mostraron diverso grado de actividad antimicrobiana. Se realizaron estudios antimicrobianos usando *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2200 (ATCC 9027) capaz de crecer a un amplio rango de pH. Se inoculó el cultivo desarrollado durante toda la noche en el caldo de nutrientes (100 micro L) nuevamente en caldo de nutrientes (10 ml) de diverso pH (ver la tabla) sin ninguna adición (control) y con el producto de quitina-ácido de fósforo. Los cultivos se incubaron en un agitador a 25 °C durante 8 horas, y se registró el crecimiento como densidad óptica (OD, del inglés *Optical Density*) del caldo a 600 nm. Una baja densidad óptica (en comparación con el control) indica menor crecimiento, y cierta actividad antimicrobiana. Sin crecimiento - cero OD - significa inhibición de microbios del 100%.

Tabla 5: Inhibición de *Pseudomonas* a un pH de 8.5

		C:P1:1	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

000175

5

0.10%		0	0
pH 9			
Control	1.69		
0.01%		1.39	1.68
0.05%		0	0
0.10%		0	0

Cuando los plátanos se almacenan durante un tiempo
 10 prolongado, la corona del racimo comienza a secarse. El tallo
 que une el cabo del plátano a la corona se llama "pedicelo".
 El pedicelo comienza a marchitarse. El marchitamiento del
 pedicelo es el mejor indicador del secado. Menos
 marchitamiento significa conservación de la frescura. El
 15 ensayo se realizó sobre 1000 kg de plátanos, cada uno
 mediante el método estándar (control) de inmersión en 0.1% de
 nuestro producto y aspersión de nuestro producto. Esto se
 repitió en 2 tandas (un total de 6000 kg de plátanos). Un muy
 bajo porcentaje de marchitamiento del pedicelo mediante
 20 inmersión así como también aspersión de la composición de
 ensayo muestra su eficacia satisfactoria para retrasar el
 secado y, en última instancia, retardar el añejamiento y la
 senescencia, y mejorar la capacidad de almacenamiento. Los
 resultados se brindan en la Tabla 6 que sigue.

000176

Tabla 6: Efectividad de producto c:p 1:1 para conservar frutas

% Marchitamiento del pedicelo / tanda usando el producto del Ejemplo 12		
Número de tanda	Tanda no. 1	Tanda no. 2
Inmersión	2.4	1.9
Aspersión	3.2	2.8
Control	2.7	2.4

Mediante el método de inmersión se observó una mejora significativa en el marchitamiento (pérdida de peso o conservación de frescura).

EJEMPLO 13

APLICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CONSERVANTE

Se prepararon soluciones a partir de 10 gramos de quitosano y su producto descrito en los ejemplos 1, 2, 4 y 10 al disolver quitosano en ácido acético al 2% y todos los otros derivados en agua para formar un volumen de 1000 ml de solución en un recipiente con una capacidad de 15 L. Se sumergieron 3 kg de tomates o 2 kg de plátanos en la solución durante 15 segundos. Cuando se retiró el material del recipiente, se dejó drenar el exceso de solución en el mismo recipiente durante 1 minuto. Esta acción de inmersión se

000177

repitió con los cinco lotes siguientes de fruta fresca. Por ende, se sumergió un total de 15 kg de tomates o 10 kg de plátanos en la solución de 10 L. Luego la solución remanente en el recipiente se midió con precisión y se registró la pérdida de líquido como la diferencia entre el volumen inicial y el final. Esto se dividió por la cantidad total de fruta sumergida, arrojando el consumo de solución por kg de fruta sumergida. Los resultados de este experimento se brindan en la tabla 7

10 Tabla 7:

Producto	Consumo en ml por Kg de tomates	Consumo en ml por kg de plátanos
Quitosano	12	19
Quitosano: Ácido láctico 1:0.4 de acuerdo con el ejemplo 1	9	10
Quitosano: anhídrido succínico 1:0.1 de acuerdo con el ejemplo 2	8	8
Producto del ejemplo 4	3	5
Producto del ejemplo 10	3	3

La Quinta composición mostró tres a cuatro veces menos

000178

-o incluso menos- consumo por kg de plátanos y tomates que la solución de quitosano en ácido acético.

EJEMPLO 14

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPOSICIONES DE QUITOSANO

5 Se disolvió quitosano en ácido acético al 2%, y sus productos descritos anteriormente se disolvieron en agua. Se usaron 300 mg del producto para formar una solución de 10 ml. Se cultivaron cultivos de *E.coli* NCIM 2065 y *Bacillus subtilis* NCIM 2063 toda la noche (10^9 células/ml de densidad)

10 diluidos 100 veces con caldo líquido estéril y se usaron para ensayo antimicrobiano. El ensayo se estableció al mezclar cultivos diluidos con solución madre de quitosano o producto de la siguiente manera:

15	Cultivo vol. en ml	7	8.5	9.7	9.9
	Quitosano/producto vol. en ml	3	1.5	0.3	0.1
	Concentración de producto (%)	1	0.5	0.1	0.033

20 La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Se determinó el conteo viable total de la mezcla. Cuando se compara con el conteo inicial del cultivo, se obtiene la efectividad microbicida del producto. Los datos para *E coli* y *Bacillus subtilis* se brindan en las tablas 8 y 9.

000179

Tabla 8: Conteo inicial de *E coli* 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: Conteo inicial de *Bacillus subtilis* 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	2×10^6	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 (0.1%) se incubó en refrigerador (a una temperatura de 4 a 10 °C) hasta 7 semanas. El incremento en la turbidez se detectó visualmente y se puntuó como +. La

000180

falta de incremento en la turbidez (-) indica actividad microbiostática.

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

5

Producto/cultivo microbiano	<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	-	-	-	-	-	+

10

La Quinta composición mostró alta actividad antimicrobiana así como también microbiostática en comparación con la solución de quitosano en ácido acético y la Primera, Segunda y Cuarta Composiciones.

EJEMPLO 15

EFFECTO DE COMPOSICIONES CONSERVANTES SOBRE LA ESTABILIDAD BAJO ALMACENAMIENTO

Cuando se usó la solución de quitosano y quitosano procesado mediante los ejemplos 6 y 7 para recubrir plátanos y fresas -100 frutas por cada conjunto- el número menor de putrefacción microbiana (22 y 9 para las respectivas frutas)

se observó después de 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente y 25 días para el quitosano procesado mediante el método/proceso del ejemplo 6.

EJEMPLO 16

5 MEJORA EN LA VIDA ÚTIL MEDIANTE EL PRODUCTO DEL EJEMPLO
10 10 (Quinta Composición)

Se trataron plátanos verdes cosechados en forma reciente (<30 h de la cosecha) usando una solución al 0.1% del producto del ejemplo 10 en agua. El tratamiento se puede
10 realizar mediante inmersión del plátano en dicha solución durante 10 a 15 segundos, o mediante aspersión directa de la solución sobre el plátano con un dispositivo adecuado a fin de humedecer la superficie del plátano, o al atravesar el plátano por una cámara cerrada que se satura con la bruma de
15 dicha solución (nebulización indirecta). Los plátanos tratados se secan al aire. Estos plátanos se almacenan a temperatura ambiente (20 a 32 °C y una humedad relativa de 40 - 60%). Los plátanos del mismo lote que son idénticos a los plátanos tratados se mantienen como "control no tratado".
20 Tanto los plátanos tratados como los no tratados se almacenan bajo condiciones idénticas hasta 15 días. Los plátanos tratados mantuvieron su color verde y su peso, mientras que los plátanos no tratados perdieron peso y desarrollaron decoloración. La fotografía de los plátanos tratados y no

000182

tratados tomada al día 12 muestra las diferencias visuales. Los plátanos tratados tuvieron mejor condición fisiológica según se evaluó a nivel químico al determinar sus sólidos totales (contenido BRIX), azúcares reductores y pérdida de peso. Los datos se ilustran en la tabla 11 y la figura 1.

Tabla 11: Resultados de los ensayos cuantitativos realizados sobre los plátanos tratados y los plátanos de control no tratados al día 6 del almacenamiento.

10

Parámetro	Tratados	Control
Pérdida de peso	2.6	8.7
BRIX	22-24	20-22
RS	800 - 1100	300 - 850

La fotografía de los plátanos no tratados (izquierda) y de los tratados (derecha) al día 12 del almacenamiento se ilustra en la Figura 1.

Además del almacenamiento durante 8 a 15 días, tanto los plátanos tratados como los plátanos de control no tratados se trataron con etileno. Los plátanos tratados maduraron en forma normal, mientras que los plátanos de control no tratados se endurecieron y no maduraron o bien se oscurecieron y ablandaron. Ambos tipos de plátanos del lote no tratado no fueron aptos para el consumo.

CAMBIOS FISIOLÓGICOS POSITIVOS Y ACTIVIDADMICROBIOSTÁTICA

Se trataron tomates enteros y manzanas trozadas con el producto del ejemplo 10, exactamente como se describió en el ejemplo 14 para los plátanos. Los tomates tratados retuvieron su peso, textura y frescura durante 30 días en comparación con los tomates no tratados de control, que se arrugaron en un lapso de 12 a 15 días, lo que generó la pérdida de peso. Los cambios fisiológicos en los tomates tratados y en los tomates de control se monitorizaron el día 7 de almacenamiento usando técnica de barrido por IRM. La piel carnosa de los tomates tratados fue más uniforme en su densidad de color. La piel carnosa de los tomates de control no tratados tenía parches oscuros que indicaban falta de uniformidad y más secado.

El barrido por IRM de los tomates representativos se incluye en la Figura 2.

Los trozos de manzana se envasaron en bolsa de polietileno o recipiente plástico transparente y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4 a 9 °C. Las manzanas trozadas de control comenzaron a adquirir un color marrón a partir del día 2 y se volvieron blandas hacia el día 3, mientras que las manzanas en trozos tratadas retuvieron su color, sabor y textura durante 6 días. La

000184

fotografía (Figura 3) muestra la diferencia en la apariencia de las manzanas en trozos tratadas y las no tratadas en el día 4.

Los trozos de manzanas tratadas y no tratadas se
5 envasaron en recipientes plásticos transparentes y se almacenaron tal como se describió con anterioridad durante hasta 25 días. Las manzanas en trozos no tratadas desarrollaron crecimiento de hongos [parches negros en la fotografía en la Figura 4], mientras que las manzanas en
10 trozos tratadas no desarrollaron ningún crecimiento de hongos ni de microbios. Los resultados se ilustran en la fotografía que sigue con posterioridad.

EJEMPLO 18

COMPOSICIÓN DE QUITINA/QUITOSANO USANDO ÁCIDO DE 15 FÓSFORO Y ÁCIDO CLORHÍDRICO

Se toman 750 g de quitosano [DDA 50 - 70, malla 100] en un matraz de fondo redondo y se agregan al mismo 15000 ml de metanol (99%). Aquí se puede usar cualquier otro grado de quitosano. La suspensión se mezcla bien mediante agitación a
20 100 rpm durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 60 °C. Luego se agrega formaldehído 750 ml en 1-2 minutos. Se disuelven 750 g de ácido de fósforo (H_3PO_3) en 7500 ml de agua y luego se agregan a gotas a esta mezcla mediante agitación durante 1 hora. La temperatura se mantiene entre 60

000185

y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas, una vez completa la adición. La suspensión se deja enfriar y se filtra, y el sólido se seca al aire. Se forman polvo de flujo libre y pequeños grumos. Dichos grumos se rompen en forma mecánica y se pasan por un tamiz de malla 100. El polvo de flujo libre se seca luego adicionalmente en un horno de aire caliente a 70 °C durante un lapso de 3 a 6 horas. La solubilidad de las partículas de flujo libre se chequea al agregar 100 mg de polvo lentamente a 100 ml de agua destilada (pH 6.5) en 5 minutos. La mezcla se agita en forma continua durante la adición y durante 10 minutos más, y luego la solubilidad se chequea visualmente. La solubilidad se chequea también a un pH de 8, 9 y 10 ajustado usando NaOH diluido, o tampón Tris.

El producto se disolvió en agua, pero se precipitó cuando el pH se elevó a 7.0. El polvo seco obtenido en esta reacción se resuspendió en 20 volúmenes de metanol al 90%, y se agregaron 2 volúmenes de HCl concentrado. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El polvo se separó por filtración, se lavó con volúmenes de metanol al 90% tres veces y se secó tal como se describió con anterioridad. El producto resultante fue soluble a un pH de 3 a 12.

Los productos de todos los otros ejemplos -

000186

particularmente el ejemplo 10 y el 12- cuando se trataron con HCl según se describe en este ejemplo, no alteraron el pH máximo de solubilidad.

EJEMPLO 19

5 USO DE QUITOSANO SOLUBLE EN AGUA COMO PORTADOR

Se disolvió 1 g de quitosano soluble en agua, según se obtuvo a partir del ejemplo 10, en 100 ml de agua. A 9 ml de esta solución se agregó 1 ml de solución de sulfato de cobre (1%). Esto se mezcló a mano durante 2 minutos. Luego se
10 agregó 1 ml de amoníaco líquido. Esto generó la precipitación del quitosano. Junto con el quitosano, el sulfato de cobre unido también se precipitó. El sulfato de cobre es libremente soluble en amoníaco líquido, y la solución resultante es de color azul profundo. La estimación del cobre se realiza por
15 colorimetría, y usando un gráfico estándar de 0.02 a 0.1%. A partir de esto, se estimó que el cobre unido al quitosano era del 90%.

000187

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un derivado de quitosano al activar quitosano, CARACTERIZADO porque comprende: suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar bajo calentamiento durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

a. dicho derivado tiene una propiedad que comprende: propiedad antimicrobiana, o microbiostática, o antitranspirante, o antifúngica, o propiedad como conservante de frutas o microbiostático, o propiedad que mejora la vida útil, o una combinación de las mismas; y

b. dichas fuerzas físicas incluyen adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

200.80

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicha quitina activada o dicho quitosano activado suspendidos en dicho alcohol a al menos uno de los siguientes pasos:

5 a. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

10 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre a aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

15 ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición,

20 b. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, y

 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en

000189

suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido en
5 aproximadamente 10% al 20% del peso en seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora, filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o
10 sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es soluble en agua;

c. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de
15 alcohol, calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a
20 aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del

000190

derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, además
5 agregar una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco de derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

10 iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

 d. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de
15 alcohol, calentar la mezcla a una temperatura entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura
20 entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

 ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro

000191

ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un
5 período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe, para
10 obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii.suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, y calentar y
15 mantener la temperatura en todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua en aproximadamente 10% de volumen respecto del volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en
20 aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período hasta que se complete la reacción,

000192

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una
5 Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y
10 secar al aire;

e. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar dicha mezcla a aproximadamente
15 60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco del quitosano activado o su derivado en forma de gotas manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C -
20 preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a

000193

reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones ligeramente turbias a transparentes;

5 f. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído 750 ml en un período de pocos minutos, agregar
10 aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente
15 a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para completar la reacción, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

 i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o
20 sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

 g. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar

000194

la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H₃PO₃) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar para recuperar la Novena Composición;

h. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a 70 °C, y

i. agregar anhídrido succínico (en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g) a esta

000195

mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de
5 tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

ii. agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado,
10 agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un
15 período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

20 iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, en donde

000196

v. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada puede ser del 1% con respecto al agua,

vi. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada se toma en una cantidad pequeña,
5 aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver la Quinta Composición,

vii. mezclar durante pocos minutos, y

viii. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula
10 cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

4. Un derivado de quitosano producido al activar quitosano CARACTERIZADO porque comprende los pasos de: suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el
15 30%, agitar con calentamiento durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un
20 derivado.

5. Un derivado de quitosano de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dicho derivado tiene una propiedad que comprende una propiedad antimicrobica, o microbiostática, o antitranspirante, o antifúngica, o

000197

conservante de frutas, o una combinación de las mismas.

6. Un derivado de quitosano de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicha quitina activada o dicho quitosano
5 activado suspendidos en dicho alcohol a al menos uno de los siguientes pasos:

a. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

10 i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o
15 sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición;

b. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C,
20 agregar anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una

000198

temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe a
5 aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% a 20% del peso en seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora, filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta
10 Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es
15 soluble en agua;

c. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar manteniendo dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de
20 tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado

000199

succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I., por 5 g en peso en seco de derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

d. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y, calentando la mezcla a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para

000200

obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe, para obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, y calentar y mantener la temperatura en todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua a un volumen de aproximadamente 10% con respecto al volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C durante

000201

aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período de tiempo hasta que se complete la reacción,

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

5 v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un
10 reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición, que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y secar al aire;

e. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar
15 la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a aproximadamente 60°C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco
20 del quitosano activado o su derivado en forma de gotas manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima

000202

Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble
5 en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones ligeramente turbias a transparentes;

f. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm
10 durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído 750 ml en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un
15 período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para completar la reacción, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la
20 adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

000203

g. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar 5 formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, 10 manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de 15 metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar 20 para recuperar la Novena Composición;

h. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a 70 °C, y

000204

i. agregar anhídrido succínico (en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0.1 g) a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

ii. agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo -preferentemente durante 1 hora- permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse

000205

en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, en donde

v. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada puede ser del 1% con respecto al agua,

5 vi. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada es tomada en una cantidad pequeña, aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver Quinta Composición, y

vii. mezclar durante pocos minutos, y

10 viii. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

7. Una composición CARACTERIZADA porque comprende al menos una de las composiciones de acuerdo con la
15 reivindicación 4 ó 5 ó 6 como ingrediente esencial o como portador de un grupo funcional/molécula activa hasta su sitio de acción.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque comprende un polvo o una solución de al
20 menos una de dichas composiciones en agua en una concentración efectiva para una acción deseada que comprende:

a. conservación de, para y sobre frutas, vegetales, productos comestibles y alimentos,

b. retraso de la maduración, retraso del añejamiento y

000206

retraso de la senescencia de productos naturales, con inclusión de frutas, vegetales y flores,

c. funcionamiento como portador para llevar una molécula activa o un grupo funcional a su sitio de acción.

5 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADA porque comprende al menos una de las siguientes características:

a. dicha composición comprende al menos cualquiera de dicha Primera Composición de acuerdo con la reivindicación a
10 dicha Décima Composición o una mezcla de las mismas,

b. dicha concentración efectiva es de aproximadamente 0.1%,

c. el ácido acético es del 2%.

15 10. Una enzima quitinolítica CARACTERIZADA porque tiene acción proteolítica así como también quitinolítica, y tiene un peso molecular de 50 kD sobre electroforesis SDS-PAGE.

11. Una enzima de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque tiene al menos una de las siguientes propiedades:

20 a. una actividad quitinolítica óptima a pH 2,

b. una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

12. Una enzima proteo-quitinolítica de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque se prepara a partir

000207

de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

13. Un proceso para preparar una enzima de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO porque comprende los
5 pasos de:

a. cultivar *Aspergillus niger* MTCC o mutantes derivados de los mismos bajo condiciones de agitación en matraz en medio de extracto de levadura y caseína,

b. recuperar enzima proteo-quitinasa cruda mediante
10 precipitación con sulfato de amonio.

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque además comprende la purificación de enzima cruda a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, mediante los pasos de:

15 a. disolver dicha enzima cruda concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio en tampón de fosfato a un pH de 7.0,

b. someter la misma a filtración en gel usando Sephadex® G-100,

20 c. recolectar las fracciones,

d. someter las fracciones a análisis del contenido proteico y la actividad enzimática,

e. recolectar y reunir las fracciones correspondientes a un único pico de proteína.

000208

15. Cultivo CARACTERIZADO porque es aislado de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

16. Un proceso para mejorar la vida útil de las frutas CARACTERIZADO porque comprende un tratamiento de inmersión, 5 aspersion, nebulización u otro proceso de aplicación o aplicaciones externas o internas a frutas trozadas o procesadas y productos naturales procesados de una composición que comprende una o más entre una composición de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 ó 6 como ingrediente 10 esencial.

17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, CARACTERIZADO porque dicho tratamiento es para ralentizar la maduración y/o putrefacción microbiana.

18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, 15 CARACTERIZADO porque dicha fruta es plátano, mango, manzana, fresa, naranja, lima.

19. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

a. dicho alcohol es metanol o cualquier otro alcohol 20 polar,

b. dicha agitación se realiza durante 30 minutos, preferentemente a 100 revoluciones por minuto.

20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha enzima

000209

quitinolítica que tiene acción proteolítica así como también quitinolítica comprende una enzima que tiene al menos una de las siguientes propiedades: un peso molecular de 50 kD (kilo Dalton) sobre electroforesis SDS-PAGE, una actividad
5 quitinolítica óptima a pH 2 y una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

21. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque comprende dicha enzima quitinolítica aislada de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados
10 del mismo.

22. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es aislada de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma.

15 23. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es xilán acil transferasa preparada a partir de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma, o cualquier otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz
20 de producir la enzima que tiene actividad de desacetilación.

24. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se usa una enzima quitinolítica termoestable que tiene actividad proteolítica así como también quitinolítica, la proteo-quitinasa, para formar un

000210

derivado hidrolizado.

25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24, CARACTERIZADO porque dicha proteo-quitinasa es preparada a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados
5 del mismo, o cualquier otro hongo o cualquier otro microorganismo capaz de producir una actividad proteo-quitinolítica.

26. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 25, CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica tiene un peso
10 molecular sobre SDS-PAGE de aproximadamente 50 kD, actividad quitinolítica óptima a pH 2 y a 80 °C.

000211

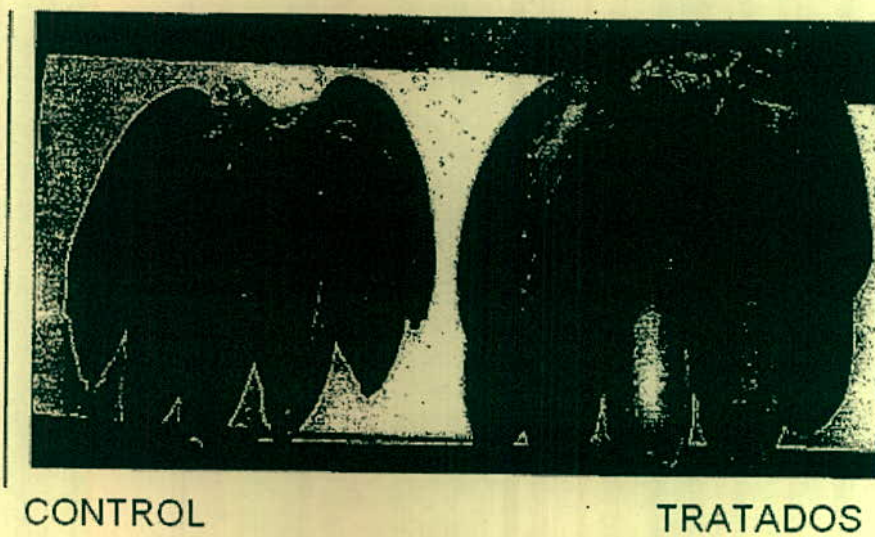


FIGURA 1

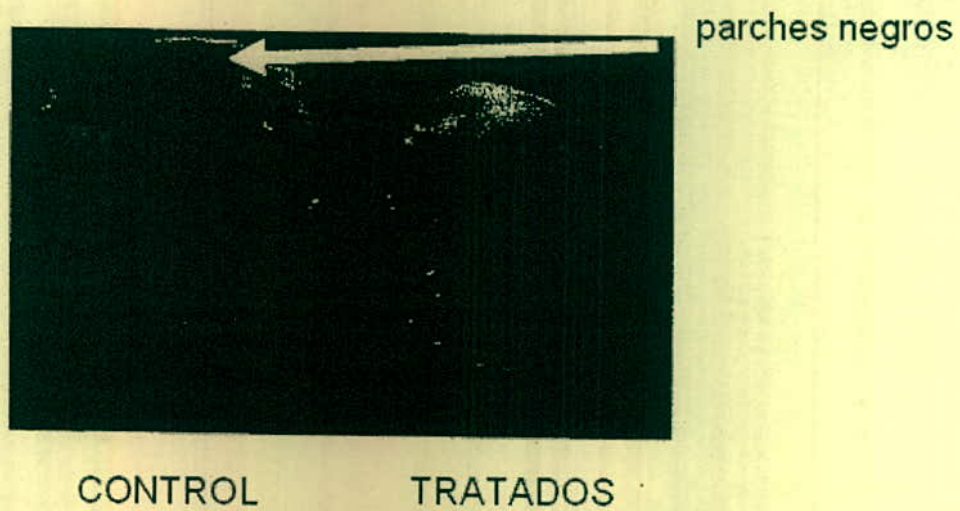


FIGURA 2

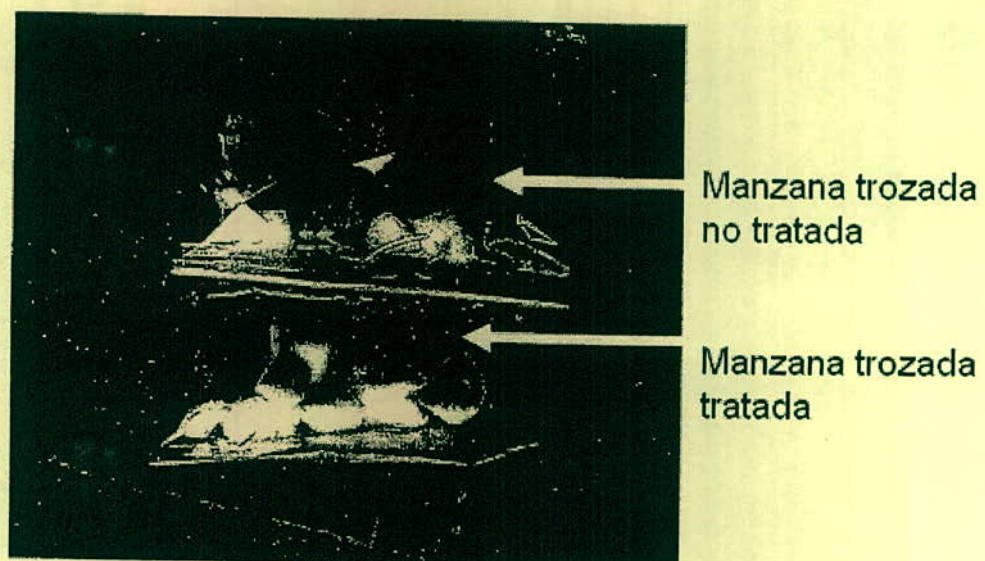
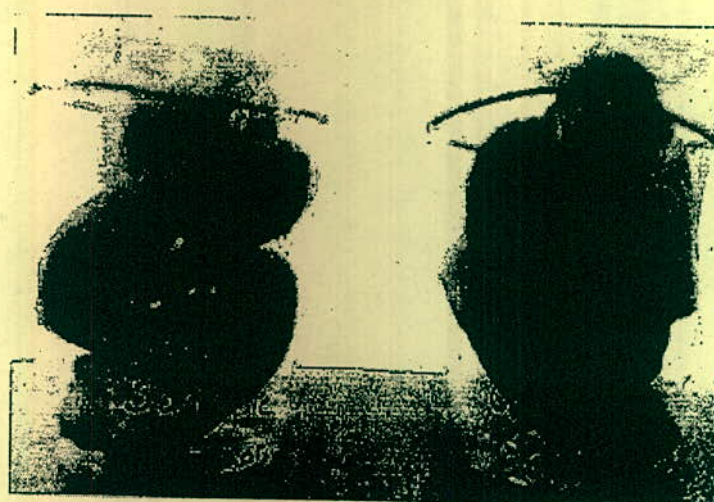


FIGURA 3



Ensayo

Control

FIGURA 4

000213

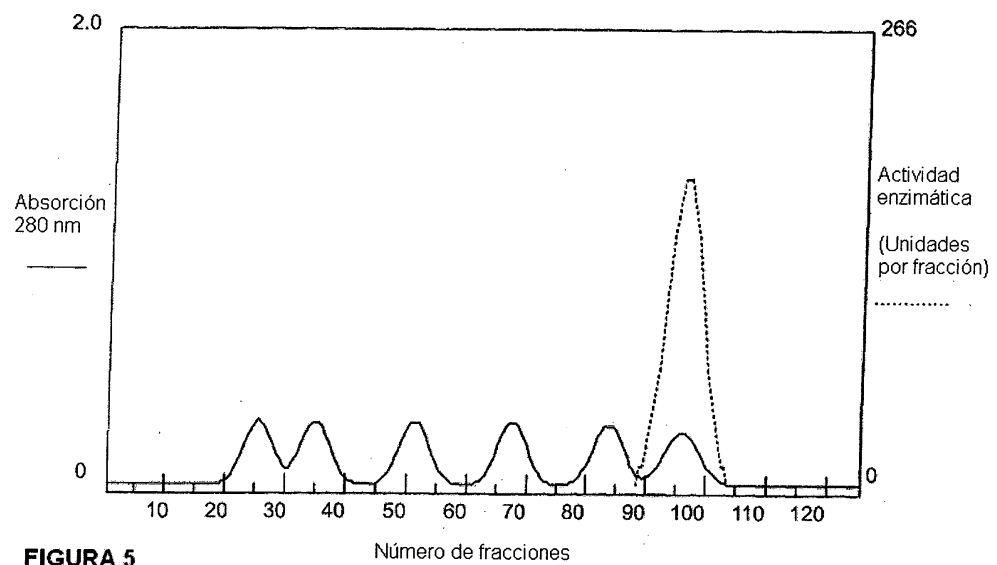
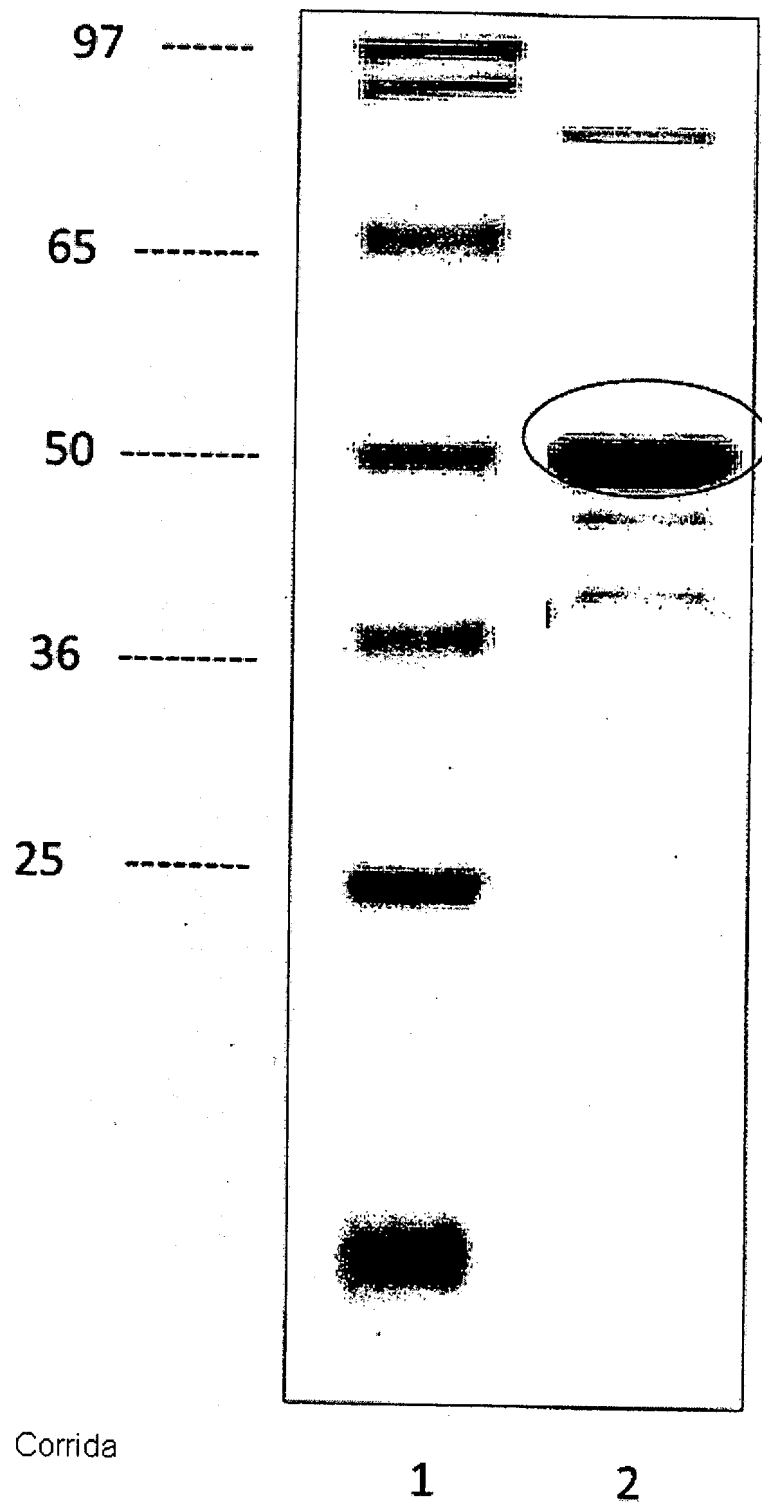


FIGURA 5

Número de fracciones

000212

**FIGURA 6**

000215

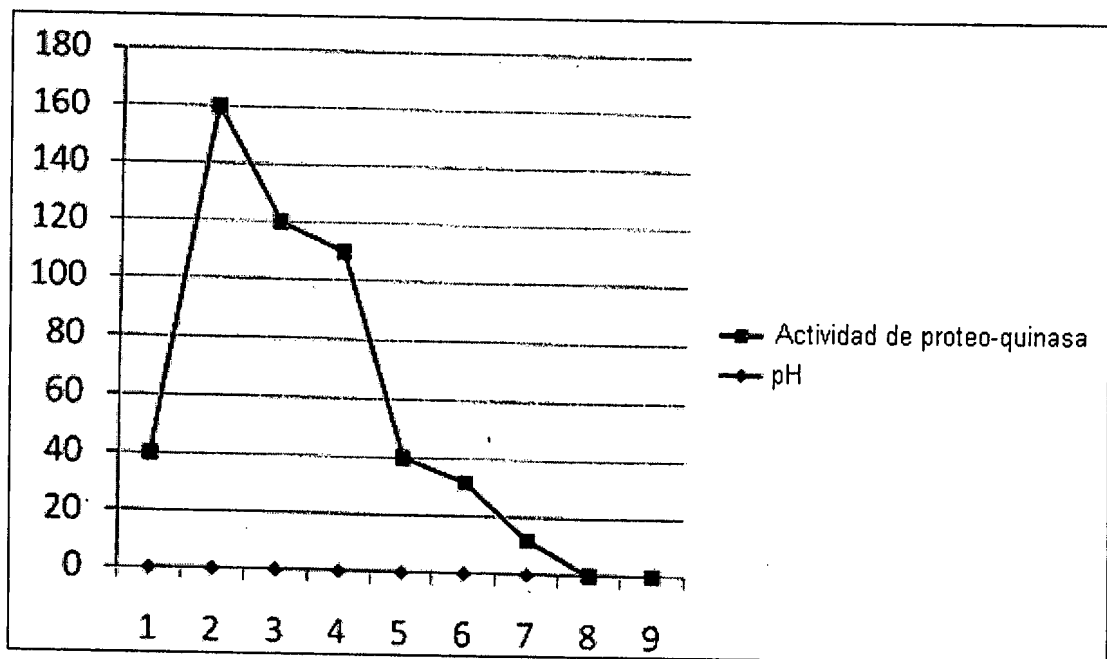
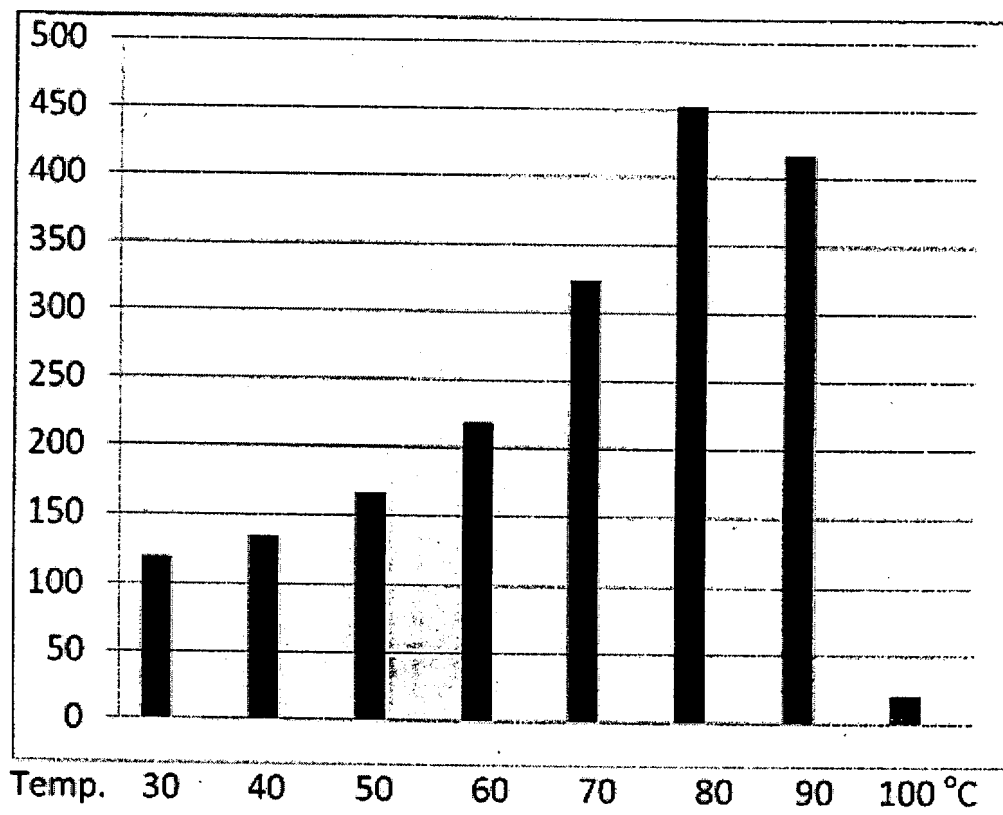
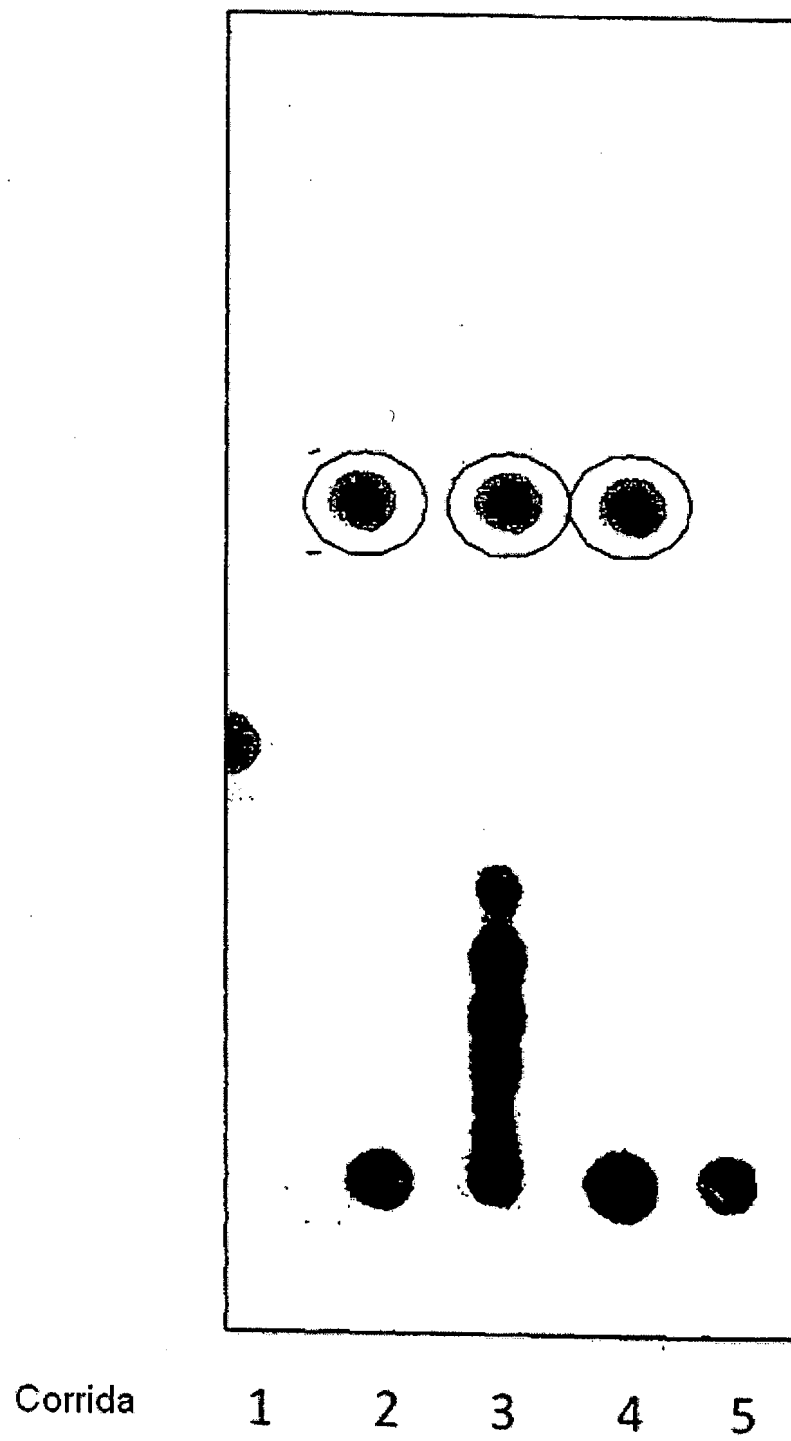


FIGURA 7

**FIGURA 8**

000217

FIGURA 9

000218

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 January 2011 (13.01.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/004398 A2

(51) International Patent Classification:
C08B 37/08 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IN2010/000458

(22) International Filing Date:
7 July 2010 (07.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
1605/MUM/2009 7 July 2009 (07.07.2009) IN
1643/MUM/2010 28 May 2010 (28.05.2010) IN

(71) Applicant (for all designated States except US): CAM-LIN FINE CHEMICALS LIMITED [IN/IN]; Camlin Fine House, Plot No F/11 & F/12, Wicel, Midc, Marol, Central Road, Andheri (East), Mumbai 400 093 (IN).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SHENDYE, Abhay Parashuram [IN/IN]; 4, Rajashree Co-Op., Housing Society 138A, Narayan Peth, Pune 411 030, Maharashtra (IN).

(74) Agent: SAVANGIKAR, Vasant Anantro; Krishna & Saurastri Associates, 74/F, Venus Worli Sea Face, Mumbai 400 018, Maharashtra (IN).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: PRESERVATIVES FROM CHITIN DERIVATIVES

FIGURE 1

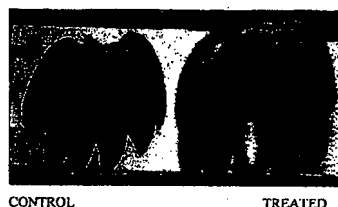
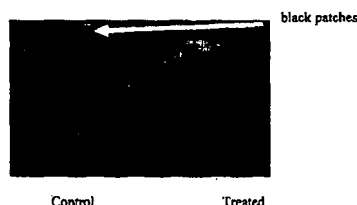


FIGURE 2



(57) Abstract: The invention comprises a process for producing a chitosan derivative, and a product prepared thereby, by activating chitosan or a chitosan precursor chitin in alcohol that contains water from 0% to maximum of about 30% and preparing derivatives by reacting with a reagent to get derivatives that have various uses including an antimicrobial, or a microbiostatic, or an antitranspirant, or an antifungal, or a fruit preservative properties or as carrier of active molecules or functional groups etc. or a combination thereof. Illustrated derivatives include acid, succinic, enzymatically deacetylated, enzymatically hydrolysed by chitinolysis, sugar, formaldehyde, phosphoric acid, hydrochloric acid and copper sulfate derivatives that are obtained by reaction individually or in a combination of consecutive reactions. A novel class of thermostable proteo-chitinase is also disclosed prepared from *Aspergillus niger* MTCC 5572 that has molecular weight on SDS PAGE of about 50 Kilo Daltons and optimum hydrolytic activity at pH 2 and 80 °C. Compositions for treatments of natural products and methods for retarding ageing, improvement of shelf life and retarding microbiological spoilage of banana and other fruits are also disclosed.

WO 2011/004398 A2

000219

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 January 2011 (13.01.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/004398 A4

(51) International Patent Classification:

C08B 37/08 (2006.01) C12N 1/14 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) A23L 3/3562 (2006.01)
C12N 9/62 (2006.01) C12N 9/42 (2006.01)
A23B 7/154 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IN2010/000458

(22) International Filing Date:

7 July 2010 (07.07.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

1605/MUM/2009 7 July 2009 (07.07.2009) IN
1643/MUM/2010 28 May 2010 (28.05.2010) IN

(71) Applicant (for all designated States except US): CAM-
LIN FINE CHEMICALS LIMITED [IN/IN]; Camlin
Fine House, Plot No F/11 & F/12, Wicel, Midc, Marol,
Central Road, Andheri (East), Mumbai 400 093 (IN).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SHENDYE, Abhay
Parashuram [IN/IN]; 4, Rajashree Co-Op., Housing So-
ciety 138A, Narayan Peth, Pune 411 030, Maharashtra
(IN).

(74) Agent: SAVANGIKAR, Vasant Anantro; Krishna &
Saurastri Associates, 74/F, Venus Worli Sea Face, Mum-
bai 400 018, Maharashtra (IN).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with amended claims and statement (Art. 19(1))

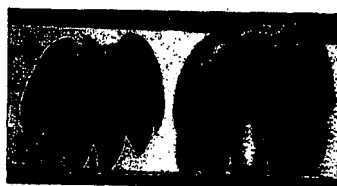
(88) Date of publication of the international search report:

28 April 2011

Date of publication of the amended claims and statement: 16
June 2011

(54) Title: PRESERVATIVES FROM CHITIN DERIVATIVES

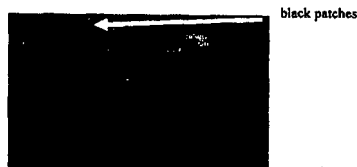
FIGURE 1



CONTROL

TREATED

FIGURE 2



Control

Treated

(57) Abstract: The invention comprises a process for producing a chitosan derivative, and a product prepared thereby, by activating chitosan or a chitosan precursor chitin in alcohol that contains water from 0% to maximum of about 30% and preparing derivatives by reacting with a reagent to get derivatives that have various uses including an antimicrobial, or a microbiostatic, or an antitranspirant, or an antifungal, or a fruit preservative properties or as carrier of active molecules or functional groups etc. or a combination thereof. Illustrated derivatives include acid, succinic, enzymatically deacetylated, enzymatically hydrolysed by chitinolysis, sugar, formaldehyde, phosphoric acid, hydrochloric acid and copper sulfate derivatives that are obtained by reaction individually or in a combination of consecutive reactions. A novel class of thermostable proteo-chitinase is also disclosed prepared from *Aspergillus niger* MTCC 5572 that has molecular weight on SDS PAGE of about 50 Kilo Daltons and optimum hydrolytic activity at pH 2 and 80 °C. Compositions for treatments of natural products and methods for retarding ageing, improvement of shelf life and retarding microbiological spoilage of banana and other fruits are also disclosed.

WO 2011/004398 A4

000220

AMENDED CLAIMS**received by the International Bureau on 25 April 2011 (25.04.2011)**

- 5 1. A process for producing a chitosan derivative by activating chitosan, by suspending the said chitosan in alcohol that contains water from 0% to maximum of about 30%, stirring with heating for a period of time to get activated chitosan or chitosan precursor and thereafter reacting the said activated chitosan or activated precursor with a reagent capable of complexing by physical forces or chemical forces to prepare a derivative.
- 10 2. A process of claim 1 wherein:
- a. the said derivative has a property that comprises an antimicrobial, or a microbiostatic, or an antitranspirant, or an antifungal, a fruit preservative or a microbiostatic, or shelf life improving or a combination thereof,
- b. the said physical forces include adsorption and the said chemical forces include a covalent bond.
- 15 3. A process of claim 2 wherein the said derivative is prepared by subjecting the said activated chitin or chitosan suspended in the said alcohol to at least one of the following steps:
- a. adding water about 20% of volume of alcohol and heating the said mixture to about 70°C, adding Succinic anhydride to this mixture,
- 20 i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction at a temperature between to about 60 – 70°C and preferably at about 65°C to get a Second Composition in suspension,
- ii. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Second Composition,

. 000221

- b. adding water about 20% of volume of alcohol and heating the said mixture to about 70°C, adding succinic anhydride at a rate of about 10% by weight of the raw material to this mixture,
- 5 i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction maintaining a temperature to about 60 – 70°C and preferably at about 65°C to get a succinic derivative in suspension,
- 10 ii. allowing the suspension to cool to about 30°C, subjecting the said succinic derivative to further reaction with lactic or another acid about 10% to 20% of the dry weight of the succinic derivative, stirring the mixture for about 1 hour, filtering and drying the solids to get a Fourth Composition in suspension,
- 15 iii. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Fourth Composition, which comprises a coarse granular material that is soluble in water,
- c. adding water about 20% of volume of alcohol and, heating and maintaining the said mixture to about 70°C, adding Succinic anhydride to this mixture,
- 20 i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction maintaining the temperature between 60 about – 70°C and preferably at about 65°C for a period of time,
- 25 ii. allowing the suspension to cool to get a succinic derivative, subjecting the said succinic derivative to further reaction with Lactic or another acid about 10% weight of the dry weight of the succinic derivative, per 5 gram dry weight of succinic derivative

. 000222

- 5 used adding enzyme for deacetylation about 4000 I.U, stirring the mixture for a period of time, preferably for 7 hours, further adding a chitinolytic enzyme, preferably around 500 I.U. per 5 g dry weight of succinic derivative, continuing stirring for a period of time, preferably for 1 hour, allowing the suspension to cool to get a Fifth Composition in suspension,
- iii. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Fifth Composition,
- 10 d. adding water about 20% of volume of alcohol and, heating the mixture to about 60°C to about 70°C, adding Succinic anhydride to this mixture,
- i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction maintaining the temperature between 60 – 70°C and preferably at around 65°C for a period of time,
- 15 ii. allowing the suspension to cool to get a succinic derivative, subjecting the said succinic derivative to further reaction with Lactic or another acid about 10% of the dry weight of the succinic derivative, and per 5 gram dry weight of succinic derivative used adding enzyme for deacetylation about 4000 I.U, stirring the
- 20 mixture for a period of time, preferably for 7 hours, further adding a chitinolytic enzyme 500 I.U. per 5 gram dry weight of succinic derivative used and continuing stirring for a period of time, preferably for 1 hour, allowing the suspension to cool, to get a Fifth Composition in suspension, recovering the said Fifth
- 25 Composition as solid powder,

. 000223

iii. suspending the dry powder of the said Fifth Composition in absolute alcohol, mixing the suspension well by stirring at 100 rpm for 30 min. and heating and maintaining the temperature throughout the process to 60°C, adding sugar dissolved in water in about 10% volume to volume of the alcohol, stirring the mixture for about 15 minutes or for a period of time enough for mixing, adding formaldehyde dropwise over about 30 minutes or over a period of time required for gradual addition with constant stirring maintaining temperature to around 60°C for about 1 to 6 hours or for a period until the reaction is complete,

iv. thereafter allowing the reaction mixture to cool down to room temperature,

v. recovering the product, washing the solids with aqueous methanol or another aqueous polar alcohol and recovering a Sixth Composition in suspension,

vi. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Sixth Composition that may be washed with 100 ml 90% methanol and air dried,

e. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min, heating the said mixture to about 60°C, adding Phosphorus acid (H_3PO_3) dissolved in water and adding drop-wise to this mixture by stirring, adding formaldehyde about equal in weight to the dry weight of activated chitosan or its derivative in drop-wise manner maintaining the temperature

. 000224

between about 60 – 65°C, preferably at 63°C, for a period of time preferably to 2 – 6 hours after the addition is complete, allowing the suspension to cool and recovering the Seventh Composition in suspension, and either (I) recovering the said composition with or without drying, or
5 (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Seventh Composition; the said Seventh Composition may be soluble in the broad range of pH 7 to 10 giving slightly turbid to clear solutions,

f. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by
10 stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min, heating the mixture to 60°C, adding formaldehyde 750 ml over a period of few minutes, adding and about 10% of inorganic acid or Phosphorus acid (H₃PO₃) dissolved in water and added drop-wise to this mixture by stirring for about one hour or over a period of time required for effective
15 mixing, maintaining the temperature between 60 – 65°C and preferably at 63°C for about six hours or for a period of time required for completion of the reaction, allowing the suspension to cool after the addition is complete and recovering the Eighth Composition in suspension,

i. and either (I) recovering the said composition with or without
20 drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Eighth Composition,

g. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by
stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min, heating the mixture to 60°C, adding formaldehyde over a period of few
25 minutes, adding about 10% inorganic acid or Phosphorus acid (H₃PO₃)

. 000225

5 dissolved in water and added drop-wise to this mixture by stirring for
about 1 hour or over a period of time required for effective mixing,
maintaining the temperature between 60 – 65°C and preferably at 63°C for
6 hours or for a period of time required for completion of reaction after the
addition is complete, allowing the suspension to cool, recovering the
suspension as dry powder, resuspending in 20 volumes of 90% methanol,
and 2 volumes of concentrated HCl or any other organic or inorganic acid,
stirring the mixture at room temperature for one hour or for a period of
time required for good mixing, filtering out, washing with 20 vol 90%
10 methanol and drying to recover Ninth Composition,

h. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by
stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min,
heating the said mixture to 70°C,

15 i. adding Succinic anhydride (in different proportions ranging from
15 g to 0.1 gm) to this mixture, stirring for one hour or for a period
of time required for good mixing, maintaining the temperature
between 60 – 70°C and preferably at around 65°C for 1 hour or for
a period of time required for the reaction, allowing the suspension
to cool to get a succinic derivative,

20 ii. adding Lactic or another acid about 10% of the dry weight of the
succinic derivative, and per 5 gram dry weight of succinic
derivative used adding enzyme for deacetylation about 4000 I.U,
stirring the mixture for a period of time, preferably for 7 hours,
adding further chitinolytic enzyme 500 I.U. per 5 gram dry
25 weight of succinic derivative used and continuing stirring for a

000226

period of time, preferably for 1 hour, allowing the suspension to cool to get solid Fifth Composition,

iii. recovering and air drying the Fifth Composition,

iv. dissolving the Fifth Composition to make a 1% solution in water, adding an aqueous solution of copper sulfate or another charged molecule, capable of adsorbing on the Fifth Composition in alkaline pH, as a solution,

v. the said solution of copper sulfate or the charged molecule that may be 1% with respect to water,

vi. the said solution of copper sulfate or the charged molecule being taken in a small quantity, about 1% of the volume of water taken for dissolving Fifth Composition and

vii. mixing for few minutes,

viii. adding liquid ammonia to precipitate chitosan with the bound copper sulfate or another charged particle to get a derivative of Tenth Composition.

4. A chitosan derivative produced by activating chitosan, by suspending the said chitosan in alcohol that contains water from 0% to maximum of about 30%, stirring with heating for a period of time to get activated chitosan or chitosan precursor and thereafter reacting the said activated chitosan or activated precursor with a reagent capable of complexing by physical forces or chemical forces to prepare a derivative.

. 000227

5. A chitosan derivative of claim 4 wherein the said derivative has a property that comprises an antimicrobial, or a microbiostatic, or an antitranspirant, or an antifungal, or a fruit preservative or a combination thereof.
6. A chitosan derivative of claim 5 wherein the said derivative is prepared by
5 subjecting the said activated chitin or chitosan suspended in the said alcohol to at least one of the following steps:
- a. adding water about 20% of volume of alcohol and heating the said mixture to about 70°C, adding Succinic anhydride to this mixture,
- i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction
10 at a temperature between to about 60 – 70°C and preferably at about 65°C to get a Second Composition in suspension,
- ii. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Second Composition,
- b. adding water about 20% of volume of alcohol and heating the said
15 mixture to about 70°C, adding succinic anhydride at a rate of about 10% by weight of the raw material to this mixture,
- i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction
20 maintaining a temperature to about 60 – 70°C and preferably at about 65°C to get a succinic derivative in suspension,
- ii. allowing the suspension to cool to about 30°C, subjecting the said succinic derivative to further reaction with lactic or another acid about 10% to 20% of the dry weight of the succinic derivative, stirring the mixture for about 1 hour,

. 000228

filtering and drying the solids to get a Fourth Composition in suspension,

- 5 iii. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Fourth Composition, which comprises a coarse granular material that is soluble in water,

- 10 c. adding water about 20% of volume of alcohol and, heating and maintaining the said mixture to about 70°C, adding Succinic anhydride to this mixture,

- i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction maintaining the temperature between 60 about – 70°C and preferably at about 65°C for a period of time,

- 15 ii. allowing the suspension to cool to get a succinic derivative, subjecting the said succinic derivative to further reaction with Lactic or another acid about 10% weight of the dry weight of the succinic derivative, per 5 gram dry weight of succinic derivative used adding enzyme for deacylation about 4000 I.U, stirring the mixture for a period of time, preferably for 7
20 hours, further adding a chitinolytic enzyme, preferably around 500 I.U. per 5 g dry weight of succinic derivative, continuing stirring for a period of time, preferably for 1 hour, allowing the suspension to cool to get a Fifth Composition in suspension,

• 000229

- iii. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Fifth Composition,
- 5 d. adding water about 20% of volume of alcohol and, heating the mixture to about 60°C to about 70°C, adding Succinic anhydride to this mixture,
- i. stirring for 1 hour or for a period of time enough for reaction maintaining the temperature between 60 – 70°C and preferably at around 65°C for a period of time,
- 10 ii. allowing the suspension to cool to get a succinic derivative, subjecting the said succinic derivative to further reaction with Lactic or another acid about 10% of the dry weight of the succinic derivative, and per 5 gram dry weight of succinic derivative used adding enzyme for deacylation about 4000
- 15 I.U, stirring the mixture for a period of time, preferably for 7 hours, further adding a chitinolytic enzyme 500 I.U. per 5 gram dry weight of succinic derivative used and continuing stirring for a period of time, preferably for 1 hour, allowing the suspension to cool, to get a Fifth Composition in
- 20 suspension, recovering the said Fifth Composition as solid powder,
- iii. suspending the dry powder of the said Fifth Composition in absolute alcohol, mixing the suspension well by stirring at 100 rpm for 30 min. and heating and maintaining the
- 25 temperature throughout the process to 60°C, adding sugar

000230

- 5 dissolved in water in about 10% volume to volume of the alcohol, stirring the mixture for about 15 minutes or for a period of time enough for mixing, adding formaldehyde dropwise over about 30 minutes or over a period of time required for gradual addition with constant stirring maintaining temperature to around 60°C for about 1 to 6 hours or for a period until the reaction is complete,
- iv. thereafter allowing the reaction mixture to cool down to room temperature,
- 10 v. recovering the product, washing the solids with aqueous methanol or another aqueous polar alcohol and recovering a Sixth Composition in suspension,
- vi. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Sixth Composition that
- 15 may be washed with 100 ml 90% methanol and air dried,
- e. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min, heating the said mixture to about 60°C, adding
- 20 Phosphorus acid (H_3PO_3) dissolved in water and adding drop-wise to this mixture by stirring, adding formaldehyde about equal in weight to the dry weight of activated chitosan or its derivative in drop-wise manner maintaining the temperature between about 60 – 65°C, preferably at 63°C, for a period of time preferably to 2 – 6 hours
- 25 after the addition is complete, allowing the suspension to cool and

000231

5 recovering the Seventh Composition in suspension, and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Seventh Composition; the said Seventh Composition may be soluble in the broad range of pH 7 to 10 giving slightly turbid to clear solutions,

10 f. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min, heating the mixture to 60°C, adding formaldehyde 750 ml over a period of few minutes, adding and about 10% of inorganic acid or Phosphorus acid (H_3PO_3) dissolved in water and added drop-wise to this mixture by stirring for about one hour or over a period of time required for effective mixing, maintaining the temperature between 60 – 65°C and preferably at 63°C for about six hours or for a period of time required for completion of the reaction, 15 allowing the suspension to cool after the addition is complete and recovering the Eighth Composition in suspension,

20 i. and either (I) recovering the said composition with or without drying, or (II) subjecting to reacting further with a reagent to get a further derivative of the said Eighth Composition,

g. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing well by stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100 rpm for 30 min, heating the mixture to 60°C, adding formaldehyde over a period of few minutes, adding about 10% inorganic acid or 25 Phosphorus acid (H_3PO_3) dissolved in water and added drop-wise to

000232

5 this mixture by stirring for about 1 hour or over a period of time
required for effective mixing, maintaining the temperature between
60 – 65°C and preferably at 63°C for 6 hours or for a period of time
required for completion of reaction after the addition is complete,
allowing the suspension to cool, recovering the suspension as dry
powder, resuspending in 20 volumes of 90% methanol, and 2
volumes of concentrated HCl or any other organic or inorganic acid,
stirring the mixture at room temperature for one hour or for a period
of time required for good mixing, filtering out, washing with 20 vol
10 90% methanol and drying to recover Ninth Composition,

- h. suspending chitosan in alcohol preferably in 20 volumes, mixing
well by stirring to achieve activation of chitosan, preferably at 100
rpm for 30 min, heating the said mixture to 70°C,
- 15 i. adding Succinic anhydride (in different proportions ranging
from 15 g to 0.1 gm) to this mixture, stirring for one hour or
for a period of time required for good mixing, maintaining
the temperature between 60 – 70°C and preferably at around
65°C for 1 hour or for a period of time required for the
reaction, allowing the suspension to cool to get a succinic
20 derivative,
- ii. adding Lactic or another acid about 10% of the dry weight of
the succinic derivative, and per 5 gram dry weight of succinic
derivative used adding enzyme for deacylation about 4000
I.U, stirring the mixture for a period of time, preferably for 7
25 hours, adding further chitinolytic enzyme 500 I.U. per 5

000233

gram dry weight of succinic derivative used and continuing stirring for a period of time, preferably for 1 hour, allowing the suspension to cool to get solid Fifth Composition,

iii. recovering and air drying the Fifth Composition,

5 iv. dissolving the Fifth Composition to make a 1% solution in water, adding an aqueous solution of copper sulfate or another charged molecule, capable of adsorbing on the Fifth Composition in alkaline pH, as a solution,

10 v. the said solution of copper sulfate or the charged molecule that may be 1% with respect to water,

vi. the said solution of copper sulfate or the charged molecule being taken in a small quantity, about 1% of the volume of water taken for dissolving Fifth Composition and

vii. mixing for few minutes,

15 viii. adding liquid ammonia to precipitate chitosan with the bound copper sulfate or another charged particle to get a derivative of Tenth Composition

20 7. A composition comprising at least one of the compositions of claim 4 or 5 or 6 as an essential ingredient or as a carrier of a functional group or a functional / active molecule up to the site of its action.

8. A composition of claim 7 comprising a powder of or a solution of at least one of the said compositions in water in an effective concentration for a desired action that comprises:

a. preservation of for and on fruits, vegetable, ingestible foods and feeds,

000234

- b. delayed ripening, delayed ageing and delayed senescence of natural products including fruits, vegetable and flowers,
- c. functioning as a carrier for delivery of an active molecule or a functional group to a site of its action.

5

9. A composition of claim 8 comprising at least one of the following:

- a. the said composition comprises at least any one of the said First Composition of claim to the said Tenth Composition or a mixture thereof,
- b. the said effective concentration is around 0.1 %,
- c. the acetic acid is 2%.

10

10. A chitinolytic enzyme having proteolytic as well as chitinolytic action, having a molecular weight of 50 Kilo Daltons on SDS-PAGE electrophoresis.

11. An enzyme of claim 10 having at least one of the following properties:

15

- a. an optimum chitinolytic activity at pH 2,
- b. an optimum chitinolytic activity at temperature of 80°C

12. A proteo-chitinolytic enzyme of claim 10 prepared from *Aspergillus niger* MTCC 5572 or mutants derived from the same.

13. A process of preparing an enzyme of claim 14 comprising the steps of:

20

- a. growing *Aspergillus niger* MTCC or mutants derived from the same.--
— under shake flask conditions in casein yeast extract medium,
- b. recovering crude proteo-chitinase enzyme by ammonium sulfate precipitation.

000235

14. A process of claim 13 further comprising purification of crude enzyme from *Aspergillus niger* MTCC 5572 or mutants derived from the same by the steps of:

- 5
- a. dissolving the said crude enzyme concentrated by ammonium sulfate precipitation in phosphate buffer pH 7.0,
 - b. subjected the same to Gel filtration using Sephadex® G-100,
 - c. collecting fractions,
 - d. subjecting the fractions for assay for protein content and enzyme activity,
 - 10 e. collecting and pooling up fractions corresponding with a single protein peak.

15. Isolated culture of *Aspergillus niger* MTCC 5572 or mutants derived from the same.

15 16. A process of improving shelf life of fruits comprising a treatment of dipping, spraying, fogging or another process of external or internal application or applications to cut or processed fruits and processed natural products of a composition comprising one or more of a composition of claim 4 or 5 or 6 as an essential ingredient.

20 17. A process of claim 16 wherein the said treatment is for slowing down ripening and/or microbial spoilage.

18. A process of claim 16 wherein the said fruit is banana, mango, apple, strawberry, orange, lime.

19. A process of claim 1 wherein :

- a. the said alcohol is methanol or any other polar alcohol,

000236

b. the said stirring is done for 30 min, preferably at 100 revolution per minute.

- 5 20. A process of claim 3 or claim 6 wherein the said chitinolytic enzyme having proteolytic as well as chitinolytic action comprises an enzyme having at least one of the following properties: a molecular weight of 50 kilo daltons (KD) on SDS-PAGE electrophoresis, an optimum chitinolytic activity at pH 2 and an optimum chitinolytic activity at temperature of 80°C.
21. A process of claim 20 comprising the said chitinolytic enzyme isolated from *Aspergillus niger* MTCC 5572 or mutants derived from the same.
- 10 22. A process of claim 3 or claim 6 comprising the said deacetylating enzyme isolated from *Bacillus sp* MTCC 5571 or mutants derived from the same.
23. A process of claim 3 or claim 6 wherein the said deacetylating enzyme is a xylan acyl transferase prepared from *Bacillus sp* MTCC 5571 or mutants derived from the same, or any other bacterium or any other microorganism capable of producing the enzyme having deacetylating activity.
- 15 24. A process of claim 1 wherein a thermostable chitinolytic enzyme having a proteolytic as well as chitinolytic activity, a proteo-chitinase, is used for making a hydrolysed derivative.
25. A process of claim 24 wherein the said proteo-chitinase is prepared from *Aspergillus niger* MTCC 5572 or mutants derived from the same or any other fungus or any other microorganism capable of producing a proteo-chitinolytic activity.
- 20 26. A process of claim 25 wherein the said chitinolytic enzyme has a molecular weight on SDS_PAGE of about 50 Kilo Daltons, optimum chitinolytic activity at pH 2 and at 80°C.
- 25

000237

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un derivado de quitosano al activar quitosano, CARACTERIZADO porque comprende: suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar bajo calentamiento durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

a. dicho derivado tiene una propiedad que comprende: propiedad antimicrobiana, o microbiostática, o antitranspirante, o antifúngica, o propiedad como conservante de frutas o microbiostático, o propiedad que mejora la vida útil, o una combinación de las mismas; y

b. dichas fuerzas físicas incluyen adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicha quitina activada o dicho quitosano activado suspendidos en dicho alcohol a al menos uno de los siguientes pasos:

a. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

000238

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre a aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición,

b. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido en aproximadamente 10% al 20% del peso en seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora, filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es

000239

soluble en agua;

c. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar y mantener dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, además agregar una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I. por 5 g en peso en seco de derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

d. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar la mezcla a una temperatura entre

000240

aproximadamente 60 °C y aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe, para obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, y calentar y mantener la temperatura en todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua en aproximadamente 10% de volumen respecto del volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario

000241

para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período hasta que se complete la reacción,

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y secar al aire;

e. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar dicha mezcla a aproximadamente 60 °C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregar a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco del quitosano activado o su derivado en forma de gotas manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un

000242

derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones ligeramente turbias a transparentes;

f. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído 750 ml en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para completar la reacción, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

g. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado

000243

efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar para recuperar la Novena Composición;

h. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a 70 °C, y

i. agregar anhídrido succínico (en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0,1 g) a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

ii. agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente

. 000244

durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, en donde

v. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada puede ser del 1% con respecto al agua,

vi. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada se toma en una cantidad pequeña, aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver la Quinta Composición,

vii. mezclar durante pocos minutos, y

viii. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

4. Un derivado de quitosano producido al activar quitosano CARACTERIZADO porque comprende los pasos de: suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar con calentamiento durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o

000245

fuerzas químicas para preparar un derivado.

5. Un derivado de quitosano de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dicho derivado tiene una propiedad que comprende una propiedad antimicrobica, o microbiostática, o antitranspirante, o antifúngica, o conservante de frutas, o una combinación de las mismas.

6. Un derivado de quitosano de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicha quitina activada o dicho quitosano activado suspendidos en dicho alcohol a al menos uno de los siguientes pasos:

a. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un periodo de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre aproximadamente 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición;

b. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a una proporción de aproximadamente 10% en peso del material en crudo a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un periodo de

. 000246

tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de aproximadamente 60 a 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- para obtener un derivado succínico en suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe a aproximadamente 30 °C, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% a 20% del peso en seco del derivado succínico, agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora, filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es soluble en agua;

c. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol, calentar manteniendo dicha mezcla a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 aproximadamente y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% en peso del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico

000247

usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica, con preferencia a aproximadamente 500 U.I., por 5 g en peso en seco de derivado succínico, continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

d. agregar agua a aproximadamente 20% de volumen de alcohol y, calentando la mezcla a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente

000248

durante 7 horas, agregar además una enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo, preferentemente durante 1 hora, permitir que la suspensión se enfríe, para obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien mediante agitación a 100 rpm durante 30 minutos, y calentar y mantener la temperatura en todo el proceso a 60 °C, agregar azúcar disuelto en agua a un volumen de aproximadamente 10% con respecto al volumen del alcohol, agitar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos o durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en aproximadamente 30 minutos o en un período de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 1 a 6 horas o durante un período de tiempo hasta que se complete la reacción,

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta

000249

Composición, que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y secar al aire;

e. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a aproximadamente 60°C, agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído aproximadamente igual en peso al peso en seco del quitosano activado o su derivado en forma de gotas manteniendo la temperatura entre aproximadamente 60 y 65 °C -preferentemente a 63 °C- durante un período de tiempo preferentemente de 2 a 6 horas una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones ligeramente turbias a transparentes;

f. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído 750 ml en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente una hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C

000250

-preferentemente a 63 °C- durante aproximadamente seis horas o durante un período de tiempo necesario para completar la reacción, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

g. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20 volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano, preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos, calentar la mezcla a 60 °C, agregar formaldehído en un período de pocos minutos, agregar aproximadamente 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o en un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C - preferentemente a 63 °C- durante 6 horas o durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en 20 volúmenes de metanol al 90% y 2 volúmenes de HCl concentrado o cualquier otro ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con 20 volúmenes de metanol al 90% y secar para recuperar la Novena Composición;

h. suspender quitosano en alcohol preferentemente en 20

000251

volúmenes, mezclar bien mediante agitación para alcanzar la activación del quitosano -preferentemente a 100 rpm durante 30 minutos- calentar dicha mezcla a 70 °C, y

i. agregar anhídrido succínico (en diferentes proporciones que abarcan desde 15 g hasta 0,1 g) a esta mezcla, agitar durante una hora o durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C -con preferencia a aproximadamente 65 °C- durante 1 hora o durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

ii. agregar ácido láctico u otro ácido a aproximadamente 10% del peso en seco del derivado succínico y, por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado, agregar enzima para desacetilación a aproximadamente 4000 U.I., agitar la mezcla durante un período de tiempo, preferentemente durante 7 horas, agregar además enzima quitinolítica a 500 U.I. por 5 gramos en peso en seco del derivado succínico usado y continuar agitando durante un período de tiempo -preferentemente durante 1 hora- permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua al 1%, agregar una solución acuosa de sulfato de cobre u otra molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, en donde

v. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula

000252

cargada puede ser del 1% con respecto al agua,

vi. dicha solución de sulfato de cobre o la molécula cargada es tomada en una cantidad pequeña, aproximadamente 1% del volumen del agua tomado para disolver Quinta Composición, y

vii. mezclar durante pocos minutos, y

viii. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con el sulfato de cobre unido u otra partícula cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

7. Una composición CARACTERIZADA porque comprende al menos una de las composiciones de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 ó 6 como ingrediente esencial o como portador de un grupo funcional/molécula activa hasta su sitio de acción.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque comprende un polvo o una solución de al menos una de dichas composiciones en agua en una concentración efectiva para una acción deseada que comprende:

a. conservación de, para y sobre frutas, vegetales, productos comestibles y alimentos,

b. retraso de la maduración, retraso del añejamiento y retraso de la senescencia de productos naturales, con inclusión de frutas, vegetales y flores,

c. funcionamiento como portador para llevar una molécula activa o un grupo funcional a su sitio de acción.

9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADA porque comprende al menos una de las siguientes características:

. 000253

a. dicha composición comprende al menos cualquiera de dicha Primera Composición a la decima Composición o una mezcla de las mismas,

b. dicha concentración efectiva es de aproximadamente 0,1%,

c. el ácido acético es del 2%.

10. Una enzima quitinolítica CARACTERIZADA porque tiene acción proteolítica así como también quitinolítica, y tiene un peso molecular de 50 kD sobre electroforesis SDS-PAGE.

11. Una enzima de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque tiene al menos una de las siguientes propiedades:

a. una actividad quitinolítica óptima a pH 2,

b. una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

12. Una enzima proteo-quitinolítica de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

13. Un proceso para preparar una enzima de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO porque comprende los pasos de:

a. cultivar *Aspergillus niger* MTCC o mutantes derivados de los mismos bajo condiciones de agitación en matraz en medio de extracto de levadura y caseína,

b. recuperar enzima proteo-quitinasa cruda mediante precipitación con sulfato de amonio.

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13,

000254

CARACTERIZADO porque además comprende la purificación de enzima cruda a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, mediante los pasos de:

a. disolver dicha enzima cruda concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio en tampón de fosfato a un pH de 7,0,

b. someter la misma a filtración en gel usando Sephadex® G-100,

c. recolectar las fracciones,

d. someter las fracciones a análisis del contenido proteico y la actividad enzimática,

e. recolectar y reunir las fracciones correspondientes a un único pico de proteína.

15. Cultivo CARACTERIZADO porque es aislado de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

16. Un proceso para mejorar la vida útil de las frutas CARACTERIZADO porque comprende un tratamiento de inmersión, aspersión, nebulización u otro proceso de aplicación o aplicaciones externas o internas a frutas trozadas o procesadas y productos naturales procesados de una composición que comprende una o más entre una composición de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 ó 6 como ingrediente esencial.

17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, CARACTERIZADO porque dicho tratamiento es para ralentizar la maduración y/o putrefacción microbiana.

18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16,

000255

CARACTERIZADO porque dicha fruta es plátano, mango, manzana, fresa, naranja, lima.

19. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

a. dicho alcohol es metanol o cualquier otro alcohol polar,

b. dicha agitación se realiza durante 30 minutos, preferentemente a 100 revoluciones por minuto.

20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica que tiene acción proteolítica así como también quitinolítica comprende una enzima que tiene al menos una de las siguientes propiedades: un peso molecular de 50 kD (kilo Dalton) sobre electroforesis SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

21. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque comprende dicha enzima quitinolítica aislada de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

22. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es aislada de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma.

23. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es xilán acil transferasa preparada a partir de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma, o

000256

cualquier otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz de producir la enzima que tiene actividad de desacetilación.

24. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se usa una enzima quitinolítica termoestable que tiene actividad proteolítica así como también quitinolítica, la proteo-quitinasa, para formar un derivado hidrolizado.

25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24, CARACTERIZADO porque dicha proteo-quitinasa es preparada a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, o cualquier otro hongo o cualquier otro microorganismo capaz de producir una actividad proteo-quitinolítica.

26. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 25, CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica tiene un peso molecular sobre SDS-PAGE de aproximadamente 50 kD, actividad quitinolítica óptima a pH 2 y a 80 °C.

000257

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SAVANGIKAR, Vasant Anantro
Krishna & Saurastri Associates
74/F, Venus Worli Sea Face
Mumbai 400 018
Maharashtra
INDE

Date of mailing (day/month/year) 09 December 2011 (09.12.2011)	
Applicant's or agent's file reference	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IN2010/000458	International filing date (day/month/year) 07 July 2010 (07.07.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address CAMLIN FINE CHEMICALS LIMITED Camlin Fine House Plot No F/11 & F/12 Wicel, Midc, Marol, Central Road Andheri (East) Mumbai 400 093 India	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address CAMLIN FINE SCIENCES LIMITED Camlin Fine House Plot No F/11 & F/12 Wicel, Midc, Marol, Central Road Andheri (East) Mumbai 400 093 India	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

- ☐
- the receiving Office
-
- ☐
- the International Searching Authority
-
- ☐
- the Authority(ies) specified for supplementary search

- ☐
- the International Preliminary Examining Authority
-
- ☒
- the designated Offices concerned
-
- ☐
- the elected Offices concerned
-
- ☐
- other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 70 90	Authorized officer Clemente Rodolfo e-mail pt01.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 01
---	--



No. 12-021203- -00000-0000

- Fecha: 2012-02-07 15:21:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UT

Tra. 11 PATENTEIYII Folios: 258
Act. 411 PRESENTACION

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐