

56.007/SZE

KIVONAT

**Eljárás bioszintetikus peszticideket tartalmazó készítmények
előállítására és a kapott készítmények alkalmazása**

Bejelentő: NOVO NORDISK A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK91/00213

A nemzetközi bejelentés napja: 1991.07.18.

Elsőbbsége: 1990.07.23. /9000738/ BELGIUM

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/01383

A találmány tárgya: eljárás a Bacillaceae családba tartozó mikroorganizmusokból kinyert bioszintetikus peszticid termékeket és legalább tanninsavat tartalmazó készítmények előállítására. A kapott készítmények rovarok ellen hatásosan alkalmazhatók.

fül. d. l. r. k.
B. l. c. m. Z. e. l. t.

1365/92

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY** - 1 -

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

192

72

NSZOG

ROIN 05/00, 03/02

05/00, 03/10

56.007/SZE

A

**Eljárás bioszintetikus peszticideket tartalmazó készítmények
előállítására és a kapott készítmények alkalmazása**

Bejelentő: NOVO NORDISK A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

Feltalálók: DETROZ René, OHAIN

CAPRASSE Michel, TILF

CHARMOILLE Lucien, BRÜSSZEL

BELGIUM

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK91/00213

A nemzetközi bejelentés napja: 1991.07.18.

Elsőbbsége: 1990.07.23. /9000738/ BELGIUM

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/01383

A találmány tárgya: eljárás a Bacillaceae családba tartozó mikroorganizmusokból kinyert bioszintetikus peszticid termékeket tartalmazó készítmények előállítására és a kapott készítmények alkalmazása.

Egy olyan eljárás, amely bioszintetikus peszticid termékeknek mikroorganizmusokból való kinyerésére irányul, általában a következő főbb lépésekből tevődik össze:

- a mikroorganizmus fermentálása tenyészet előállítására,
- e tenyészet kinyerése és
- a termék kikészítése pép, por, granulátum vagy krém alakban.

A tenyészet elkülönítése kényes lépés ebben az eljárásban. Ez a lépés, amely lényegében abból áll, hogy a tenyészet, a biomassza alakjában, és a fermentlevet elválasztjuk egymástól, egyik oka annak, hogy termékveszteség lép fel és általában alacsony kitermelés érhető el.

Ezenkívül a peszticid termék hatóanyaga érzékeny vegyület, biológiai szerkezete következményeként, amely könnyen denaturálódik, ha bizonyos körülményekre / ilyen különösen a hőmérséklet, a pH, az oldószerek és az adalékanyagok / nem ügyelünk.

A tenyészet kinyerése során megfigyelhető alacsony kitermelés különösen a következő tényezőknek tulajdonítható:

- a többé-kevésbé viszkózus tenyészet számos összetevőjének nehéz szétválaszthatósága,
- a szétválasztás során fellépő mechanikai hatások, amelyek a peszticid termék hatóanyagának bomlását és így a biológiai aktivitás csökkenését idézik elő,
- olyan hatásfokozó anyagok hozzáadása, amelyek befolyásolják a készítmény stabilitását és/vagy fizikai megjelenését /így a pép viszkozitását/, a pép vagy a kenőcs szegregálódását tárolás során és a készítmény vízben való diszper-

gálhatóságát.

Ezenkívül feltűnő biológiai aktivitás csökkenést figyelhetünk meg abban az esetben is, ha a készítményt pép alakban készítjük ki. Ez a kikészítési forma bizonyos esetekben előnyös, mivel elkerüli a szárítási lépést / amely kisebb-nagyobb mértékben károsítja a terméket és amely drága ugyan, de a hosszabb időtartamú tartósításhoz szükséges /.

A biológiai aktivitás kiszámítása során ténylegesen 30-50%-os különbség figyelhető meg a tenyészet és a pép biológiai aktivitása között, mimellett kisebb a különbség a pép szárításával kapott por és a tenyészet biológiai aktivitása között. Ezért feltehető, hogy a pép biológiai aktivitása nem teljesen hozzáférhető.

A találmány olyan készítmények előállítására irányul, amelyek mentesek az előbbi hátrányoktól. Közelebbről a találmány tárgya: eljárás a lehetséges maximális biológiai aktivitású készítmények gazdaságos módon való előállítására, azaz a kitermelés és a biológiai aktivitás csökkenés minden szinten való elkerülése / mind kvantitatív, mind kvalitatív vonatkozásban /, mimellett a készítmény stabil és megfelelő fizikai megjelenésű. Azt is megfigyeltük, hogy a találmány szerinti készítmények különlegesen magas biológiai aktivitásúak.

E cél elérése érdekében a találmány szerinti eljárás - a Bacillaceae családba tartozó mikroorganizmusokból kapott bioszintetikus peszticid termékeket és tannint vagy egy tannin-származékot tartalmazó készítmények előállítására - a következő lépésekből áll:

i) a mikroorganizmust táptalajban tenyésztjük, nagymenyiségű mikroorganizmust tartalmazó tenyészet előállítására /1. lépés/,

ii) a kapott tenyészethez tannint vagy egy tannin-származékot adunk /2. lépés/,

iii) a tannint vagy tannin-származékot tartalmazó tenyészetből eltávolítjuk a vizet, pép előállítására /3. lépés/ és

iv) az így kapott pépet kikészítjük /4. lépés/.

A találmány szerinti kitűntetett eljárás szerint a második lépésben tanninsavat adunk a tenyészethez.

A Bacillaceae családból kinyerhető bioszintetikus peszticidek a betöményített készítményekben nagyon különböző formákban fordulhatnak elő. Néhány ilyen forma pl.:

- maguk az organizmusok, fejlődésük valamely fázisában, ideértve a lehetséges vegetatív alakokat, eredeti formában, a tenyészközeggel együtt; teljesen vagy részlegesen lizált alak; teljesen vagy részlegesen spórás alak; olyan alak, amelyből a spórákat valamely módon, pl. bakteriális autolízissel teljesen vagy részlegesen kiszabadítottuk, vagy az organizmusok által spontán kiválasztott termék / pl. exotoxinok /; az ilyen organizmusokból bármely ismert módon - ideértve a szóbanforgó organizmus lizisét - extrahált termék /pl. endotoxinok /; olyan termékek, amelyeket az organizmus fejlődése bizonyos fázisaiban kiválaszthat /adott esetben spórákkal kevert kristályok vagy endotoxinok/ vagy egyidejűleg több ilyen különböző forma.

Ezek a különböző alakok a fermentléből származó maradé-

kokkal keveredhetnek. Jó eredményeket értünk el olyan keverékekkel, amelyek a spórákat, a kristályokat vagy az endotoxinokat és esetleg a baktériumnak a spórázási folyamat végén bekövetkező autolizise során spontán képződő exotoxinokat tartalmazzák. Egy ilyen keverék a spórák, az ezekkel adott esetben összefüggő kristályok és a lehetséges exotoxinok mellett sejteket vagy sejttörmeléket, valamint a tenyésztéshez alkalmazott táptalaj maradék szilárd komponenseit tartalmazhatja.

A Bacillaceae családba tartozó, bioszintetikus peszticidek forrásaként általában igen alkalmas mikroorganizmusok a *Bacillus* nem képviselői, így a *Bac. thuringiensis*, *Bac. sphaericus*, *Bac. popilliae*, *Bac. cereus*, *Bac. larvae*, *Bac. lentimorbus*, *Bac. fribourgiensis* és a *Bac. penetrans* /*Pasteuria*/.

Jó eredményeket értünk el valamennyi szerotípusba sorolt *Bac. sphaericus* és *Bac. thuringiensis* esetében, ideértve a genetikai transzformáció eredményeként kapott baktériumokat, közelebbről az 1a, 2a2b, 2a2c, 5a5b, 6, 25, 26a26b, 26a26c szerotípusba sorolt *Bac. sphaericus*-szal és az 1, 3a, 3a3b, 4, 6, 7, 8a8b, 9, 10 és 14 szerotípusba sorolt *Bac. thuringiensis*-szel.

A legjobb eredményeket a következőkkel kaptuk:

- *Bac. sphaericus* 5a5b és 25 szerotípus és
- *Bac. thuringiensis* 1 szerotípus /*thuringiensis* fajta/, 3a3b szerotípus /*kurstaki* fajta/, 6 szerotípus /*subtoxicus* és *entomocidus* fajta/, 7 szerotípus /*aizawai* fajta/, 8a8b szerotípus /*morrisoni* fajta/ és 14 szerotípus /*israeliensis*

fajta/.

A különböző *Bac. thuringiensis* és *Bac. sphaericus* féleségek a találmány szerinti készítményekben közvetlenül mikroorganizmusként, eredeti vagy lizált alakban, spóráként, endotoxinként vagy a spórákkal adott esetben összefüggő kristályként vagy több ilyen alakban lehetnek jelen. Ezek a különböző alakok a táptalaj maradékaival keveredhetnek. Jó eredményeket értünk el spórákat és kristályokat tartalmazó keverékek alkalmazásával / a kristályok spontán képződnek a baktérium autolizise során, a spórázás végső szakaszában /. Az ilyen keverékek a spórák és az adott esetben a spórákkal összefüggő kristályok mellett sejteket vagy sejttörmeléket, valamint a tenyésztéshez alkalmazott táptalaj szilárd komponenseinek maradékát tartalmazhatják.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények alakjára jellemző, hogy azokban a bioszintetikus peszticid termékek szilárd részecskék alakjában egy folyadékban szuszpendálva, vagy szilárd alakban / pl. porként vagy granulátumként / vannak jelen.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények ezenkívül különböző egyéb adalékokat is tartalmazhatnak, amelyek minősége és funkciója a készítmények felhasználása függvénye és amelyek a szakember számára ismertek.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények ugyancsak tartalmazhatnak a bioszintetikus peszticid előállításából származó maradékokat.

Ha a találmány szerinti készítmények folyadékban szuszpendált anyagként vannak jelen, ezek a szuszpenziók általá-

ban 10 - 45 tömeg% és leggyakrabban 15 - 40 tömeg% bioszintetikus peszticid terméket tartalmaznak. A folyadék közömbös kell, hogy legyen a bioszintetikus peszticid vonatkozásában: különösen nem fordulhat elő, hogy ez inaktiválja a peszticideket vagy kicsapódást vagy bármely más fizikai elváltozást idézzen elő. A folyadék egyetlen oldószer vagy egy oldószer-elegy lehet. Az oldószer általában vizet tartalmaz.

Jó eredményeket értünk el abban az esetben, amikor az oldószer legalább 80 tömeg% és leginkább legalább 95 tömeg% vizet tartalmazott. A találmány szerinti készítményben jelenlevő folyadékot általában lényegében víz alkotja.

A második lépésben a tannin vagy tannin-származékok szükséges mennyisége általában 0,05 - 4 tömeg% a tenyészet tömegére vonatkoztatva; ez az érték rendszerint 0,1 - 3% és előnyösen 0,25 - 2%.

A harmadik lépést, amely a tenyészet vízmentesítéséből áll, a víz eltávolítására szokásosan alkalmazott módszerekkel hajtjuk végre, amilyen a centrifugálás, ultraszűrés, kicsapás, valamely nem-oldószer / pl. aceton / hozzáadása, szűrés vagy kicsapás; ily módon pépet kapunk. Az előnyösen alkalmazott módszer a centrifugálás és/vagy az ultraszűrés.

Ehhez a péphez ezután, a kikészítés során, hozzáadjuk a lehetséges adalékanyagokat.

A *Bac. thuringiensis* és a *Bac. sphaericus* esetében a tenyésztést pl. a spórázási fázis végén állítjuk le.

Egy másik eljárás abból áll, hogy a spórázási fázis végén a bioszintetikus pesztideket termelő mikroorganizmusok fermentlevéből elkülönítjük az endotoxinban vagy a spórákban

vagy mindkét ilyen termékben dús frakciókat. Ezeket a frakciókat a továbbiakban ugyanazokkal a módszerekkel kezeljük, amelyeket a pépek kezelésével kapcsolatban említettünk.

A találmány szerinti készítmények száraz por alakjában való előállítására az előbbiek szerint kapott pépet a szokásos módon / amilyen pl. a porlasztva szárítás, fagyasztva szárítás vagy dobszáritás / szárítjuk olyan szilárd részecskék előállítására, amelyek általában 12%-nál / és előnyösen 7%-nál / kevesebb vizet tartalmaznak.

Egy másik eljárás abból áll, hogy a péphez szárítás előtt adjuk hozzá a lehetséges adalékanyagokat, majd elvégezzük a szárítást, valamelyik említett eljárás alkalmazásával.

A találmány szerinti készítmények szuszpenzió alakban való előállítására a szilárd peszticid részecskéket egy folyadékfázisban diszpergálhatjuk, amely előnyösen vizet, továbbá a tannint vagy a tannin-származékokat, valamint az egyéb lehetséges adalékanyagokat tartalmazza, krémszerű anyag képződése közben.

A készítmények alkalmazási eljárása ugyancsak a találmány tárgyát képezi.

A találmány szerinti készítmények peszticidekként, közelebbről olyan szerekként alkalmazhatók, amelyek alkalmasak a rovarok bármely fejlődési fázisban való elpusztítására. Ennek érdekében a készítményeket permetezéssel felvisszük a fertőzött felületekre, növényekre, folyóvizekre, patakokra és bármilyen vízfelületre. Erre a célra bármely ismert módszer alkalmazható, amilyen a kézi permetezés, mechanikai permetezés és különösen a levegőből való permetezés. A

permetezés különösen rovarokkal, közelebbről a Lepidopter, Dipter, Coleopter, Aphanipter, Orthopter, Isopter és Homopter félékkel fertőzött felületekre irányítható.

Az alkalmazandó dózis függ a felhasznált bioszintetikus peszticid tulajdonságaitól és az elpusztítandó célorganizmustól.

A Bac. thuringiensis és a Bac. sphaericus esetében általában 50 - 5000 g szilárd részecske/hektár mennyiséget permetezünk ki. A találmány szerinti készítményeket, ha szuszpenzió alakúak, közvetlenül permetezhetjük. De ezeket diszpergálhatjuk, hígíthatjuk vagy emulgeálhatjuk is valamely hígítóval, pl. vízzel vagy egy szerves hígítóval. Ebben az esetben a hígítás mértéke 1:300, rendszerint 2-120 és előnyösen 4-60 térf./térf. hígítószer.

A következő példák a találmány szemléltetésére szolgálnak.

1. példa

450 g szójalisztet / fehérjetartalom kb. 52% /, 250 g hidrolizált keményítőt, 20 g KH_2PO_4 -t, 20 g K_2HPO_4 -t, 3,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -t, 0,12 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t, 0,14 g ZnSO_4 -t, 0,2 g $\text{Fe}_2/\text{SO}_4/3$ -t, 1,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t és 10 liter vizet beadagolunk egy keverővel, pH-csővel, oxigén-csővel és levegőztetőrendszerrel felszerelt, sterilizálható 15 literes BIOLAFFITE fermentorba.

Ezt a táptalajt kevertetve homogenizáljuk, majd a pH-t 7-re állítjuk be.

A táptalajt 30 percen át 120°C -on sterilizáljuk.

A táptalajt 30°C-ra lehűtjük és sterilen beoltjuk 1 liter növekedési fázisban levő *Bac. thuringiensis* 14 szerotípus /israeliensis fajta/ tenyészzettel.

A fermentort 450 ford./perc sebességgel kevertetjük és 0,4 térf.levegő /térf.fermentlé sebességgel levegőztetjük.

32 óra múlva a *Bac. thuringiensis* részlegesen lizált spórás baktérium alakjában van jelen. Ez a tenyészet $1,1 \times 10^9$ /ml spórát tartalmaz, pH-ja 7,5 és a szárazanyag-tartalom 3 g/liter.

A tenyészet inszekticid aktivitását *Aedes aegypti* felhasználásával határozzuk meg, H. d Barjac-I. Larget biológiai titrálós módszerével / WHO-VBC-79.774 /. Ez az érték 300 egység/ml $\pm 20\%$.

Az így kapott termékhez 2 ezredrész mennyiségű porított citromsavat adunk.

A keverék pH-ját foszforsav hozzáadásával 4-re állítjuk be.

500 g így kapott termékhez 5 g tannint / TANIN PB5^R, PHARMACHEMIC cég, tanninsav-tartalom 99% / adunk.

A kapott termék inszekticid aktivitása - a mérési hiba határai között - azonos a tenyészetével. A hozzáadott savak és a tannin tehát nem toxikus a célrovarokra nézve.

A terméket centrifugálással betöményítjük. Így kb. 12% szárazanyagot tartalmazó pépet kapunk.

Ennek a pépnek az inszekticid aktivitása 2800 egység/mg $\pm 20\%$.

Ez a pép folyékony és az időben stabil.

2R /összehasonlító/ példa

Az 1. példa szerint *Bac. thuringiensis* szerotípus 14 tenyészetet állítunk elő. Az 1. példában leírtakkal azonos módon - azzal az eltéréssel, hogy tannint nem adagolunk - pépet állítunk elő.

A kapott pép inszekticid aktivitása 1500 egység/mg $\pm$ 20%.

A találmány szerinti eljárásra vonatkozó 1. példa és a 2R összehasonlító példa eredményeinek összevetése arra mutat, hogy tanninsavnak a tenyészethez a centrifugálás előtt való hozzáadása lehetővé teszi a szétválasztás megkönnyítését, a centrifugálás kitermelésének javítását és a termék hatóanyag-tartalmának hozzáférhetőbbé tételét.

3R / összehasonlító/ példa

Az 1. példában leírtak szerint *Bac. thuringiensis* 14 szerotípus tenyészetet állítunk elő. Ezután az 1. példában leírt módon pépet állítunk elő, azzal az eltéréssel, hogy a tannint 0,1% szilikagéllal / AEROSIL R^R, DEGUSSA cég / helyettesítjük.

A kapott pép inszekticid aktivitása 1300 egység/mg $\pm$ 20%.
A pép kompakt és vízben nem diszpergálható.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a Bacillaceae családkhoz tartozó mikroorganizmusokból származó bioszintetikus peszticid termékeket és tannint vagy egy tannin-származékot tartalmazó készítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy

- a mikroorganizmust - bőséges tenyészet előállítására - táptalajban tenyésztjük,

- a kapott tenyészethez tannint vagy egy tannin-származékot adunk,

- a tannint vagy a tannin-származékot tartalmazó tenyészetből - pép előállítására - eltávolítjuk a vizet és

- az így kapott pépet formázzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy tanninsavat adagolunk.

3. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy Bac. thuringiensis vagy Bac. sphaericus típusú mikroorganizmusokat tenyésztünk.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tenyészet tömegére vonatkoztatva 0,005 - 4 % tannint vagy tannin-származékot adunk a tenyészethez.

5. Eljárás rovarirtásra, azzal jellemezve, hogy az 1.-4. igénypontok bármelyike szerint előállított készítményt a fertőzött felületre permetezzük.

12 oldal + 0 ábrák
Kétszeres

A meghatalmazott:

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.O. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664