(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
27 de diciembre de 2018 (27.12.2018) WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/234599 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2018/070369

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de mayo de 2018 (22.05.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201730818 21 de junio de 2017 (21.06.2017) ES

(71) Solicitante: **FUNDACION UNIVERSITARIA SAN PABLO** [ES/ES]; C/ Isaac Peral nº 58, 28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: **GUTIERREZ ALBANCHEZ, Enrique**; C/ Isaac Peral nº 58, 28040 Madrid (ES). **GUTIERREZ MAÑERO, Francisco Javier**; C/ Isaac Peral nº 58, 28040 Madrid (ES). **LUCAS GARCIA, Jose Antonio**; C/ Isaac Peral nº 58, 28040 Madrid (ES). **RAMOS SOLANO, Beatriz**; C/ Isaac Peral nº 58, 28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **FUENTES PALANCAR, José Julian**; C/ Bravo Murillo,9 - 48, 28015 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciónes según la Regla 4.17:
— *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))*

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
— *con (una) indicación(es) relativa(s) a material biológico depositado en virtud de lo dispuesto en la Regla 13bis, aparte de la descripción (Reglas 13bis.4(d)(i) y 48.2(a)(viii))*

(54) Title: BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS QV15 STIMULANT FOR THE SECONDARY METABOLISM OF PHENOLIC COMPOUNDS AND THE INHIBITORY CAPACITY OF RASPBERRY AND STRAWBERRY EXTRACTS FOR ENZYMES RELATED TO METABOLIC SYNDROME

(54) Título: BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS QV15 ESTIMULANTE DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y DE LA CAPACIDAD INHIBIDORA DE LOS EXTRACTOS DE FRAMBUESA Y FRESA SOBRE LOS ENZIMAS RELACIONADAS CON EL SÍNDROME METABÓLICO

(57) Abstract: Bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), a microorganism from the group of Gram + bacteria, genus *Bacillus*, a stimulant for the secondary metabolism of phenolic compounds, enhancer of the extracts from raspberry and strawberry fruit and leaf for the enzymes related to regulation of blood glucose (alpha-glucosidase), hypertension (angiotensin-converting enzyme, ACE) and inflammation (cycloxygenase, COX2). This strain has been isolated from the rhizosphere of *Pinus pinea*, in nutrient agar (PCA), and has been characterised from a morphological, biochemical and genetic point of view by sequencing of the 16s gene. It can be used to enhance the properties of the extracts as regards the application thereof to enzymes related to metabolic syndrome, or in order to modify secondary metabolism to enhance phenolic compounds in plant species of agronomic, pharmacological and food interest, and to obtain a greater quantity of active substances and/or novel foods with a standardised phenol content.

(57) Resumen: Cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Bacillus*, estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos, mejorador de los extractos de fruto y hoja de frambuesa y fresa sobre las enzimas relacionadas con la regulación de la glucosa en sangre (alfa glucosidasa), hipertensión (enzima convertidora de angiotensina ACE), e inflamación (cicloxigenasa COX2). Esta cepa ha sido aislada a partir de la rizosfera de *Pinus pinea*, en agar nutritivo (PCA), y ha sido caracterizada desde el punto de vista morfológico, bioquímico y genético mediante secuenciación del gen 16s. Puede ser utilizada con objeto de mejorar las propiedades de los extractos con respecto a su aplicación sobre enzimas relacionadas con el síndrome metabólico, o con el fin de modificar el metabolismo secundario para mejorar los compuestos fenólicos en especies vegetales de interés agronómico, farmacológico y alimentario, y obtener mayor cantidad de principios activos y/o nuevos alimentos con un contenido estandarizado en fenoles.

WO 2018/234599 A1

DESCRIPCION

Bacillus amyloliquefaciens QV15 estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos y de la capacidad inhibidora de los extractos de frambuesa y fresa sobre los enzimas relacionadas con el síndrome metabólico.-

La presente invención se refiere a una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* (QV15, código interno del laboratorio) para su aplicación en plantas con el objeto de mejorar la síntesis de compuestos fenólicos del metabolismo secundario con interés agronómico, farmacológico y nutricional, concretamente, mejorar la coloración en frutos de fresa y frambuesa, además de mejorar las propiedades de los extractos de frambuesa y fresa sobre el efecto de inhibición sobre alfa glucosidasa, ACE y COX2 para mejora de los síntomas o prevención del síndrome metabólico.

Esta cepa, que cuando se aisló se la asignó la referencia interna L81, ha sido depositada con fines de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con fecha 31 de mayo de 2017, donde se le ha asignado el número 9371. La CECT tiene su sede en el edificio de investigación de la Universidad de Valencia, sito en el campus de Burjassot (DP 46100 – Valencia, España).

Esta cepa bacteriana puede servir de base para la preparación de diferentes tipos de productos estimulantes del metabolismo secundario de plantas~~.~~ de interés agronómico, farmacológico y alimentario, y obtener mayor cantidad de principios activos y/o nuevos alimentos con un contenido estandarizado en fenoles, como frutos del bosque (fresas y frambuesas) con mayor contenido en compuestos fenólicos, concretamente antocianos, mejorando la coloración y ºBrix. Estos productos mejorarán el contenido en bioactivos de naturaleza fenólica que puedan constituir principios activos de diversos medicamentos, mejorar la calidad de ciertos alimentos. Además, se podrá utilizar para mejorar las propiedades de los extractos de fruto de mora, frambuesa y fresa sobre el efecto de inhibición sobre alfa glucosidasa y COX2 para mejora de síndrome metabólico.

CAMPO TECNICO.-

La invención se encuadra dentro de los campos de la biotecnología, la farmacología y los nuevos alimentos.

ESTADO DE LA TÉCNICA.-

Los mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se pueden resumir en dos tipos: directos, cuando los metabolitos producidos alteran el metabolismo de la planta (actividad hormonal, estimulación de los mecanismos defensivos..), e indirectos, cuando sintetizan compuestos que facilitan la captación o movilización de nutrientes o evitan el crecimiento de microorganismos patógenos sin implicar a la planta, sin alterar el metabolismo de la planta.

En este caso resulta de interés uno de los mecanismos directos, es decir, los que alteran el metabolismo de la planta. La planta posee un metabolismo secundario, altamente inducible, relacionado con la defensa de la planta y adaptaciones a situaciones adversas, a las que tiene que hacer frente. Dentro de este metabolismo secundario se encuentra el metabolismo de compuestos fenólicos, que además de estar relacionados con la defensa de la planta, son de interés para la salud humana, tanto cuando se consumen alimentos de origen vegetal que los contienen de forma natural, como los extractos vegetales dedicados a suplementos nutricionales. También son importantes como fuente de principios activos para la obtención de medicamentos. La fuente de esqueletos carbonados para nutrir el metabolismo secundario es la fotosíntesis, y cualquier mecanismo que afecte a este proceso, afectará la salud de la planta.

Bacillus amyloliquefaciens pertenece al grupo de las bacterias Gram +. El género *Bacillus* es común entre bacterias del suelo, y pueden ser patógenos oportunistas en animales y patógenos de plantas. Siguiendo la taxonomía del Manual Bergeys, edición marzo de 2001, esta bacteria se encuadra dentro del Dominio Bacteria, Phylum Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Bacillales, Familia Bacillaceae, Género *Bacillus*, Especie *B.amyloliquefaciens*. El género *Bacillus* es muy común en el sistema edáfico, y se ha descrito en repetidas ocasiones como bacteria protectora frente a distintas enfermedades de plantas. Pueden producir sideróforos no fluorescentes de tipo catecol, que, entre otras funciones, actúan como moléculas capaces de capturar el hierro del medio para el metabolismo del microorganismo La presencia de *Bacillus* sp. en la rizosfera de distintas plantas afecta de forma beneficiosa a su fisiología indicando que es muy posible su selección a nivel rizosférico.

Existen numerosas referencias en la literatura científica que citan a cepas del género *Bacillus* como capaces de realizar numerosas actividades de interés en el

campo de la biotecnología, agricultura, y fitopatología. En el campo de la biotecnología, existen estudios i) sobre su papel como indicadores biológicos para la esterilización, en los estudios de biodefensa, ii) sobre su influencia sobre el metabolismo primario de la planta incrementando su crecimiento y producción, iii) como agentes de desinfección, iv) como agentes antimicrobianos por su capacidad para producir moléculas antimicrobianas de tipo policétido o lipopéptido. En el campo de la agricultura y fitopatología existen numerosas referencias sobre la capacidad de *Bacillus amyloliquefaciens* para inducir las defensas vegetales de la planta; por otra parte, existen cepas capaces de producir quitinasas y glucanasas, protegiendo directamente frente a los hongos *Alternaria* y *Fusarium.* Existen también referencias sobre cepas del genero *Bacillus* capaces de proteger frente a estrés salino y frente al patógeno foliar *Pseudomonas syringae* DC3000 (Barriuso et al, 2008 Phytopathology), pero ninguna de *Bacillus amyloliquefaciens*. Por último, no existe ninguna cepa de *Bacillus,* ni de *Bacillus amyloliquefaciens* para modular la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, flavonoides y antocianos, aumentando la concentración de polifenoles, concretamente flavonoles y antocianos.

Por otra parte, es ampliamente conocido que los extractos de origen vegetal ricos en flavonoides, antocianos y otros compuestos fenólicos, presentan un alto poder antioxidante beneficioso para la salud. Extractos procedentes de especies de arándano se han citado frecuentemente como productos saludables por su capacidad antioxidante, prevención neurodegenerativa, evitar pérdida de masa ósea, prevención coronaria y efectos anticancerosos. También los extractos de bayas, tanto bayas salvajes como especies comerciales se han relacionado con la actividad hipoglucémica, inhibición de la adipogénesis, mejora de los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, capacidad antiinflamatoria y capacidad para inducir saciedad y contrarrestar el sobrepeso. Un artículo reciente de Lila, M.A. (Functional Foods in Health and Disease, 2011, 2:13-24 Page 13 of 24), discute el impacto de los bioflavonoides procedentes de bayas en biomarcadores del síndrome metabólico, asociados con las condiciones de diabetes, sobrepeso u obesidad y enfermedades cardiovasculares.

Dentro de este campo de los extractos de origen vegetal con cualidades beneficiosas para la salud, otros dos artículos recientes de investigadores de prestigio, Sharma, Kumar (Journal of Diabetology, June 2011; 2:4) y Kaume, Howard, Devareddy (J.10 Agric. Food Chem. 2012, 60, 5716–5727), reflejan bien el estado de la técnica

más próximo al objeto de la presente invención, en el sentido de que los frutos de la zarzamora (*Rubus* sp.var Loch Ness), por sus altos niveles en los referidos compuestos fenólicos, han sido relacionados, entre otras funciones, con la actividad hipoglucemiante, y la capacidad para inducir saciedad y contrarrestar el sobrepeso. De hecho, el artículo de Sharma y Kumar, versa sobre el efecto antidiabético de extractos de frutos de *Rubus ellipticus* en ratones con diabetes inducida mediante aloxano, si bien es de destacar la inexistencia de estudios en ratones sanos y animales normales.

Pues bien, siguiendo esta línea de investigación, el equipo inventor ha conseguido preparar extractos metanólicos a partir de fresas y frambuesas obtenidas de plantas tratadas con *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 durante todo el ciclo biológico de producción. Estos extractos están perfectamente caracterizados en su composición y poder antioxidante y han demostrado tener una mayor capacidad para inhibir las enzimas alfa-glucosidasa, ACE y COX2, que los hace potencialmente útiles en la elaboración de preparados alimenticios y fármacos destinados a la prevención y mejora de los síntomas asociados a síndrome metabólico.

Realizando una búsqueda retrospectiva de patentes a nivel mundial en la base de datos de producción española Invenet (OEPM) y en la internacional Worlwide, a través del sistema Esp@cenet, se confirma dicha conclusión extraída de la consulta de literatura científica: aunque sí que existe una referencia similar con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (ES 2 336 758 B1), la inexistencia de documentos de patente relativos a la especie bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* que soporten la capacidad de estimular el metabolismo secundario, en concreto la ruta de fenilpropanoides, flavonoides y antocianos. De esta manera es capaz de modificar el perfil metabólico de la planta, y, por tanto, de los efectos beneficiosos sobre la salud que la fruta o extractos preparados a partir de este material vegetal puedan tener.

Tras la referida búsqueda se ha constatado que existen patentes relacionadas con la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* publicadas a nivel mundial, de las cuales ninguna guarda relación con la capacidad de modular el perfil metabólico del fruto a nivel de compuestos fenólicos, en la ruta de flavonoides y antocianos, siendo este efecto global el objeto de la presente invención. La mayoría de las patentes hacen referencia a la protección de cultivo mediante la producción bacteriana de enzimas (glucanasas, quitinasas, etc.), que ejercen su efecto protector al liberarse en el exterior

de la célula, a nivel edáfico o foliar (mecanismo indirecto), y no implican al metabolismo de la planta en esta protección (mecanismo directo).

LA INVENCIÓN.-

El objeto de la invención que aquí se describe y que, a la vista del estado de la técnica anterior, se entiende cumple con las condiciones de novedad y actividad inventiva necesarias para poder ser merecedora del derecho de patente, es el aislamiento y caracterización de la cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), que es un microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Bacillus*, con capacidad de modular el metabolismo secundario, más concretamente el metabolismo de los compuestos fenólicos, así como mejorar las propiedades de los extractos vegetales sobre la enzimas relacionadas con el síndrome metabólico (COX2, ACE y alfa glucosidasa).

Las características fisiológicas y el análisis genético de esta cepa permiten identificarla inequívocamente, diferenciándola de otras especies del género *Bacillus*.

Una vez aislada y caracterizada, con código de referencia interno L81, se realizaron diversas pruebas para poner de manifiesto el potencial de esta bacteria. Estas fueron, producción de auxinas, degradación de 1-aminociclopropano-1-carboxilato, solubilización de fosfato y producción de sideróforos y quitinasas, resultando positiva para la producción de sideróforos.

Hasta el momento se han realizado experiencias consistentes en la inoculación de suspensiones bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 sobre *Arabidopsis thaliana*, mejorando la fotosíntesis (φPSII/NPQ), sin afectar al crecimiento de la planta. En estos experimentos se ha detectado un aumento de actividad SOD y una disminución de la actividad APX y del resto de actividades de *ROS scavenging*, junto con un aumento moderado en las actividades glucanasa (PR2) y quitinasa (PR3) de la planta. Cuando se someten estas plantas previamente inoculadas con QV15 al choque con *Xanthomonas campestris* pv tomato, las plantas resistían mucho mejor este ataque, presentando una protección del 60 %, asociada a un aumento de más del doble que en los controles en la actividad PR2 y PR3.

Por otra parte, se han realizado experimentos en campo en plantas de mora (*Rubus* var Loch Ness), frambuesa (*Rubus idaeus*) y fresa (*Fragaria vesca*) en invernaderos de producción. Se han realizado aplicaciones con QV15 a nivel radical, desde septiembre hasta febrero, cada 15 días, en condiciones de producción contra-estación. Se detecta incremento en la síntesis de compuestos fenólicos en todas ellas; en mora, este incremento se controla a nivel de factores de transcripción, estimulando la transcripción de MYB6, y de determinados genes de la ruta de biosíntesis de flavonoles.

Estos experimentos realizados en distintas especies vegetales demuestran que *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 es capaz de modular el metabolismo secundario de las plantas, así como mejorar las propiedades de los extractos de fruto de frambuesa y fresa mejorando el efecto de inhibición de los enzimas alfa glucosidasa, ACE y COX2 con respecto a los controles no inoculados y, por tanto, esta bacteria, o cualquier molécula derivada de ella, pueden utilizarse en cualquier tipo de cultivo de interés agronómico, farmacológico o nutricional, agrario o forestal, para la mejora de los síntomas o prevención de síndrome metabólico.

Bacillus amyloliquefaciens QV15 puede aplicarse a plantas de mora (*Rubus* var Loch Ness), frambuesa (*Rubus idaeus*) y fresa (*Fragaria vesca*) modificando el contenido en compuestos fenólicos en hojas y en frutos, especialmente en derivados de flavonoles, antocianos y catequinas. En hojas de mora actúa a nivel de factores de transcripción, así como en determinados genes de la ruta de biosíntesis de flavonoles y antocianos, y con ello modifica el perfil metabólico (flavonoles y derivados) en hojas. En frutos de mora, actúa también a nivel de factores de transcripción y de determinados genes de la ruta de biosíntesis de flavonoles y antocianos. Esto puede aplicarse a cualquier especie vegetal de las que constituyen los frutos rojos o frutos del bosque, como fresa, frambuesa, mora, arándano, o mirtillo, o uva, con el objeto de incrementar su contenido en compuestos fenólicos de interés farmacológico, nutricional, concretamente en frambuesa y fresa para mejorar el contenido de antocianos y, por tanto, su coloración.

Los referidos experimentos sobre el uso *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 como estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos, concretamente antocianos en fresa y frambuesa, y para mejorar los extractos sobre la acción de los

enzimas alfa glucosidasa, ACE y COX2 se exponen al final de la presente memoria, dentro del apartado forma de realización.

La finalidad que se persigue, en definitiva, con esta invención y que constituye la ventaja técnica aportada con la misma, es disponer de una bacteria que estimule el metabolismo secundario de compuestos fenólicos en plantas de interés agronómico, farmacológico, nutricional consiguiendo un doble efecto: por una parte, mejorar el contenido en antocianos en fresas y frambuesas, y por lo tanto, su valor comercial, y por otra parte, obtener la materia prima vegetal fuente de extractos mejorados con respecto a los controles no inoculados por su efecto sobre los enzimas alfa-glucosidasa, ACE y COX2 y, por tanto, pueden utilizarse para la mejora de los síntomas o prevención de síndrome metabólico.

En consecuencia, con la presente solicitud de patente se reivindica el uso de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* QV15,o cualquier fracción de la misma, para su aplicación en cualquier tipo de especie vegetal, formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, con el fin de estimular el metabolismo secundario de compuestos fenólicos en plantas de interés agronómico, farmacológico, nutricional y que a la vez mejore los extractos obtenidos a partir de material vegetal tratado con la cepa, sobre la acción de alfa glucosidasa, ACE y COX2.

FORMA DE REALIZACIÓN.-

Estudiando la rizosfera de dos especies del género *Pinus*, seleccionadas por su interés forestal, encontramos la cepa del género *Bacillus* que aquí se reseña.

La cepa fue aislada de la rizosfera de una población natural de *Pinus pinea* L. Durante el aislamiento de bacterias llevado a cabo en la rizosfera de dos especies de pino (*Pinus pinaster* Aiton y *Pinus pinea* L.) y en la micosfera del hongo micorrizógeno asociado a ambos, *Lactarius deliciosus* (Fries) S.F. Gray., en otoño de 2000, coincidiendo con el periodo de fructificación de *Lactarius deliciosus*, en la sierra de Aracena (Huelva). Como resultado de dicho muestreo se coleccionaron 720 cepas entre las que se encontró *Bacillus amyloliquefaciens* (QV15, código interno del laboratorio). El aislamiento de dicha cepa se realizó en agar nutritivo (PCA).

En el laboratorio este microorganismo se mantiene con una elevada tasa de supervivencia en glicerol al 20% en caldo nutritivo (Pronadisa) a -80ºC o en glicerol al 15% en agua a -20ºC y se recuperan con facilidad en el medio de cultivo utilizado para el aislamiento tanto en fase sólida como en fase liquida a 28ºC.

Para la caracterización de las cepas se consideraron diferentes caracteres fenotípicos que se pormenorizan en esta memoria: (i) morfología de las colonias (ii) morfología de las células, (iii) secuenciación del gen del ADN ribosomal correspondiente a la subunidad 16S. iv) Secuenciación del genoma

Características morfológicas, bioquímicas y genéticas de *Bacillus amyloliquefaciens QV15*.-

La caracterización taxonómica de *Bacillus amyloliquefaciens* se realizó identificando la cepa mediante secuenciación parcial del ADN ribosomal 16S, su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos reveló una homología del 100% con una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

A continuación, se especifica la morfología de las colonias a las 24 h de incubación a 28º en agar para métodos estándar (PCA).

TABLA 1

	QV15
Tamaño de la colonia	< 1 mm∅
Forma	circular
Borde	Liso
Transparencia	No
Consistencia	Cremosa
Color	Amarillo oscuro

Creciendo en medio líquido (Lennox Pronadisa) el color del medio cambia a amarillo más oscuro desde la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria de crecimiento.

Los caracteres morfológicos de *Bacillus amyloliquefaciens QV15* a las 24 h de incubación a 28º en agar para métodos estándar (PCA) corresponden a un bacilo Gram positivo esporulado.

A continuación, se procedió al análisis genético de la cepa para su identificación, para ellos se siguieron los siguientes pasos:

Extracción del ADN.-

Para la extracción del ADN, las colonias crecieron durante 24 horas en Lennox (Pronadisa) a 28ºC en agitación. Transcurrido este tiempo, Se extrajo el ADN genómico de cada bacteria con el kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation (MoBio, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

Amplificación del ADNr 16S.-

Se amplificaron mediante PCR los 1500 pb correspondientes a esta región con los siguientes cebadores: directo 5´-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3´ y reverso 5´-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3´ (Ulrike, 1989), en una reacción de 25 µL con 1X de tampón 10X, 2.5 µM $MgCl_2$, 250 µM de cada DNTP, 2.5 µM cebador forward, 2.5 µM cebador reverse 1,25 unidades de ADN polimerasa (AmpliTaq Applied) y 100 ng del ADN bacteriano. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 95ºC 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94ºC 30 segundos, 65,5ºC 30 segundos y 72ºC 30 segundos, finalizando con 7 minutos a 72ºC.

Visualización de los geles.-

El producto de PCR se resolvió en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1%) con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc2000TM 170-8126 (Biorad, CA, EE.UU).

Secuenciación de ADN.-

Una vez comprobada la amplificación, el producto de PCR, se purificó con el kit UltraClean™ PCR Clean-up DNA purification (MoBio, CA, EE.UU.), se secuenció

UNIDAD DE GENÓMICA PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID-U.C.M. en un secuenciador ABI PRIMS® 377 ADN Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA).

Análisis informático de la secuencia.-

Las secuencias se alinearon con el programa Bioedit Sequence Aligment editor 5.0.3. ®, se revisaron manualmente se corrigieron y se analizaron por BLASTN 2.2.6.(Altschul et al., 1997) en el GeneBank EMBL y DDBJ (página Web del NCBI BLASTR: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), resultando la mayor homología: *Bacillus amyloliquefaciens QV15* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence, y quedando depositada la secuencia en el GeneBank con el número de acceso AY307364.1

Bacillus amyloliquefaciens como mejorador de la adaptación a condiciones de estrés y estimulante del metabolismo primario y secundario de compuestos fenólicos.-

1º. Experimento de elicitación en plántulas de *Arabidopsis thaliana* inoculando la bacteria dos veces a nivel radical, en la cuarta y quinta semanas desde la germinación de las semillas. Tres días después de la segunda inoculación, se inocula el patógeno (*Xantomonas campestris*) a nivel foliar mediante un pulverizado del patógeno. Se determinó la fotosíntesis mediante fluorescencia (Fo, Fv/Fm, ΦPSII, y NPQ), actividades enzimáticas (ciclo de scavenging de ROS, y enzimas de defensa), y el índice relativo de enfermedad. Se observó: i) un aumento de la actividad de SOD y una disminución de APX, ii) un aumento en la actividad de glucanasas, quitinasas, y celulasas, en el tratamiento con QV15+patógeno, mientras que en QV15 mantienen una actividad similar o inferior al control, demostrando una inducción de defensa sistémica, iii) una reducción en la sintomatología de la enfermedad causada por el ataque del patógeno de un 63,61%.

2º. Experimento de elicitación en plantas de *Rubus var Loch Ness* aplicando la bacteria en la raíz.- Se inoculó una suspensión bacteriana de la cepa QV15 en la raíz de plantas de *Rubus var Loch Ness* cada dos semanas (Septiembre de 2014 a Febrero de 2015), desde el trasplante. Se determinó la fotosíntesis mediante fluorescencia (Fo, Fv/Fm, ΦPSII, y NPQ), actividades enzimáticas (ciclo del ROS, y enzimas de defensa), bioactivos en hojas (fenoles totales, flavonoles y antocianos), clorofilas, en dos momentos de muestreo (floración y máxima fructificación); en máxima fructificación se determinaron los parámetros nutricionales (pH, ºBrix, y %ácido cítrico) y bioactivos en

frutos; se ha estudiado la expresión génica de la ruta de flavonoides y proteínas de defensa en hojas y frutos recogidos en fructificación; y por último se han realizado medidas con los extractos de fruta sobre la inhibición de enzimas relacionadas con la regulación de la glucosa (alfa-amilasa y alfa-glucosidasa), sobre la hipertensión (ACE), y sobre la inflamación (COX2), enzimas relacionadas con el síndrome metabólico. Se observó: i) a nivel de fotosíntesis aumenta ΦPSII y disminuye NPQ ii) inducción de la actividad de SOD, disminución de APX, iii) aumento en la actividad y expresión de proteínas de defensa (glucanasas, y quitinasas), tanto en floración como en fructificación, relacionados con un aumento en la defensa frente a patógenos, concretamente frente a Mildiu, iv) a nivel de bioactivos en hojas se observa en floración un aumento en fenoles, aunque flavonoles y antocianos no se alteran, mientras que en fructificación disminuyen todos en las hojas, v) aumento en clorofila A, B y total tanto en floración como fructificación, vi) en los frutos se observó una disminución de los fenoles, mientras que flavonoles y antocianos no se alteraron, lo que indica modificación del metabolismo secundario vii) en frutos de mora, un aumento del potencial antioxidante, viii) aumento de la expresión de los genes de la ruta de flavonoles y antocianos CHS, F3H, DFR, LAR, y GST1 (en fruta y hojas), datos que coinciden con el análisis de bioactivos, y que sugieren un desvío de la ruta de flavonoles hacia la producción de catequinas en estados intermedios de maduración.

Los extractos se prepararon a partir de moras frescas y hojas de la variedad “Loch Ness”. Para los extractos usados para medir el efecto sobre alfa-glucosidasa, ACE, y COX2, primero se liofilizaron las moras, a continuación se extrajo con metanol 80%, se centrifugó y se evaporó la fracción orgánica al vacío. El extracto con un 20% de agua se caracterizó; mientras que para los extractos usados para el resto de medidas se realizó una extracción con metanol 80%. Por lo que las medidas obtenidas para alfa-glucosidasa, ACE, y COX2 serían en peso seco mientras que para el resto en peso fresco.

Para la caracterización del extracto se realizaron las siguientes determinaciones:

El contenido fenólico total del extracto se determina por el método colorimétrico de Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. Am J Enol Vitic 10 16,144-158, que se basa en la oxidación en medio básico de los grupos hidroxilos de los fenoles por el

reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico /g de extracto. De esta forma, los extractos obtenidos siguiendo los procesos que a continuación se detallan presentan un contenido fenólico total mínimo de 20 mg/g.

El contenido en flavonoles totales del extracto se determina por el método colorimétrico de cloruro de alumino de Zishen et al. (1999) Zhishen J, Mengcheng T,Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 64:555-559. doi: 20 10.1016/S0308-8146(98)00102-2 con modificaciones. Se expresa como mg equivalentes de catequina por gramo de extracto fresco.

El contenido de antocianos totales se determinó por el método diferencial de pH descrito por Giusti y Wrolstad (2001), Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Anthocyanins Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, Wiley J (ed) Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York, pp F121-F129. doi: 10.1002/0471142913.faf0102s00, que evalúa la diferente absorbancia de los antocianos a distintos pH. Los resultados se expresan como mg 30 de cianidina-3-glucósido por gramo de extracto fresco.

Para la medida de las actividades enzimáticas relacionadas con defensa y estrés oxidativo se utilizaron los métodos descritos en García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., & Tena, M. (2002). Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (Cicer arietinum L.) and Fusarium oxysporum f. sp. ciceris. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61(6), 325–337. Lee, B.-R., Jung, W. J., Lee, B.-H., Avice, J.-C., Ourry, A., & Kim, T. H. (2008). Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. Physiologia Plantarum, 132(3), 329–337. Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, B., Raguchander, T., Suresh, S., & Samiyappan, R. (2008). Pseudomonas fluorescens enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leaffolder pest. Journal of Applied Entomology, 132(6), 469–479. Xu, C., Natarajan, S., & Sullivan, J. H. (2008). Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. Environmental and Experimental Botany, 63(1-3), 39–48.

Para las medidas de clorofilas se siguió el método descrito en Harmut K. Lichtenthaler and Claus Buschmann (2001). Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls an Carotenoids. Current Protocols in Food Analytical Chemistry F.4.2.1-F.4.2.1.

3º. Experimento de elicitación en plantas de frambuesa (*Rubus idaeus var Adelita*), inoculando la bacteria a nivel radical, cada dos semanas, desde octubre de 2015 hasta mayo de 2016, analizando los dos máximos de producción de la frambuesa (enero y mayo). Se determinó la fotosíntesis mediante fluorescencia (Fo, Fv/Fm, ΦPSII, y NPQ), bioactivos (fenoles flavonoles, y antocianos) en hojas y frutos, nutricionales en frutos (pH, ºBrix, y %ácido cítrico); y por último se han realizado medidas con los extractos metanólicos de fruto sobre la inhibición de enzimas relacionadas con la regulación de la glucosa (alfa amilasa y alfa glucosidasa), hipertensión (ACE) y sobre la inflamación (COX2), enzimas relacionadas con el síndrome metabólico. Se observó en frutos: i) un aumento de los ºBrix, reducción en la cantidad de ácido cítrico, así como una disminución del pH, ii) aumento de la cantidad de antocianos, fenoles y flavonoles, con respecto al control, iii) incremento de la capacidad de los extractos de fruto para inhibir la alfa glucosidasa, ACE y COX2. El contenido de antocianos, fenoles y flavonoles en frutos de plantas inoculadas y control aparece en la tabla 2; el IC50 de la α glucosidasa, y el % de inhibición de ACE y COX2 aparecen en la tabla 3.

Tabla 2.

	Fenoles (mg Equivalentes Gálico /100g peso fresco)		Flavonoles (mg Equivalentes (+)-catequina(195) /100g peso fresco)		Antocianos (mg Equivalentes cianidina-3-glucosido/100g peso fresco)	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
Control	154.17±7.7	389.47±10.0	6.06±0.24	87.46±1.18	9.39±1.27	23.52±1.5
QV15	248.45±6.4	379.44±7.45	11.28±0.92	77.67±1.18	4.62±0.19	21.19±1.76

Tabla 3.

	α Glucosidasa (IC50, mg de extracto seco/ml)		% inhibición ACE [10 mg de extracto seco/ ml]		% inhibición COX2 [10 mg de extracto seco/ ml]	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
Control	3.80±0.16	4.66±0.05	92.15±0.04	91.180.02	29.59±0.87	29.02±0.25
QV15	3.32±0.04	3.36±0.22	91.88±0.01	92.09±0.07	32.24±0.88	32.40±0.49

El extracto de frambuesa se preparó a partir de frambuesas frescas de la variedad "*Adelita*". Para los extractos usados para medir el efecto sobre alfa-glucosidasa, ACE, y COX2, primero se liofilizaron las moras, a continuación se extrajo con metanol 80%, se centrifugó y se evaporó la fracción orgánica al vacío. El extracto con un 20% de agua se caracterizó;' mientras que para los extractos usados para el resto de medidas se realizó una extracción con metanol 80%. Por lo que las medidas obtenidas para alfa-glucosidasa, ACE, y COX2 serían en peso seco mientras que para el resto en peso fresco.

Para la caracterización del extracto se realizaron las siguientes determinaciones:

El contenido fenólico total del extracto se determina por el método colorimétrico de Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. Am J Enol Vitic 10 16,144-158, que se basa en la oxidación en medio básico de los grupos hidroxilos de los fenoles por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico /g de extracto. De esta forma, los extractos obtenidos siguiendo los procesos que a continuación se detallan presentan un contenido fenólico total mínimo de 20 mg/g.

El contenido en flavonoles totales del extracto se determina por el método colorimétrico de cloruro de alumino de Zishen et al. (1999) Zhishen J, Mengcheng T,Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 64:555-559. doi: 20 10.1016/S0308-8146(98)00102-2 con modificaciones. Se expresa como mg equivalentes de catequina por gramo de extracto fresco.

El contenido de antocianos totales se determinó por el método diferencial de pH descrito por Giusti y Wrolstad (2001), Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Anthocyanins Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, Wiley J (ed) Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York, pp F121-F129. doi: 10.1002/0471142913.faf0102s00, que evalúa la diferente absorbancia de los antocianos a distintos pH. Los resultados se expresan como mg 30 de cianidina-3-glucósido por gramo de extracto fresco.

4º. Experimento de elicitación en plantas de fresa (*Fragaria vesca* var *Fortuna*) inoculando tras el trasplante cada dos semanas a nivel radical durante todo el ciclo de la planta (Enero a Mayo 2016). Se determinó la fotosíntesis mediante fluorescencia (Fo, Fv/Fm, ΦPSII, y NPQ)a mitad de ciclo productivo (marzo 2016) y al final (mayo 2016), se determinaron los bioactivos (fenoles flavonoles, y antocianos) y nutricionales (pH, ºBrix, y %ácido cítrico) en frutos en ambos momentos; y, por último, se han realizado medidas con los extractos metanólicos de fruto sobre la inhibición de enzimas relacionadas con la regulación de la glucosa (alfa amilasa y alfa glucosidasa), hipertensión (ACE) y sobre la inflamación (COX2), enzimas relacionadas con el síndrome metabólico. Se observó: i) a nivel de fotosíntesis una disminución de Fo y NPQ, por lo que se entiende que la planta se encuentra menos estresada que el control y pierde menos energía procedente de la fotosíntesis en forma de calor, por lo que se destinará a la generación de metabolitos primarios o secundarios ii) un aumento en los antocianos, iii) un aumento de los ºBrix, iv)una disminución de la fruta podrida y aumento en la fruta de primera calidad, v) incremento de las propiedades de los extractos de fruto sobre alfa glucosidasa, ACE y COX2. El contenido de antocianos, fenoles y flavonoles en frutos de plantas inoculadas y control aparece en la tabla 4; el IC50 de la α glucosidasa, y el % de inhibición de ACE y COX2 aparecen en la tabla 5.

Tabla 4.

	Fenoles (mg Equivalentes Gálico /100g peso fresco)		Flavonoles (mg Equivalentes (+)-catequina(195) /100g peso fresco)		Antocianos (mg Equivalentes cianidina-3-glucosido/100g peso fresco)	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
Control	315.79±6.86	188.24±2.7	80.15±0.37	38.40±0.49	17.24±1.62	21.19±5.61

		4				
QV15	315.79±22.41	202.50±2.75	59.38±1.35	29.30±0.55	39.11±0.19	20.28±2.6

Tabla 5.

	α Glucosidasa (IC50, mg de extracto seco/ml)		% inhibición ACE [10 mg de extracto seco/ ml]		% inhibición COX2 [10 mg de extracto seco/ ml]	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
Control	11.56±1.05	8.27±0.43	95.2±0.06	99.06±0.02	35.39±0.21	33.76±0.32
QV15	9.99±0.1	10.04±0.56	92.41±0.01	91.98±0.14	36.61±1.15	34.12±0.55

El extracto de fresa se preparó a partir de fresas frescas de la variedad "*Fortuna*". Para los extractos usados para medir el efecto sobre alfa-glucosidasa, ACE, y COX2, primero se liofilizaron las moras, a continuación se extrajo con metanol 80%, se centrifugó y se evaporó la fracción orgánica al vacío. El extracto con un 20% de agua se caracterizó;' mientras que para los extractos usados para el resto de medidas se realizó una extracción con metanol 80%. Por lo que las medidas obtenidas para alfa-glucosidasa, ACE, y COX2 serían en peso seco mientras que para el resto en peso fresco.

5º. Experimento de elicitación en plantas de fresa (*Fragaria vesca* var *Fortuna*) inoculando tras el trasplante cada dos semanas a nivel radical durante todo el ciclo de la planta (Octubre a Marzo 2017). Se determinó la fotosíntesis mediante fluorescencia (Fo, Fv/Fm, ΦPSII, y NPQ)a mitad de ciclo productivo (Enero 2017), y al final del ciclo (Marzo 2017) se determinaron los bioactivos (fenoles flavonoles, y antocianos) y nutricionales (pH, ºBrix, y %ácido cítrico) y el tamaño de la fruta. Se observó: i) un aumento de la cantidad de fruta de mayor tamaño tras las inoculaciones ii) un aumento en los antocianos, iii) un aumento de los flavonoles, iv)una disminución del % de ácido cítrico.

El extracto de fresa se preparó a partir de fresas frescas de la variedad "*Fortuna*". Se realizó una extracción con metanol 80%.

APLICACIÓN INDUSTRIAL.-

Dadas las propiedades arriba apuntadas de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 como estimulador del metabolismo secundario, esta cepa bacteriana tiene una aplicación específica en la industria agroalimentaria, química y farmacéutica, al poder ser utilizada formando parte de cualquier preparado (de forma individual o en combinación con otros microorganismos) y haciéndola entrar en contacto (a la cepa o cualquier parte de ella) con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas por cualquier medio disponible, en cualquier especie vegetal, o en cualquier forma de cultivo *in vitro*, para incrementar la concentración de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica con interés farmacológico y/o nutricional. En frambuesa y fresa, para mejorar la coloración en la producción en contra-estación, concretamente debida al aumento de antocianos; y para obtener extractos mejorados por su capacidad para inhibir los enzimas alfa glucosidasa, ACE y COX2.

REIVINDICACIONES

1. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Bacillus*, **caracterizado** por su capacidad de estimular el metabolismo secundario de compuestos fenólicos de especies vegetales, concretamente flavonoides, antocianos, catequinas y de producir un aumento de grados Brix.

2. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), según reivindicación 1, **caracterizado** por su capacidad de incrementar el contenido de antocianos en frutos de fresa y frambuesa.

3. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT9371), microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Bacillus*, **caracterizado** por su capacidad de mejorar las propiedades de los extractos de fruto de frambuesa y fresa como inhibidores de los enzimas relacionados con el síndrome metabólico: alfa glucosidasa, reguladores de la glucosa en sangre, ACE, convertidora de angiotensina para hipertensión, y COX2, inflamación.

4. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 3, para su aplicación en cualquier tipo de cultivo de interés agronómico, farmacológico o nutricional, agrario o forestal, a fin de incrementar en bioactivos y/o la mejora de los extractos de hoja y/o fruto sobre el efecto de éstos sobre alfa glucosidasa, ACE y COX2.

5. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 4, para su aplicación en cualquier especie de plantas de la familia *Rubus* sp.

6. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 4 5, para su aplicación en cualquier especie vegetal de las que constituyen los frutos rojos o frutos del bosque, (como fresa, frambuesa, mora, arándano, o mirtillo), o de las constituyentes de uvas, con el objeto de mejorar las cualidades organolépticas y la coloración de la fruta, especialmente de antocianos.

7. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 6, bien la cepa individual o en combinación con otros organismos, formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, y por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas.

8. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 6, bien la cepa individual o en combinación con otros organismos, o formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, y por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con células vegetales en cualquier estado de diferenciación en cultivo *in vitro*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070369

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, C05F, A01N, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ABDELHI DIHAZI *et al*. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused byin date palm (L) seedlings. PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 20120302 GAUTHIER-VILLARS, PARIS, FR. Cheynier; Davies Kevin M; Lattanzio Vincenzo, 02/03/2012, Vol. 55, Pages 7 - 15, ISSN 0981-9428, <DOI: doi:10.1016/j.plaphy.2012.03.003> page 8, left column, fourth paragraph; page 9, left column , paragraph 2.3.3.	1-8
A	MARA LAURA TONELLI *et al*. Peanut priming induced by biocontrol agents. PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, 20101104 ACADEMIC PRESS LTD, GB. He Zuhua; Tang Wei-Hua; Lou Yonggen, 04/11/2010, Vol. 75, N° 3, Pages 100 - 105, ISSN 0885-5765, <DOI: doi:10.1016/j.pmpp.2010.11.001> page 100; page 101, paragraphs 2.2 and 2.3; page 102, right column, second paragraph; page 102, right column, last paragraph; page 103, right column, last paragraph.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29/08/2018	**(05/09/2018)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer S. González Peñalba Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070369

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016183537 A1 (TAGHAVI SAFIYH *et al.*) 30/06/2016, paragraphs [0009], [0010], [0069], [0074], [0075] and example 13.	1-8
A	SEO M-J *et al*. Isolation of the putative biosynthetic gene cluster of 1-deoxynojirimycin by *Bacillus amyloliquefaciens* 140N, its production and application to the fermentation of soybean paste. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2013 Japan Soc. for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry jpn. 30/11/2012, Vol. 77, Nº 2, Pages 398 - 401, ISSN 0916-8451 (print) ISSN 1347-6947 (electronic), <DOI: doi:10.1271/bbb.120753> page 400, right column, last paragraph; page 401, left column , second paragraph.	1-8
A	MCDOUGALL GORDON J *et al.* Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 20050401 American Chemical Society, Books and Journals Division, US. 01/04/2005, Vol. 53, Nº 7, Pages 2760 - 2766, ISSN 0021-8561, <DOI: doi:10.1021/jf0489926> page 2763, left column; page 2764, left column, last paragraph and abstract.	1-8
A	HONG Y *et al.* Potentiality of *Bacillus amyloliquefaciens* KFCC11574P isolated from Korean traditional doenjang as a starter in the production of functional soya bean paste. International Journal of Food Science and Technology 20160101 Blackwell Publishing Ltd gbr. 01/01/2016, Vol. 51, Nº 1, Pages 105 - 113, ISSN 0950-5423 (print) ISSN 1365-2621 (electronic), <DOI: doi:10.1111/ijfs.12973> page 106, left column, third paragraph and page 107, right column, second paragraph.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070369

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/20 (2006.01)
C05F11/08 (2006.01)
A01N63/02 (2006.01)
C12R1/07 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2018/070369

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2016183537 A1	30.06.2016	CL2017001738 A1	08.06.2018
		BR112017014057 A2	16.01.2018
		JP2018508472 A	29.03.2018
		CN107820392 A	20.03.2018
		MX2017008733 A	31.10.2017
		KR20170100644 A	04.09.2017
		UY36477 A	30.06.2017
		AU2015374282 A1	20.07.2017
		US2017196226 A1	13.07.2017
		AR103288 A1	26.04.2017
		TW201639461 A	16.11.2016
		EP3240406 A1	08.11.2017
		WO2016109396 A1	07.07.2016

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070369

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, C05F, A01N, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ABDELHI DIHAZI *et al.* Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused byin date palm (L) seedlings. PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 20120302 GAUTHIER-VILLARS, PARIS, FR. Cheynier; Davies Kevin M; Lattanzio Vincenzo, 02/03/2012, Vol. 55, Páginas 7 - 15, ISSN 0981-9428, <DOI: doi:10.1016/j.plaphy.2012.03.003> página 8, columna izquierda, cuarto párrafo; página 9, columna izquierda, apartado 2.3.3.	1-8
A	MARA LAURA TONELLI *et al.* Peanut priming induced by biocontrol agents. PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, 20101104 ACADEMIC PRESS LTD, GB. He Zuhua; Tang Wei-Hua; Lou Yonggen, 04/11/2010, Vol. 75, Nº 3, Páginas 100 - 105, ISSN 0885-5765, <DOI: doi:10.1016/j.pmpp.2010.11.001> página 100; página 101, apartados 2.2 y 2.3; página 102, columna derecha, segundo párrafo; página 102, columna derecha último párrafo; página 103, columna derecha, último párrafo.	1-8

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29/08/2018	**05 de septiembre de 2018 (05/09/2018)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado S. González Peñalba Nº de teléfono 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070369

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2016183537 A1 (TAGHAVI SAFIYH *et al.*) 30/06/2016, párrafos [0009], [0010], [0069], [0074], [0075] y ejemplo 13.	1-8
A	SEO M-J *et al.* Isolation of the putative biosynthetic gene cluster of 1-deoxynojirimycin by *Bacillus amyloliquefaciens* 140N, its production and application to the fermentation of soybean paste. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2013 Japan Soc. for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry jpn. 30/11/2012, Vol. 77, Nº 2, Páginas 398 - 401, ISSN 0916-8451 (print) ISSN 1347-6947 (electronic), <DOI: doi:10.1271/bbb.120753> página 400, columna derecha, último párrafo; página 401, columna izquierda, segundo párrafo.	1-8
A	MCDOUGALL GORDON J *et al.* Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 20050401 American Chemical Society, Books and Journals Division, US. 01/04/2005, Vol. 53, Nº 7, Páginas 2760 - 2766, ISSN 0021-8561, <DOI: doi:10.1021/jf0489926> página 2763, columna izquierda; página 2764, columna izquierda, último párrafo y resumen.	1-8
A	HONG Y *et al.* Potentiality of *Bacillus amyloliquefaciens* KFCC11574P isolated from Korean traditional doenjang as a starter in the production of functional soya bean paste. International Journal of Food Science and Technology 20160101 Blackwell Publishing Ltd gbr. 01/01/2016, Vol. 51, Nº 1, Páginas 105 - 113, ISSN 0950-5423 (print) ISSN 1365-2621 (electronic), <DOI: doi:10.1111/ijfs.12973> página 106, columna izquierda, tercer párrafo y página 107, columna derecho, segundo párrafo.	1-8

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070369

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C12N1/20 (2006.01)
C05F11/08 (2006.01)
A01N63/02 (2006.01)
C12R1/07 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070369

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2016183537 A1	30.06.2016	CL2017001738 A1	08.06.2018
		BR112017014057 A2	16.01.2018
		JP2018508472 A	29.03.2018
		CN107820392 A	20.03.2018
		MX2017008733 A	31.10.2017
		KR20170100644 A	04.09.2017
		UY36477 A	30.06.2017
		AU2015374282 A1	20.07.2017
		US2017196226 A1	13.07.2017
		AR103288 A1	26.04.2017
		TW201639461 A	16.11.2016
		EP3240406 A1	08.11.2017
		WO2016109396 A1	07.07.2016
---	---	---	---