

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 886**

51 Int. Cl.:

C07H 1/06 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2017 PCT/US2017/020157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17151742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2017 E 17711438 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3423459**

54 Título: **Procedimiento de purificación de compuestos antifúngicos y exopolisacáridos a partir de un cultivo de células microbianas**

30 Prioridad:

03.03.2016 US 201662303171 P

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

03.03.2022

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**KIMMELSHUE, CHAD;
LI, YAN;
TAYLOR, COLLEEN S. y
ZHU, HONG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 897 886 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de compuestos antifúngicos y exopolisacáridos a partir de un cultivo de células microbianas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para procesar cultivos de células microbianas para concentrar o purificar lipopéptidos y exopolisacáridos producidos por células microbianas.

Antecedentes de la invención

- 10 Los fungicidas tienen innumerables usos, que incluyen la protección de cultivos; como conservantes de alimentos y cosméticos; así como agentes terapéuticos para aplicación humana y veterinaria. La reducción del rendimiento de los cultivos, las enfermedades transmitidas por los alimentos y las infecciones fúngicas de seres humanos y animales, son un problema tanto en los países desarrollados como en desarrollo.

- 15 Los insecticidas o fungicidas sintéticos a menudo son inespecíficos y, por lo tanto, pueden actuar sobre organismos distintos de los organismos objetivo, incluidos otros organismos beneficiosos naturales. Debido a su naturaleza química, también pueden ser tóxicos y no biodegradables. Los consumidores en todo el mundo son cada vez más conscientes de los posibles problemas ambientales y de salud asociados con los residuos de los productos químicos, especialmente en los productos alimenticios. Esto ha dado lugar a una creciente presión del consumidor para reducir el uso o al menos la cantidad de pesticidas químicos (es decir, sintéticos). Por lo tanto, existe la necesidad de gestionar los requisitos de la cadena alimentaria al tiempo que se permite un control de plagas eficaz.

- 20 Un problema adicional que surge con el uso de insecticidas o fungicidas sintéticos es que la aplicación repetida y exclusiva de un insecticida o fungicida a menudo conduce a la selección de microorganismos patógenos resistentes. Normalmente, tales cepas también son resistentes contra otros principios activos que tienen el mismo modo de acción. Esto elimina el control efectivo de los patógenos con los compuestos activos. Sin embargo, los ingredientes activos que tienen nuevos mecanismos de acción son difíciles y costosos de desarrollar.

- 25 El riesgo de desarrollo de resistencia en las poblaciones de patógenos, así como las preocupaciones ambientales y de salud humana, han fomentado el interés en la identificación de alternativas a los insecticidas y fungicidas sintéticos para el tratamiento de enfermedades de las plantas. El uso de agentes de control biológico es una alternativa.

- 30 Los péptidos no ribosómicos, tales como las fusaricidinas, son bien reconocidos por sus propiedades antimicrobianas y se han empleado en el campo de la protección de cultivos. Debido a su modo de acción, también tienen usos potenciales en aplicaciones biofarmacéuticas y otras aplicaciones de biotecnología. Las fusaricidinas se puede aislar del *Paenibacillus* sp. y tienen una estructura de anillo compuesta de 6 residuos de aminoácidos, además del ácido 15-guanidino-3-hidroxipentadecanoico. Las fusaricidinas aisladas del *Paenibacillus polymyxa* incluyen LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F07 y LI-F08 (Kurusu K, Ohba K, Arai T y Fukushima K., J. Antibiotics, 40:1506-1514, 1987), así como las fusaricidinas adicionales A, B, C y D, de las que también se ha informado (Kajimura Y. y Kaneda M., J. Antibiotics, 49:129-135, 1996; Kajimura Y. y Kaneda M., J. Antibiotics, 50:220-228), 1997).

- 35 Se sabe que ciertas fusaricidinas tienen actividad germicida contra hongos patógenos de plantas, tales como *Fempearium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium thomii*. Algunas fusaricidinas también tienen actividad germicida contra bacterias grampositivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* (Kajimura Y. y Kaneda M., J. Antibiotics, 49:129-135, 1996; Kajimura Y. y Kaneda M., J. Antibiotics, 50:220-228, 1997). Además, se ha encontrado que las fusaricidinas específicas tienen actividad antifúngica contra la *Leptosphaeria maculans*, la cual causa la podredumbre de la raíz de canola (Beatty PH y Jensen SE., Can. J. Microbiol., 48:159-169, 2002).

- 40 Existe la necesidad de identificar procedimientos eficientes para enriquecer compuestos activos tales como fusaricidinas en caldos de fermentación. Esto puede ser particularmente difícil ya que tales caldos de fermentación a menudo contienen altos niveles de exopolisacáridos (EPS) y otros biopolímeros que aumentan la viscosidad del caldo y por lo tanto hacen que el procedimiento de enriquecimiento sea más difícil. El documento EP1176209 desvela la adición de alcoholes para la precipitación de exopolisacáridos de un cultivo celular y el documento WO2009/044279 desvela la precipitación de lipopéptidos de un cultivo celular por la adición de HCl.

- 45 Los EPS son polímeros de alto peso molecular que están compuestos por residuos de azúcar y son secretados por muchos microorganismos al ambiente circundante. Los microorganismos sintetizan un amplio espectro de polisacáridos multifuncionales que incluyen polisacáridos intracelulares, polisacáridos capsulares y polisacáridos extracelulares (EPS). Los exopolisacáridos generalmente consisten en monosacáridos modificados y, tentativamente, algunos sustituyentes que no son carbohidratos, tales como acetato, piruvato, succinato y fosfato.

- 50 Muchos EPS, tales como los glucanos y fructanos, se producen extracelularmente por la actividad de glucosiltransferasa o fructosiltransferasa, respectivamente, que emplean el disacárido sacarosa como sustrato principal y son secretados por microorganismos en el medio de cultivo. Estas enzimas rompen la sacarosa en una primera etapa, y luego transfieren glucosa o fructosa a un polímero de azúcar en crecimiento que forma glucanos o

fructanos. Los monómeros de azúcar libres restantes se metabolizan posteriormente.

Con fines comerciales, los EPS se aíslan actualmente de los caldos de fermentación después de la separación de la biomasa mediante procedimientos posteriores como la precipitación alcohólica (Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., y Schorr-Galindo, S., Carbohydrate Polymers, 87:951-962, 2012). El procesamiento corriente abajo para separar los EPS de los compuestos activos en caldos de fermentación, puede ser costoso y degradar los compuestos activos. La síntesis de biopolímeros viscosos dificulta el procedimiento de fermentación (es decir, la agitación y la oxigenación), así como la recuperación de moléculas altamente purificadas. Existe la necesidad de un procedimiento rentable y eficiente para separar los biopolímeros viscosos de los compuestos activos en el caldo de fermentación, mientras se preserva la actividad de dichos compuestos.

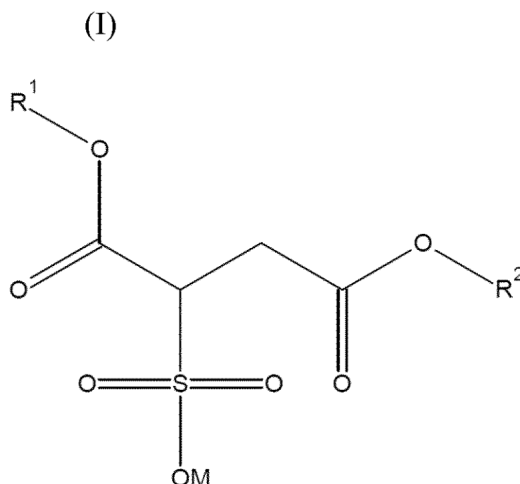
10 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para enriquecer un lipopéptido en un cultivo de células microbianas, comprendiendo el procedimiento: a) mezclar un sulfonato anfífilo y/o un sulfato anfífilo como se caracteriza en las reivindicaciones con el cultivo celular para inducir la formación de agregados que contienen el lipopéptido; b) centrifugar el cultivo celular para generar una fracción sobrenadante y una fracción de sedimentos; c) separar la fracción de sedimentos de la fracción sobrenadante; y d) mezclar la fracción de sedimentos con un alquil éter de polioxietilenglicol para liberar el lipopéptido de los agregados.

En ciertos aspectos, el lipopéptido se selecciona del grupo que consiste en compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo fusaricidina y combinaciones de los mismos. En un aspecto, el lipopéptido es un compuesto de tipo fusaricidina.

20 En algunas realizaciones, el compuesto de tipo fusaricidina se selecciona del grupo que consiste en fusaricidina A, fusaricidina B, fusaricidina C, fusaricidina D, LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08, Paeniserina A1, Paeniserina A2, Paeniserina A3, Paeniserina A4, Paeniserina B1, Paeniserina B2, Paeniserina B3, Paeniserina B4, Paeniserina C1, Paeniserina C2, Paeniserina C3, Paeniserina C4, Paeniprolixina A1, Paeniprolixina A2, Paeniprolixina B1, Paeniprolixina B2, Paeniprolixina C1, Paeniprolixina C2, Paeniprolixina D1, Paeniprolixina D2, Paeniprolixina E1, Paeniprolixina E2, Paeniprolixina F1, Paeniprolixina F2 y combinaciones de los mismos.

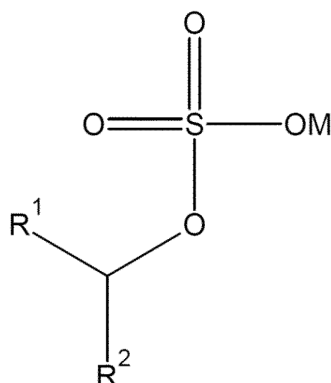
En otras realizaciones, se mezcla un sulfonato anfífilo con el cultivo celular y el sulfonato anfífilo es un compuesto de fórmula (I):



30 en la que R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado; y M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺. En un aspecto, R₁ y R₂ son independientemente alquilo C₈ lineal o ramificado. En otro aspecto, el sulfonato es dioctil sulfosuccinato; 1,4-bis(2-etilhexoxi)-1,4-dioxobutano-2-sulfonato; o una sal Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺, de los mismos.

En otras realizaciones, se mezcla un sulfato anfífilo con el cultivo celular y el sulfato anfífilo es un sulfato de alquilo de fórmula (II):

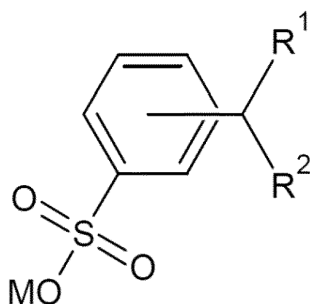
(II)



- 5 en la que R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado; y M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺. En un aspecto, R¹ y R² son independientemente un alquilo C₃₋₂₀ ramificado. En otro aspecto, el sulfato de alquilo es sulfato de 7-etil-2-metil-4-undecanilo o una sal de Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺, del mismo. En otro aspecto más, R¹ es H y R² es un alquilo C₃₋₂₀ ramificado. En una realización, el sulfato de alquilo es sulfato de 2-etilhexilo o una sal de Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺, del mismo.

También se describe en el presente documento que un sulfonato anfífilo se mezcla con el cultivo celular y el sulfonato anfífilo es un alquilbencenosulfonato lineal o un alquilbencenosulfonato ramificado. Dicho sulfonato anfífilo es un alquilbencenosulfonato lineal de fórmula (III):

(III)



- 10 en la que R¹ y R² son independientemente H o un alquilo C₁₋₂₀ lineal; y M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺; con la condición de que R¹ y R² no sean ambas H. En una realización, R¹ y R² forman una cadena alquílica C₁₀₋₁₆. En otra realización, el alquilbencenosulfonato lineal es dodecibenzosulfonato o una sal Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺, del mismo.

- 15 En ciertos aspectos, el alquil éter de polioxietilenglicol es un compuesto con una fórmula molecular de C_nH_{2n+1}(OCH₂CH₂)_mOH, en la que m es un número entero entre 1 y 120; y n es un número entero entre 1 y 20. En algunos aspectos, n es 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20. En un aspecto, n es 12 o 18. En otros aspectos más, m es un número entero entre 5 y 100. En una realización, m es 25. En otra realización, m es 100.

- 20 En otras realizaciones más, la presente invención se refiere a un procedimiento para purificar un exopolisacárido (EPS) de un cultivo de células microbianas, comprendiendo el procedimiento: a) mezclar un sulfonato anfífilo o un sulfato anfífilo como se caracteriza en las reivindicaciones con el cultivo celular para inducir la formación de agregados; b) centrifugar el cultivo celular para generar una fracción sobrenadante y una fracción de sedimentos; c) separar la fracción sobrenadante de la fracción de sedimentos; d) añadir alcohol a la fracción sobrenadante para precipitar el EPS; y e) eliminar el EPS precipitado de la fracción sobrenadante.

- 25 En ciertos aspectos, el EPS se selecciona de glucano, fructano, curdlano, gellan, xantano, emulsano, dextrano, celulosa y combinaciones de los mismos.

- 30 También se describe en el presente documento un procedimiento para purificar un biopolímero soluble en agua a partir de un cultivo de células microbianas, comprendiendo el procedimiento: a) mezclar un sulfonato anfífilo y/o un sulfato anfífilo con el cultivo celular para inducir la formación de agregados; b) centrifugar el cultivo celular para generar una fracción sobrenadante y una fracción de sedimentos; c) separar la fracción sobrenadante de la fracción de sedimentos; d) añadir alcohol a la fracción sobrenadante para precipitar el biopolímero; y e) eliminar el biopolímero precipitado de la fracción sobrenadante.

En otros aspectos más, el pH del cultivo de células microbianas se ajusta a entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7 antes de mezclar con el sulfonato anfífilo y/o el sulfato anfífilo. En un aspecto, el pH del cultivo de células microbianas se ajusta a aproximadamente 6.

5 En aún otras realizaciones, se agrega una sal al cultivo de células microbianas a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % antes del centrifugado. En una realización, se añade cloruro de sodio o cloruro de potasio al cultivo de células microbianas a una concentración de aproximadamente 2 %.

10 En otro aspecto, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., o *Pseudomonas* sp. En una realización, el cultivo de células microbianas comprende la cepa de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, la cepa de *Bacillus subtilis* NRRL B-21661 y/o una cepa mutante fungicida de las mismas, que tenga todas las características de identificación de la cepa respectiva.

Breve descripción de los dibujos

15 La **figura 1** representa las actividades antifúngicas medidas con plantas jóvenes inoculadas con *Botrytis cinerea* (BOTRCI). Se compararon las actividades antifúngicas del caldo entero ("CE") de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 y una fracción de sedimentos ("Sedimentos") y la fracción sobrenadante ("Sob") después del centrifugado del caldo entero a una FCR de 24.790×g, con control no tratado ("Agua").

La **figura 2** representa fotografías de sedimentos de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 centrifugado sin ayuda de centrifugado etiquetado como "CE-SDOS" y el caldo entero centrifugado mezclado con GEROPON® (SDOS), etiquetado como "CE+SDOS".

20 La **figura 3** representa sedimentos formados después del centrifugado durante 5 minutos a una FCR de 17.000×g, con o sin GEROPON® (SDOS) de un caldo entero de otra cepa de *Paenibacillus*, conocida por producir niveles relativamente altos de EPS.

La **figura 4** representa la cuantificación relativa de fusaricidina A en fracciones de sedimentos y sobrenadantes que contienen GEROPON® (SDOS) o SDOS purificado.

25 Las **figuras 5A-5E** representan un análisis de tamaño de partícula en concentrados de caldo y sobrenadantes producidos a partir de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 centrifugado con o sin GEROPON® (SDOS).

La **figura 6** representa fotografías de sedimentos formados a partir de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 ajustado a un pH de 3, 6 o 10 y centrifugado con GEROPON® (SDOS).

30 La **figura 7A** representa fotografías de sedimentos formados a partir de un caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 con otros compuestos químicos, además de GEROPON® (SDOS). La **figura 7B** representa una fotografía de las fracciones de sedimentos y sobrenadantes de un experimento a mayor escala, que confirma que NIAPROOF® 4 (7-etil-2-metil-4-undecanil sulfato de sodio) produce un efecto similar al GEROPON® (SDOS).

35 La **figura 8** representa la cuantificación relativa de fusaricidina A en una fracción sobrenadante y fracciones de sedimentos que contienen GEROPON® (SDOS), solo o en combinación con dodecil éter de polioxietileno (25) (también conocido como C12EO25) o BRIJ® L23 (dodecil éter de polioxietileno (23); también conocido como C12EO23).

La **figura 9** representa la cuantificación relativa de fusaricidina A en fracciones de sedimentos que contienen GEROPON® (SDOS), solo o en combinación con uno de varios compuestos químicos que actúan como auxiliares de liberación.

40 La **figura 10** representa la mayor suspensibilidad de una fracción de sedimentos, después de la adición del auxiliar de liberación, C12EO25.

La **figura 11** representa la cuantificación relativa de fusaricidina A en cinco lotes de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 y los concentrados de caldo correspondientes utilizando GEROPON® (SDOS), como auxiliar de centrifugación y BRIJ® S100 (octadecil éter de polioxietileno (100)), como auxiliar de liberación.

45 La **figura 12** representa sedimentos formados después del centrifugado durante 5 minutos a una FCR de 1.500×g con o sin GEROPON® (SDOS), de un caldo entero (CE) viscoso de la cepa NRRL B-21661 de *Bacillus subtilis*.

50 La **figura 13** representa la cuantificación relativa de fusaricidina A en caldos enteros ("CE") y los sobrenadantes correspondientes ("Sob"), así como los concentrados de caldo ("CC") producidos con GEROPON® (SDOS), como auxiliar de centrifugación y BRIJ® S100 (octadecil éter de polioxietileno (100)), como auxiliar de liberación con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 y otras dos cepas de *Paenibacillus*.

Descripción detallada de la invención

55 Como se emplea en este documento, el verbo "comprender" y sus conjugaciones como se emplea en esta descripción y en las reivindicaciones, se usa en un sentido no limitativo para significar que se incluyen los artículos que siguen a la palabra, pero los artículos que no se mencionan específicamente no son excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno/a" no excluye la posibilidad de que exista más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que exista uno y solo uno de ellos. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "uno/a", por lo general, significa "al menos uno".

Como se emplea en este documento, el término "anfífilo" describe un compuesto químico que posee propiedades tanto hidrófilas como lipófilas.

En ciertos aspectos, el sulfonato anfífilo y/o un sulfato anfífilo se mezclan con el cultivo celular a una concentración (% p/v) de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,0 %; por ejemplo, cualquier intervalo dentro de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,0 % tal como aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,2 %, etc.

5 En otros aspectos, el sulfonato anfífilo o un sulfato anfífilo se mezclan con el cultivo celular a una concentración (% p/v) de al menos 0,01 %, al menos 0,02 %, al menos 0,03 %, al menos 0,04 %, al menos 0,05 %, al menos 0,06 %, al menos 0,07 %, al menos 0,08 %, al menos 0,09 %, al menos 0,10 %, al menos 0,12 %, al menos 0,14 %, al menos 0,16 %, al menos 0,18 %, o al menos 0,20 %.

10 En ciertos aspectos, el alquil éter de polioxietilenglicol se mezcla con la fracción de sedimentos o la fracción sobrenadante a una concentración (% p/v) de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,0 %; por ejemplo, cualquier intervalo dentro de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,0 % tal como aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,2 %, etc.

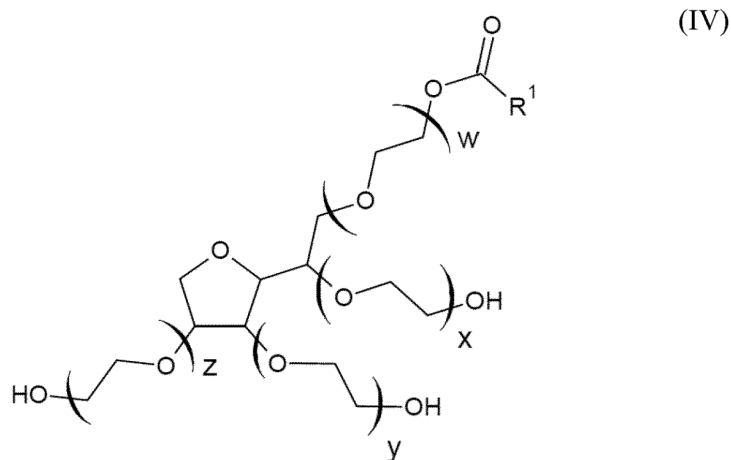
15 En otros aspectos, el alquil éter de polioxietilenglicol se mezcla con la fracción de sedimentos o la fracción sobrenadante a una concentración (% p/v) de al menos 0,01 %, al menos 0,02 %, al menos 0,03 %, al menos 0,04 %, al menos 0,05 %, al menos 0,06 %, al menos 0,07 %, al menos 0,08 %, al menos 0,09 %, al menos 0,10 %, al menos 0,12 %, al menos 0,14 %, al menos 0,16 %, al menos 0,18 % o al menos 0,20 %.

20 En otros aspectos más, la relación (p/p) de sulfonato anfífilo y/o un sulfato anfífilo a alquil éter de polioxietilenglicol mezclado con el cultivo celular o fracciones derivadas del mismo, es de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 1:50; por ejemplo, cualquier intervalo dentro de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 1:50, tal como aproximadamente 40:1 a aproximadamente 1:40, aproximadamente 30:1 a aproximadamente 1:30, aproximadamente 25:1 a aproximadamente 1:25, aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20, aproximadamente 15:1 a aproximadamente 1:15, aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5 o aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2.

25 En algunos aspectos, la relación (p/p) de sulfonato anfífilo o un sulfato anfífilo a alquil éter de polioxietilenglicol mezclado con el cultivo celular o fracciones derivadas del mismo es aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9 o aproximadamente 1:10.

En algunas realizaciones, el cultivo celular se centrifuga a una velocidad de al menos 5.000 FCR, al menos 10.000 FCR, al menos 15.000 FCR, al menos 20.000 FCR, al menos 25.000 FCR, al menos 30.000 FCR, al menos 35.000 FCR o al menos 40.000 FCR.

35 En ciertos aspectos, la fracción de sedimentos se mezcla con un derivado de polioxietileno de un éster de sorbitán de un ácido carboxílico, para liberar los lipopéptidos de los agregados. En una realización, el derivado de polioxietileno de un éster de sorbitán de un ácido carboxílico es un compuesto de fórmula (IV):



40 en la que R¹ es un alquilo C₆₋₁₈ o un alqueno C₆₋₁₈ y w+x+y+z=20. En una realización, el compuesto de fórmula (IV) es TWEEN® 80 (2-[2-[3,4]-bis(2-hidroxietoxi)oxolan-2-il]-2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etil(E)-octadec-9-enoato; también conocido como oleato de polioxietilensorbitán).

El dioctilsulfosuccinato de sodio se comercializa bajo varios nombres comerciales que incluyen GEROPON DOS®, AEROSOL® OT, TERMUL® 3667, TERMUL® 3665, LANKROPOL® KPH70 y SYNERGEN® W10.

Los lipopéptidos incluyen, pero no se limitan a, péptidos anfífilos cíclicos obtenibles a partir de diversas bacterias, que incluyen *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Streptomyces* sp.

En un aspecto, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de *Paenibacillus* sp. En otro aspecto, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de una cualquiera de las siguientes especies de *Paenibacillus*: *P. agarexedens*, *P. agaridevorans*, *P. alginolyticus*, *P. alkaliterrae*, *P. alvei*, *P. amylolyticus*, *P. anaericanus*, *P. antarcticus*, *P. assamensis*, *P. azoreducens*, *P. azotofixans*, *P. barcinonensis*, *P. borealis*, *P. brasiliensis*, *P. brassicae*, *P. campinasensis*, *P. chinjuensis*, *P. chitinolyticus*, *P. chondroitinus*, *P. cineris*, *P. cookie*, *P. curdlanolyticus*, *P. daejeonensis*, *P. dendritiformis*, *P. durum*, *P. ehimensis*, *P. elgii*, *P. favisporus*, *P. glucanolyticus*, *P. glycanilyticus*, *P. gordonae*, *P. graminis*, *P. granivorans*, *P. hodogayensis*, *P. illinoisensis*, *P. jamilae*, *P. kobensis*, *P. koleovorans*, *P. koreensis*, *P. kribbensis*, *P. lactis*, *P. larvae*, *P. lautus*, *P. lentimorbus*, *P. macerans*, *P. macquariensis*, *P. massiliensis*, *P. mendelii*, *P. motobuensis*, *P. naphthalenovorans*, *P. nematophilus*, *P. odorifer*, *P. pabuli*, *P. peoriae*, *P. phoenicis*, *P. phyllosphaerae*, *P. polymyxa*, *P. popilliae*, *P. pulvificiens*, *P. rhizosphaerae*, *P. sanguinis*, *P. stellifer*, *P. terrae*, *P. thiaminolyticus*, *P. timonensis*, *P. tylopili*, *P. turicensis*, *P. validus*, *P. vortex*, *P. vulneris*, *P. wynnii*, *P. xylanilyticus*, y combinaciones de las mismas.

En otro aspecto, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de *Bacillus* sp. En ciertos aspectos, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de una cualquiera de las siguientes especies de *Bacillus*: *B. acidiceler*, *B. acidicola*, *B. acidiproducens*, *B. aeolius*, *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. agaradhaerens*, *B. beningensis*, *B. akibai*, *B. alcalophilus*, *B. algicola*, *B. alkalinitrilicus*, *B. alkalisediminis*, *B. alkalitelluris*, *B. altitudinis*, *B. alveayuensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aquimaris*, *B. arsenicus*, *B. aryabhatai*, *B. asahii*, *B. atrophaeus*, *B. aurantiacus*, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. barbaricus*, *B. bataviensis*, *B. beijingensis*, *B. benzoovorans*, *B. beveridgei*, *B. bogoriensis*, *B. boroniphilus*, *B. butanolivorans*, *B. canaveralius*, *B. carboniphilus*, *B. cecembensis*, *B. cellulosityticus*, *B. cereus*, *B. chagannorensis*, *B. chungangensis*, *B. cibi*, *B. circulans*, *B. clarkii*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. coahuilensis*, *B. cohnii*, *B. decisifrondis*, *B. decolorationis*, *B. drentensis*, *B. farraginis*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. foraminis*, *B. fordii*, *B. para es*, *B. fumarioli*, *B. funiculus*, *B. galactosidilyticus*, *B. galliciensis*, *B. gelatini*, *B. gibsonii*, *B. ginsengi*, *B. ginsengihumi*, *B. graminis*, *B. halmopalus*, *B. halochares*, *B. halodurans*, *B. hemicellulosityticus*, *B. herbertsteinensis*, *B. horikoshi*, *B. horneckiae*, *B. horti*, *B. humi*, *B. hwajinpoensis*, *B. idriensis*, *B. indicus*, *B. infantis*, *B. infernus*, *B. isabellae*, *B. isronensis*, *B. jeotgali*, *B. koreensis*, *B. korlensis*, *B. kribbensis*, *B. krulwichiae*, *B. lehensis*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. litoralis*, *B. locisalis*, *B. luciferensis*, *B. luteolus*, *B. macauensis*, *B. macyae*, *B. mannanylyticus*, *B. mariflavi*, *B. marmarensis*, *B. massiliensis*, *B. megaterium*, *B. metanolicus*, *B. methylotrophicus*, *B. mojavensis*, *B. muralis*, *B. murimartini*, *B. mycoides*, *B. nanhaiensis*, *B. nanhaiisediminis*, *B. nealsonii*, *B. neizhouensis*, *B. niabensis*, *B. niacini*, *B. novalis*, *B. oceanisediminis*, *B. odysseyi*, *B. okhensis*, *B. okuhidensis*, *B. oleronius*, *B. oshimensis*, *B. panaciterrae*, *B. patagoniensis*, *B. persepolensis*, *B. plakortidis*, *B. pocheonensis*, *B. polygona*, *B. pseudoalcaliphilus*, *B. pseudofirmus*, *B. pseudomycoides*, *B. psychrosaccharolyticus*, *B. pumilus*, *B. qingdaonensis*, *B. rigui*, *B. raris*, *B. safensis*, *B. salarii*, *B. saliphilus*, *B. schlegelii*, *B. selenatarsenatis*, *B. selenitireducens*, *B. seohaeanensis*, *B. shackletonii*, *B. siamensis*, *B. simplex*, *B. sivalis*, *B. smithii*, *B. soli*, *B. solisalsi*, *B. sonorensis*, *B. sporothermodurans*, *B. stratosphericus*, *B. subterraneus*, *B. subtilis*, *B. taeanis*, *B. tequilensis*, *B. thermantarcticus*, *B. thermoamylovorans*, *B. thermocloacae*, *B. thermolactis*, *B. thioparans*, *B. thuringiensis*, *B. tripoxylicola*, *B. tuciae*, *B. vallismortis*, *B. vedderi*, *B. vietnamensis*, *B. vireti*, *B. wakoensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. xiaoxiensis* y combinaciones de las mismas.

En otro aspecto, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de *Pseudomonas* sp. En ciertos aspectos, el cultivo de células microbianas comprende una cepa de una cualquiera de las siguientes especies de *Pseudomonas*: *P. antarctica*, *P. azotoformans*, *P. blatchfordae*, *P. brassicacearum*, *P. brenneri*, *P. cedrina*, *P. corrugate*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, *P. mandelii*, *P. marginalis*, *P. mediterranea*, *P. meridiano*, *P. migulae*, *P. mucidolens*, *P. orientalis*, *P. panacis*, *P. protegens*, *P. proteolytica*, *P. Rhodesiae*, *P. synxantha*, *P. thivervalensis*, *P. tolaasii*, *P. veronii* y combinaciones de las mismas.

Como se emplea en este documento, el término "lipopéptidos" puede referirse a péptidos anfífilos cíclicos y péptidos antimicrobianos.

Los péptidos cíclicos anfífilos generalmente están compuestos por varios α -aminoácidos unidos a un ácido graso β -amino o β -hidroxi, que incluyen, pero no se limitan a, compuestos de tipo fengicina, compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo surfactina, fusaricidinas, viscosinas, anfisinas, tolaasinas, siringomicinas y putisolvinas. Los compuestos de tipo iturina están compuestos de siete aminoácidos y están unidos a un ácido graso β -amino. La longitud de la cadena de ácido graso de ciertos lipopéptidos varía de C14 a C17. Estos compuestos se pueden obtener a partir de diversas especies de *Bacillus*, incluyendo *subtilis* y *amyloliquefaciens*. Las iturinas y sus variantes se describen en Ongena, *et al.*, "Bacillus Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol", Trends in Microbiology, 16 (3):115-125, (2007).

Los compuestos de tipo iturina de la presente invención incluyen uno o más de los siguientes compuestos: bacilomicina D, bacilomicina F, bacilomicina L, bacilomicina LC (también conocida como bacilopectina), micosubtilina, iturina A, iturina AL e iturina C (con los últimos tres compuestos mencionados aquí, colectivamente, como iturinas).

Los compuestos de tipo fengicina están compuestos por diez aminoácidos unidos a un ácido graso β -hidroxi con una cadena que varía en longitud desde C14 hasta C18. Estos compuestos se pueden obtener a partir de diversas especies de *Bacillus*, incluyendo *subtilis*, *amyloliquefaciens*, *ceruus* y *thuringiensis* y de *Streptomyces* sp. Los compuestos del

tipo fengicina se describen en Ongena, mencionado anteriormente. Los compuestos de tipo fengicina adecuados para las composiciones descritas en el presente documento incluyen fengicina A, fengicina B, plipastatina A, plipastatina B, las plipastatinas de un *Streptomyces* sp. descrito en Kimura, *et al.*, "SNA 60-367 - New Peptide Enzyme Inhibitors Against Aromatase," *Journal of Antibiotics*, 50(6): 529-531, (1997), y agrastatinas, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.291.426. (con los últimos cuatro listados mencionados aquí, colectivamente, como plipastatinas).

Los compuestos tipo surfactina están compuestos de siete aminoácidos unidos a un ácido graso β -hidroxi con una cadena que varía en longitud de C13 a C16. Estos compuestos se pueden obtener a partir de diversas especies de *Bacillus*, incluyendo *subtilis*, *amiloliquefaciens*, *coagulans*, *pumilus* y *licheniformis*. La familia de compuestos de surfactina se describe en Ongena, mencionado anteriormente. Los compuestos del tipo de la surfactina de la presente invención incluyen uno o más de los siguientes compuestos: esperina, liquenisina, pumilacidina y surfactina.

Los compuestos de tipo fusaricidina están compuestos de seis aminoácidos unidos a un ácido 15-guanidino-3-hidroxipentadecanoico. Estos compuestos se pueden obtener a partir de *Paenibacillus* sp., incluyendo *polymyxa*. La familia de compuestos de fusaricidina se describe en Choi, S-K, *et al.*, "Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of *Paenibacillus polymyxa* E681", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365:89-95, (2008). Los compuestos de tipo fusaricidina de la presente invención incluyen uno o más de los siguientes compuestos: fusaricidinas A, B, C y D y fusaricidinas LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F06, LI-F07 y LI-F08. Los compuestos de tipo fusaricidina adicionales incluyen las Paeniserinas y las Paeniprolixinas, descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 62/232.205, presentada el 24 de septiembre de 2015. Los ejemplos de Paeniserinas y Paeniprolixinas incluyen Paeniserina A1, Paeniserina A2, Paeniserina A3, Paeniserina A4, Paeniserina B1, Paeniserina B2, Paeniserina B3, Paeniserina B4, Paeniserina C1, Paeniserina C2, Paeniserina C3, Paeniserina C4, Paeniprolixina A1, Paeniprolixina A2, Paeniprolixina B1, Paeniprolixina B2, Paeniprolixina C1, Paeniprolixina C2, Paeniprolixina D1, Paeniprolixina D2, Paeniprolixina E1, Paeniprolixina E2, Paeniprolixina F1 y Paeniprolixina F2.

Las viscosinas, anfisinas, tolaasinas, siringomicinas y putisolvinas se producen por *Pseudomonas* spp. asociadas a plantas, como se describe en Raaijmakers, *et al.*, (2006) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(7): 699-710. Las viscosinas incluyen viscosina, viscosina-amida, massetolida A, massetolida D, WLIP, pseudofomina A y pseudofomina B. Las anfisinas incluyen anfisina, tensina, folipeptina A, lokisina y artrofactina. Las tolaasinas incluyen, tolaasina, FP-B corpeptina A, SP22 y SP25A. Las siringomicinas incluyen siringomicina, siringostatina, siringotoxina, pseudomicina A y cormicina A. Las putisolvinas incluyen, putisolvina I y putisolvina II.

Los péptidos antimicrobianos se describen en Wang y Wang (2004) *Nucleic Acids Research* 32: D590-D592. Los péptidos antimicrobianos pueden ser un péptido no ribosómico sintetizados o péptidos ribosómicamente sintetizados (RAMP). Los péptidos no ribosómicamente sintetizados se encuentran en bacterias y hongos. Estos péptidos antimicrobianos se ensamblan mediante péptidos sintetizadas en oposición a la síntesis sostenida por ribosomas. La gramicidina (por ejemplo, Gramicidina S, Gramicidina D), bacitracina, polimixina B, melitina, cecropina y vancomicina son ejemplos de péptidos antimicrobianos no ribosómicamente sintetizados. Zeitler, *et al.* (2013) *PLOS One* 8(8): e71687. Además, la pantocina A, pantocina B, polioxinas, nikkomicinas, rizocitina, bacilisina, blasticidina y mildiomicina, son todos péptidos antimicrobianos activos contra patógenos de plantas que pueden emplearse en las composiciones o procedimientos reivindicados. El PEP6, PAF26, BPC194, PEP3, PEP11, BP76, CAMEL, Iseganano, D4E1, TYP, ESF12, ESF1, Pexiganano, MSI-99, MB-39, Pen4-1 y D32R son todos péptidos antimicrobianos sintéticos con actividad contra patógenos de plantas que se pueden emplear en las composiciones o procedimientos reivindicados. Además, la cecropina A, B, taquiplesina, heliomicina/drosomicina, sacrotoxina IA, defensiva de mejillón, magainina, esculentina-1, Rs-AFP2, Alf-AFP, Spi1, DRR230-a, BSD1, WT1, Dm-AMP1, Mj-AMP1, Pn-AMP, hordontionina, alfa-tionina, AFP, SB-37, Shiva-1, SB37, MB-39, MsrA1, MSI-99, Myp30, Rev4 y D4E1 se han expresado en plantas transgénicas que confieren al menos resistencia parcial a patógenos y pueden emplearse en las composiciones y procedimientos descritos en este documento. Montesinos (2007) *FEMS Microbiol Lett* 270:1-11.

Una lista no limitativa del EPS que se puede purificar con los procedimientos desvelados en el presente documento incluye; acetano (*Acetobacter xylinum*); alginato (*Azotobacter vinelandii*); celulosa (*Acetobacter xylinum*); quitosano (*Mucorales* spp.); curdlano (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*); ciclosporano (*Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp. y *Xanthomonas* spp.); dextrano (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* y *Lactobacillus hilgardii*); emulsano (*Acinetobacter calcoaceticus*); galactoglucopolisacáridos (*Achromobacter* spp., *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas marginalis*, *Rhizobium* spp. y *Zooglea* spp.); galactosaminogalactano (*Aspergillus* spp.); gellan (*Aureomonas elodea* y *Sphingomonas paucimobilis*); glucuronano (*Sinorhizobium meliloti*); N-acetilglucosamina (*Staphylococcus epidermidis*); N-acetil-heparosano (*Escherichia coli*); ácido hialurónico (*Streptococcus equi*); indicano (*Beijerinckia indica*); kefirano (*Lactobacillus hilgardii*); lentinano (*Lentinus elodes*); levano (*Alcaligenes viscosus*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*); pululano (*Aureobasidium pullulans*); escleroglucano (*Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium delphinii* y *Sclerotium gluconicum*); esquizofilano (*Schizophyllum commune*); stewartano (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*); succinoglucano (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, *Sinorhizobium meliloti*); xantano (*Xanthomonas campestris*); y welano (*Alcaligenes* spp.).

Los procedimientos desvelados pueden emplearse con composiciones obtenidas cultivando cepas microbianas (por ejemplo, cepa de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, cepa de *Bacillus subtilis*, NRRL B-21661 o un mutante fungicida (cepa) derivado de ellas), de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos convencionales de cultivo microbiano a gran escala incluyen la fermentación sumergida, la fermentación en estado

sólido o el cultivo en superficie líquida. Hacia el final de la fermentación, a medida que se agotan los nutrientes, las células comienzan la transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de modo que el producto final de la fermentación es en gran parte esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación es parte del ciclo de vida natural del *Paenibacillus* y generalmente es iniciada por la célula en respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación está configurada para obtener altos niveles de unidades formadoras de colonias y para promover la esporulación. Las células bacterianas, esporas y metabolitos en los medios de cultivo resultantes de la fermentación, pueden emplearse directamente o concentrarse mediante procedimientos industriales, tales como centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración en profundidad y evaporación.

Dichas composiciones incluyen productos de fermentación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, mediante un procedimiento de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación y los metabolitos residuales. La expresión "concentrado de caldo", como se emplea en este documento, se refiere a caldo entero (caldo de fermentación) que se ha concentrado por procedimientos industriales, como se describe en la presente memoria, pero permanece en forma líquida. La expresión "sólido de fermentación", como se emplea en el presente documento, se refiere al material sólido que queda después de que el caldo de fermentación se seca. La expresión "producto de fermentación", como se emplea en el presente documento, se refiere a caldo entero, concentrado de caldo y/o sólidos de fermentación. Los procedimientos de la presente invención se pueden emplear para preparar composiciones que incluyen productos de fermentación.

El caldo de fermentación o concentrado de caldo se puede secar con o sin la adición de vehículos empleando procedimientos o procedimientos de secado convencionales, tales como secado por pulverización, liofilización, secado en bandeja, secado en lecho fluidizado, secado en tambor o evaporación.

Los productos secos resultantes pueden procesarse adicionalmente, tal como mediante molienda o granulación, para conseguir un tamaño de partícula específico o un formato físico. También se pueden agregar vehículos, que se describen a continuación, después del secado.

Las preparaciones exentas de células de caldo de fermentación de las cepas de la presente invención pueden obtenerse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como extracción, centrifugación y/o filtración de caldo de fermentación. Los expertos en la técnica apreciarán que las llamadas preparaciones libres de células pueden no estar desprovistas de células, sino que están en gran parte libres de células o esencialmente libres de células, dependiendo de la técnica utilizada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para eliminar las mismas. La preparación libre de células resultante puede secarse y/o formularse con componentes que ayuden en su aplicación a plantas o a medios de cultivo de plantas. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritas anteriormente para el caldo de fermentación, también son aplicables a las preparaciones libres de células.

En algunas realizaciones, los procedimientos divulgados son producir composiciones que son formulaciones líquidas. Los ejemplos no limitantes de formulaciones líquidas incluyen concentraciones de suspensión y dispersiones oleosas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención son formulaciones sólidas. Los ejemplos no limitantes de formulaciones líquidas incluyen polvos liofilizados y polvos secados por pulverización.

Las composiciones preparadas con los procedimientos de la presente invención pueden incluir elementos inertes de formulación añadidos a composiciones que comprenden células, preparaciones sin células o metabolitos para mejorar la eficacia, estabilidad y empleabilidad y/o para facilitar el procesamiento, el envasado y la aplicación de uso final. Dichos elementos inertes e ingredientes de formulación pueden incluir vehículos, agentes de estabilización, nutrientes o agentes modificadores de la propiedad física, que pueden añadirse individualmente o en combinación. En algunas realizaciones, los vehículos pueden incluir materiales líquidos tales como agua, aceite y otros disolventes orgánicos o inorgánicos y materiales sólidos tales como minerales, polímeros o complejos de polímeros, derivados biológicamente o mediante síntesis química. En algunas realizaciones, el vehículo es un aglutinante o adhesivo que facilita la adherencia de la composición a una parte de la planta, tal como una semilla o raíz. Ver, por ejemplo, Taylor, A.G., *et al.*, "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments", *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 321-339 (1990). Los agentes de estabilización pueden incluir agentes antiaglutinantes, agentes antioxidantes, desecantes, protectores o conservantes. Los nutrientes pueden incluir fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo tales como azúcares, polisacáridos, aceites, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y fosfatos. Los modificadores de las propiedades físicas pueden incluir agentes de carga, agentes humectantes, espesantes, modificadores del pH, modificadores de la reología, dispersantes, adyuvantes, agentes tensioactivos, agentes anticongelantes o colorantes. En algunas realizaciones, la composición que comprende células, la preparación sin células o los metabolitos producidos por fermentación, se puede emplear directamente con o sin agua como diluyente, sin ninguna otra preparación de formulación. En algunas realizaciones, los elementos inertes de formulación se agregan después de concentrar el caldo de fermentación y durante o después del secado.

INFORMACIÓN DE DEPÓSITO

Una muestra de cepa de *Paenibacillus* sp. de la invención ha sido depositada en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola ubicada en el Centro Nacional de Investigación de Utilización Agrícola, Servicio de Investigación Agrícola, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, EE.UU., bajo el Tratado de Budapest del 28 de agosto de 2014, y se le ha asignado el número de

acceso: NRRL B-50972. Una muestra de la cepa de *Bacillus subtilis* de la invención, se ha depositado en el NRRL, bajo el Tratado de Budapest del 7 de mayo de 1997, y se le ha asignado el número de acceso: NRRL B-21661.

La cepa de *Paenibacillus* sp. y la cepa de *Bacillus subtilis* se han depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo esté disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a alguien determinado por parte del Comisionado de Patentes y Marcas que tenga derecho a ello según los 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa de *Paenibacillus* sp depositada.

Se proporcionan los siguientes ejemplos.

Ejemplos

10 Ejemplo 1. Niveles de fusaricidina A y actividad antifúngica en las fracciones de sedimentos y sobrenadantes de un caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972

Se cultivó *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 en un medio a base de soja para producir un cultivo de caldo entero. Una porción del cultivo de caldo entero se centrifugó a continuación, a una fuerza centrífuga relativa (FCR) de 24.790xg durante 10 minutos, para producir una fracción de sedimentos (es decir, concentrado de caldo) y un sobrenadante. El centrifugado a esta velocidad solo fue posible para volúmenes pequeños (~30 ml) y dio como resultado una fracción de sedimentos blanda y un sobrenadante relativamente turbio. La fracción de sedimentos representó entre un cuarto y un tercio del volumen original, y la fracción sobrenadante representó el volumen restante. La fracción de sedimentos y la fracción sobrenadante se analizaron en estos volúmenes sin ninguna dilución o concentración adicional.

Con volúmenes mayores (~1.000 ml), donde la velocidad de centrifugación máxima se limitó a una FCR de 17.000xg, no fue posible separar una fracción de sedimentos de una fracción sobrenadante, con el caldo de cultivo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972. Era evidente que el centrifugado a gran escala del caldo de cultivo entero del *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 requeriría la modificación del cultivo de caldo entero para permitir la separación de una fracción de sedimentos y una fracción sobrenadante a velocidades de centrifugación más bajas.

Se usó un procedimiento cromatográfico empleando cromatografía líquida de ultra-rendimiento/espectrometría de masas con triple tiempo de ejecución (UPLC/MS Triple TOF), para evaluar las cantidades relativas del compuesto antifúngico conocido, fusaricidina A, en las fracciones: Columna: ZORBAX™ Eclipse Plus, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm; Agua (0,1 % de FA) y acetonitrilo (0,1 % de FA); Gradiente (%B): 0-5 min 10-95 %; Lavado. La identidad de la fusaricidina A se determinó por su tiempo de retención y masa únicos. Las intensidades relativas de señal del pico de la fusaricidina en los espectros se presentan en la Tabla 1, con cada intensidad normalizada con respecto a la presente en todo el espectro de caldo. La fusaricidina A se concentró en la fracción de sedimentos, con una pequeña cantidad restante en la fracción sobrenadante.

Las unidades formadoras de colonias presentes en cada fracción se cuantificaron haciendo diluciones en serie de cultivo en el caldo entero, en la fracción de sobrenadante y en la fracción de sedimento y sembrando en placas las diluciones en el medio sólido. Las colonias resultantes se contaron y registraron (ver Tabla 1). Como se esperaba, la mayoría de las células se movieron a la fracción de sedimentos, mediante el centrifugado.

35 **Tabla 1.** Unidades formadoras de colonias (UFC) y cantidades relativas de fusaricidina a en un caldo de cultivo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972.

Muestra	Cantidad relativa de fusaricidina A	UFC/g
Caldo entero	1,00	$2,0 \times 10^7$
Sobrenadante	0,11	$1,3 \times 10^5$
Sedimentos (concentrado de caldo)	2,16	$9,4 \times 10^7$
Caldo entero de una fermentación independiente	0,93	Sin medición

Las actividades antifúngicas de las fracciones también se midieron en un ensayo *in vivo* con *Botrytis cinerea* (BOTRCI). El caldo entero con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 y las fracciones correspondientes de sobrenadante y sedimento se diluyeron cada una en agua, hasta volúmenes finales equivalentes. El caldo entero diluido, la fracción sobrenadante y la fracción de sedimento se aplicaron a plantas jóvenes que posteriormente se expusieron a un inóculo de *Botrytis cinerea* (BOTRCI). Varios días después de la exposición al inóculo del patógeno de planta, cada planta se puntuó para el control porcentual del patógeno, en relación con las plantas de control no tratadas. Cada tratamiento fue evaluado con varias repeticiones.

Los resultados mostrados en la Figura 1 demuestran que la mayor actividad antifúngica estaba presente en el caldo entero ("CE") y en la fracción de sedimento ("Sedimentos"), mientras que la fracción sobrenadante ("Sob") proporcionaba poca actividad antifúngica observable, en comparación con el control no tratado ("Agua").

Estos datos experimentales indican que los compuestos antifúngicos en caldo entero con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, se pueden enriquecer o concentrar centrifugando el caldo entero y eliminando el sobrenadante del sedimento resultante.

Ejemplo 2. Identificación de un auxiliar de procesamiento de centrifugación para caldo de cultivo entero con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972

5 El caldo entero con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 contiene biopolímeros viscosos, tales como exopolisacáridos (EPS), que dificultan la producción de una fracción compacta de sedimentos por centrifugación. Esto se puede ver en las fotografías de los sedimentos de caldo entero centrifugados sin ningún auxiliar de procesamiento, etiquetados como "CE-SDOS" en la Figura 2. Después de probar varios agentes químicos por su capacidad de inducir la formación de una fracción de sedimento compacta durante el centrifugado, se identificó el GEROPON® (diocilsulfosuccinato de sodio; también conocido como SDOS).

10 Cuando se añadió GEROPON® (SDOS) al caldo entero ("CE") con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 a una concentración de centrifugación de la mezcla del 0,1 % al 0,5 % (p/v), dio como resultado una fracción compacta de sedimentos y un sobrenadante relativamente libre de materia particulada. Esto puede verse en las fotografías del caldo entero centrifugado mezclado con GEROPON® (SDOS), etiquetado como "CE+SDOS" en la Figura 2.

Ejemplo 3. Efecto de la ayuda de procesamiento de centrifugación con caldo entero de otra cepa de *Paenibacillus*

15 Para investigar si el GEROPON® (SDOS) podría inducir la formación de una fracción compacta de sedimentos durante el centrifugado con otras cepas productoras de EPS, se cultivó otra cepa de *Paenibacillus*, conocida por producir niveles relativamente altos de EPS, en un medio a base de soja. Varias preparaciones de caldo entero se centrifugaron a una FCR de 17.000xg, durante 5 minutos, con y sin GEROPON® (SDOS), a una concentración de entre 0,1 % y 0,5 % (p/v).

20 Como se muestra en la Figura 3, la adición de GEROPON® (SDOS) al caldo entero de la cepa de *Paenibacillus* productora de EPS, dio como resultado una fracción compacta de sedimentos y una fracción sobrenadante clara. Por el contrario, el centrifugado del mismo caldo entero sin GEROPON® (SDOS), generalmente produjo una fracción difusa de sedimentos y una fracción sobrenadante turbia.

Ejemplo 4. Confirmación de que el SDOS induce la formación de una fracción compacta de sedimentos y la medición de la fusaricidina A en sedimentos y fracciones de sobrenadantes

25 El GEROPON® (SDOS) es un producto comercial disponible de Solvay (Bruselas, Bélgica). Para confirmar que el SDOS en el GEROPON® era responsable del efecto de centrifugación y no otro componente químico en el producto comercial, se compró una preparación purificada de SDOS de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri). El experimento descrito en el Ejemplo 2 se repitió con GEROPON® (SDOS) añadido al caldo entero, hasta lograr una concentración final de 0,1 % o el SDOS purificado se añadió a concentraciones finales de 0,1 % o 0,5 %. Se produjeron fracciones de sedimentos compactas con GEROPON® (SDOS) o el SDOS purificado.

30 El procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 1 se utilizó a continuación, para determinar los niveles relativos de fusaricidina A en el caldo entero y las fracciones de sedimentos y sobrenadantes que contenían GEROPON® (SDOS) o el SDOS purificado. Volúmenes equivalentes del caldo entero, la fracción de sedimentos y la fracción de sobrenadante se analizaron para niveles de fusaricidina A que se normalizaron con respecto a la señal producida por la misma, en el caldo entero. La mayoría de la fusaricidina A se separó en las fracciones de sedimentos con muy pocos restantes en las fracciones sobrenadantes (ver la Figura 4)

35 Las fracciones de sedimentos en estos experimentos representaron entre un cuarto y un tercio del volumen original, y la fracción sobrenadante representó el volumen restante, como se observó en el Ejemplo 1. Como la fracción de sedimentos representó una forma concentrada de caldo entero, se hubiera esperado que las cantidades relativas de fusaricidina A en la fracción de sedimentos fueran considerablemente más altas que las detectadas en el caldo entero (ver, por ejemplo, los niveles de fusaricidina A en el caldo entero y la fracción de sedimentos en la Tabla 1). Sin embargo, en las fracciones de sedimentos formadas con GEROPON® (SDOS), este no fue el caso (comparar los niveles de fusaricidina A en el caldo entero y las fracciones de sedimentos en la Figura 4). Estos resultados sugirieron que mientras que el GEROPON® (SDOS) facilitó la formación de una fracción de sedimentos compacta de caldo entero, a velocidades de centrifugación relativamente bajas, también disminuyó la cantidad de fusaricidina A detectable con el procedimiento cromatográfico descrito en el Ejemplo 1. Este procedimiento analítico se basa en la capacidad de la columna de cromatografía para separar la fusaricidina A de otros compuestos y no detecta la fusaricidina A unida a grandes agregados insolubles.

Ejemplo 5. Análisis de tamaños de partículas en el caldo de cultivo con *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 con y sin GEROPON® (SDOS)

40 Los resultados experimentales sugieren que el GEROPON® (SDOS) indujo la formación de grandes agregados de esporas, fusaricidina A y otros materiales en el caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 y dichos agregados produjeron una fracción compacta de sedimentos durante el centrifugado, a velocidades relativamente bajas. Para investigar si la agregación estaba ocurriendo por el GEROPON® (SDOS), se realizó un análisis de tamaño de partículas (PSA).

Un PSA mide la distribución del tamaño de las partículas en una muestra de suspensión líquida. Se pasa una luz láser a través de una suspensión de partículas líquidas y la variación angular en la intensidad de la luz dispersa se registra a medida que el haz de láser pasa a través de la muestra. Esta dependencia de intensidad angular se emplea luego para generar la distribución del tamaño de partículas. La curva de datos resultante representa el tamaño de las partículas, como una función de la población de partículas de ese tamaño.

Se realizó un PSA con caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, un caldo concentrado con y sin GEROPON® (SDOS), y fracciones sobrenadantes de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 con y sin GEROPON® (SDOS). El caldo concentrado estaba constituido por fracciones de sedimentos de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 después del centrifugado a alta velocidad sin GEROPON® (SDOS) o el centrifugado a baja velocidad con GEROPON® (SDOS), con una pequeña cantidad de sobrenadante que era difícil de eliminar de los sedimentos. Las curvas de datos resultantes se muestran en las **Figuras 5A-5E**. Las dos curvas en cada gráfico representan dos medidas tomadas con cada muestra.

Las curvas de datos de PSA para el concentrado de caldo con GEROPON® (SDOS) identificaron poblaciones de partículas con diámetros mayores que las observadas con el caldo concentrado sin GEROPON® (SDOS). La mayoría de las partículas del concentrado de caldo con GEROPON® (SDOS) mostraron un diámetro de 6 µm o mayor. Por el contrario, la mayoría de las partículas del concentrado de caldo sin GEROPON® (SDOS) mostraron un diámetro de menos de 6 µm (comparar la **Figura 5B** y la **Figura 5C**). Estos resultados confirmaron la hipótesis de que el GEROPON® (SDOS) indujo la formación de grandes agregados.

El análisis de las fracciones sobrenadantes con y sin GEROPON® (SDOS) confirmó adicionalmente esta hipótesis. La mayoría de las partículas en la fracción sobrenadante del caldo entero con GEROPON® (SDOS) exhibieron diámetros de menos de 0,4 µm, mientras que la mayoría de las partículas en la fracción sobrenadante del caldo entero sin GEROPON® (SDOS) tenían diámetros mayores a 0,4 µm (comparar la **Figura 5D** y la **Figura 5E**). Estos datos sugieren que la adición de GEROPON® (SDOS) al caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 induce la formación de agregados grandes que se eliminan eficazmente de la fracción de sobrenadante y sedimentan con la fracción de sedimentos, durante el centrifugado.

Ejemplo 6. Efecto del pH y la concentración de sal en la formación de sedimentos y los niveles de fusaricidina A

Los compuestos antifúngicos, tales como la fusaricidina A, a menudo portan grupos ionizables que están influidos por el pH de la solución en la que se disuelven. La carga eléctrica de estos grupos ionizables afecta a la forma en que los compuestos antifúngicos interactúan con otros compuestos en la solución. Para identificar los pH que mejoran la capacidad del GEROPON® (SDOS) para inducir la formación de agregados en el caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, el pH del caldo entero se ajustó entre 3 y 10, mediante la adición de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, antes del centrifugado.

La observación de las fracciones de sedimentos después de centrifugación a baja velocidad, con caldo entero que contiene GEROPON® (SDOS) a un pH de 3, 6 o 10, demostró que se produjo una fracción de sedimentos compacta con un sobrenadante claro a un pH de 6 (ver la **Figura 6**). Este experimento se repitió con caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 que contenía GEROPON® (SDOS) y se ajustó a un pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Después del centrifugado, las fracciones de sedimentos se separaron de las fracciones sobrenadantes y los niveles relativos de la fusaricidina A en las fracciones de sedimentos se determinaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los niveles más altos de fusaricidina A se detectaron en fracciones de sedimentos de caldo entero con un pH entre 4 y 7.

La concentración de sal afecta a la fuerza iónica de una solución. Las altas concentraciones de sal pueden proteger las interacciones de los dipolos y disminuir la hidratación de los compuestos polares, lo que permite la "precipitación por adición de sales" de estos compuestos de la solución. Se añadieron diversas concentraciones de sal (por ejemplo, cloruro de sodio o cloruro de potasio) al *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 para determinar su efecto sobre la formación de una fracción compacta de sedimentos después de una centrifugación a baja velocidad con GEROPON® (SDOS). Las concentraciones de sal de entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 10 % facilitaron la formación de una fracción de sedimentos compacta.

Ejemplo 7. Identificación de auxiliares de procesamiento de centrifugación adicionales con caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972

Después de identificarse el GEROPON® (SDOS), se evaluaron los agentes químicos adicionales por su capacidad de producir un efecto similar con el caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972. Cada agente químico se mezcló con caldo entero en viales cónicos de 50 ml a una concentración de entre 0,1 % y 0,5 % (p/v) y se centrifugó a una velocidad de centrifugación relativamente baja, produciendo un FCR de 3.000xg durante 5 minutos.

Los caldos enteros centrifugados mezclados con los diversos agentes químicos se compararon entonces con el caldo entero centrifugado sin ningún agente químico (es decir, el vial cónico más a la izquierda en la **Figura 7A**). Varios agentes químicos produjeron un sobrenadante transparente después de una centrifugación a baja velocidad (es decir, un FCR de 3.000xg) y se investigaron adicionalmente. Como se demuestra en el Ejemplo 1, se requirió centrifugación a FCR de 24.790xg para formar una fracción de sedimentos identificable en ausencia de estos agentes químicos.

Los agentes químicos que mejoraron la formación de la fracción de sedimentos del caldo entero se probaron con volúmenes mayores para confirmar este efecto. El GEROPON® (SDOS) se incluyó en estos experimentos de confirmación como control positivo. La **Figura 7B** muestra una fotografía de las fracciones de sedimentos y sobrenadantes de uno de tales experimentos que confirma que el NIAPROOF® 4 (sulfato de 7-etil-2-metil-4-undecanilo de sodio) produce un efecto similar al observado con el GEROPON® (SDOS).

El NIAPROOF® 4 (sulfato de 7-etil-2-metil-4-undecanil de sodio); el NIAPROOF® 8 (2-etilhexil sulfato de sodio); y el alquilbencenosulfonato lineal, dodecibencenosulfonato de sodio, permitió la formación de una fracción de sedimentos compacta, después de una centrifugación a baja velocidad del caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972.

Ejemplo 8. Identificación de un auxiliar de liberación para los compuestos antifúngicos en la fracción de sedimento de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972

El análisis de PSA de concentrados de caldo y fracciones sobrenadantes con y sin GEROPON® (SDOS), indicó que la adición de un auxiliar de centrifugación (por ejemplo, GEROPON® (SDOS)), indujo la formación de agregados que formaban más fácilmente una fracción de sedimentos compacta tras el centrifugado (ver **Figuras 5A-5E**). Se desprende que un auxiliar de liberación añadido después del centrifugado y el aislamiento de la fracción de sedimentos podría alterar los agregados y aumentar la biodisponibilidad de los compuestos antifúngicos y la eficacia del producto de fermentación resultante.

Se probaron varios compuestos químicos con las fracciones de sedimentos por su capacidad para actuar como auxiliares de liberación. Para evaluar la eficacia de los compuestos como auxiliares de liberación, se generó una fracción de sedimentos con GEROPON® (SDOS) del caldo entero, como se describe en el Ejemplo 2. A continuación, se mezclaron porciones de la fracción de sedimento con los diversos compuestos químicos y la cantidad de fusaricidina A presente en cada muestra se determinó con el procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 1. Todas las medidas de fusaricidina A se normalizaron con respecto a la cantidad presente en el caldo entero del material de partida. La fracción de sedimento con solo GEROPON® (SDOS) se incluyó como control.

Se descubrió que varios compuestos de éter alquílico de polioxietilenglicol aumentan la cantidad relativa de fusaricidina A presente en la fracción de sedimentos. Estos compuestos incluyen dodecil éter de polioxietileno (25) (también conocido como C12EO25) y BRIJ® L23 (dodecil éter de polioxietileno (23), también conocido como C12EO23) (ver la **Figura 8**). Experimentos adicionales demostraron que los compuestos de alquil éter de polioxietilenglicol C12EO6 (dodecil éter de polioxietileno (6)) y BRIJ® S100 (octadecil éter de polioxietileno (100)) también aumentaron la cantidad relativa de fusaricidina A presente en la fracción de sedimentos (ver la **Figura 9**). También se encontró que el TWEEN® 80 ((E)-octadec-9-enoato de 2-[2-[3,4-bis(2-hidroxi)etoxi]oxolan-2-il]-2-(2-hidroxi)etoxi]etilo también conocido como oleato de polioxietilensorbitán) funciona como un auxiliar de liberación (ver la **Figura 9**).

Ejemplo 9. Aumento de la suspensibilidad de la fracción de sedimentos después de la adición del auxiliar de liberación

Se investigaron las propiedades físicas de la fracción de sedimentos con el GEROPON® (SDOS) solo o con ambos GEROPON® (SDOS) y C12EO25. Una de las propiedades físicas investigadas fue la suspensibilidad de la fracción concentrada de sedimentos.

El *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 se cultivó en un medio a base de soja y se sometió a centrifugación a baja velocidad con GEROPON® (SDOS), para producir una fracción de sedimentos. La fracción de sedimentos se separó en dos fracciones y el C12EO25 se mezcló con una de las fracciones. Se mezclaron alícuotas de ambas fracciones con agua en viales cónicos de 15 ml para hacer diluciones de 10 veces. Las fracciones de sedimentos diluidas se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante varios minutos.

Después de ser equilibrada, la fracción de sedimentos sin C12EO25 se separó en dos capas, una capa transparente en la parte superior y una capa turbia en la parte inferior (ver el vial cónico a la izquierda en la **Figura 10**). Por el contrario, la fracción de sedimentos que contiene C12EO25 permaneció como una única suspensión después de equilibrada (ver el vial cónico a la derecha en la **Figura 8**). Estos resultados demostraron que el C12EO25 aumenta la suspensibilidad del caldo concentrado de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, cuando se diluye en agua.

Ejemplo 10. Incremento de la actividad antifúngica del caldo entero de *Paenibacillus* Sp. NRRL B-50972 con adición de un ayudante de centrifugado y liberación

El *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 se cultivó en un medio a base de soja para producir un caldo entero. Se añadió 0,1 % de GEROPON® (SDOS) y 2 % de KCl a una porción del caldo entero y el pH se ajustó a 6. Esta porción del caldo entero se centrifugó para generar una fracción de sedimentos (es decir, un concentrado de caldo), y la fracción sobrenadante se eliminó. Una porción de la fracción de sedimentos se mezcló luego con el auxiliar de liberación, C12EO25.

El caldo entero, la fracción de sedimentos con solo GEROPON® (SDOS) y la fracción de sedimentos con GEROPON® (SDOS) y C12EO25, se diluyeron en agua a concentraciones del 10 %, 5 %, 2,5 % y 1,25 %. Los caldos enteros diluidos se aplicaron a plantas jóvenes que posteriormente se expusieron a un inóculo de *Alternaria solani* (ALTESO)

o *Botrytis cinerea* (BOTRCI). Varios días después de la exposición al inóculo del patógeno de la planta, cada planta se calificó para el control porcentual del patógeno, en relación con las plantas de control sin tratar (UTC). Cada tratamiento se evaluó con tres repeticiones y se informó del porcentaje de control promedio (ver **Tablas 2-3**).

5 En cada uno de los ensayos, la fracción de sedimentos con solo GEROPON® (SDOS) tenía una mayor actividad antifúngica que el caldo entero, y la fracción de sedimentos con GEROPON® (SDOS) y C12EO25 tenía la mayor actividad antifúngica. Estos datos experimentales indican que la adición de GEROPON® (SDOS) al caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 permite el enriquecimiento o la concentración de los compuestos antifúngicos en una fracción de sedimentos, durante una centrifugación a baja velocidad y la adición de C12EO25 potencia la actividad antifúngica de dicha fracción de sedimentos.

10 También se aplicaron GEROPON® (SDOS) y C12EO25 a plantas jóvenes a velocidades finales similares a las de las fracciones de sedimento. Las plantas jóvenes se inocularon más tarde con un patógeno fúngico y cada planta se puntuó para el control porcentual del patógeno, en relación con las plantas UTC. Estos tratamientos de control demostraron que GEROPON® (SDOS) y C12EO25 no tenían actividad antifúngica inherente que pudiera identificarse después de la comparación con las plantas UTC.

15 **Tabla 2.** Control de *Alternaria solani* (ALTESO) logrado con caldo entero de *Paenibacillus* Sp. NRRL B-50972, una fracción de sedimentos resuspendida con GEROPON® (SDOS) y una fracción de sedimentos resuspendida con GEROPON® (SDOS) y C12EO25 a tasas de dilución del 10 %, 5 %, 2,5 % y 1,25 %

Tratamiento	Tasa de aplicación	Porcentaje de control promedio
Caldo Entero	10 %	98
	5 %	78
	2,5 %	78
	1,25 %	57
Fracción de sedimento + GEROPON® (SDOS)	10 %	98
	5 %	96
	2,5 %	80
	1,25 %	82
Fracción de sedimento + GEROPON® (SDOS) + C12EO25	10 %	99
	5 %	96
	2,5 %	94
	1,25 %	93

20 **Tabla 3.** Control de *Botrytis cinerea* (BOTRCI) logrado con caldo entero de *Paenibacillus* Sp. NRRL B-50972, una fracción de sedimento resuspendida con GEROPON® (SDOS) y una fracción de sedimento resuspendida con GEROPON® (SDOS) y C12EO25, a tasas de dilución del 10 %, 5 %, 2,5 % y 1,25 %

Tratamiento	Tasa de aplicación	Porcentaje de control promedio
Caldo Entero	10 %	63
	5 %	75
	2,5 %	68
	1,25 %	28
Fracción de sedimento + GEROPON® (SDOS)	10 %	89
	5 %	93
	2,5 %	60
	1,25 %	73
Fracción de sedimento + GEROPON® (SDOS) + C12EO25	10 %	100
	5 %	98
	2,5 %	94
	1,25 %	75

Ejemplo 11. Niveles de fusaricidina A en preparaciones a gran escala de concentrado de caldo de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 con auxiliar de centrifugación y auxiliar de liberación

5 Cinco lotes grandes separados de caldo concentrado de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 se prepararon como se describe en el Ejemplo 10, empleando GEROPON® (SDOS) como auxiliar de centrifugación y BRIJ® S100 (octadecil éter de polioxietileno (100)), como auxiliar de liberación. Cada lote constituía varios litros de material. Los niveles de fusaricidina en el caldo entero y el concentrado de caldo resultante de cada lote se cuantificaron como se describe en el Ejemplo 1. Todos los resultados se normalizaron con respecto a los niveles de fusaricidina A en un caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 almacenado a -80 grados Celsius (es decir, el "patrón de CE").

10 La **Figura 11** presenta los resultados mediante las barras en el gráfico que indican el intervalo de confianza del 95 %, en las mediciones de fusaricidina A. Los niveles de fusaricidina A en los concentrados de caldo fueron hasta 3,5 veces mayores que los detectados en los caldos enteros correspondientes.

Ejemplo 12. Efecto de un ayudante de centrifugación en un caldo entero con *Bacillus subtilis* NRRL B-21661

La cepa de *Bacillus subtilis* NRRL B-21661 se cultivó en un medio a base de soja. El caldo entero viscoso resultante se centrifugó a una FCR de 1.500xg durante 5 minutos con y sin GEROPON® (SDOS) a una concentración de entre 0,1 % y 0,5 % (p/v).

15 La adición de GEROPON® (SDOS) al caldo entero de la cepa de *Bacillus subtilis* NRRL B-21661, dio como resultado una fracción de sedimento más compacta y una fracción de sobrenadante más clara (ver la **Figura 12**). Por el contrario, el centrifugado del mismo caldo entero sin GEROPON® (SDOS) produjo una fracción de sedimento relativamente difusa y una fracción de sobrenadante turbia.

Ejemplo 13. Confirmación del aumento de la actividad antifúngica y la respuesta a la dosis de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 con un ayudante de centrifugado y liberación

20 El caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 se preparó y procesó como se describe en el Ejemplo 10. El caldo entero resultante, la fracción de sedimento con solo GEROPON® (SDOS) y la fracción de sedimento con GEROPON® (SDOS) y C12EO25 se diluyeron en serie para preparar muestras que tenían una concentración de materiales de partida de 1X, 0,5X, 0,25X y 0,125X. A continuación, las muestras diluidas en serie se aplicaron a las plantas jóvenes a una tasa de 0,625 %. Las plantas se inocularon con el hongo patógeno *Alternaria solani* y posteriormente se evaluaron para el control de la enfermedad, en relación con las plantas UTC. Los valores de control de la enfermedad informados son los promedios de tres repeticiones independientes.

30 Como se muestra en la **Tabla 4**, la fracción de sedimentos con solo GEROPON® (SDOS) tenía una mayor actividad antifúngica que el caldo entero, y la fracción de sedimentos con GEROPON® (SDOS) y C12EO25 tenía la mayor actividad antifúngica. Además, se observó una clara respuesta a la dosis en cada una de las muestras con la mayor actividad observada con las muestras 1X y la menor actividad observada con las muestras 0,125X.

35 **Tabla 4.** Control de *Alternaria solani* (ALTESO) logrado con caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, una fracción de sedimentos resuspendida con GEROPON® (SDOS) y una fracción de sedimentos resuspendida con GEROPON® (SDOS) y C12EO25 a diluciones en serie 1X, 0,5X, 0,25X y 0,125X de cada muestra. Todas las preparaciones de muestra se aplicaron a las plantas a una tasa de 0,625 %.

Tratamiento	Dilución en serie	Porcentaje de control promedio
Caldo entero	1X	61
	0,5X	26
	0,25X	16
	0,125X	0
Fracción de sedimento + GEROPON® (SDOS)	1X	93
	0,5X	81
	0,25X	39
	0,125X	7
Fracción de sedimento + GEROPON® (SDOS) + C12EO25	1X	97
	0,5X	88
	0,25X	70
	0,125X	32

Ejemplo 14. Niveles de fusaricidina A en caldo entero, concentrados de caldo y sobrenadantes de tres cepas diferentes de *Paenibacillus*

Se prepararon concentrados de caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 y de caldos enteros de dos cepas

de *Paenibacillus* adicionales, como se describe en el Ejemplo 10, empleando GEROPON® (SDOS) como auxiliar de centrifugación y BRIJ® S100 (octadecil éter de polioxietileno (100)) como un auxiliar de liberación. Las muestras de cada caldo entero y de los sobrenadantes eliminados durante la producción de los concentrados de caldo se guardaron para el análisis. Los niveles de fusaricidina en el caldo entero y los concentrados de caldo y sobrenadantes resultantes de cada cepa se cuantificaron, como se describe en el Ejemplo 1. Todos los resultados se normalizaron a los niveles de fusaricidina A en un caldo entero de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972 almacenado a -80 grados Celsius.

La **Figura 13** presenta los resultados con las barras de error en el gráfico que indican el intervalo de confianza del 95 % en las mediciones de fusaricidina A. La concentración efectiva de fusaricidina A, pasando de caldo entero a concentrado de caldo, se observó en las tres cepas con niveles en concentrados de caldo que aumentaron hasta 7 veces con respecto a los detectados en los caldos enteros correspondientes. No se encontró fusaricidina A detectable en ninguno de los sobrenadantes.

Se analizaron los caldos enteros, los concentrados de caldo y los sobrenadantes para determinar la actividad antifúngica contra la *Alternaria solani*, como se describe en el Ejemplo 10. Los tratamientos con BRAVO® (clorotalonil) se incluyeron como controles positivos. Los resultados presentados en la **Tabla 5** demuestran que se encontró actividad antifúngica en los caldos enteros y concentrados de caldo con poca o ninguna actividad antifúngica detectable observada en los sobrenadantes.

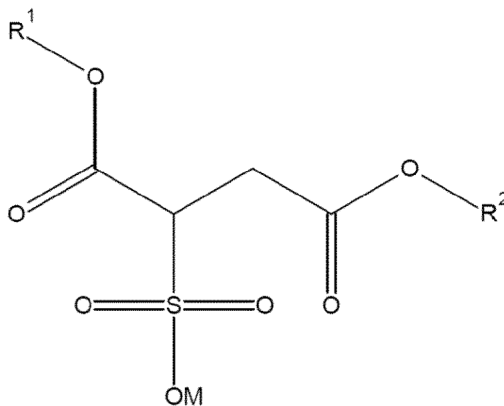
Tabla 5. Control de *Alternaria solani* (ALTESO) Logrado con caldos enteros, concentrados de caldo y sobrenadantes de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, cepa de *Paenibacillus* sp. A y cepa de *Paenibacillus* sp. B a tasas de dilución de 5 %, 2,5 % y 1,25 %.

Tratamiento	Tasa de aplicación	Porcentaje de control promedio
Caldo entero de <i>Paenibacillus</i> sp. NRRL B-50972	5 %	73
	2,50 %	73
	1,25 %	81
Concentrado de caldo de <i>Paenibacillus</i> sp. NRRL B-50972	5 %	93
	2,50 %	93
	1,25 %	92
Sobrenadante de <i>Paenibacillus</i> sp. NRRL B-50972	5 %	54
	2,50 %	31
	1,25 %	0
Caldo entero de cepa A de <i>Paenibacillus</i> sp.	5 %	92
	2,50 %	92
	1,25 %	90
Concentrado de caldo de cepa A de <i>Paenibacillus</i> sp.	5 %	95
	2,50 %	95
	1,25 %	95
Sobrenadante de cepa A de <i>Paenibacillus</i> sp.	5 %	0
	2,50 %	0
	1,25 %	0
Caldo entero de cepa B de <i>Paenibacillus</i> sp.	5 %	93
	2,50 %	94
	1,25 %	90
Concentrado de caldo de cepa B de <i>Paenibacillus</i> sp.	5 %	95
	2,50 %	96
	1,25 %	95
Sobrenadante de cepa B de <i>Paenibacillus</i> sp.	5 %	0
	2,50 %	0
	1,25 %	0
BRAVO® (Clorotalonil)	128 ppm	98
BRAVO® (Clorotalonil)	32 ppm	92

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer un lipopéptido en un cultivo de células microbianas, comprendiendo el procedimiento:

a) mezclar un sulfonato anfífilo de fórmula (I)

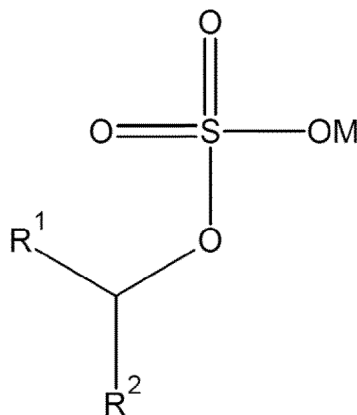


5

en la que:

R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado; y
M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺

y/o un sulfato anfífilo de fórmula (II)



10

en la que:

R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado; y
M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺;

con el cultivo celular para inducir la formación de agregados que contienen el lipopéptido;

b) centrifugar el cultivo celular para generar una fracción sobrenadante y una fracción de sedimento;
c) separar la fracción de sedimento de la fracción sobrenadante; y
d) mezclar la fracción de sedimento con un éter alquílico de polioxietilenglicol para liberar el lipopéptido de los agregados.

15

20

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el lipopéptido se selecciona del grupo que consiste en compuestos de tipo iturina, compuestos de tipo fengicina, compuestos de tipo surfactina, compuestos de tipo fusaricidina y combinaciones de los mismos.

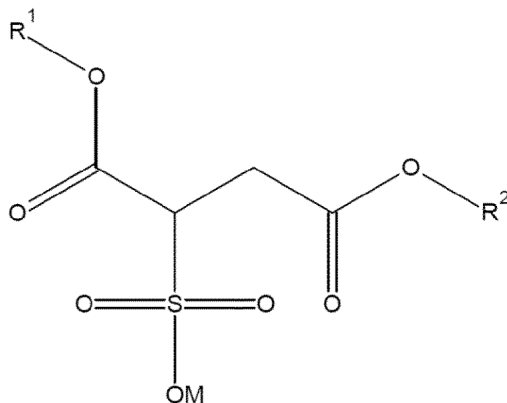
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el lipopéptido es un compuesto de tipo fusaricidina.

25

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el compuesto de tipo fusaricidina se selecciona del grupo que consiste en fusaricidina A, fusaricidina B, fusaricidina C, fusaricidina D, LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08, Paeniserina A1, Paeniserina A2, Paeniserina A3, Paeniserina A4, Paeniserina B1, Paeniserina B2, Paeniserina B3, Paeniserina B4, Paeniserina C1, Paeniserina C2, Paeniserina C3, Paeniserina C4, Paeniprolixina A1, Paeniprolixina A2, Paeniprolixina B1, Paeniprolixina B2, Paeniprolixina C1, Paeniprolixina C2, Paeniprolixina D1, Paeniprolixina D2, Paeniprolixina E1, Paeniprolixina E2, Paeniprolixina F1, Paeniprolixina F2, y combinaciones de los mismos.

5. Un procedimiento para purificar un exopolisacárido (EPS) de un cultivo de células microbianas, comprendiendo el procedimiento:

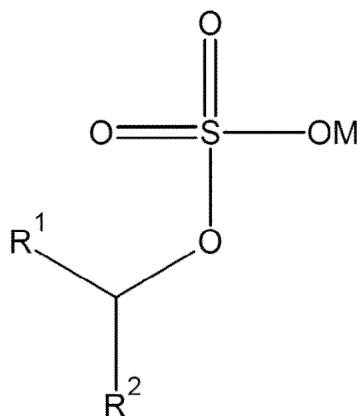
a) mezclar un sulfonato anfífilo de fórmula (I)



5 en la que:

R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado; y M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺

y/o un sulfato anfífilo de fórmula (II)



10 en la que

R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁₋₂₀ lineal o ramificado; y M es H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺

con el cultivo celular para inducir la formación de agregados;

- 15 b) centrifugar el cultivo celular para generar una fracción sobrenadante y una fracción de sedimento;
 c) separar la fracción sobrenadante de la fracción de sedimento;
 d) añadir alcohol a la fracción sobrenadante para precipitar el EPS; y
 e) eliminar el EPS precipitado de la fracción sobrenadante.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el EPS se selecciona de glucano, fructano, curdlano, gellan, xantano, emulsano, dextrano, celulosa y combinaciones de los mismos.

20 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R₁ y R₂ de dicho sulfonato de fórmula (I) son independientemente un alquilo C₈ lineal o ramificado.

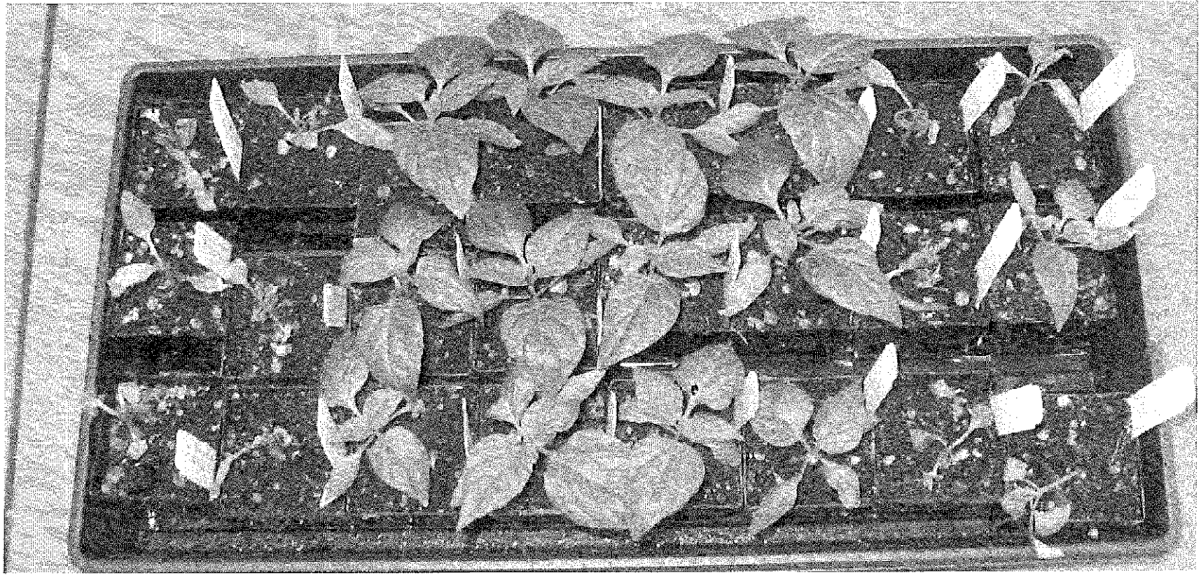
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el sulfonato es dioctil sulfosuccinato; 1,4-bis(2-etilhexoxi)-1,4-dioxobutano-2-sulfonato; o una sal Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺ de los mismos.

25 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R¹ y R² de dicho sulfato de fórmula (II) son independientemente un alquilo C₃₋₂₀ lineal o ramificado.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el sulfato de alquilo es sulfato de 7-etil-2-metil-4-undecanilo, sulfato de 2-etilhexilo o una sal de Li⁺, Na⁺, K⁺ o (alquilo C₁₋₈)₄N⁺ de los mismos.

11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de una cualquiera las reivindicaciones 1 a 4 y 7 a 10, en el que el alquil éter de polioxietilenglicol es un compuesto con una fórmula molecular de $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$ en el que
5 m es un número entero entre 1 y 120; y
n es un número entero entre 1 y 20.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH del cultivo de células microbianas se ajusta a entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7 antes de mezclar con el sulfonato anfífilo y/o el sulfato anfífilo.
- 10 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se agrega una sal al cultivo de células microbianas a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % antes del centrifugado.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo de células microbianas comprende una cepa de *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp. o *Pseudomonas* sp.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el cultivo de células microbianas comprende la cepa de *Paenibacillus* sp. NRRL B-50972, la cepa de *Bacillus subtilis* NRRL B-21661 y/o una cepa mutante fungicida de las mismas que tiene todas las características de identificación de la cepa respectiva.

FIG. 1



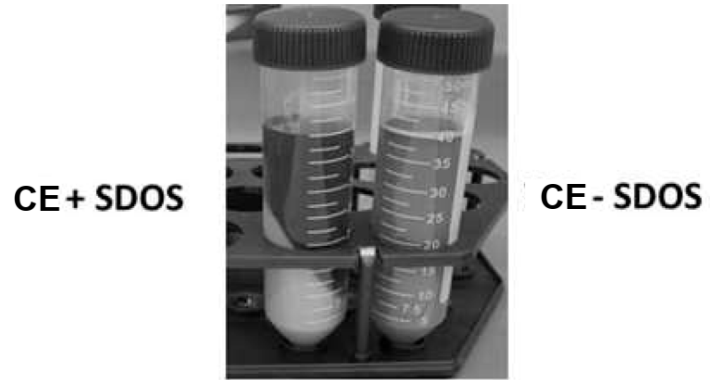
Agua

CE

Sedimentos

Sobrenadante

FIG. 2



CE - SDOS



CE + SDOS

FIG. 3



Superior: vista frontal, Inferior: vista posterior

FIG. 4

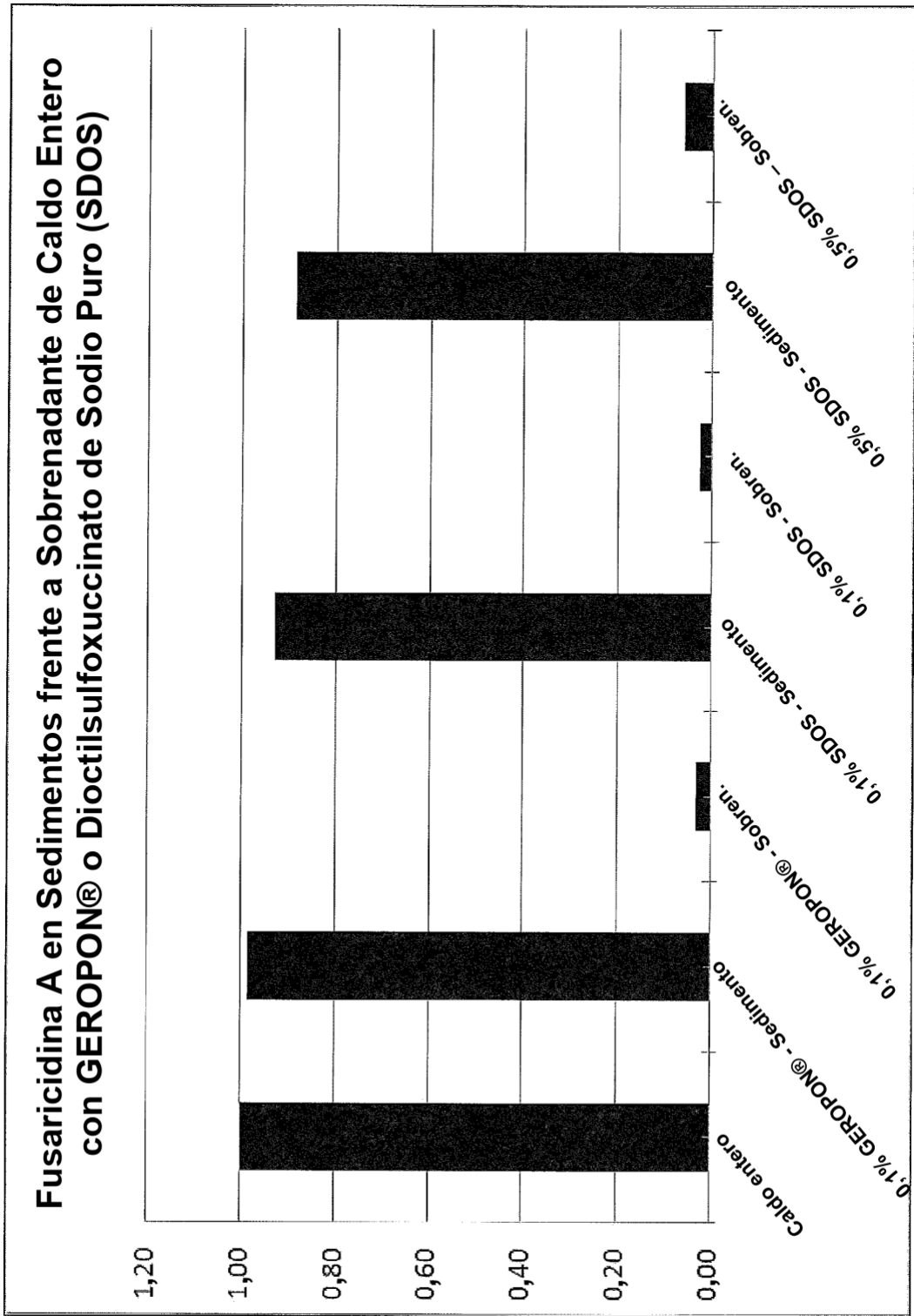
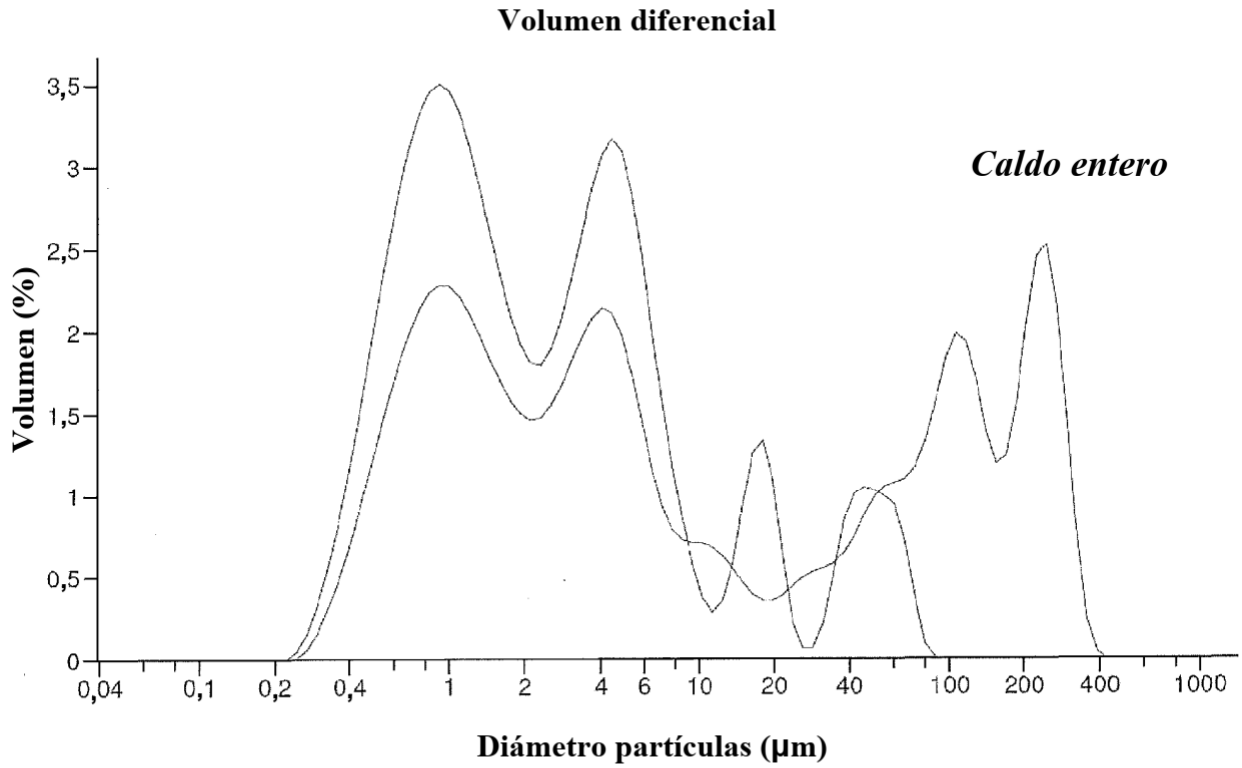


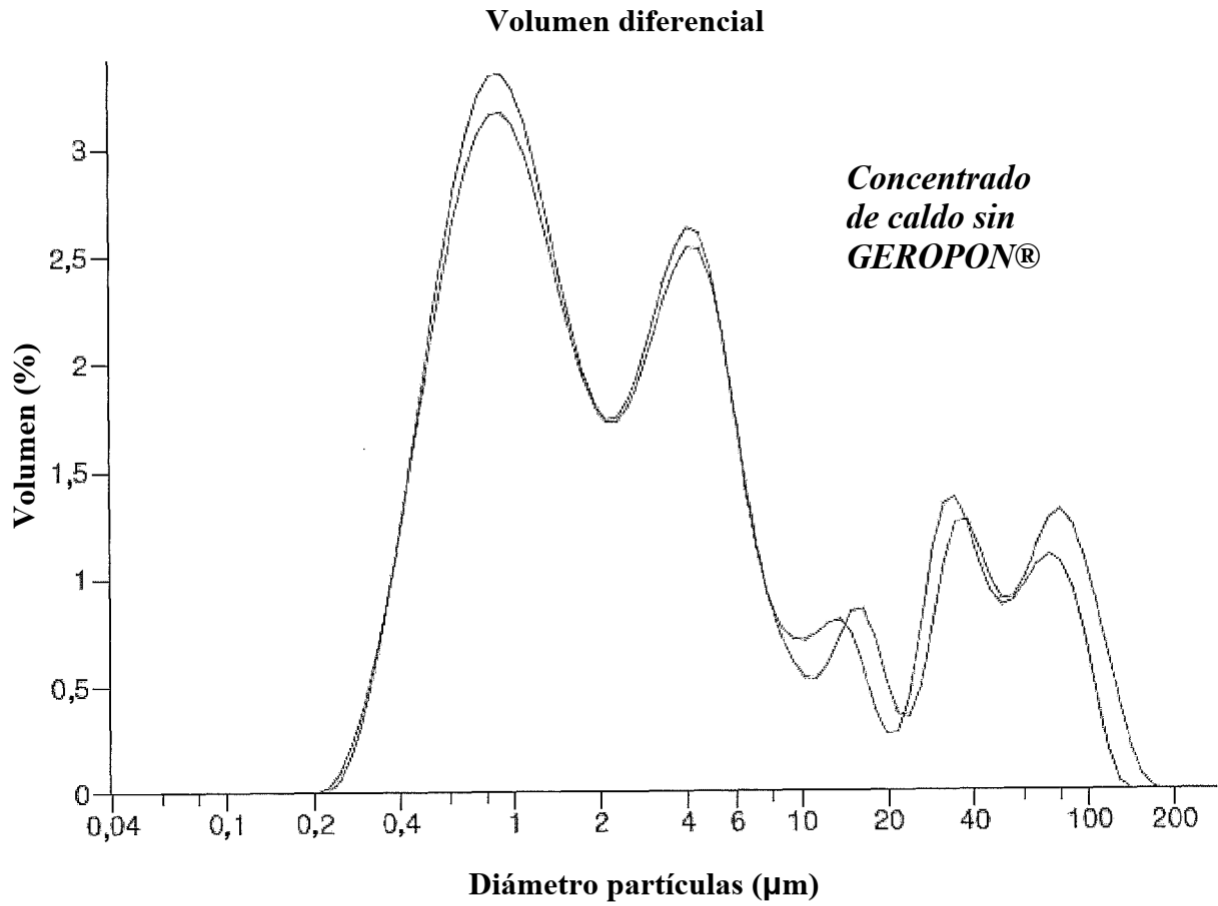
FIG. 5A



Estadísticas volumen (aritmético)
Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Media µm	D.T. µm	Varianza µm ²	d10 µm	d50 µm	d90 µm
55,9	85,4	7,302	0,709	5,02	210
7,22	13,6	186	0,578	2,12	18,6

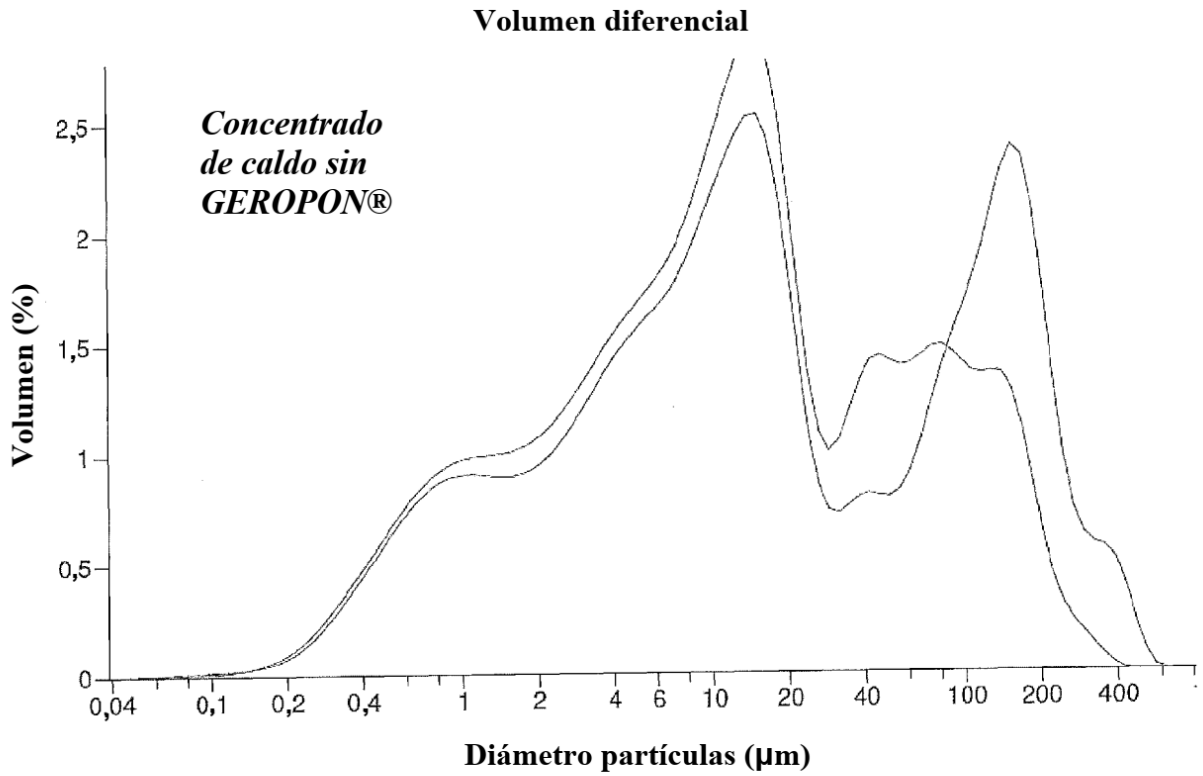
FIG. 5B



Estadísticas volumen (aritmético)
Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Media µm	D.T. µm	Varianza µm ²	d10 µm	d50 µm	d90 µm
14,3	26,7	713	0,572	2,53	53,7
11,6	21,7	472	0,572	2,33	41,0

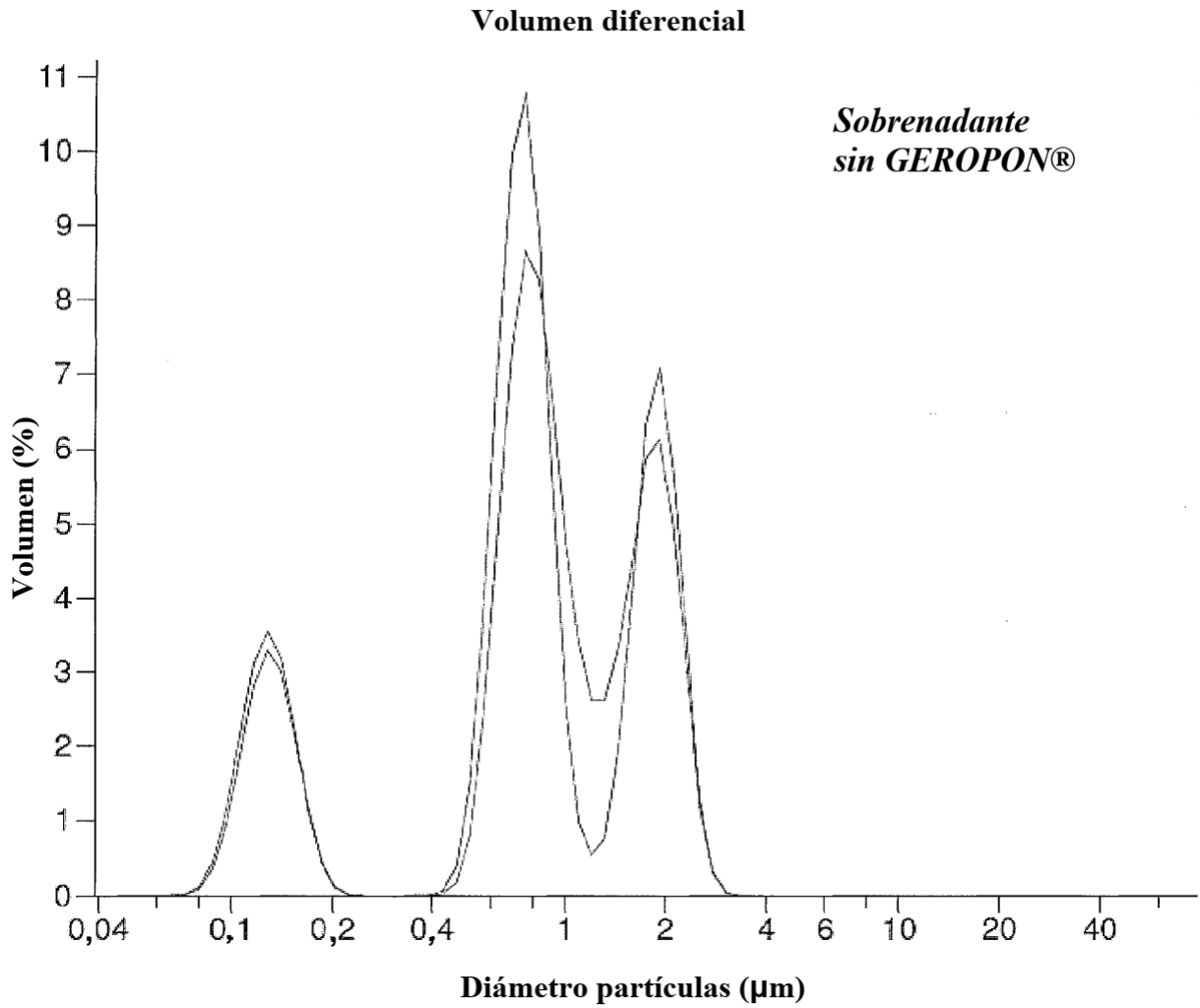
FIG. 5C



Estadísticas volumen (aritmético)
Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Media µm	D.T. µm	Varianza µm ²	d10 µm	d50 µm	d90 µm
57,3	85,5	7310	1,09	13,8	177
33,7	51,5	2655	1,02	11,8	106

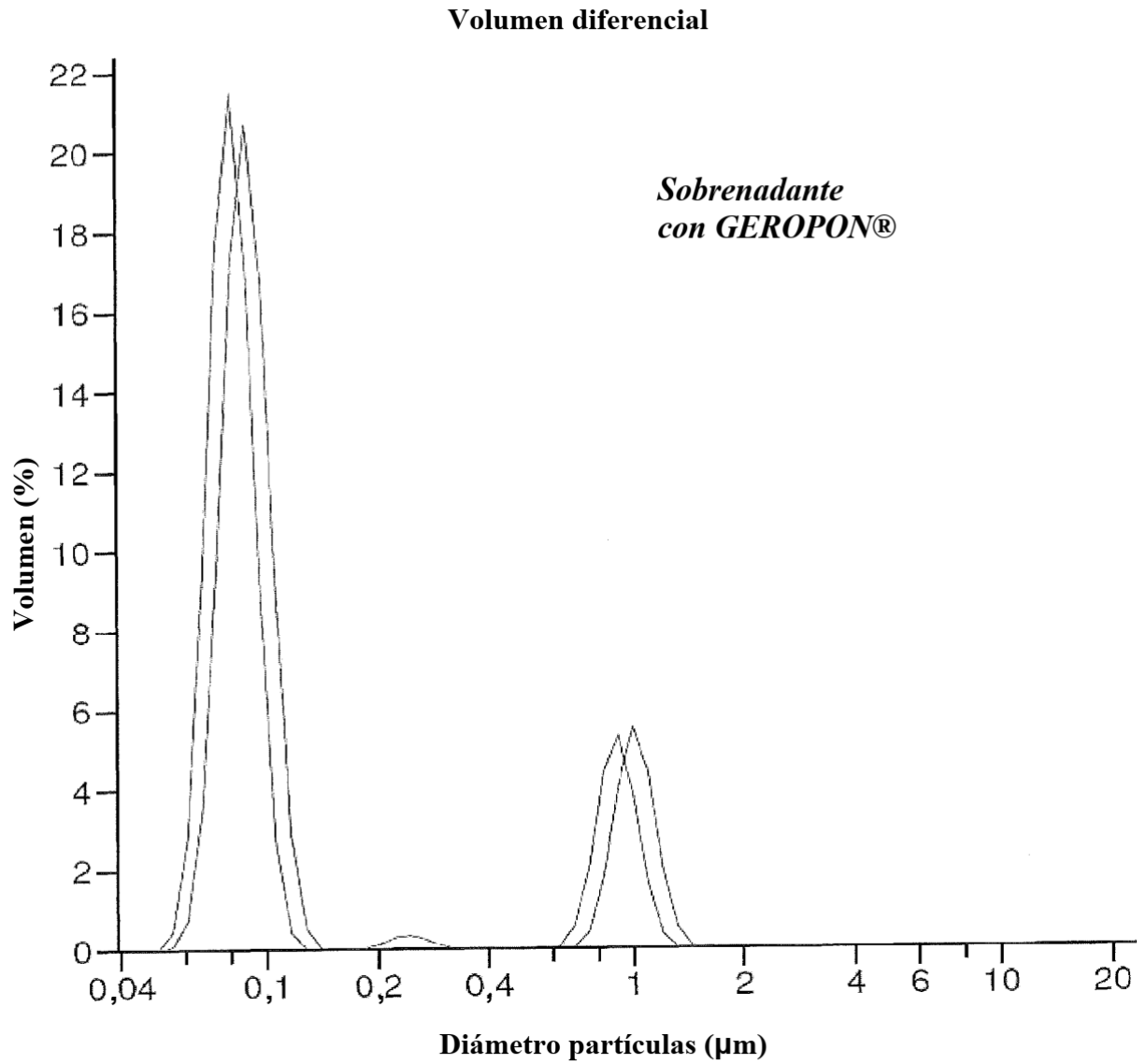
FIG. 5D



Estadísticas volumen (aritmético)
Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Media µm	D.T. µm	Varianza µm ²	d10 µm	d50 µm	d90 µm
1,03	0,656	0,430	1,333	0,866	2,00
1,02	0,673	0,454	0,137	0,791	2,05

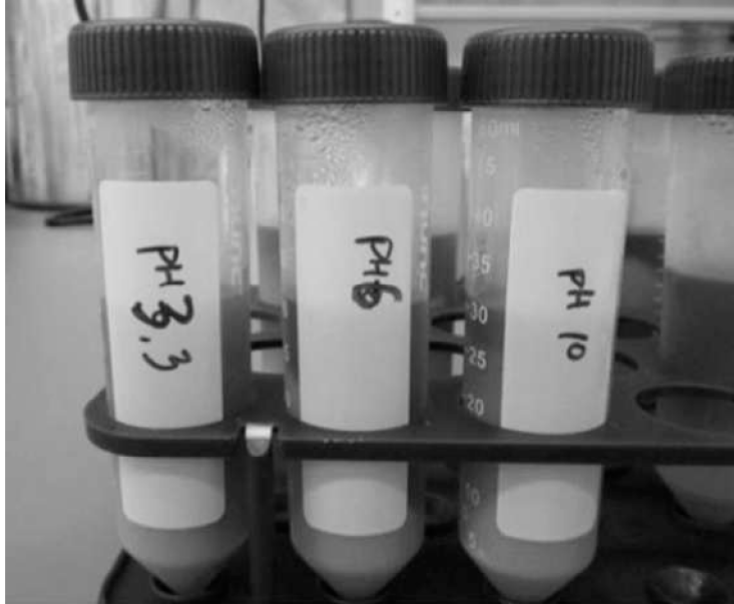
FIG. 5E



Estadísticas volumen (aritmético)
Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Media µm	D.T. µm	Varianza µm ²	d10 µm	d50 µm	d90 µm
0,263	0,366	0,134	0,074	0,092	0,997
0,234	0,323	0,104	0,068	0,064	0,888

FIG. 6

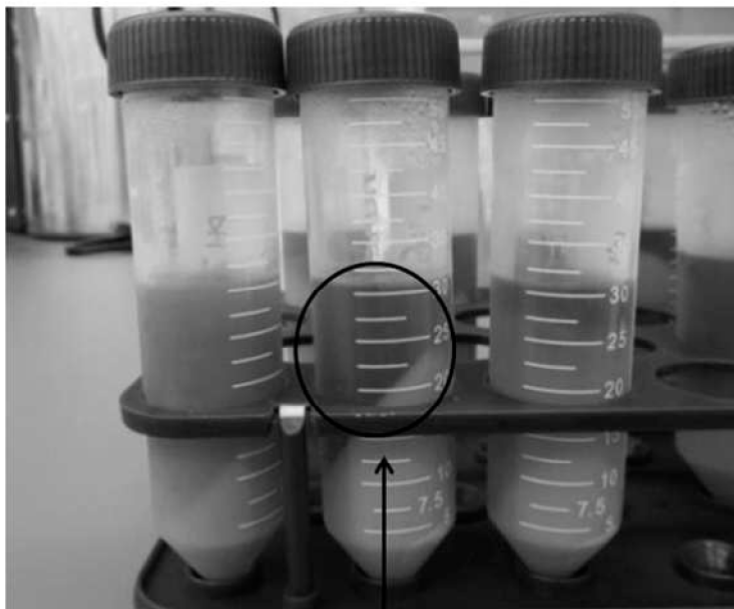


Vista
Frontal

pH 3

pH 6

pH 10



Vista
Posterior

Sobrenadante
más claro

FIG. 7A

Sobrenadantes claros



FIG. 7B



NIAPROOF® 4
sulfato de 7-etil-2-metil-4-
undecanilo de sodio

GEROPON®
dioctilsulfosuccinato
sódico

FIG. 8

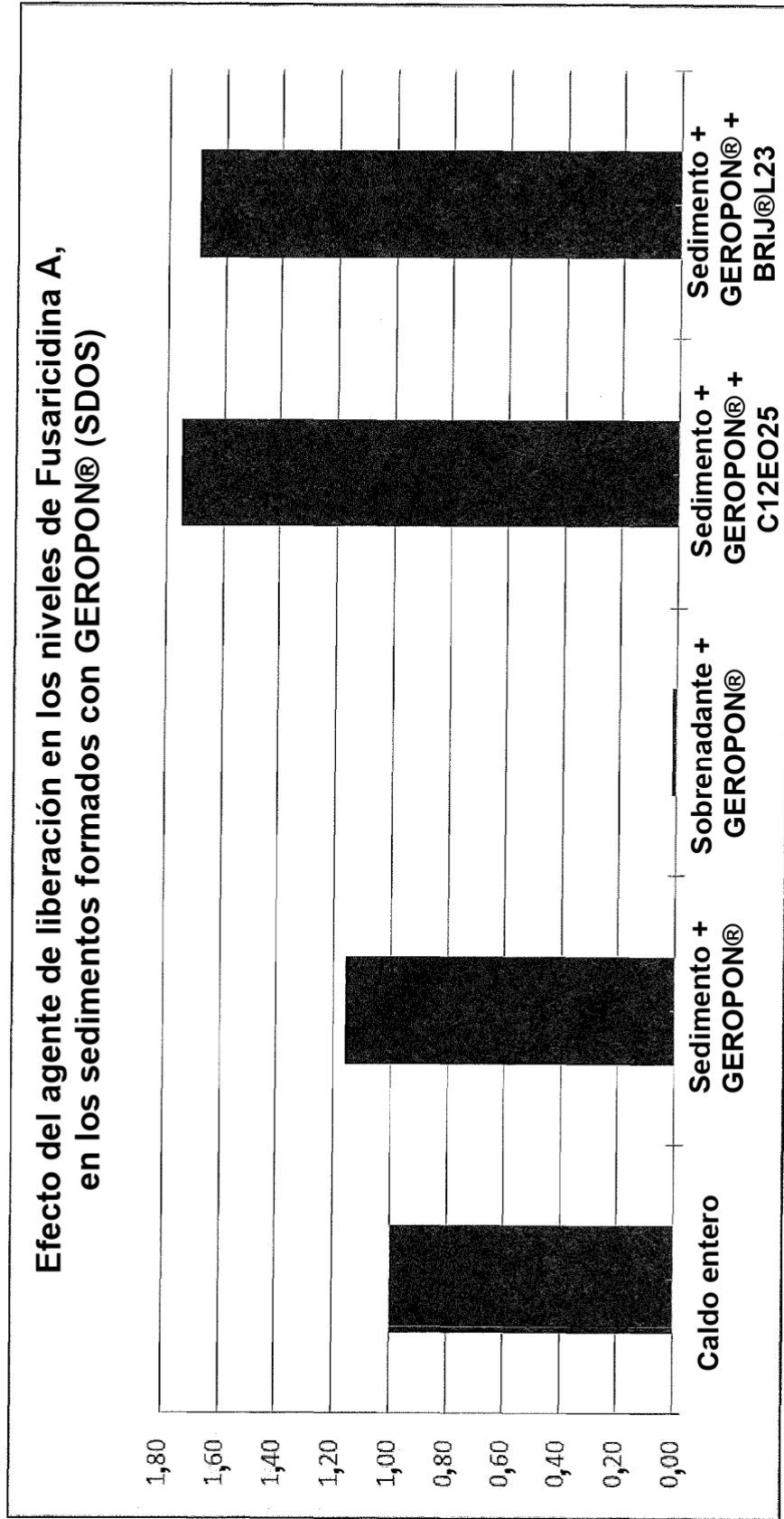


FIG. 9

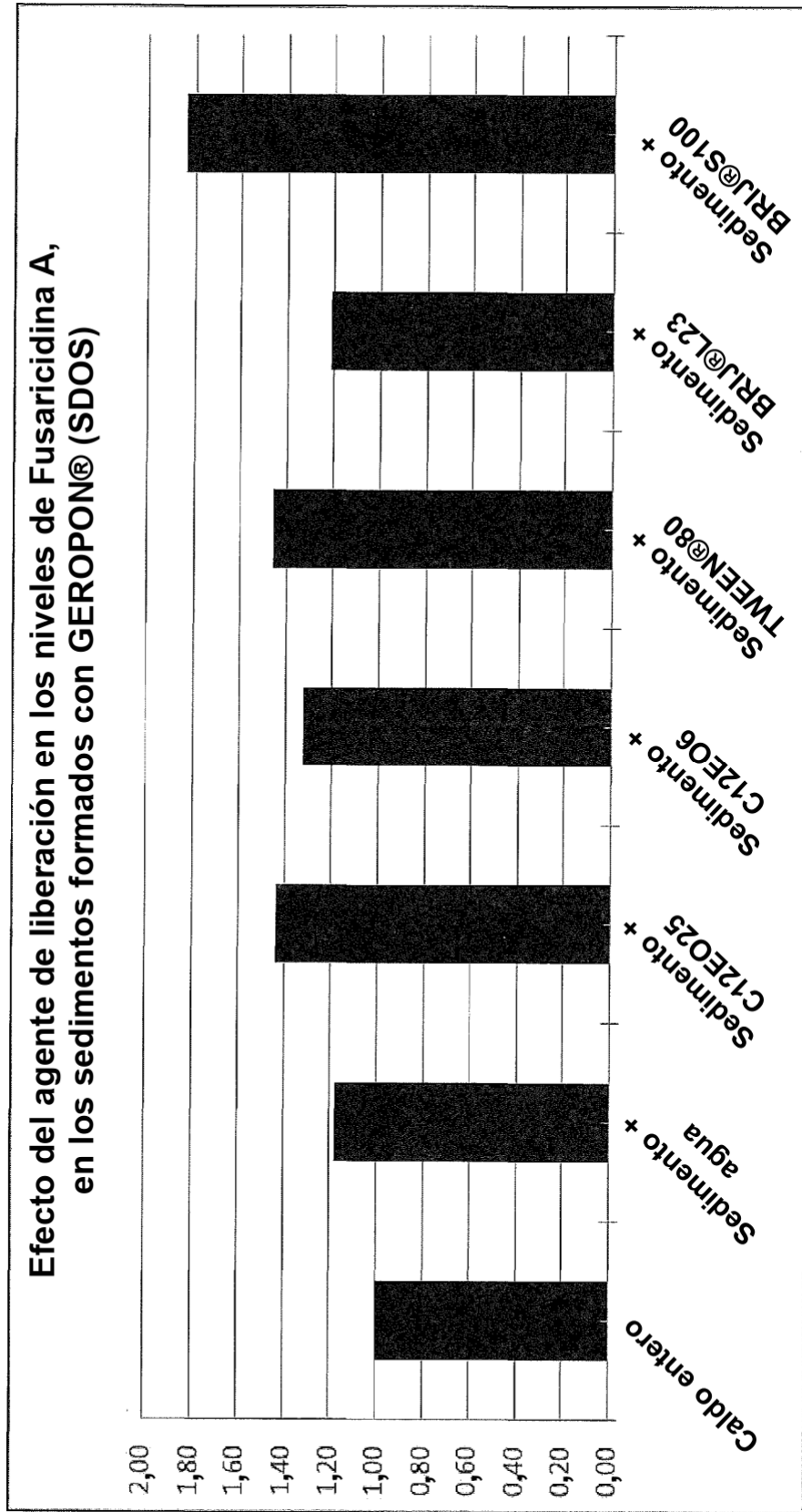
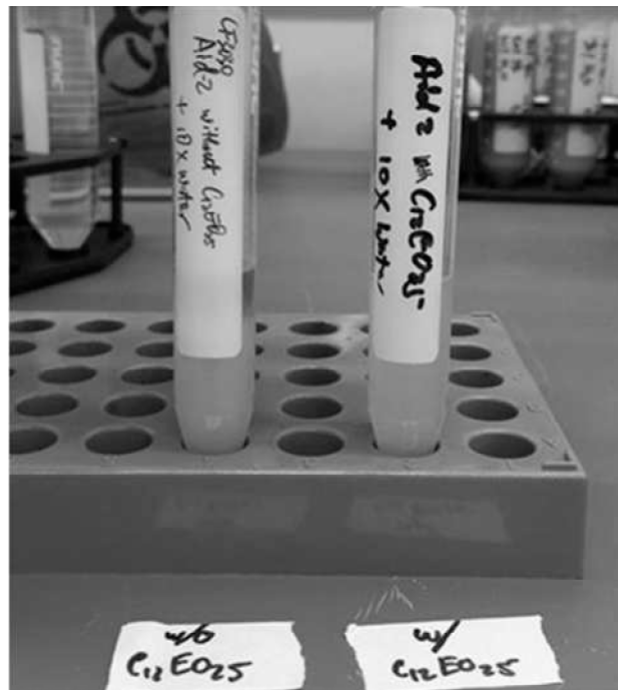


FIG. 10

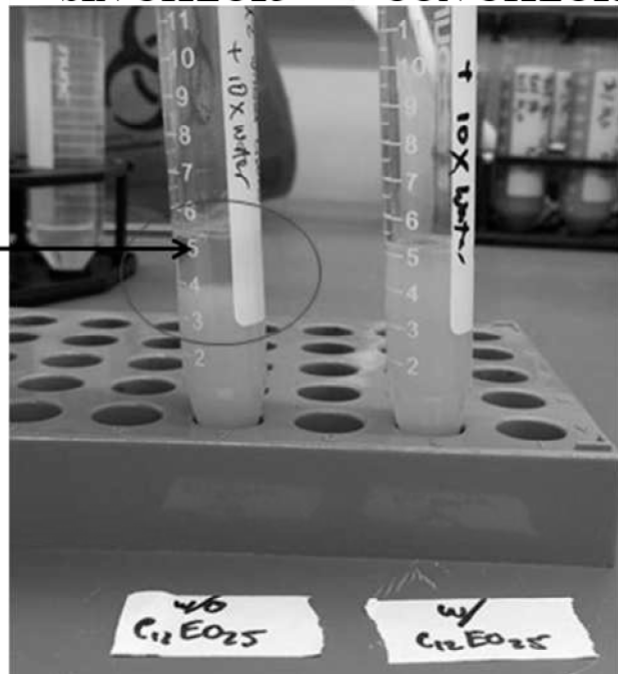


Vista Frontal

Sedimento resuspendido SIN C12E025

Sedimento resuspendido CON C12E025

Separación Observada SIN C12E025



Vista Posterior

FIG. 11

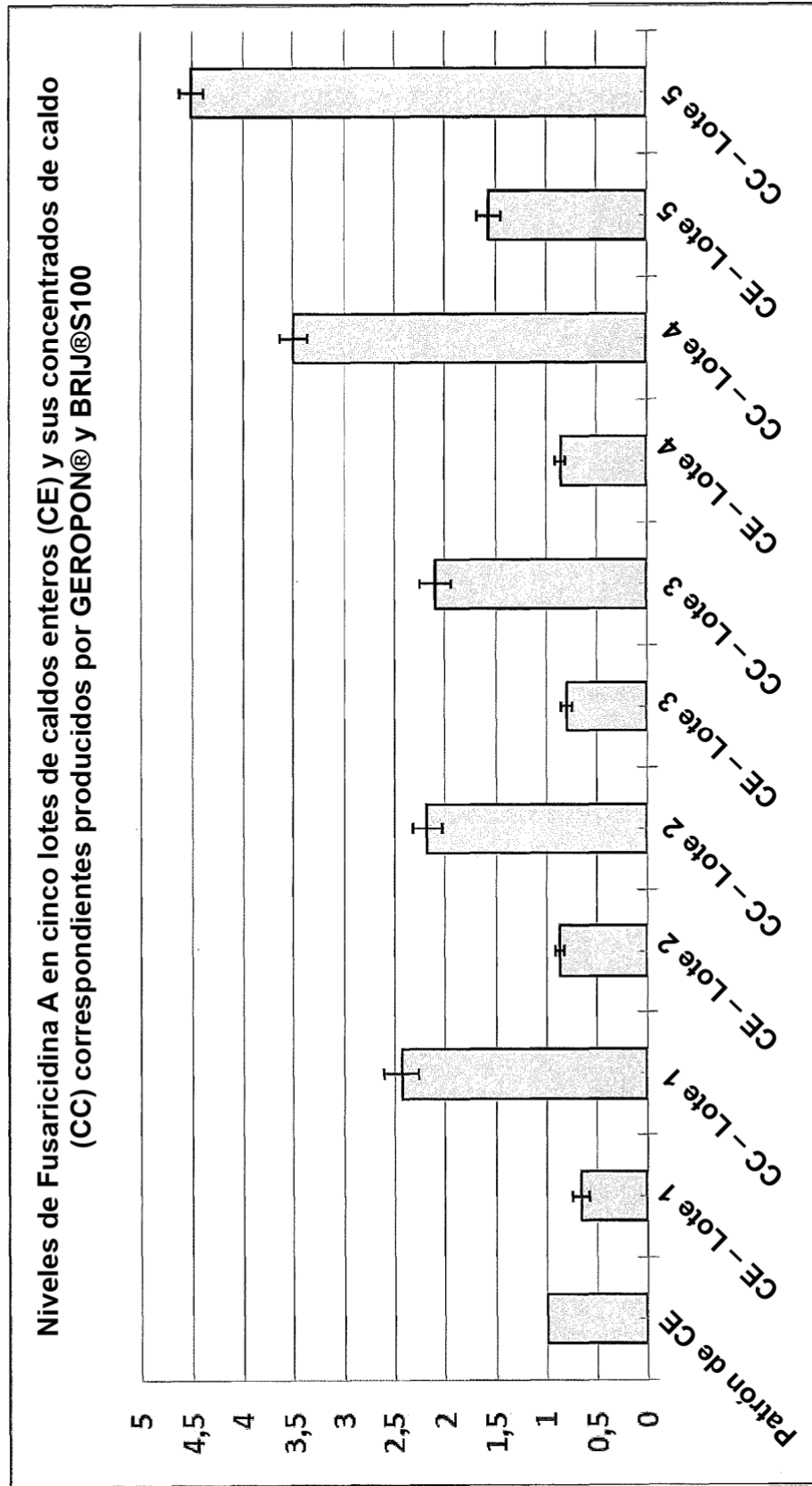


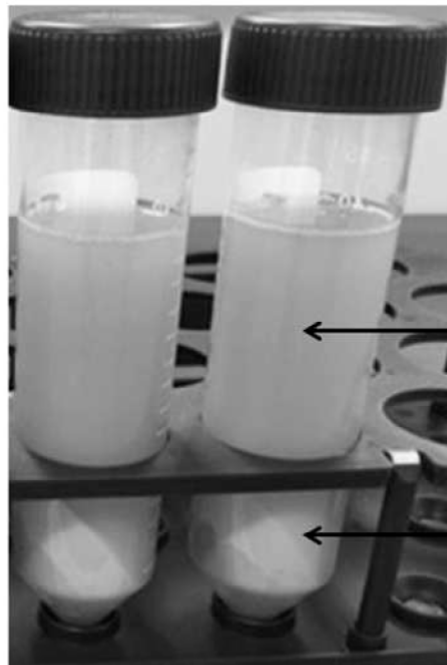
FIG. 12

Vista
Frontal



NRRL B-21661 CE NRRL B-21661 CE
- GEROPON® + GEROPON®

Vista
Posterior



Sobrenadante
más claro

Sedimento
más compacto

FIG. 13

