



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 804**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C07K 7/56** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C12R 1/125** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03755679 .2**

96 Fecha de presentación : **22.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1543142**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54

Título: **Procedimiento de producción para iturina A y sus homólogos.**

30

Prioridad: **24.09.2002 JP 2002-277873**  
**27.09.2002 US 413755 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73

Titular/es: **Showa Denko K.K.**  
**13-9, Shiba Daimon 1-chome**  
**Minato-ku, Tokyo 105-8518, JP**

72

Inventor/es: **Yoneda, Tadashi;**  
**Kitakuni, Eiichi y**  
**Furuya, Kazuo**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 316 804 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 producción para iturina A y sus homólogos.

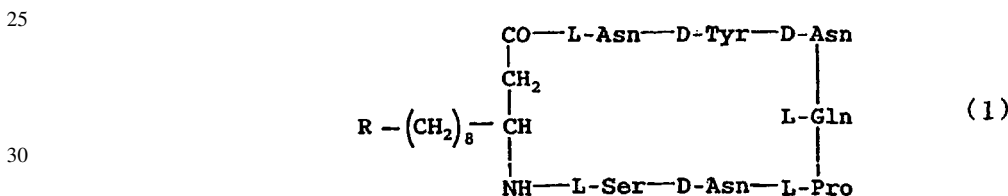
5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir iturina A y sus homólogos cultivando un microbio perteneciente al género *Bacillus* en un medio líquido que contiene soja o su extracto como fuente de nitrógeno a efectos de acumular iturina A y sus homólogos en altas concentraciones en dicho medio líquido. Además, la presente invención se refiere a un producto de cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, a una sustancia sólida que contiene iturina A y sus homólogos obtenida secando el producto de cultivo, y a los procedimientos de aplicación del mismo.

15 **Antecedentes de la técnica**

Es conocido convencionalmente el hecho de que los microbios pertenecientes al género *Bacillus*, particularmente el *Bacillus subtilis*, producen iturina A y sus homólogos (véase, por ejemplo, Besson *et al*, Journal of Antibiotics, 1978, Vol. 31, p.284-288).

20 Iturina A y sus homólogos se refiere a un grupo de compuestos que presentan la estructura representada a continuación por la fórmula 1 y que presentan actividades antimicrobianas sobre hongos, particularmente sobre los microbios patogénicos de vegetales, de tal modo que han atraído la atención como componentes excelentes para prevenir las enfermedades en vegetales.



(R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono).

Los ejemplos de procedimientos para producir iturina A y sus homólogos incluyen los descritos en JP-A-59-212416, JP-A-7-143897 (patente US nº 5.470.827 y nº 5.494.809), etc.

Sin embargo, los microbios *Bacillus* producen iturina A y sus homólogos con productividades demasiado bajas para aplicarlos a la producción a escala industrial. En consecuencia, muchos investigadores han dedicado esfuerzos a incrementar las productividades con las que se producen la iturina A y sus homólogos.

Hatada *et al* dan a conocer un procedimiento para producir una sustancia basada en iturina A mediante cultivo aeróbico de cepa nº NA-apb-1 de *Bacillus subtilis* en un medio nutriente (JP-B-63-20519). En dicha publicación se indican como fuentes de nitrógeno peptona, extracto de carne, extracto de levadura, hidrolizados de caseína, licor de almidón de maíz, harina de gluten y fuentes de nitrógeno inorgánicas, y se describe el hecho de que se obtienen 270 mg de iturina A a partir de 30 l de un filtrado de cultivo obtenido cultivando la cepa en un medio que contiene peptona, extracto de carne y extracto de levadura. Sandrin *et al* dan a conocer el hecho de que se pueden obtener 480 mg/l de iturina A y sus homólogos en un medio sintético que contiene prolina como fuente de nitrógeno (Biotechnology and Applied Biochemistry, 1990, Vol. 12, p.370-375).

Hbid *et al* dan a conocer un procedimiento que alcanza un rendimiento de iturina A y sus homólogos de 1.388 mg/l en un medio que contiene peptona (Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, Vol. 57/58, p.571-579). Phae *et al* dan a conocer un procedimiento que alcanza un rendimiento de iturina A y sus homólogos de 620 mg/l (Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991, Vol. 71, p.118-121).

Por otro lado, como procedimiento para cultivar un microbio *Bacillus* en un medio líquido que contiene soja en polvo o su extracto, los inventores de la presente invención han dado a conocer un procedimiento de producción para la surfactina (JP-A-2002-176993). Sin embargo, dicha publicación no da a conocer nada sobre la iturina A y sus homólogos. Además, el documento JP-A-59-212416 da a conocer la realización de un cultivo en un medio que contiene 1% de soja en polvo a efectos de obtener 300 mg de iturina A y sus homólogos a partir de 16 l del caldo de cultivo. Sin embargo, la cantidad de iturina A obtenida es sólo ligeramente mayor que la cantidad obtenida mediante un procedimiento de cultivo conocido.

Se desconoce el hecho de que el cultivo de un microbio *Bacillus* que presenta la capacidad para producir iturina A y sus homólogos en un medio líquido que contiene soja en polvo o su extracto en una cantidad de 2% en peso o mayor permite la acumulación de iturina A y sus homólogos en dicho medio en una concentración de 1,5 g/l o mayor.

## ES 2 316 804 T3

El documento WO 9850422 da a conocer un procedimiento para producir compuestos de iturina A, que comprende el cultivo de un microbio *Bacillus subtilis*.

### Exposición de la invención

5 La productividad de iturina A y sus homólogos obtenida convencionalmente resulta insuficiente para aplicaciones industriales, de tal modo que existe una demanda de un procedimiento de producción que permita una mayor productividad.

10 Correspondientemente, un objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer un procedimiento para producir iturina A y sus homólogos cultivando un microbio *Bacillus* que produce iturina A y sus homólogos y permite a dicho microbio acumular iturina A y sus homólogos en el caldo de cultivo en concentraciones elevadas.

15 Otro objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer un producto de cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, un producto sólido del mismo y un procedimiento para utilizarlos.

20 Para alcanzar los objetivos anteriormente mencionados, los inventores de la presente invención han llevado a cabo intensos estudios de diversos componentes en los medios de cultivo. Como resultado, han descubierto que el cultivo de un microbio *Bacillus* que produce iturina A y sus homólogos en un medio que contiene 2% en peso o más de soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno produce una acumulación de iturina A y sus homólogos en el caldo de cultivo en concentraciones elevadas, llevando a cabo de este modo la presente invención.

25 Es decir, la presente invención se refiere a procedimientos para producir iturina A y sus homólogos, a cultivos que contienen iturina A y sus homólogos, y a sólidos que contienen iturina A y sus homólogos, descritos a continuación.

30 1. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos, que comprende cultivar un microbio *Bacillus* que presenta la capacidad de producir iturina A y sus homólogos en un medio líquido que contiene 2% en peso o más de soja en polvo o su extracto a efectos de permitir que el microbio acumule iturina A y sus homólogos en el medio en una concentración de 1,5 g/l o mayor, en el que el microbio *Bacillus* que presenta la capacidad de producir iturina A y sus homólogos es un microbio *Bacillus* que no presenta capacidad para acumular surfactina en una cantidad mayor de 50 ppm cuando se cultiva en un medio que contiene soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno, y en el que el microbio *Bacillus* que presenta capacidad para producir iturina A y sus homólogos es un microbio *Bacillus* que puede desarrollarse en un medio que contiene 1,5 g/l o más de iturina A y sus homólogos.

35 2. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según el punto 1 anterior, en el que se añaden al medio líquido de 0 a 3% en peso de fosfatos, en términos de  $K_2HPO_4$ .

40 3. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según los puntos 1 ó 2 anteriores, en el que el microbio es *Bacillus subtilis*.

4. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según cualquiera de los puntos 1 a 3 anteriores, en el que el microbio es *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427.

45 5. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según el punto 1 anterior, en el que el medio líquido que contiene 2% en peso o más de soja en polvo o su extracto contiene, por lo menos, un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en maltosa, jarabe de almidón, almidón soluble, dextrina, glucosa, sucrosa y fructosa.

50 6. Microbio *Bacillus* que presenta capacidad para producir iturina A y sus homólogos y no presenta capacidad para acumular surfactina en una cantidad mayor de 50 ppm cuando se cultiva en un medio que contiene soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno, en el que el microbio *Bacillus* que presenta capacidad para producir iturina A y sus homólogos es un microbio *Bacillus* que puede desarrollarse en un medio que contiene 1,5 g/l o más de iturina A y sus homólogos.

55 7. Microbio *Bacillus* según el punto 6 anterior, que es *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427.

8. Cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, y el microbio *Bacillus* según los puntos 6 ó 7 anteriores.

9. Sólido que contiene iturina A y sus homólogos, que se puede obtener secando el cultivo según el punto 8 anterior.

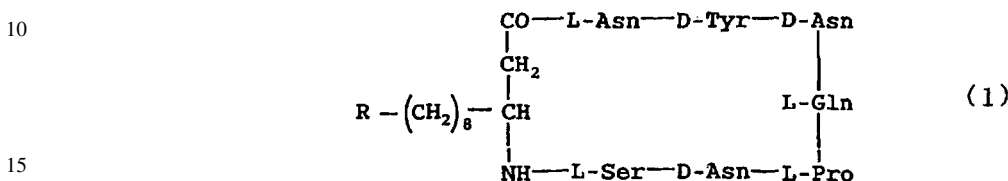
60 10. Agente para prevenir enfermedades de los vegetales, que comprende el cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, o el sólido obtenido del mismo, según los puntos 8 ó 9 anteriores.

65 11. Procedimiento para prevenir una enfermedad de vegetales, que comprende utilizar el cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, o el sólido obtenido del mismo, según los puntos 8 ó 9 anteriores, en una forma no purificada.

**Descripción detallada de la invención**

A continuación, la presente invención se describe con detalle.

5 En la presente invención, iturina A y sus homólogos significa derivados representados por la siguiente fórmula (1), incluyendo compuestos relacionados:



(R representa un grupo alquilo lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono).

20 Según la presente invención, el cultivo de un microbio que produce iturina A y sus homólogos en un medio, añadiendo soja en polvo o su extracto como fuente de nitrógeno en una cantidad de 2% en peso o más a dicho medio, permite la acumulación en concentraciones elevadas de iturina A y sus análogos en dicho medio. Hasta donde llega el conocimiento de los presentes inventores, la técnica por la cual se cultiva un microbio *Bacillus* en un medio que contiene soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno es convencionalmente conocida. Sin embargo, los presentes inventores han sido los primeros en descubrir la técnica novedosa por la que un microbio que produce iturina A y sus homólogos se cultiva en un medio que contiene 2% en peso o más de soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno a efectos de acumular iturina A y sus homólogos en concentraciones elevadas en dicho medio.

30 El microbio *Bacillus* utilizado en la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando produzca iturina A y sus homólogos. Dado que la iturina A y sus homólogos se acumulan en el medio en concentraciones elevadas, resulta necesario que dicho microbio puede desarrollarse en presencia de una concentración elevada de iturina. En consecuencia, el microbio *Bacillus* es un microbio que presenta la capacidad para producir iturina A y sus homólogos y que puede desarrollarse en un medio que contiene 1,5 g/l de iturina A y sus homólogos. Además, como otro ejemplo preferente, el microbio *Bacillus* es un microbio *Bacillus* que presenta capacidad para producir iturina A y sus homólogos pero no presenta capacidad para producir surfactina. “No presenta la capacidad para producir surfactina”, en la presente memoria, significa que cuando un microbio se cultiva en un medio que contiene soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno, la cantidad de acumulación de surfactina es de 50 ppm o menor. Los ejemplos preferentes de microbio *Bacillus* que presenta la capacidad para producir iturina A y sus homólogos y que puede desarrollarse en un medio que contiene 1,5 g/l o más de iturina y sus homólogos incluyen el *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427.

45 El *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427, aislado a partir de compost, presenta las siguientes características micológicas.

*Propiedades bacteriológicas*

50 (a) *Morfología*

- (1) Forma del bacterio: barra,
- (2) Tamaño del bacterio: 0,7 a 0,9 x 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ ,
- 55 (3) Polimorfismo: no
- (4) Motilidad: sí
- (5) Esporas: presentes,  
Forma de las esporas: elípticas o cilíndricas
- (6) Tinción Gram: positiva
- 65 (7) Resistencia a ácidos: negativo

## ES 2 316 804 T3

### (b) Condiciones de crecimiento en cultivo de jugo de carne y placa de agar

Colonia circular con un diámetro de 1 a 2 mm, con perímetro ondulado, viscosa, sin tendencia expansiva.

### 5 (c) Propiedades fisiológicas

- (1) Reducción de nitratos: positivo
- (2) Test VP: positivo
- 10 (3) Producción de indola: negativo
- (4) Utilización de ácido cítrico: positivo
- 15 (5) Utilización de ácido succínico: negativo
- (6) Utilización de ácido propiónico: negativo
- (7) Utilización de ácido tartárico: negativo
- 20 (8) Ureasa: negativo
- (9) Oxidasa: positivo
- 25 (10) Catalasa: positivo
- (11) Intervalo de crecimiento: pH 5 a 9, temperatura 20 a 50°C
- (12) Medio NaCl 10%: crecimiento
- 30 (13) Cultivo anaeróbico: negativo
- (14) Reacción de yema de huevo: negativo
- 35 (15) Hidrólisis de almidón: positivo
- (16) Descomposición de arginina: positivo
- (17) Descomposición de tirosina: negativo
- 40 (18) Licuefacción de gelatina: positivo
- (19) Descomposición de esculina: positivo
- 45 (20) Test OF: oxidativo
- (21) Producción de ácido a partir de glucosa: negativo

50 El *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427 se depositó en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, en AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal: 305-8566) (nº de acceso FERM P-19032) y se transfirió del depósito original al depósito internacional el 10 de julio de 2003 (nº FERM BP-08427).

55 Además, en la presente invención, los mutantes obtenidos por mutación espontánea de la cepa de *Bacillus subtilis* depositada también se pueden utilizar preferentemente. Dichos mutantes se pueden obtener como cepas mutantes espontáneas seleccionando aquellas que presenten una morfología de colonia modificada en un medio de placa o haciendo reaccionar un factor químico o físico de inducción de mutación con la cepa de *Bacillus subtilis* depositada, a efectos de producir un stock de cepas bacterianas con rendimientos modificados de iturina A y sus homólogos y, a partir de las mismas, aislar una colonia que presente una mayor productividad.

60 Como factor químico inductor de mutación, por ejemplo, se pueden utilizar EMS (metanosulfonato de etilo), sulfato de dietilo, o NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina). Como factor físico inductor de mutación, se pueden utilizar rayos ultravioleta, rayos gamma, rayos X, etc., en una cantidad requerida a efectos de inducir una mutación.

65 Un ejemplo de procedimiento para producir un stock de mutantes es un procedimiento en el que células de *Bacillus subtilis* desarrolladas hasta una etapa logarítmica en un medio nutriente tal como NB (Nutrient Broth; fabricado por Difco Laboratories, Inc.) se recogen y suspenden en solución salina fisiológica tras el lavado, se añade una cantidad

## ES 2 316 804 T3

inductora de mutación de NTG a las células a efectos de inducir una mutación, y a continuación las células se recogen nuevamente, se lavan a efectos de eliminar el NTG y se cultivan en un medio nutriente tal como NB (Nutrient Broth; fabricado por Difco Laboratories, Inc.) a efectos de obtener un stock de cepas mutantes.

5 Los ejemplos de procedimientos para aislar una colonia con una productividad aumentada incluyen un procedimiento en el que un stock apropiadamente diluido de mutantes se esparce a efectos de cultivar células de *Bacillus subtilis* en un medio de placa preparado añadiendo agar a un medio tal como TBAB (Agar Triptosa Base Sangre; fabricado por Difco Laboratories, Inc.) o con sangre de oveja añadida al mismo, y una colonia con una zona nítida alrededor de la colonia mayor que otras colonias se aísla a efectos de seleccionar cepas mutantes que pueden producir iturina A y sus homólogos en concentraciones elevadas.

10 Posteriormente, la productividad de iturina A y sus homólogos del mutante de *Bacillus subtilis* aislado de este modo se puede confirmar cultivando la cepa de *Bacillus subtilis* depositada como control en un tubo de ensayo.

15 A continuación se describe el procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según la presente invención. El procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según la presente invención se puede llevar a cabo muy convenientemente, por ejemplo, del modo siguiente. La cepa de *Bacillus subtilis* depositada se cultiva en un medio nutriente, tal como un medio L a una temperatura de 25 a 42°C, preferentemente de 28 a 38°C, durante aproximadamente 5 a aproximadamente 24 horas, y el caldo de cultivo obtenido en una cantidad de 0,1 a 10% en peso, preferentemente de 0,5 a 7% en peso, más preferentemente de 1 a 5% en peso, se inocula en un medio que contiene soja en polvo o su extracto como fuente de nitrógeno. El mismo se cultiva a una temperatura de 25 a 42°C, preferentemente de 28 a 35°C, durante aproximadamente 30 a aproximadamente 150 horas. En caso de que la temperatura esté fuera del intervalo de temperaturas mencionado anteriormente, la producción de iturina A y sus homólogos disminuye considerablemente de modo no deseado.

25 En la presente invención, la expresión “soja en polvo o su extracto” se refiere a polvo de soja en grano, obtenido pulverizando soja o soja desgrasada, polvo de soja pulverizado, obtenido pulverizando soja hasta obtener un polvo fino, extractos de los mismos (por ejemplo, extractos en agua caliente), hidrolizados (por ejemplo, hidrolizados por ácido, hidrolizados por enzima), etc. La concentración de soja en polvo o su extracto es deseablemente de 2% en peso o más. Sin embargo, por otro lado, dado que la soja en polvo o su extracto en una concentración demasiado elevada puede provocar una esterilización insuficiente, resulta deseable que la concentración de la soja en polvo o su extracto no exceda de 20% en peso. Consecuentemente, la concentración de la soja en polvo o su extracto para obtener una productividad elevada es de 2 a 20% en peso, preferentemente de 3 a 17% en peso, más preferentemente de 4 a 14% en peso.

35 El medio utilizado en la presente invención puede contener, además de la soja en polvo o su extracto, habitualmente fuentes de carbono catabolizables utilizadas, fuentes de nitrógeno catabolizables y sales inorgánicas, etc. Además, se pueden añadir aminoácidos y/o vitaminas, etc., en caso necesario.

40 Los ejemplos de fuentes de carbono catabolizables incluyen glucosa, maltosa, sucrosa, fructosa, almidón soluble, jarabe de almidón, dextrina, molasas, extracto de patata, malta, turba, remolacha, aceite vegetal, licor de procesados de maíz, fructosa, jarabe, azúcar, azúcar líquido, azúcar invertido, alcoholes, ácidos orgánicos, sales de ácidos orgánicos, alcanos u otras fuentes generales de carbono. Dichas fuentes se pueden utilizar individualmente o en combinación. Entre ellas, resultan preferidas maltosa, almidón soluble, jarabe de almidón y dextrina. Las mismas se pueden utilizar en concentraciones habitualmente comprendidas entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50% en peso, preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 40% en peso.

45 Además, como fuentes de nitrógeno catabolizables, se pueden utilizar aquellas que contienen nitrógeno inorgánico u orgánico, por ejemplo, sales de amonio tales como nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, carbonato de amonio y bicarbonato de amonio, amoníaco, nitrato de sodio, nitrato de potasio, glutamato de sodio, urea, peptona, extracto de carne, licor de procesados de maíz, hidrolizados de caseína, harina de plumas y extracto de levadura. Dichas fuentes se pueden utilizar ventajosamente en concentraciones habitualmente comprendidas entre 0,01 y 30% en peso, preferentemente entre 0,1 y 10% en peso.

55 Además, como componentes inorgánicos, se pueden añadir cationes o aniones, tales como ion potasio, ion sodio, ion magnesio, ion fosfato, ion hierro, ion manganeso, ion calcio, ion zinc, ion cobalto, ion níquel, ion cobre, ion molibdeno, ion sulfato, ion cloruro, o ion nitrato. La cantidad de componente inorgánico a añadir puede variar en función de las condiciones de cultivo. Habitualmente, la sal de magnesio se añade hasta una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 2% en peso, y en caso de sales distintas de fosfato, la sal se añade hasta una concentración de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 1.000 ppm. Los iones fosfato se pueden añadir como sales de fosfato. Si la sal de fosfato se añade en una concentración mayor de 3% en peso, en términos de  $K_2HPO_4$ , la concentración de iturina A acumulada y sus homólogos disminuye. En consecuencia, resulta deseable que la sal de fosfato se añada hasta una concentración de 3% en peso o menor. Más preferentemente, resulta preferente un medio sin la adición de ion fosfato.

65 Los ejemplos de aminoácidos a añadir incluyen L-glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-serina, L-treonina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-cisteína, cistina, L-metionina, L-triptófano, L-histidina, L-prolina, ácido L-aspártico, L-asparagina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-arginina, L-lisina, D-valina, D-isoleucina, etc. Se pueden

## ES 2 316 804 T3

añadir uno o varios de los mismos. El aminoácido se añade hasta una concentración de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5% en peso, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1% en peso.

5 Como vitamina, se pueden añadir una o más de entre biotina, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, nicotinamida, ácido pantoténico, piridoxal, mio-inositol, colina, ácido fólico, cobalamina, cianocobalamina, etc. La vitamina se añade hasta una concentración de 0,1 a 100 ppm, preferentemente de 1 a 50 ppm.

10 En el cultivo según la presente invención, el medio mencionado anteriormente se coloca en un recipiente tal como un tubo de ensayo, un matraz o un tanque de fermentación, y se lleva a cabo el cultivo con aireación vigorosa.

15 En caso de cultivo utilizando un recipiente tal como un tubo de ensayo o un matraz, la aireación se lleva a cabo agitando vigorosamente, y el pH inicial del medio se ajusta a entre 6,5 y 8,0. En el caso en el que se lleva a cabo producción de concentración elevada utilizando un recipiente tal como un tanque de fermentación, el cultivo se lleva a cabo bajo un flujo de aire estéril con agitación. En el caso en el que se produce espuma en un alcance tal que el cultivo resulta difícil, se puede añadir un agente antiespumante de utilización común.

20 El pH del medio se mantiene entre 6,0 y 9,0, preferentemente entre 6,5 y 8,0, más preferentemente entre 6,8 y 7,3. El ajuste del pH se lleva a cabo por adición de una solución acuosa básica, tal como una solución acuosa de amoníaco, una solución acuosa de hidróxido de potasio, una solución acuosa de carbonato de sodio, o una solución acuosa de carbonato de potasio. Entre las mismas, resulta preferente utilizar una solución acuosa de amoníaco. Ventajosamente, la concentración de solución acuosa de amoníaco está comprendida entre aproximadamente 8 y aproximadamente 25% en peso. Llevando a cabo dicho cultivo en condiciones preferentes, un cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, que contiene iturina A y homólogos en una concentración de 1,5 g/l o mayor, se puede obtener en de 30 a 150 horas.

25 Secando el cultivo mencionado anteriormente mediante un procedimiento conocido, tal como liofilización o secado por pulverización, se puede obtener un sólido que contiene iturina A y sus homólogos. El cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, o el sólido que contiene iturina A y sus homólogos, que exhibe un efecto de prevenir enfermedades en vegetales cuando se aplica a la tierra de cultivo o a las hojas de la plantación, resulta útil. El cultivo que contiene iturina A y sus homólogos y el sólido que contiene iturina A y sus homólogos entran también dentro del alcance de la presente invención.

30 Además, la iturina A y sus homólogos se pueden recuperar del cultivo que contiene iturina A y sus homólogos y se pueden purificar. Dicha purificación se puede llevar a cabo mediante un procedimiento conocido, por ejemplo, un procedimiento en el que un cultivo se vuelve ácido por adición de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico o similares, a efectos de precipitar la iturina A y sus homólogos, sometiéndose a continuación los precipitados a tratamiento de extracción con un disolvente orgánico, tal como metanol, etanol o cloroformo, tratamiento con carbono activado, tratamiento de cristalización y/o similares.

40 La iturina A y sus homólogos obtenidos según la presente invención se pueden utilizar no solamente como agentes para prevenir enfermedades en vegetales, sino también como detergentes, tensoactivos, humidificantes, espesantes, solubilizadores, agentes antiestáticos, agentes antiniebla, lubricantes, etc. La iturina A y sus homólogos obtenidos según la presente invención son útiles como ingrediente de composición para cosméticos, alimentos, productos farmacéuticos, sustancias químicas agrícolas, etc.

### 45 **Mejor modo de poner en práctica la invención**

A continuación, la presente invención se describe con mayor detalle mediante los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no debe considerarse limitada a dichos ejemplos.

#### 50 *Ejemplo de preparación 1 para obtener un mutante de la cepa de Bacillus subtilis depositada*

55 La cepa de *Bacillus subtilis* depositada se inoculó en 5 mm de un medio L (10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio y agua hasta alcanzar 1 litro), y se incubó a 35°C a 300 rpm durante 16 horas. A continuación, el cultivo obtenido se inoculó en 5 ml del mismo medio a 1% v/v y se incubó a 35°C a 300 rpm hasta que el OD660 alcanzó el valor 0,2. A continuación, las células se recuperaron mediante centrifugación. El sobrenadante se descartó. Las células recuperadas se lavaron con 5 ml de tampón PBS (0,8% p/v de NaCl, 0,02% p/v de KCl, 0,144% p/v de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,024% p/v de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7,4 con HCl) tres veces y se suspendieron nuevamente en 0,5 ml del mismo tampón.

60 Se añadieron 0,05 ml de una solución acuosa de 2.000 ppm de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a la suspensión y la mezcla se dejó reposar a 30°C durante 10 minutos. Dicha suspensión se centrifugó, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 5 ml del mismo tampón tres veces y se suspendieron de nuevo en 1 ml de un medio L fresco. La suspensión se añadió a 4 ml de un medio L y se sometió a crecimiento celular a 35°C durante una noche. A continuación, se añadieron 2,5 ml de una solución acuosa de glicerol al 50% en peso a la suspensión, se dispusieron alcuotas de la misma en viales para crioconservación y se congelaron a -135°C para conservarlos como transformantes.

## ES 2 316 804 T3

A continuación, los transformantes conservados diluidos con agua esterilizada se colocaron en placas a una concentración de 50.000/placa sobre medio de placa de agar, conteniendo cada uno de ellos 5% p/v de sangre de oveja, 4% p/v de glucosa, 0,1% p/v NB (fabricado por Difco Laboratories, Inc.) y 0,1% p/v de extracto de levadura (Applied Environmental Microbiology, 42:408-412 (1981)), de tal modo que se obtuvieron aproximadamente 200 colonias/placa. Tras la incubación a 35°C durante un periodo de 20 a 48 horas, se observaron zonas claras formadas alrededor de las colonias desarrolladas y se seleccionaron 50.000 colonias que formaban grandes zonas claras.

La cepa de *Bacillus subtilis* depositada y las 50.000 colonias obtenidas se depositaron en medio L de placa y se dejaron crecer a 35°C durante una noche. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de un medio con la siguiente composición A en tubos de ensayo, en cada uno de los cuales se inoculó un asa de inoculación del medio L de placa, y se incubaron a 35°C durante 72 horas.

	<Composición A>	(% en peso)
15	Soja en polvo	8
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
20	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
	CaCl <sub>2</sub>	0,0184
	Maltosa	6,7
25	Agua de intercambio iónico	Equilibrio

El cultivo se centrifugó y la iturina A y sus homólogos contenidos en el sobrenadante se determinaron mediante un procedimiento HPLC en las siguientes condiciones:

30 Tamaño de muestra: 10 µl

Columna: Shodex Silica C18P4E, 4,6 mm x 250 mm, fabricada por Showa Denko K. K.

35 Temperatura de columna: 40°C

Eluyente: acetonitrilo : solución acuosa de ácido trifluoroacético 10 mM = 35:75 (v/v)

Velocidad de flujo: 1,5 ml/min

40 Detector: detector UV

Longitud de onda: 205 nm

45 La determinación se llevó a cabo preparando una curva de calibración utilizando muestras estándar de iturina A y sus homólogos (preparadas por Sigma-Aldrich Co.).

50 Se obtuvo una cepa mutante (mutante 1) que produce iturina A y sus homólogos con una productividad elevada, que muestra una concentración aumentada de iturina A acumulada y sus homólogos en comparación con las cepas originales depositadas de cepa de *Bacillus subtilis*.

### *Ejemplo de preparación 2 para obtener un mutante de la cepa depositada de Bacillus subtilis*

55 La concentración de surfactina en el sobrenadante del cultivo del ejemplo de preparación 1 se determinó mediante un procedimiento HPLC en las siguientes condiciones:

Tamaño de muestra: 20 µl

60 Columna: Shodex Silica C18P4E, 4,6 mm x 250 mm, fabricada por Showa Denko K. K.

Temperatura de columna: 40°C

65 Eluyente: acetonitrilo : solución acuosa de ácido trifluoroacético 19 mM = 80:20 (v/v)

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

## ES 2 316 804 T3

Detector: detector UV

Longitud de onda: 205 nm

5

La determinación se llevó a cabo preparando una curva de calibración utilizando muestras estándar de iturina A y sus homólogos (preparadas por Sigma-Aldrich Co.).

10 Se obtuvo una cepa mutante (mutante 2) que no produce sustancialmente surfactina, siendo la concentración de surfactina acumulada de 50 ppm o menor.

### Ejemplo 1

15 *Efecto de una fuente de nitrógeno sobre la producción de iturina A y sus homólogos en cultivo en tubo de ensayo*

Se dispusieron cepas de la cepa de *Bacillus subtilis* depositada en medio L de placa y se dejaron crecer a 35°C durante una noche. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de un medio con la siguiente composición B en tubos de ensayo en cada uno de los cuales se inoculó un asa de inoculación del medio L de placa, y se incubaron a 35°C durante 72 horas.

<Composición B>	(% en peso)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
25 MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
30 CaCl <sub>2</sub>	0,0184
Maltosa	6,7
Fuente de nitrógeno*	2,0
Agua de intercambio iónico	Equilibrio

35 \*La fuente de nitrógeno se selecciona de entre el grupo que consiste en soja en polvo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, urea, glutamato de sodio y peptona

40 El cultivo se centrifugó y las concentraciones de iturina A y sus homólogos contenidas en el sobrenadante se determinaron mediante un procedimiento HPLC.

La concentración de iturina A acumulada y sus homólogos en cada caso utilizando una fuente de nitrógeno fue la siguiente:

Fuente de nitrógeno utilizada	Concentración de iturina A y sus homólogos
45 Soja en polvo	1,5 g/l
Nitrato de potasio	0,03 g/l
50 Nitrato de amonio	0,03 g/l
Sulfato de amonio	0,03 g/l
Urea	0,03 g/l
Glutamato de sodio	0,1 g/l
55 Peptona	0,15 g/l

### Ejemplo 2

60 *Efecto de la concentración de soja en polvo sobre la producción de iturina A y sus homólogos en cultivo en tubo de ensayo*

Se dispusieron cepas de la cepa de *Bacillus subtilis* depositada en medio L de placa y se dejaron crecer a 35°C durante una noche. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de un medio con las siguientes composiciones C, D y E, respectivamente, en tubos de ensayo en cada uno de los cuales se inoculó un asa de inoculación del medio L de placa, y se incubaron a 35°C durante 72 horas.

## ES 2 316 804 T3

	<Composición C>	(% en peso)
	Soja en polvo	1
5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
10	CaCl <sub>2</sub>	0,0184
	Maltosa	6,7
	Agua de intercambio iónico	Equilibrio

	<Composición D>	(% en peso)
	Soja en polvo	2
20	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
25	CaCl <sub>2</sub>	0,0184
	Maltosa	6,7
	Agua de intercambio iónico	Equilibrio

	<Composición E>	(% en peso)
	Soja en polvo	8
35	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
40	CaCl <sub>2</sub>	0,0184
	Maltosa	6,7
	Agua de intercambio iónico	Equilibrio

45 El cultivo se centrifugó y las concentraciones de iturina A y sus homólogos contenidas en el sobrenadante se determinaron mediante un procedimiento HPLC.

50 La concentración de iturina A acumulada y sus homólogos en cada caso utilizando el medio fue la siguiente:

	Medio utilizado	concentración de iturina A y sus homólogos
55	composición C:	0,3 g/l
	composición D:	1,5 g/l
	composición E:	3,8 g/l

### 60 Ejemplo 3

*Efecto de una fuente de carbono sobre la producción de iturina A y sus homólogos en cultivo en tubo de ensayo*

65 Se dispusieron cepas de la cepa de *Bacillus subtilis* depositada en medio L de placa y se dejaron crecer a 35°C durante una noche. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de un medio con la siguiente composición F, a las que se añadió la siguiente fuente de carbono en tubos de ensayo, en cada uno de los cuales se inoculó un asa de inoculación del medio L de placa, y se incubaron a 35°C durante 72 horas.

## ES 2 316 804 T3

<Composición F>	(% en peso)
Soja en polvo	8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
CaCl <sub>2</sub>	0,0184
Fuente de carbono**	6,7
Agua de intercambio iónico	Equilibrio

\*\*La fuente de carbono se selecciona de entre el grupo compuesto por maltosa, almidón soluble, jarabe de almidón, dextrina, glucosa, sucrosa y fructosa

El cultivo se centrifugó y las concentraciones de acumulación de iturina A y sus homólogos contenidas en el sobrenadante se determinaron mediante un procedimiento HPLC.

Las concentraciones de acumulación de iturina A y sus homólogos en cada caso utilizando la fuente de carbono fueron las siguientes:

Maltosa	3,8 g/l
Almidón soluble	3,8 g/l
Jarabe de almidón	3,8 g/l
Dextrina	3,8 g/l
Glucosa	2,8 g/l
Sucrosa	2,2 g/l
Fructosa	2,3 g/l

### Ejemplo 4

*Efecto de un fosfato sobre la producción de iturina A y sus homólogos en cultivo en tubo de ensayo*

Se dispusieron cepas de la cepa de *Bacillus subtilis* depositada en medio L de placa y se dejaron crecer a 35°C durante una noche. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de un medio con la siguiente composición G, a las que se añadió K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con la concentración (1) a (6) en tubos de ensayo, en cada uno de los cuales se inoculó un asa de inoculación del medio L de placa, y se incubaron a 35°C durante 72 horas.

<Composición G>	(% en peso)
Soja en polvo	8
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0025
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0022
CaCl <sub>2</sub>	0,0184
Maltosa	6,7

Concentración de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(% en peso)
(1)	0 % en peso (no adición)
(2)	0,1 % en peso
(3)	0,5 % en peso
(4)	1,5 % en peso
(5)	3,0 % en peso
(6)	4,5 % en peso
Agua de intercambio iónico	Equilibrio

## ES 2 316 804 T3

Después de ajustar a pH 7 con carbonato de sodio, el cultivo se centrifugó y las concentraciones de acumulación de iturina A y sus homólogos contenidas en el sobrenadante se determinaron mediante un procedimiento HPLC. La concentración de acumulación de iturina A y sus homólogos en cada caso en el que se añadió  $K_2HPO_4$  con cada concentración fue la siguiente:

5

	Concentración de $K_2HPO_4$	Concentración de iturina A y homólogos
	(1) 0 % en peso	3,8 g/l
10	(2) 0,1 % en peso	3,6 g/l
	(3) 0,5 % en peso	3,5 g/l
	(4) 1,5 % en peso	3,0 g/l
	(5) 3,0 % en peso	2,2 g/l
15	(6) 4,5 % en peso	1,5 g/l

20 Ejemplo 5

### *Producción de iturina A y sus homólogos en un tanque de fermentación*

25 La cepa de *Bacillus subtilis* depositada, el mutante 1 y el mutante 2 se dispusieron en medio L de placa y se dejaron crecer a 35°C durante una noche. Un asa de inoculación de cada medio se inoculó en un matraz con deflector al que se añadieron 50 ml de un medio L, y se incubó a 35°C a 150 rpm durante 8 horas. Se preparó un medio con la siguiente composición H en un tanque de fermentación de 5 l y se le añadió cada cultivo de medio L de placa. Mientras se ajustaba el pH a un valor comprendido entre 6,5 y 7,5 con agua de amoníaco al 20% y se llevó a cabo la incubación a 35°C durante 150 horas.

30

	<Composición H>	
	Soja en polvo	160 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
35	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,22 g
	$CaCl_2$	1,84 g
	Jarabe de almidón	450 g
40	Agua de intercambio iónico	1.383 g

45 El cultivo se centrifugó y las concentraciones de acumulación de iturina A y sus homólogos contenidas en el sobrenadante se determinaron mediante un procedimiento HPLC. Las cantidades de iturina A y sus homólogos fueron las siguientes:

	Cepa de <i>Bacillus subtilis</i> depositada	3,8 g/l
	Mutante 1	6,7 g/l
50	Mutante 2	6,7 g/l

A partir de los resultados, resulta evidente que cada una de estas cepas puede crecer en presencia de 1,5 g/l o más de iturina A.

55

### **Aplicabilidad industrial**

60 Según la presente invención, la iturina A y sus homólogos, que son útiles en diversos campos industriales tales como los productos farmacéuticos, sustancias químicas agrícolas, alimentos, cosméticos y productos químicos, se pueden producir utilizando materias primas y medio no costosos con unas concentraciones drásticamente aumentadas en comparación con los procedimientos convencionales.

65 Además, según la presente invención, que permite la producción de iturina A y sus homólogos en una concentración elevada, en el campo de las sustancias químicas agrícolas y de prevención de enfermedades en vegetales, el cultivo en sí se puede utilizar en aplicaciones en las que un cultivo convencional no puede ser utilizado como tal debido a una concentración suficiente.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos, que comprende cultivar un microbio *Bacillus* que  
presenta la capacidad de producir iturina A y sus homólogos en un medio líquido que contiene 2% en peso o más  
de soja en polvo o su extracto para permitir que el microbio acumule iturina A y sus homólogos en el medio en una  
concentración de 1,5 g/l o mayor, en el que el microbio *Bacillus* que presenta la capacidad de producir iturina A y sus  
10 homólogos es un microbio *Bacillus* que no presenta capacidad para acumular surfactina en una cantidad superior a 50  
ppm cuando se cultiva en un medio que contiene soja pulverizada o su extracto como fuente de nitrógeno, y en el que  
el microbio *Bacillus* que presenta la capacidad para producir iturina A y sus homólogos es un microbio *Bacillus* que  
puede desarrollarse en un medio que contiene 1,5 g/l o más de iturina A y sus homólogos.

15 2. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según la reivindicación 1, en el que se añaden al medio  
líquido de 0 a 3% en peso de fosfatos, en términos de  $K_2HPO_4$ .

3. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según la reivindicación 1 ó 2, en el que el microbio es  
*Bacillus subtilis*.

20 4. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que  
el microbio es *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427.

5. Procedimiento para producir iturina A y sus homólogos según la reivindicación 1, en el que el medio líquido  
que contiene 2% en peso o más de soja en polvo o su extracto contiene, por lo menos, un elemento seleccionado de  
entre el grupo constituido por maltosa, jarabe de almidón, almidón soluble, dextrina, glucosa, sucrosa y fructosa.

25 6. Microbio *Bacillus* que presenta la capacidad para producir iturina A y sus homólogos y no presenta la capacidad  
para acumular surfactina en una cantidad superior a 50 ppm cuando se cultiva en un medio que contiene soja pulve-  
rizada o su extracto como fuente de nitrógeno, en el que el microbio *Bacillus* que presenta la capacidad para producir  
iturina A y sus homólogos es un microbio *Bacillus* que puede desarrollarse en un medio que contiene 1,5 g/l o más de  
30 iturina A y sus homólogos.

7. Microbio *Bacillus* según la reivindicación 6, que es *Bacillus subtilis* con número de acceso FERM BP-08427.

8. Cultivo que contiene iturina A y sus homólogos, y el microbio *Bacillus* según la reivindicación 6 ó 7.

35 9. Sólido que contiene iturina A y sus homólogos, que se puede obtener secando el cultivo según la reivindicación  
8.

40 10. Agente para prevenir enfermedades de los vegetales, que comprende el cultivo que contiene iturina A y sus  
homólogos, o el sólido obtenido del mismo, según la reivindicación 8 ó 9.

11. Procedimiento para prevenir una enfermedad de vegetales, que comprende utilizar el cultivo que contiene  
iturina A y sus homólogos, o el sólido obtenido del mismo, según la reivindicación 8 ó 9 en una forma no purificada.

45

50

55

60

65