



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 221 786**

② Número de solicitud: 200203050

⑤ Int. Cl.

C12P 27/00 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **20.12.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2005**

Fecha de la concesión: **22.02.2006**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.04.2006

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla**
c/ Valparaíso, 5 - 1ª Planta
41013 Sevilla, ES
Universidad de Granada

⑱ Inventor/es: **Oller López, Juan Luis;**
Cerdá Olmedo, Enrique;
Ávalos Cordero, Javier;
Fernández Barrero, Alejandro y
Oltra Ferrero, Juan Enrique

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Producción de giberelinas, GA₁ y GA₃ mediante fermentaciones con estirpes silvestres del hongo *Gibberella Fujikuroi*.**

㉑ Resumen:

Producción de giberelinas, GA₁ y GA₃ mediante fermentaciones con estirpes silvestres del hongo *Gibberella Fujikuroi*. Es objeto de esta invención un método de producción de giberelinas (especialmente GA₁ y GA₃) mediante estirpes silvestres de *Gibberella Fujikuroi*, sin necesidad de manipulación genética previa del hongo. El método es independiente de la estirpe silvestre del hongo *Gibberella Fujikuroi* que se utilice. En un primer paso se inocula las estirpes en un medio complejo y la fermentación se lleva a cabo con agitación orbital a una temperatura que oscila entre 22 y 32°C y en un período de tiempo que va de los 5 a los 15 días. Finalizada la fermentación, el caldo de cultivo se filtra, se acidifica y se extrae con disolventes orgánicos. Tras la evaporación del disolvente queda un residuo que contiene una mezcla de giberelinas en una cantidad en torno a los 2 g por litro de medio, con una riqueza en GA₁+GA₃ mayor de un 70% y en una proporción aproximadamente equivalentes.

ES 2 221 786 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

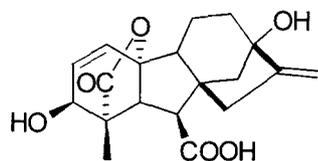
DESCRIPCIÓN

Método de producción de giberelinas, GA₁ y GA₃ mediante fermentaciones con estirpes silvestres del hongo *Gibberella Fujikuroi*.

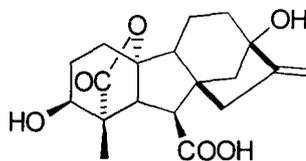
Objeto

Es objeto de esta invención un método de producción de giberelinas GA₁ y GA₃, usando estirpes silvestres *Gibberella Fujikuroi*, sin necesidad de manipulación genética previa del hongo.

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas naturales que regulan el crecimiento y la floración de las plantas entre otras actividades fisiológicas. Estas fitohormonas se encuentran a nivel de trazas en las plantas pero su aplicación exógena produce resultados espectaculares por lo que tienen un gran interés en agricultura intensiva y la industria de la cerveza. Se han descrito más de 100 giberelinas entre las cuales GA₃ (**1**), también conocida como ácido giberélico, se ha considerado tradicionalmente la giberelina más activa en plantas (MacMillan, J, *Natural Product Report*, **1997**, 221). Sin embargo estudios recientes han mostrado que GA₁ (**2**) tiene una importante actividad biológica, incluso superior a GA₃ en plantas como el arroz (Kobayashi M, MacMillan J, Phinney B, Gaskin P, Spray CR, Hedden P, *Phytochemistry*, **2000**, 55, 317), el tomate (Grünzweig JM, Rabinowitch HD, Katan J, Wodner M, Ben-Tal Y, *Phytochemistry* **1997**, 46, 811), el cerezo (Huanpu M, Blake PS, Browning G; Taylor JM, *Phytochemistry*, **2001**, 56, 67) o el guisante (Yaxley JR, Ross JJ, Sherriff LJ, Reid JB, *Plant Physiol*, **2001**, 125, 627).



1



2

Antecedentes de la invención

El hongo filamentoso *Gibberella Fujikuroi* es un organismo capaz de producir giberelinas en cantidades suficientes para su explotación industrial.

La producción de giberelinas por distintas estirpes silvestres o mutantes de *Gibberella Fujikuroi* en diversos medios de cultivo ha sido descrita en varias ocasiones. Concretamente, la producción de GA₃ (**1**) ha sido cubierta bajo diferentes patentes (GB844341, GB850018, GB886551, US2918413) así como la producción de la mezcla activa de giberelinas GA₄ + GA₇ (US6287800, CN1222575). Sin embargo, la producción de mezclas de GA₁ + GA₃ a niveles que puedan ser útiles en la industria agroquímica no ha sido descrita previamente, y precisamente la invención que se presenta en esta solicitud de patente consiste en un método de producción de giberelinas que tiene como resultado una mezcla de GA₁ + GA₃ en una riqueza del 70%.

Descripción de la invención

En esta solicitud de patente se describe un métodos para la producción de giberelinas (especialmente GA₁ y GA₃) mediante estirpes silvestres de *Gibberella Fujikuroi*, sin necesidad de manipulación genética previa del hongo.

El método es independiente de la estirpe silvestre del hongo *Gibberella Fujikuroi* que se utilice. En un primer paso se inocula las estirpe en un medio complejo y la fermentación se lleva a cabo con agitación orbital a una temperatura que oscila entre 22 y 32°C y en un periodo de tiempo que va de los 5 a los 15 días. Finalizada la fermentación, el caldo de cultivo se filtra, se acidifica y se extrae con disolventes orgánicos. Tras la evaporación del disolvente queda un residuo que contiene una mezcla de giberelinas en una cantidad en tomo a los 2 g por litro de medio, con una riqueza en GA₁ + GA₃ mayor de un 70% y en una proporción aproximadamente equivalentes.

Descripción de una realización preferida

Para ilustrar el ejemplo de realización de la invención, se ha tomado como punto de partida la estirpe FKMC1995 del hongo *Gibberella Fujikuroi* perteneciente a la Colección de la Universidad de Kansas.

Para llevar a cabo la fermentación se distribuyó el medio de cultivo complejo en matraces Erlenmeyer, que fueron inoculados con una suspensión de esporas de la estirpe silvestre FKMC1995 de *Gibberella Fujikuroi*. Los matraces, tapados con algodón graso, fueron incubados a una temperatura de 28-30°C con una agitación orbital de 200 rpm

ES 2 221 786 B1

aproximadamente. A los 8 días se detuvo la fermentación y el caldo de cultivo fue filtrado, acidificado a pH 1.5-3 con HCl, y extraído con acetato de etilo. La evaporación a vacío del disolvente y posterior desengrasado del extracto generó un residuo (2.3 g por litro de medio de cultivo) constituido mayoritariamente por giberelinas. Las giberelinas mayoritarias de esta mezcla fueron GA₁ y GA₃ (en proporciones aproximadamente equivalentes) entre las cuales sumaron alrededor de 1.5 g por litro de medio de cultivo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 221 786 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Método de producción de giberelinas GA₁ y GA₃ mediante fermentaciones con estirpes silvestres del hongo *Gibberella Fujikuroi* **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- 10 a) Inoculación mediante suspensión en un medio complejo
- b) Incubación y fermentación del cultivo con agitación orbital a temperatura comprendida entre 22°C-32°C y por un periodo de tiempo entre 5-15 días.
- c) Filtración, acidificación y extracción con disolventes orgánicos del caldo de cultivo
- 15 d) Evaporación del disolvente del caldo de cultivo.

2. Residuo obtenido de la aplicación del método según reivindicación 1, **caracterizado** porque contiene una mezcla de giberelinas en una cantidad en torno a 2 g/l de medio cultivado y con una riqueza GA₁ + GA₃ mayor al 70% y en un proporción aproximadamente equivalente.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 221 786

② Nº de solicitud: 200203050

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.12.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12P 27/00, C12N 1/14

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	KUHR et al. Factors affecting the production of various gibberellins during submerged cultivation of <i>Gibberella fujikuroi</i> . Folia Microbiologica, 1961, Vol. 6, páginas 179-181.	1,2
Y	PODOJIL, M. y RICICOVÁ, A. Influence of the soya meal fractions on gibberellic acid and gibberellin A production in submerse cultivation of <i>Gibberella fujikuroi</i> . Folia Microbiologica, 1965, Vol. 10 (1), páginas 55-59.	1,2
Y	CS 104329 A (FUSKA et al.) 15.07.1962 (resumen) HCAPLUS [en línea] [recuperado el 26.10.2004]. Recuperado de STN International, Columbus, Ohio (EEUU). AN: 1964:42042.	1,2
Y	GB 839652 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED) 29.06.1960, todo el documento.	1,2
A	SEREBRYAKOV, E.P. et al. Gibberellins and related compounds. IV. Comparative study of the formation of neutral metabolites by <i>Fusarium moniliforme</i> in various enzymic media. Khimiya Prirodnykh Soedinenii, 1969, Vol. 5 (3), páginas 156-163 (resumen) HCAPLUS [en línea] [recuperado el 11.10.2004]. Recuperado de STN International, Columbus, Ohio (EEUU). AN: 1970:20594.	
A	BRÜCKNER B. y BLECHSCHMIDT, D. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in <i>Gibberella fujikuroi</i> . Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, Vol. 35, páginas 646-650.	
A	ES 2046129 A1 (C.S.I.C.) 16.01.1994	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
04.11.2004	A. Polo Díez	1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 221 786

② Nº de solicitud: 200203050

③ Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12P 27/00, C12N 1/14

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 02055725 A2 (PHIBRO-TECH, INC.) 18.07.2002	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.11.2004

Examinador

A. Polo Díez

Página

2/2