



①9

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 228 281**

②1 Número de solicitud: 200400724

⑤1 Int. Cl.

**C12P 27/00** (2006.01)**C12N 1/14** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②2 Fecha de presentación: **20.12.2002**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2005**Fecha de la concesión: **25.04.2006**④5 Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2006**④5 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2006**⑥2 Número de la solicitud inicial: **200203050**⑦3 Titular/es: **Universidad de Sevilla**  
**c/ Valparaíso, 5 - 1ª Planta**  
**41013 Sevilla, ES**  
**Universidad de Granada**⑦2 Inventor/es: **Oller López, Juan Luis;**  
**Fernández Barrero, Alejandro;**  
**Oltra Ferrero, Juan Enrique;**  
**Cerdá Olmedo, Enrique y**  
**Ávalos Cordero, Javier**⑦4 Agente: **No consta**⑤4 Título: **Método de producción de giberelinas GA<sub>3</sub>, mediante fermentaciones con la estirpe silvestre IMI58289 del hongo *Gibberella fujikuroi*.**

⑤7 Resumen:

Método de producción de giberelinas GA<sub>3</sub>, mediante fermentaciones con la estirpe silvestre IMI58289 del hongo *Gibberella Fujikuroi*.

Es objeto de esta invención un método para la producción de giberelinas con la estirpe silvestre de *Gibberella fujikuroi* IMI58289, sin necesidad de manipulación genética previa del hongo. En primer lugar, la estirpe IMI58289 se inocula durante 6 días en medio rico en nitrógeno, condiciones en las que se inhibe la producción de giberelinas. A los seis días, los cultivos se filtran y el micelio se lava con agua destilada y se resuspende en una solución de glucosa con microelementos. La incubación posterior en estas condiciones da lugar a una mezcla de giberelinas con una proporción inusualmente elevada de GA<sub>3</sub>.

ES 2 228 281 B1

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

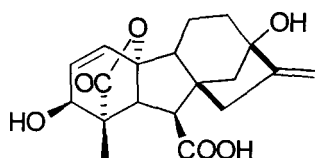
## DESCRIPCIÓN

Método de producción de giberelinas GA<sub>3</sub> mediante fermentaciones con la estirpe silvestre IMI58289 del hongo *Gibberella fujikuroi*.

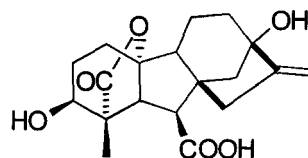
## Objeto

Es objeto de esta invención un método de producción de giberelinas GA<sub>3</sub>, usando la estirpe silvestre IMI58289 de *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 GA<sub>3</sub> (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 GA<sub>1</sub> (2) tiene una importante actividad biológica, incluso superior a GA<sub>3</sub> 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 GA<sub>3</sub> (1) ha sido cubierta bajo diferentes patentes (GB844341, GB850018, GB886551, US2918413) así como la producción de la mezcla activa de giberelinas GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> (US6287800, CN1222575). Sin embargo, la producción de GA<sub>3</sub> (2) o mezclas de GA<sub>1</sub> + GA<sub>3</sub> 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 GA<sub>3</sub>.

## Descripción de la invención

En esta solicitud de patente se describe un método para la producción de giberelinas con la estirpe silvestre de *Gibberella fujikuroi* IMI58289 sin necesidad de manipulación genética previa del hongo.

En primer lugar, la estirpe IMI58289 se incuba durante 6 días en medio de rico en nitrógeno, condiciones en las que se inhibe la producción de giberelinas. A los seis días, los cultivos se filtran y el micelio se lava con agua destilada y se resuspende en una solución de glucosa con microelementos. La incubación posterior en estas condiciones da lugar a una mezcla de giberelinas aproximada de 0.1 g/l de medio cultivado, con una proporción inusualmente elevada de GA<sub>3</sub>.

Los extractos de cada fermentación fueron analizados mediante espectroscopia <sup>1</sup>H RMN y la técnica combinada Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) [Columna: HP-1 (Crosslinked Methyl Siloxane) 25 m x 0.2 mm x 0.33 μm; gas portador: helio con un flujo de 0.6 ml/min; temperatura del inyector: 260°C; temperatura del detector: 280°C; temperatura inicial: 120°C, incrementada a 5°C/min hasta 220°C, incrementada posteriormente a 3°C/min hasta 280°C, donde se mantiene durante 10 minutos].

## ES 2 228 281 B1

### Descripción de una realización preferida

La fermentación se llevó a cabo en dos etapas. En una primera etapa se distribuyó el medio de cultivo rico en nitrógeno en matraces Erlenmeyer, que se inocularon con una suspensión de esporas de la estirpe silvestre IMI58289 de *Gibberella fujikuroi*. Los matraces, tapados con algodón graso para facilitar la aireación, se incubaron a 30°C con una agitación orbital de 200 rpm aproximadamente. A los 6 días se detuvo la fermentación y se separó el micelio del medio de cultivo por filtración. A continuación se resuspendió en una solución de glucosa con microelementos y se incubó durante 6 días en las condiciones arriba mencionadas. Finalmente se filtró el caldo de cultivo, se acidificó a pH 1.5-3 con HCl, y se extrajo con acetato de etilo. La evaporación a vacío del disolvente y posterior desengrasado del extracto generó un residuo constituido mayoritariamente por giberelinas. La giberelina mayoritaria de esta mezcla fue GA<sub>3</sub> (en una proporción superior al 50%).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 228 281 B1

## REIVINDICACIONES

5 1. Método de producción de giberelinas GA<sub>3</sub> mediante fermentaciones con estirpes silvestres del hongo *Gibberella Fujikuroi* **caracterizado** porque la estirpe silvestre de *Gibberella fujikuroi* usada es la IMI58289 y porque comprende las etapas siguientes:

a) Inoculación mediante suspensión de esporas en un medio de cultivo rico en nitrógeno.

10 b) Incubación y fermentación del cultivo con agitación orbital a temperatura comprendida entre 22°C-32°C y por un periodo de tiempo de 6 días.

c) Separación del micelio por filtración y suspensión del mismo en una solución glucosa con microelementos.

15 d) Incubación del nuevo caldo de cultivo en las mismas condiciones de temperatura y agitación orbital y por un periodo de 6 días.

e) Filtración, acidificación y extracción con disolventes orgánicos del caldo de cultivo.

20 f) Evaporación del disolvente del caldo de cultivo.

25 2. Residuo obtenido tras la realización del método de producción de giberelinas según la reivindicación 1, **caracterizado** porque contiene una mezcla de giberelinas en una cantidad en torno a 0.1 g/l de medio cultivado y con una riqueza de GA<sub>3</sub> superior al 50%.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 228 281

② Nº de solicitud: 200400724

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
X	FERNÁNDEZ-MARTÍN, R. et al. ent-Kaurene and squalene synthesis in <i>Fusarium fujikuroi</i> cell-free extracts. <i>Phytochemistry</i> , 2000, Vol. 54, páginas 723-728.	1,2
A	CANDAU, R. et al. Regulation of gibberellin biosynthesis in <i>Gibberella fujikuroi</i> . <i>Plant Physiol.</i> , 1992, Vol. 100, páginas 1184-1188.	1,2
A	US 2906670 A (BORROW et al.) 29.09.1959, todo el documento.	1,2
A	GB 838033 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED) 22.06.1960, todo el documento.	1,2
A	GB 819110 A (CHAS. PFIZER & CO. INC.) 26.08.1959, todo el documento.	1,2

#### 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  
02.03.2005

Examinador  
A. Polo Díez

Página  
1/1