

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 686**

51 Int. Cl.:

C05C 11/00 (2006.01)

C05F 11/10 (2006.01)

A01N 43/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2005 PCT/JP2005/003015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2005 WO05082145**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2005 E 05719465 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 1723850**

54 Título: **Fertilizante/revitalizante para plantas**

30 Prioridad:

26.02.2004 JP 2004050810

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

26.04.2018

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC (100.0%)
15-1 KYOBASHI 1-CHOME, CHUO-KU
TOKYO 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**TAKEUCHI, MAKOTO,C/O AJINOMOTO CO., INC.;
MIYAZAWA, YUKI,C/O AJINOMOTO CO., INC.;
SATO, HIROYUKI,C/O AJINOMOTO CO., INC. y
DATE, MASAZUMI,C/O AJINOMOTO CO., INC.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 665 686 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

Fertilizante/revitalizante para plantas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para su uso como fertilizante o revitalizante para plantas, que está compuesto por una disolución acuosa de L-prolina (a continuación en el presente documento, denominada a veces simplemente "prolina").

10

Técnica anterior

Se sabe que la prolina que es un tipo de aminoácidos tiene efectos como fertilizante o revitalizante para plantas, y hay mucha bibliografía previa que describe los efectos de la misma, tal como el documento de patente 1. Se comercializan productos que publicitan estos efectos.

15

Hasta ahora, la prolina ha estado disponible en una gran cantidad de formas de producto como materia prima para productos farmacéuticos o alimentos. Sin embargo, la prolina en cualquier forma está en un estado cristalino o en polvo, de modo que la prolina se conserva, distribuye y comercializa en formas de producto sólidas casi sin contenido en humedad. Entre esos productos, se conoce Hanakagami (nombre comercial) fabricado y comercializado por Shoko Co., Ltd. como producto que contiene un alto porcentaje de prolina y que se comercializa actualmente en Japón como fertilizante o revitalizante para plantas. De manera similar, Hanakagami se conserva, distribuye y comercializa en un estado sólido en polvo.

20

Los productos de prolina que se conservan, distribuyen y comercializan como sólidos presentan aglomeración y delicuescencia, debido a la alta propiedad higroscópica de la prolina, que deteriora en gran medida la calidad de los productos. Con el fin de evitar estos problemas, y para prevenir la absorción de humedad por parte de la prolina, se requiere que los productos comerciales sólidos convencionales estén encerrados con gel de sílice que tiene una propiedad higroscópica superior a la de la prolina, o que se envasen en un material de envasado tal como una película aluminizada cara que apenas tiene permeabilidad a la humedad.

25

30

La razón principal por la que la prolina se distribuye como un sólido a pesar del trabajo engorroso y de su coste tal como se describió anteriormente es que la disolución líquida de prolina se descompone fácilmente y se deteriora por exposición a microorganismos. En otras palabras, muchos aminoácidos, incluyendo prolina, cuando están en disolución acuosa sin un aditivo que previene la contaminación microbiana, tal como un conservante o un microbicida, empieza a descomponerse gradualmente debido a contaminación microbiana en el plazo de varios días debido a su alto valor nutritivo. Este efecto se observa incluso cuando la prolina está en un entorno de conservación normal, pero no en un entorno aséptico. Si estos problemas no existieran, se distribuiría preferiblemente prolina líquida en estado líquido para su aplicación como fertilizante o revitalizante para plantas, porque es excelente en cuanto a capacidad de conservación, operabilidad y propiedad de distribución.

35

40

Por consiguiente, solo hay unos pocos documentos conocidos que describen formas de conservación y distribución, y un método de distribución para un producto de prolina para un fertilizante o un revitalizante para plantas, particularmente un producto de prolina en un estado líquido. Cuando se realizan descripciones de los mismos, siempre se describe que se añade un aditivo tal como un conservante o un microbicida a un líquido que contiene prolina para prevenir la contaminación microbiana.

45

Por ejemplo, el documento de patente 2 describe que se usa un hidrolizado de prolina o de una proteína que contiene prolina, o una mezcla de aminoácidos, como fuente de prolina para un acelerador de formación de capullos que contiene una combinación de prolina y uracilo. Sin embargo, no se menciona un líquido como la forma de prolina como materia prima que va a usarse para la preparación del acelerador de formación de capullos.

50

Mientras tanto, el documento de patente 3 describe, como disolución que contiene diversos aminoácidos incluyendo prolina, una disolución obtenida descomponiendo proteínas de soja, grano de cereal o un cuerpo de célula microbiana, mediante diversos métodos, y disoluciones de fermentación de diversos aminoácidos. Sin embargo, no hay ninguna descripción sobre la forma de conservación, la forma de distribución ni el método de distribución de la disolución que contiene aminoácidos incluyendo prolina.

55

Además, como ejemplos de aplicación de la prolina a una planta, los documentos de patente 4 a 6 describen una disolución de fermentación de aminoácidos que contiene prolina, alanina, valina, ácido glutámico y similares, que se ha sometido a la eliminación de cuerpos celulares o esterilización. Sin embargo, no hay ninguna descripción específica sobre la forma de conservación, la forma de distribución ni el método de distribución de tal disolución que contiene aminoácidos.

60

El documento de patente 7 describe que una disolución de fermentación de aminoácidos que va a aplicarse a una planta puede estar en forma de una mezcla con un material orgánico o inorgánico que se combinan entre sí para

65

facilitar el almacenamiento, transporte o manipulación de la disolución de fermentación de aminoácidos. Es decir, se describe que, para cubrir las deficiencias de la disolución de fermentación de aminoácidos, se añade preferiblemente un material orgánico o material inorgánico de cualquier clase apropiada para mejorar la capacidad de conservación o la capacidad para su distribución. Los ejemplos específicos de este material que va a añadirse para mejorar la propiedad de almacenamiento incluyen, cuando es un líquido, diversos alcoholes, éteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos parafínicos y aldehídos.

El documento de patente 7 describe que una disolución, que se obtiene eliminando cuerpos celulares de una disolución de fermentación de aminoácidos que contiene diversos aminoácidos. Esta disolución experimenta un cambio en los componentes debido a la proliferación de microorganismos contaminados si no se hace nada para la disolución, excepto en el caso en el que se utiliza la disolución inmediatamente. Por tanto, es preferible que se conserve la disolución después de ajustar el pH de la misma a 3 o menos para estabilizar la calidad. En general, debe añadirse una gran cantidad de un ácido mineral fuerte tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico para ajustar el pH de la disolución de fermentación resultante para que tenga un pH de aproximadamente neutro a 3 o menos.

El documento de patente 9 describe que puede añadirse un aditivo tal como un tensioactivo, un regulador de pH o un conservante a una disolución de fermentación de aminoácidos, según se requiera. El documento de patente 10 describe la forma de un producto que contiene prolina y también describe que el producto que contiene prolina que se prepara con la adición de un tensioactivo, cuando se usa en forma líquida. Además, el documento de patente 11 describe que los productos que contienen prolina pueden combinarse con un microbicida, un tensioactivo o un conservante desde el punto de vista de prevención de la degradación por microbios.

Documento de patente 1: Documento JP-A 2001-131009

Documento de patente 2: Documento JP-B 46-42566

Documento de patente 3: Documento JP-B 56-32961

Documento de patente 4: Patente japonesa n.º 2852677

Documento de patente 5: Patente japonesa n.º 2874788

Documento de patente 6: Patente japonesa n.º 2874789

Documento de patente 7: Documento JP-A 06-80530

Documento de patente 8: Patente japonesa n.º 3377873

Documento de patente 9: Documento JP-A 2001-192310

Documento de patente 10: Documento JP-A 2002-199812

Documento de patente 11: Documento JP-A 2003-48803

Tetuo Tomayama *et al.*, The Journal of General Physiology, 20 de noviembre de 1935, páginas 379-382, se refiere a las solubilidades de L-prolina y L-hidroxiprolina en agua, los calores de disolución calculados y el volumen molar parcial de L-hidroxiprolina.

El documento JP 63 045211 A se refiere a un método para aumentar el rendimiento de arroz, frutas y verduras, raíces comestibles, flores y plantas ornamentales, árboles frutales, o similares.

El documento JP 57 002691 A se refiere a la preparación de L-prolina mediante un método de fermentación.

El documento JP 59 066893 se refiere a la preparación de L-prolina.

Divulgación de la invención

Los problemas convencionalmente conocidos asociados con disoluciones que contienen prolina los provoca el uso de diversos aditivos para suprimir la proliferación de microorganismos para prevenir el deterioro en la capacidad de conservación de la disolución provocado por la contaminación microbiana.

En general, se aplican fertilizantes o revitalizantes para plantas que contienen prolina mezclando o inyectando estas composiciones en el suelo de cultivo en el que están creciendo las plantas, o dispersándolas sobre las partes de las plantas que están por encima del terreno. Por tanto, cuando se aplica un fertilizante o un revitalizante para plantas que contiene prolina a una planta, los diversos aditivos añadidos a la disolución que contiene prolina se aplican simultáneamente no solo a las plantas, sino también a las zonas circundantes. Como resultado, por ejemplo, cuando

se aplica un conservante, un microbicida o similares a cultivo de campo, se observa un efecto adverso sobre el crecimiento de diversos organismos incluyendo bacterias del suelo en el suelo de cultivo. En los últimos años, diversos productos químicos agrícolas y hormonas medioambientales dejados en el suelo se han vuelto problemáticos, y la prevención de contaminación medioambiental que acompaña a la producción agrícola es una gran preocupación social.

Además, también cuando se aplica un conservante o un bactericida tal como se describió anteriormente en una instalación tal como un invernadero, la influencia sobre el entorno circundante también se ha vuelto ciertamente problemática, y los efectos adversos sobre la salud de los trabajadores dieron como resultado incluso más problemas.

Además, un método que implica añadir un ácido a la disolución que contiene prolina para reducir el pH de la disolución y así suprimir la proliferación de microorganismos contaminados también incluye problemas relacionados con la destrucción medioambiental, similares al problema con la adición de un bactericida. Esto es porque la disolución ácida se dispersa alrededor de la planta cuando se aplica la disolución que contiene prolina a la planta.

Además, el uso de una disolución que contiene prolina en la que el pH de la misma se reduce añadiendo un ácido, particularmente un ácido mineral tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, provoca la acumulación de iones inorgánicos de clorhidrato y sulfuro en el suelo sobre el cual crece la planta a la que se ha aplicado la disolución que contiene prolina, llevando a contaminación del suelo que se denomina acumulación de sal. Existe la preocupación de que la aplicación repetida de la disolución que contiene prolina durante muchos años pueda provocar un denominado daño por sal, lo que da como resultado la inhibición del crecimiento de plantas debido a un aumento en la concentración de sal del suelo de cultivo.

Los problemas que acompañan a estos bactericidas, conservantes y disoluciones ácidas son que las aplicaciones repetidas de los mismos provocan gradualmente contaminación medioambiental, aunque se use la disolución que contiene prolina como fertilizante o revitalizante para plantas tras diluirla con una gran cantidad de agua, así que los problemas esenciales no se resuelven.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una disolución de prolina para usar como fertilizante o revitalizante para plantas, que tenga capacidad de conservación, operabilidad y distribución mejoradas sin usar aditivos que puedan provocar la contaminación medioambiental tal como se describió anteriormente.

Los inventores de la presente invención han estudiado exhaustivamente para lograr el objetivo mencionado anteriormente. Como resultado, encontraron que una disolución que contiene prolina muestra un efecto significativo de prevenir la degradación debida a microbios sin alterar la operabilidad de la disolución ajustando la concentración de prolina en la disolución dentro de un intervalo apropiado, y por tanto han completado la presente invención basándose en tal observación.

Es decir, la presente invención es tal como se describe a continuación en el presente documento.

1. Uso de una disolución acuosa de L-prolina que tiene una concentración de L-prolina del 20 % (p/p) al 80 % (p/p) como fertilizante o revitalizante para plantas,

en el que la disolución acuosa de L-prolina puede obtenerse cultivando un microorganismo que tiene capacidad de producir L-prolina en un medio, produciendo y acumulando L-prolina en el medio, eliminando cuerpos celulares de una disolución de fermentación de L-prolina resultante, desalando la disolución de fermentación de L-prolina y concentrando la disolución.

2. Uso de composición según el punto 1, en el que la concentración de L-prolina es del 40 al 70 % (p/p).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento se describirá en detalle la presente invención. Obsérvese que, en el presente documento, el término "prolina" en el presente documento se refiere a "L-prolina".

La composición que va a usarse como fertilizante o revitalizante para plantas descrita en el presente documento es para mejorar el crecimiento de una planta al aplicarla a la planta. Los ejemplos típicos de la planta de interés incluyen: flores y plantas ornamentales tales como rosas y pensamientos; verduras tales como pepinos, tomates, fresas, melones y espinacas; frutas tales como peras, mandarinas y uvas; y granos de cereal tales como arroz y judías. Mientras tanto, los ejemplos del método de aplicación incluyen mezclar o inyectar en el suelo de cultivo en el que están creciendo las plantas, y dispersión en las partes por encima del terreno de las plantas.

La composición para un fertilizante o un revitalizante para plantas descrita en el presente documento está compuesta por una disolución acuosa de L-prolina que tiene una concentración de L-prolina del 20 % (p/p) o más.

En general, cuando una disolución acuosa de un aminoácido se somete, por ejemplo, a vaporización de la humedad en la disolución acuosa con el propósito de ajustar la concentración de aminoácido o el contenido de humedad, el contenido de humedad en la disolución acuosa disminuye mientras aumenta la concentración de aminoácido, dando como resultado un aumento en la presión osmótica de la disolución acuosa. Como consecuencia, muchos microorganismos no pueden sobrevivir en un entorno en el que la presión osmótica supera un nivel en el que las bacterias pueden sobrevivir en la disolución. Sin embargo, el grado en el que el contenido de humedad disminuye y la presión osmótica aumenta para suprimir la proliferación de microorganismos tales como microorganismos saprofitos depende del tipo de disolución, el tipo de soluto, condiciones físicas tales como temperatura o pH, y similares, y por tanto no es constante.

Por otro lado, la concentración de aminoácido en la disolución acuosa aumenta gradualmente a medida que se evapora la humedad, y los aminoácidos disueltos se convierten en cristales y precipitan cuando la concentración supera la saturación de los aminoácidos con respecto al agua. La disolución acuosa de aminoácido en la que el cristal precipita no puede mantener su uniformidad porque el cristal se deposita sobre una parte de fondo, y tiene una operabilidad inferior porque el componente sólido se mezcla en la misma y por tanto no es preferible para conservación o para distribución. Además, si el contenido en humedad disminuye adicionalmente cuando el cristal precipita, la concentración de aminoácido de la disolución no aumenta. Por tanto, si la presión osmótica en ese momento está dentro de un intervalo en el que una bacteria puede proliferar, lo más probable es que no se produzca el efecto de prevenir la degradación de la disolución por medio de microbios mediante ajuste adicional del contenido en humedad.

Por consiguiente, hasta ahora, apenas se han puesto en práctica la condición de conservación, condición de distribución y método de distribución, en los que tales métodos de ajustar el contenido en humedad en una disolución acuosa de aminoácido se usan para prevenir la descomposición de aminoácidos por una bacteria. En particular, no se ha divulgado previamente tal distribución de prolina.

Los inventores de la presente invención han investigado relaciones entre la concentración de prolina en una disolución acuosa de prolina, el crecimiento de microorganismos en la disolución y la operabilidad de la disolución. Como resultado, han encontrado que la concentración de prolina de una disolución puede ajustarse dentro de un intervalo particular, lo que hace posible prevenir la proliferación de microorganismos sin alterar la operabilidad de la disolución. Además, el envasado de tales productos se vuelve compacto al aumentar la concentración de prolina, haciendo así posible mejorar la distribución en vista de su conservación, transporte y similares.

La concentración de prolina de la disolución descrita en el presente documento es preferiblemente del 80 % (p/p) o menos, más preferiblemente del 20 al 70 % (p/p) y aún más preferiblemente del 40 al 70 % (p/p). Una concentración de prolina particularmente preferible es del 50 % (p/p). La concentración de prolina se ajusta dentro del intervalo anteriormente mencionado, haciendo así posible prevenir la proliferación de microorganismos contaminados. Mientras tanto, cuando la concentración de prolina está dentro de este intervalo, puede prevenirse la precipitación de prolina durante la conservación, y la viscosidad de la disolución de prolina no se vuelve demasiado alta. Por tanto, pueden mantenerse propiedades físicas adecuadas para distribuir la disolución usando una bomba o pulverizando la disolución.

La disolución de prolina descrita en el presente documento puede producirse, por ejemplo, disolviendo prolina en agua de tal manera que la concentración de prolina está dentro del intervalo anteriormente mencionado. La disolución de prolina descrita en el presente documento puede contener componentes distintos de la prolina siempre y cuando la eficacia de la disolución no se vea alterada. Los ejemplos de los otros componentes incluyen otros componentes fertilizantes, revitalizante para plantas, reguladores de crecimiento de plantas, vitaminas, minerales, esparcidores y otros materiales agrícolas/hortícolas generalmente aplicados. Sin embargo, cuando la disolución de prolina descrita en el presente documento se usa como fertilizante o revitalizante para plantas y se dispersa en tierras de cultivo, la cantidad de componentes distintos de prolina es preferiblemente pequeña para prevenir la inhibición del crecimiento (por ejemplo, daño por sal) de las plantas y contaminación medioambiental resultante.

El término "disolución" o "disolución acuosa" en la presente invención significa que un disolvente es agua o una disolución a base de agua. La disolución a base de agua puede contener un disolvente orgánico soluble en agua tal como un alcohol tal como etanol. La concentración del disolvente orgánico soluble en agua no está particularmente limitada siempre que pueda mantenerse de manera estable una determinada solubilidad de prolina. Por ejemplo, cuando el disolvente incluye etanol, la concentración del mismo es preferiblemente del 20 % (p/p) o menos y preferiblemente del 10 % (p/p) o menos.

Por otro lado, desde un punto de vista económico, puede usarse preferiblemente una materia prima más barata siempre y cuando la eficacia de la disolución de prolina no se vea alterada. Un ejemplo de tal materia prima incluye una disolución de fermentación de prolina obtenida usando un microorganismo que tiene la capacidad de producir prolina.

Cuando se usa una disolución de fermentación de prolina como materia prima para la disolución de prolina descrita en el presente documento, el método de ajustar la concentración de prolina no está particularmente limitado. Por

ejemplo, se eliminan cuerpos de células microbianas en la disolución de fermentación de prolina y después puede ajustarse la concentración de prolina usando un dispositivo para eliminar la humedad que se conoce de manera general tal como un evaporador a vacío o una membrana de ósmosis inversa. La disolución de fermentación de prolina en la que se han eliminado los cuerpos celulares puede complementarse con prolina sólida tal como un cristal de prolina o un líquido que contiene una alta concentración de prolina, para aumentar la concentración de prolina. Esto aumenta la concentración de prolina en la disolución de fermentación sin los cuerpos celulares. En la presente invención, preferiblemente se eliminan las sales, excepto prolina, de la disolución de fermentación de prolina de la que se han eliminado los cuerpos celulares. Los ejemplos de tales sales incluyen sales inorgánicas que se derivan del medio. Los ejemplos del método de desalación incluyen un tratamiento con resina de intercambio iónico, electroósmosis y un tratamiento con membrana de ósmosis inversa. La razón (es decir, la razón en peso) de sales contaminantes con respecto a prolina en la disolución de prolina es preferiblemente de 1 o menos, más preferiblemente de 0,5 o menos o aún más preferiblemente de 0,3 o menos.

La disolución de fermentación de prolina puede obtenerse cultivando un microorganismo que tiene capacidad de producir L-prolina en un medio de manera que se produce y se acumula L-prolina en el medio. El microorganismo anteriormente mencionado no está particularmente limitado mientras que tenga la capacidad de producir prolina, y ejemplos del mismo incluyen bacterias que pertenecen al género *Escherichia*, bacterias corineformes y bacterias que pertenecen al género *Serratia*. Los ejemplos específicos de las mismas incluyen las siguientes cepas, pero la presente invención no se limita a estas cepas.

Escherichia coli AJ11543 (FERM P-5483) (Documento JP-A 56-144093)

Escherichia coli AJ11544 (FERM P-5484) (JP-A 56-144093)

Brevibacterium lactofermentum AJ11225 (FERM P-4370) (JP-A 60-87788)

Brevibacterium flavum AJ11512 (FERM P-5332) (JP-B 62-36679)

Brevibacterium flavum AJ11513 (FERM P-5333) (JP-B 62-36679)

Brevibacterium flavum AJ11514 (FERM P-5334) (JP-B 62-36679)

Corynebacterium glutamicum AJ11522 (FERM P-5342) (JP-B 36679)

Corynebacterium glutamicum AJ11523 (FERM P-5343) (JP-B 62-36679)

El microorganismo que puede usarse en la fermentación de prolina puede ser una cepa de tipo natural o puede ser una cepa mutante o recombinante obtenida cultivando un microorganismo para mejorar la capacidad de producir prolina.

El medio que puede usarse en la fermentación de prolina puede ser uno que se usa convencionalmente en la fermentación de prolina, y que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos y, según se requiera, micronutrientes orgánicos tales como aminoácidos y vitaminas.

Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen sacáridos tales como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa; disoluciones de almidón sacarificado que contienen esos sacáridos; melaza de batata, melaza de azúcar de remolacha, melaza de alta calidad, ácidos orgánicos tales como ácido acético, y alcoholes tales como etanol y glicerina.

Los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen materias primas que contienen nitrógeno tales como gas amoniacal, agua amoniacal, sales de amonio, urea y ácido nítrico.

Las condiciones de cultivo no son particularmente diferentes del método convencional de cultivar una bacteria que produce prolina.

La disolución de prolina descrita en el presente documento puede conservarse y distribuirse sin contaminarse por microorganismos, ajustando la concentración de prolina dentro del intervalo anteriormente mencionado. Los ejemplos del microorganismo contaminado incluyen microorganismos que pertenecen al género *Bacillus*, *Aspergillus* o *Saccharomyces*.

Ejemplos

A continuación en el presente documento se describirá en más detalle la presente invención haciendo referencia a ejemplos.

[Ejemplo de referencia 1] Producción de la disolución de fermentación de prolina

(1) Fermentación de prolina

Puede obtenerse una disolución de fermentación de prolina mediante un método descrito en ejemplo 2 en el documento JP-A 05-284985. Específicamente, puede producirse de una manera como la descrita a continuación.

Se preparó un medio líquido que tenía la composición mostrada en la tabla 1 y se ajustó a un pH de 7,2. Después, se añadieron 20 ml del medio líquido a un matraz de 500 ml con agitación y se esterilizó por calentamiento. Se inoculó un aro de platino de células de *Corynebacterium glutamicum* AJ11522 que se había cultivado previamente en un medio natural en el medio líquido y se cultivó con agitación a 30 °C durante 72 horas. Tras completarse el cultivo, normalmente estaban presentes 3,4 g/dl de L-prolina en la disolución de cultivo.

La cepa AJ11522 es auxotrofa para L-isoleucina y es una bacteria que produce L-prolina que tiene una alta actividad citrato sintetasa (documento JP-A 05-284985).

Tabla 1

Componente	Concentración
Glucosa	10 g/dl
KH ₂ PO ₄	0,1 g/dl
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0 g/dl
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,04 g/dl
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg/dl
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1 mg/dl
Biotina	250 µg/l
Clorhidrato de tiamina	500 µg/l
Hidrolizado de proteína de soja	0,3 ml/dl
Isoleucina	15 ml/dl
CaCO ₃ (esterilizado por separado)	5 g/dl

A continuación, se eliminaron los cuerpos celulares de la disolución de cultivo usando una centrifugadora. Después, se evaporó el líquido de la disolución mediante calentamiento a vacío usando un evaporador rotatorio, para así obtener 1,2 ml de una disolución concentrada. La concentración de prolina en la disolución concentrada era aproximadamente de 50 g/dl.

(2) Producción de la disolución de prolina desalada y concentrada

Puede llevarse a cabo el método de desalación de la disolución de fermentación de prolina según un método convencional. A continuación en el presente documento, se muestra como ejemplo un método que emplea una resina de intercambio iónico.

Se llevó a cabo la fermentación de prolina mediante un método descrito en la sección anteriormente mencionada (1) o cualquier otro método apropiado. Se añadió ácido sulfúrico a 320 ml de la disolución de fermentación de prolina resultante (por ejemplo, un disolución que contenía 20 g de prolina) hasta que el pH fue de 3. Después, se eliminaron los cuerpos celulares mediante ultrafiltración. Se hicieron pasar 450 ml de la disolución de prolina resultante a través de 100 ml de una resina de intercambio iónico catiónica comercialmente disponible (tipo H) que tenía fuerte acidez, que se había cargado en una columna. Se dejó adsorber la prolina de la disolución en la resina, separándose así la prolina de los aniones contaminantes presentes en la disolución de fermentación. Después, se hizo pasar a través de la columna una disolución de elución de 200 ml de NaOH 1 N, seguida de agua (normalmente, alrededor de 600 ml) hasta que la prolina, incluyendo prolina que se había adsorbido en la resina, se eluyó completamente de la columna. 700 ml de un eluato obtenido al llevar a cabo el tratamiento tal como se describió anteriormente, la disolución de fermentación de prolina que se había obtenido mediante el método descrito en la sección anteriormente mencionada (1) o cualquier otra fermentación de prolina apropiada contenía aproximadamente 16 g de prolina en una concentración de aproximadamente 2,3 g/dl. Además, la disolución desalada puede concentrarse por calentamiento a vacío para eliminar la humedad, para así obtener, por ejemplo, 32 ml de una disolución de prolina. La concentración de prolina de la disolución era de 50 g/dl.

[Ejemplo 1] Concentración de prolina en una disolución acuosa de prolina y la proliferación de microorganismos

Se investigó la proliferación de microorganismos en disoluciones acuosas de prolina a diversas concentraciones según el método tal como se describe a continuación.

Se disolvieron cristales de prolina (fabricados por Ajinomoto Co., Inc.) que tenían una calidad de una materia prima comercialmente disponible para preparaciones farmacéuticas en agua corriente para obtener disoluciones de prolina a las concentraciones mostradas en las tablas 2 y 3, para así obtener 50 ml de cada disolución acuosa. Después, se añadieron, 0,5 g de suelo sin esterilizar a cada disolución de prolina para añadir microorganismos, y se conservaron

las mezclas en botellas a 25 °C y 40 °C durante 4 semanas. Las tablas 2 y 3 muestran la proliferación de microorganismos en cada disolución de prolina tras la conservación.

Tabla 2. Proliferación de microorganismos en disolución acuosa de prolina (conservada a 25 °C durante 4 semanas)

Concentración de prolina (%)	Número de días para la conservación					pH de la disolución el día 28	Presión osmótica (Osm/kg)	Operabilidad de la disolución
	0	3	7	14	28			
0	-	-	-	-	-	6,6	0	Buena
10	-	+	+	+	+	6,4	0,9	Buena
20	-	-	+	+	+	6,5	1,8	Buena
30	-	-	+	+	+	6,5	2,7	Buena
40	-	-	-	+	+	6,6	3,6	Buena
50	-	-	-	-	-	6,9	4,5	Buena

-: no hay aparición de hongos

+: hay aparición de hongos

Tabla 3. Proliferación de microorganismos en disolución acuosa de prolina (conservada a 40 °C durante 4 semanas)

Concentración de prolina (%)	Número de días para la conservación					pH de la disolución el día 28	Presión osmótica (Osm/kg)	Operabilidad de la disolución
	0	3	7	14	28			
0	-	-	-	-	-	6,5	0	Buena
10	-	+	+	+	+	6,6	0,9	Buena
20	-	-	+	+	+	6,6	1,8	Buena
30	-	-	+	+	+	6,6	2,7	Buena
40	-	-	-	+	+	6,6	3,6	Buena
50	-	-	-	-	-	6,9	4,5	Buena

-: no hay aparición de hongos

+: hay aparición de hongos

Tal como se mostró anteriormente, se confirmó que, cuando la concentración de prolina en una disolución acuosa era del 10 % o más, se suprimió la proliferación de microorganismos. Además, se confirmó que la proliferación de los microorganismos se suprimió adicionalmente a medida que aumentaba la concentración de prolina, y cuando la concentración de prolina era de aproximadamente el 50 %, la proliferación de microorganismos se prevenía casi completamente.

Debe observarse que los valores del pH de las disoluciones acuosas de prolina tras cuatro semanas eran casi uniformes, indicando que la proliferación de los microorganismos no se suprimía por el cambio en el pH.

Además, cada disolución tenía buena operabilidad, y sin precipitación de cristales.

[Ejemplo 2] Concentración de sales contaminantes en disolución de prolina y el consecuente daño por sal a la planta

Se investigaron los efectos de sales contaminantes en una disolución de prolina y su relación con el daño por sal usando disoluciones modelo. Para las disoluciones modelo, se usaron una disolución obtenida eliminando cuerpos celulares de una disolución de fermentación de prolina (a continuación en el presente documento, denominada simplemente "disolución de fermentación de prolina") y una disolución obtenida eliminando las sales contaminantes de la disolución de fermentación (a continuación en el presente documento, denominada "disolución desalada"). La tabla 4 muestra la composición de la disolución de fermentación de prolina y la tabla 5 muestra la composición de la disolución desalada.

Se cultivó komatsuna (es decir, *Brassica campestris* var. *peruviridis*) en una maceta (que tenía un diámetro de 7,5 cm y una profundidad de 6,5 cm) con un suelo de cultivo comercialmente disponible. Se añadieron 2,5 ml de cada disolución modelo una sola vez sobre la superficie de hojas de komatsuna, para confirmar el grado de un daño por sal. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos 18 horas tras la dispersión.

Tabla 4. (Las unidades en la tabla son % en peso)

	A	B
Prolina	0,02	0,002
KH ₂ PO ₄	0,00056	0,000056
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,03458	0,003428
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,00024	0,000024
NaCl	0,00172	0,000172

Agua	99,94	99,99
Concentración total de sales inorgánicas	0,0368	0,00368

Tabla 5. (Las unidades en la tabla son % en peso)

	C	D	E
Prolina	0,020	0,002	0,000
Agua	99,980	99,998	100,00

5

Tabla 6

	A	B	C	D	E
Crecimiento	No bueno	No bueno	Bueno	Bueno	Normal

“No bueno” indica el marchitamiento de las hojas o tallos, es decir, crecimiento no vigoroso, en comparación con la parcela de control E.

10

“Bueno” indica de hojas o tallos vigorosos, es decir, buen crecimiento, en comparación con la parcela de control E.

Tal como se describió anteriormente, se suprimió el daño por sal a una planta al disminuir la concentración de sales contaminantes a cualquier concentración de prolina. Además, pudieron dispersarse disoluciones de prolina a mayor concentración. Además, se confirmó que la dispersión de una disolución de prolina a alta concentración mejora el crecimiento de una planta.

15

Aplicabilidad industrial

20

La composición para un fertilizante o un revitalizante para plantas descrita en el presente documento tiene una excelente operabilidad porque es un líquido, puede prevenir la contaminación por microorganismos, y además, probablemente no provoque un daño por sal a una planta cuando se aplica a la misma.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una disolución acuosa de L-prolina que tiene una concentración de L-prolina del 20 % (p/p) al 80 % (p/p) como fertilizante o revitalizante para plantas,
- 5
- en el que la disolución acuosa de L-prolina puede obtenerse cultivando un microorganismo que tiene capacidad de producir L-prolina en un medio, produciendo y acumulando L-prolina en el medio, eliminando cuerpos celulares de una disolución de fermentación de L-prolina resultante, desalando la disolución de fermentación de L-prolina y concentrando la disolución.
- 10
2. Uso de composición según la reivindicación 1, en la que la concentración de L-prolina es del 40 al 70 % (p/p).