(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 666 279**

(51) Int. CI.:

C12R 1/125 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2012 PCT/FR2012/052234**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050700**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2012 E 12779108 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2764126**

(54) Título: **Biotensioactivos producidos por una nueva cepa de Bacillus subtilis, composición que los comprende, método de obtención y aplicación**

(30) Prioridad:

03.10.2011 FR 1158922

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES (100.0%)
Cité Scientifique
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, FR

(72) Inventor/es:

COUTTE, FRANÇOIS;
JACQUES, PHILIPPE;
LECOUTURIER, DIDIER;
GUEZ, JEAN-SÉBASTIEN;
DHULSTER, PASCAL;
LECLERE, VALÉRIE y
BECHET, MAX

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Biotensioactivos producidos por una nueva cepa de *Bacillus subtilis*, composición que los comprende, método de obtención y aplicación

Campo técnico

La presente invención se refiere a biotensioactivos producidos con una cepa de *Bacillus sp.* y a sus utilizaciones. También se refiere a una composición que comprende estos biotensioactivos.

La presente invención encuentra aplicaciones en particular en la producción de biopesticidas o biotensioactivos para la industria fitosanitaria, y también en los campos de las industrias alimentaria, cosmética, química, farmacéutica, petrolífera y medioambiental.

En la descripción que sigue a continuación, las referencias entre corchetes (**[ ]**) hacen referencia al listado de las referencias que se presenta al final de los ejemplos.

Estado de la técnica

El sistema de producción agrícola convencional utiliza productos fitosanitarios de tipo pesticidas para asegurar una producción suficiente en cantidad y en calidad, de acuerdo con las expectativas de los mercados y con un coste aceptable para el consumidor. Aunque la utilización de estos productos aporta beneficios a los sistemas agrícolas, sin embargo puede estar en el origen de los efectos negativos para la salud humana y para el medio ambiente. La degradación de la calidad de las aguas subterráneas y de las aguas superficiales y la reducción de la biodiversidad en el medio agrícola son las consecuencias mencionadas con más frecuencia.

Los biotensioactivos, en particular de origen bacteriano, son conocidos porque tienen numerosas propiedades interesantes, en particular propiedades tensioactivas, antivirales, antibacterianas y antifúngicas susceptibles de aprovechamiento en el campo fitosanitario. Estos biotensioactivos se pueden utilizar solos o en una mezcla de varios biotensioactivos. Cuando los biotensioactivos se utilizan en forma de mezclas han mostrado efectos sinérgicos (Ongena y Jacques, 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, Trends Microbiol. 16, 115-125 **[1]**; documento CZ20011620 **[2]**; documento DE102005050123 **[3]**).

Estos biotensioactivos presentan una mejor capacidad de biodegradación, una toxicidad más baja y una resistencia fisicoquímica más importante, en comparación con un pesticida de origen químico. Además, el mercado cosmético está particularmente interesado en moléculas de origen biológico que combinen actividades antimicrobianas y propiedades fisicoquímicas como agentes emulsionantes.

Los biotensioactivos también se utilizan en la recuperación asistida del petróleo contenido en los yacimientos en los que la inyección de biotensioactivos permite reducir la viscosidad del petróleo y mejorar ligeramente la proporción de petróleo recuperado. También se utilizan para luchar contra las contaminaciones del agua por hidrocarburos y son mucho más eficaces que los tensioactivos químicos. Además, estos biotensioactivos no son tóxicos para el ecosistema de las aguas tratadas.

Por lo tanto, las solicitudes de biotensioactivos son cada vez más y más importantes en el transcurso de los últimos años, en particular en las industrias alimentaria, cosmética, química, farmacéutica, petrolífera y ambiental. Numerosos métodos de producción se han usado, se han realizado y han sido el objeto de publicaciones o de depósitos de solicitud de patente (documento FR2578552 **[4]**).

Sin embargo, los biotensioactivos disponibles en la actualidad son poco eficaces y presentan propiedades biológicas y/o químicas limitadas.

Por lo tanto existe una necesidad real de proporcionar biotensioactivos alternativos, de preferencia que tengan mejores propiedades con respecto a los biotensioactivos de la técnica anterior.

En particular se han estudiado los métodos de producción de biotensioactivos producidos por *Bacillus sp.* Sin embargo, estos métodos conducen a la formación de espuma causada por el aporte de oxígeno, en forma de burbujas. Un primer enfoque es utilizar reactores ventilados mecánicamente agitados y extraer en modo continuo la espuma provocada por el biotensioactivo y que contiene este último. Este método es difícil y poco aprovechable, en particular a gran escala (Guez et ál., 2007. Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of Bacillus subtilis for the production and continuous removal of lipopeptides. J. Biotechnol., 131, 67-75 **[5]**).

Con el fin de evitar este problema de espuma, se ha intentado trabajar en condiciones anaerobias y utilizar nitrato como aceptor final de electrones (Davis, Lynch y Varley. 1999. The production of surfactin in batch culture by Bacillus subtilis ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enzyme Microb. Technol. 25, 322-329. **[6]**; documento WO0226961 **[7]**; documento EP1320595 **[8]**). Las producciones de biotensioactivos

dependen en gran medida de la capacidad de las cepas de adaptarse o no a estas condiciones anaerobias. Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna solución eficaz que permita producir biotensioactivos en cantidades industriales. Además, dado que cada vez se cuestiona más la utilización de pesticidas de origen químico, Es necesario investigar y utilizar moléculas de origen biológico para sustituir los pesticidas de origen químico y preparar métodos de producción de estas moléculas de origen biológico a escala industrial.

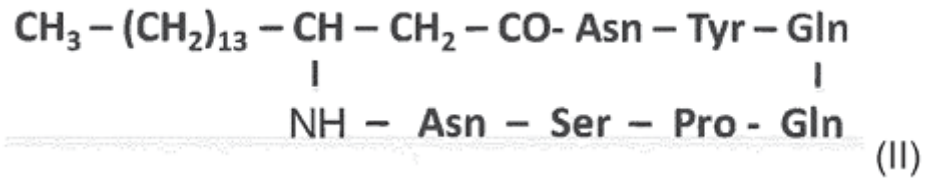
Por lo tanto, existen necesidades reales de preparar un método que solucionen estos defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, que comprenda un método que permita producir biotensioactivos en modo continuo, en cantidades importantes, con bajos costos de producción.

Descripción de la invención

La presente invención responde de forma precisa a las necesidades mencionadas anteriormente, proporcionando micosubtilinas tal como se reivindican, y una composición que comprende estas micosubtilinas.

Por lo tanto la presente invención tiene como objeto la siguiente micosubtilina:

◦ Micosubtilina Gln3 C17: micosubtilina cuya cadena de ácido graso comprende 17 átomos de carbono y que tiene una glutamina en el lugar de la asparagina en la posición 3 en su ciclo peptídico y representada por la fórmula (II) que sigue a continuación:



(II)

Los inventores también han descrito una micosubtilina C18, es decir, una micosubtilina cuya cadena de ácido graso comprende 18 átomos de carbono, y que se representa con la fórmula (I) que sigue a continuación:
(I)

Las micosubtilinas C18 y Gln3 C17 descritas anteriormente se pueden utilizar como agente antifúngico. Además presentan efectos antifúngicos equivalentes incluso superiores a los de las micosubtilinas utilizadas en la actualidad como agente antifúngico.

En la presente divulgación, por « agentes antifúngicos », se hace referencia a sustancias que tienen la capacidad de tratar y/o prevenir infecciones por hongos y/o levaduras.

Los inventores también han elaborado una composición que comprende una mezcla de micosubtilinas.

Por lo tanto la presente invención también tiene como objeto una composición que comprende al menos una micosubtilina Gln3 C17.

Por ejemplo, esta composición puede comprender además una o varias otras micosubtilinas elegidas entre el grupo que comprende una micosubtilina *iso*-C16, una micosubtilina n-C16, una micosubtilina *anteiso*-C17, una micosubtilina *iso*-C17 y una micosubtilina C18.

Cuando una micosubtilina C18 está presente en la composición, ésta puede estar presente con una concentración comprendida entre un 1 % y un 5 % en peso de la composición.

Cuando una micosubtilina micosubtilina Gln3 C17 está presente en la composición, ésta puede estar presente con una concentración comprendida entre un 1 % y un 20 % en peso de la composición.

Cuando una micosubtilina micosubtilina *iso*-C16 está presente en la composición, ésta puede estar presente con una concentración comprendida entre un 1 % y un 60 % en peso de la composición.

Cuando una micosubtilina micosubtilina n-C16 está presente en la composición, ésta puede estar presente con una concentración comprendida entre un 1 % y un 10 % en peso de la composición.

Cuando una micosubtilina micosubtilina *anteiso*-C17 está presente en la composición, ésta puede estar presente con una concentración comprendida entre un 20 % y un 95 % en peso de la composición.

Cuando una micosubtilina micosubtilina *iso*-C17 está presente en la composición, ésta puede estar presente con una concentración comprendida entre un 5 % y un 30 % en peso de la composición.

Por ejemplo, la composición de acuerdo con la invención puede comprender, en porcentaje con respecto al peso de la composición: entre 1 % y un 60 % de micosubtilina *iso*-16, entre 1 % y un 20 % de micosubtilina Gln3 C17, entre 1 % y un 10 % de micosubtilina n-C16, entre 20 y un 95 % de micosubtilina *anteiso*-C17, entre un 5 % y un 30 % de micosubtilina *iso*-C17 y entre 1 % y un 5 % de micosubtilina C18.

De preferencia, esta composición comprende, en porcentaje con respecto al peso de la composición: un 26 % de micosubtilina *iso*-16, un 1 % de micosubtilina Gln3 C17, un 2 % de micosubtilina n-C16, un 44 % de micosubtilina *anteiso*-C17, 23 % de micosubtilina *iso*-C17 y un 1 % de micosubtilina C18.

Por ejemplo esta composición se puede utilizar como composición antifúngica. En otros términos, se puede tratar de una composición para utilización como antifúngico.

La composición que comprende una mezcla de micosubtilinas de acuerdo con la presente invención tiene un poder antifúngicos que varía de una concentración mínima inhibitoria de 4 a 32 µM.

Las micosubtilinas y la composición que comprende una mezcla de micosubtilinas de acuerdo con la presente invención se pueden mezclar en una solución elegida entre el grupo que comprende agua, etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), carbonato de sodio, Tris-HCl y una mezcla de estas soluciones.

Le mezcla de estas soluciones puede ser una mezcla binaria o ternaria. Cuando la mezcla de soluciones es binaria, la proporción de agua/etanol, agua/metanol, agua/DMSO, agua/carbonato de sodio, agua/ Tris-HCl, etanol/metanol, etanol/DMSO, etanol/ carbonato de sodio, etanol/ Tris-HCl, metanol/DMSO, metanol/ carbonato de sodio, metanol/ Tris-HCl, puede estar comprendida por ejemplo entre 4/1 y 1/4, por ejemplo entre 3/1 y 1/3, por ejemplo entre 2/1 y 1/2, por ejemplo una proporción de 1/1, 2/1, 3/1 o 4/1. Cuando la mezcla de soluciones es ternaria, la proporción de agua/etanol/metanol, agua/etanol/DMSO, agua/etanol/carbonato de sodio, agua/etanol/Tris-HCl, agua/metanol/DMSO, agua/metanol/carbonato de sodio, agua/metanol/Tris-HCl, etanol/metanol/DMSO, etanol/metanol/carbonato de sodio, etanol/metanol/ Tris-HCl, DMSO/ carbonato de sodio / Tris-HCl puede ser por ejemplo 1/1/1, 2/1/1, 1/2/1, 1/1/2, 3/1/1, 1/3/1, 1/1/3, 3/2/1, 3/1/2, 2/3/1, 2/1/3, 1/2/3 o 1/3/2.

Las micosubtilinas y la composición que comprende una mezcla de micosubtilinas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar por ejemplo como agente antifúngico.

Por lo tanto la presente invención también tiene como objeto una micosubtilina de acuerdo con la invención, o una composición de acuerdo con la invención para utilización como agente antifúngico.

La presente invención también proporciona una descripción de una cepa de *Bacillus subtilis* para producir la micosubtilina, un método de obtención de estas micosubtilinas y un dispositivo que permite la producción de un biotensioactivo a escala industrial, en particular que suprime o que limita la formación de espuma.

El método de obtención de un biotensioactivo, comprende una etapa **(a)** de cultivo de un microorganismo capaz de producir un biotensioactivo en un medio de cultivo que comprende un sustrato orgánico, siendo el cultivo del microorganismo realizado en la superficie de un elemento de contacto de membrana de aire/líquido.

En efecto, los inventores han sido los primeros en realizar este método y han descubierto, de forma sorprendente, que la inmovilización de las células elemento de contacto de membrana de aire/líquido es particularmente favorable para la producción de los biotensioactivos en modo continuo, a la vez que se evita la formación de espuma. Además, el método permite aumentar el rendimiento de producción de biotensioactivo. Además, la utilización de un elemento de contacto de membrana de aire/líquido en el método de acuerdo con la presente invención permite producir un biotensioactivo en modo continuo.

En la presente, por « biotensioactivo », se hace referencia a una molécula de tensioactivo que es anfifílica y que se produce a partir de un microorganismo. Por ejemplo, se puede tratar de un compuesto elegido entre el grupo que comprende un lipopéptido, un fosfolípido, un glucolípido, una lipoproteína, un éster de ácido graso. Por ejemplo, el lipopéptido se puede elegir entre el grupo que comprende una iturina, una surfactina, una micosubtilina, una siringomicina, una fengicina (o plipastatina), una liquenisina, una bacilomicina, una kurstaquina, una tolaasina, una artrofactina, una serrawettina, una putisolvina, un masetolido. El fosfolípido se puede elegir por ejemplo entre el grupo que comprende una fosfatidilcolina. El éster se puede elegir por ejemplo entre el grupo que comprende un éster de sorbitán, de ramnosa, una monomiristina, una monolinoleína y una monolinolenina. El glucolípido puede ser por ejemplo un ramnolípido.

Por « cultivo de un microorganismo » se hace referencia al conjunto de las técnicas utilizadas para hacer crecer un microorganismo y/o hacer que produzca una o varias moléculas.

Por « microorganismo capaz de producir un biotensioactivo » se hace referencia a todo organismo microscópico unicelular o pluricelular desprovisto de diferenciación tisular, y que tiene la capacidad de sintetizar un biotensioactivo. Se puede tratar por ejemplo de una bacteria, una levadura, un moho o una alga.

Por ejemplo, la bacteria puede pertenecer a un género elegido entre el grupo que comprende *Bacillus, Pseudomonas, Rhodococcus, Acinetobacter, Serratia, Burkholderia, Mycobacterium, Nocardia, Flavobacterium, Corynebacterium, Clostridium, Thiobacillus, Arthrobacter, Alcanivorax, Paenibacillus.* Por ejemplo, la levadura puede pertenecer a un género elegido entre el grupo que comprende *Candida, Pseudozyma, Ustilago, Schizonella, Kurtzmanomyces, Torulopsis, Rhodotorula, Wickerhamiella.* De preferencia, el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo pertenece al género *Bacillus.*

Cuando el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo pertenece al género *Bacillus,* se puede elegir por ejemplo entre el grupo que comprende *Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Bacillus mojavensis.* Se puede tratar por ejemplo de las cepas elegidas entre el grupo que comprende *Bacillus subtilis,* tal como la depositada el 10 de marzo de 2011 con el número CNCM I-4451 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur (Paris, Francia), también denominada BBG125 de *Bacillus subtilis*, así como ATCC 21332 de *Bacillus subtilis*, BBG21 de *Bacillus subtilis*, ATCC 6633 de *Bacillus subtilis*, BBG100 de *Bacillus subtilis*, ATCC 9943 de *Bacillus subtilis*, S499 de *Bacillus subtilis*, BBG116 de *Bacillus subtilis*, BBG131 de *Bacillus subtilis*, BAS50 de *Bacillus licheniformis*, una cepa obtenida a partir de ATCC 14580 de *Bacillus licheniformis* y BBG300 de *Bacillus thuringiensis*.

De preferencia, para la producción de micosubtilina, el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo se elige entre el grupo que comprende BBG125 de *Bacillus subtilis*, BBG100 de *Bacillus subtilis* y *Bacillus subtilis* BBG1116, de preferencia entre el grupo que comprende BBG125 de *Bacillus subtilis* y BBG100 de *Bacillus subtilis*.

De preferencia, para la producción de surfactina, el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo es BBG131 de *Bacillus subtilis*.

De preferencia, para la producción de fengicina, el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo se elige entre el grupo que comprende ATCC 21332 de *Bacillus subtilis*, BBG21 de *Bacillus subtilis*.

Incluso de preferencia, de acuerdo con la invención, el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo es BBG125 de *Bacillus subtilis*.

Cuando el microorganismo capaz de producir un biotensioactivo pertenece al género *Pseudomonas,* se puede elegir por ejemplo entre el grupo que comprende *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas tolaasii.*

En la presente, por « sustrato orgánico » se hace referencia a toda sustancia o mezcla de sustancias que permite hacer crecer al microorganismo y/o hacerle producir una o varias moléculas. Por ejemplo, el sustrato orgánico se puede elegir entre el grupo que comprende almidón, glucosa, glutamato, sacarosa, xilosa, glicerol, ácidos orgánicos, aminoácidos y una mezcla de estos sustratos orgánicos. Por ejemplo, el sustrato orgánico puede ser el medio de Landy cuya composición es la siguiente: glucosa, 20 g/l; ácido glutámico, 5 g/l; extracto de levadura, 1 g/l, K_2HPO_4, 1 g/l; $MgSO_4$, 0,5 g/l; KCl, 0,5 g/l; $CuSO_4$, 1,6 mg/l; $Fe_2(SO_4)_3$, 1,2 mg/l; $MnSO_4$, 0,4 mg/l (Landy et ál., 1948. Bacillomycin; an antibiotic from Bacillus subtilis active against pathogenic fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67, 539-541) **[9]**. El sustrato orgánico también puede ser, por ejemplo un milieu de Landy modificado, por ejemplo un medio de Landy completado con sulfato de amonio a 2,3 g/l y/o la concentration en ácido glutámico es de 2 g/l (Guez et ál., 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by Bacillus subtilis. J. Biotechnol. 134, 121-126 **[10]**).

En la presente, por « elemento de contacto de aire/líquido » se hace referencia a un dispositivo que permite oxigenar un medio líquido a partir de un gas que contiene oxígeno. Un elemento de contacto de aire/líquido comprende en particular un elemento de contacto de membrana de aire/líquido. Por ejemplo se puede tratar de un reactor que comprende un elemento de contacto de membrana de aire/líquido. A modo de ejemplos de elemento de contacto de aire/líquido, se pueden mencionar los siguientes elementos de contacto: « Cartuchos de fibra hueca » de GE Healthcare de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por CFP y « Módulos de fibra hueca de Spectrum Labs » de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por KM.

Un elemento de contacto de aire/líquido de membrana también permite separar la fase líquida de la fase gaseosa: la fase gaseosa circula por un lado de la membrana y la fase líquida fluye por el otro lado (Remize y Cabassud. 2003 Un nouveau réacteur d'oxydation sans bulles : le contacteur à membrana G/L. Récents progrès en génie des procédés. Intégration des membranes dans les procédés 2. Lavoisier Tec y Doc. **[11]**), sin que estas dos fases se mezclen.

Por « elemento de contacto de membrana de aire/líquido » se hace referencia a una membrana porosa que permite la difusión de oxígeno en un medio de cultivo.

Por ejemplo, el elemento de contacto de membrana de aire/líquido puede ser una membrana de fibras huecas o en membranas planas.

El elemento de contacto de membrana de aire/líquido puede tener por ejemplo óleos cuyo tamaño está comprendido entre 0,01 y 2 µm, por ejemplo entre de 0,01 a 1 µm, por ejemplo entre 0,1 y 0,65 µm.

El elemento de contacto de membrana de aire/líquido puede tener por ejemplo una superficie comprendida entre 0,1 y 20 m^2. De preferencia, la superficie del elemento de contacto de membrana de aire/líquido es superior a 1 m^2.
El elemento de contacto de membrana de aire/líquido puede ser por ejemplo una membrana hidrófoba, que permite garantizar una mejor separación de estas dos fases. Por ejemplo, el elemento de contacto de membrana de aire/líquido se puede preparar con un material elegido entre el grupo de polímeros que comprenden polietersulfona, polipropileno, polisulfona, celulosa regenerada y los ésteres de celulosa.

El elemento de contacto de membrana de aire/líquido puede ser por ejemplo plano, cilíndrico, cilindrocónico o de cualquier forma geométrica que permita optimizar la superficie de cultivo de microorganismo y los intercambios con el oxígeno.

A modo de ejemplo de elementos de contacto de membranas de aire/líquido, se pueden mencionar en particular las siguientes membranas:

- (CFP-6-D-45) de GE-Healthcare Europe GmbH (Munich, Alemania),
- módulos de filtración de fibras huecas (Cartuchos de fibra hueca) de GE Healthcare de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por CFP,
- módulos de filtración de fibras huecas (Módulos de fibra hueca) de Spectrum Labs de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por KM.

Los microorganismos capaces de producir un biotensioactivo se pueden inmovilizar de forma activa ya sea totalmente ya sea parcialmente en la superficie del elemento de contacto de membrana de aire/líquido. En otros términos, una gran parte de los microorganismos presentes en el elemento de contacto de aire/líquido se inmovilizan en la superficie de la membrana de este elemento de contacto, la otra parte encontrándose en suspensión en el medio de cultivo después de su liberación.

Por lo tanto, el método puede comprender una etapa **(a)** de cultivo de un microorganismo capaz de producir un biotensioactivo en un medio de cultivo que comprende un sustrato orgánico, siendo el cultivo del microorganismo realizado en la superficie de un elemento de contacto de membrana de aire/líquido. En otros términos, el método permite de forma ventajosa pasar desde un tanque de cultivo o un fermentador. El método permite de forma ventajosa producir micosubtilinas en modo continuo y en cantidad muy satisfactoria. De forma ventajosa, el método se realiza en modo continuo. Opcionalmente se puede añadir un tanque de cultivo o un fermentador pero no es indispensable. La adición de un tanque de cultivo o de un fermentador está más bien desaconsejada ya que podría disminuir los rendimientos de producción. Por lo tanto, de forma ventajosa, el método se realiza en un dispositivo que no comprende tanque de cultivo o un fermentador. En otros términos, de acuerdo con el método, el cultivo del microorganismo capaz de producir un biotensioactivo se puede realizar únicamente en la superficie del elemento de contacto de membrana de aire/líquido.

El oxígeno necesario para los microorganismos capaces de producir un biotensioactivo se transfiere por difusión a través de los poros del elemento de contacto de membrana de aire/líquido en el que dichos microorganismos están inmovilizados. En otros términos, la oxigenación del medio de los microorganismos no se realiza mediante un sistema de burbujeo situado en un reactor ni con un sistema de oxigenación situado en el exterior del reactor de cultivo de los microorganismos.

El caudal de oxígeno del elemento de contacto de membrana de aire/líquido se puede ajustar a cualquier caudal que permita oxigenar los microorganismos capaces de producir un biotensioactivo. El experto en la materia tiene la capacidad de determinar los caudales de oxígeno del elemento de contacto de membrana de aire/líquido en función del aporte de oxígeno deseado. Los inventores han observado que un caudal de ventilación comprendido entre 0,2 y 2 volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto (vvm) es particularmente eficaz para oxigenar el medio de cultivo y los microorganismos. Por lo tanto, el caudal de aire del elemento de contacto del aire y líquido puede está comprendido entre 0,5 y 2 vvm. De preferencia, el caudal de ventilación del elemento de contacto de aire/líquido es de 0,25 vvm para la producción de micosubtilina. De preferencia, el caudal de ventilación del elemento de contacto de aire/líquido es de 1 vvm para la producción de surfactina. De preferencia, el caudal de ventilación del elemento de contacto de aire/líquido es de 0,5 vvm para la producción de fengicina.

De acuerdo con el método, la etapa **(a)** de cultivo se puede realizar en la superficie de una pluralidad de elementos de contacto de membranas de aire/líquido. Por ejemplo, la etapa **(a)** de cultivo se puede realizar en la superficie de 2 elementos de contacto de membrana de aire/líquido, por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 membranas de aire/líquido, incluso más. El experto en la materia tiene la capacidad de determinar el número de elementos de contacto de membrana de aire/líquido en función de la cantidad de biotensioactivo a producir.

Uno de los objetivos es aumentar la cantidad de microorganismos inmovilizados en la superficie del elemento de contacto de membrana de aire/líquido. Esto se puede realizar mediante un aumento de la superficie del elemento de contacto de membrana de aire/líquido y/o del número de elementos de contacto de membrana de aire/líquido.

Cuando la etapa **(a)** de cultivo se realiza en la superficie de una pluralidad de elementos de contacto de membrana de aire/líquido, los elementos de contacto de membrana de aire/líquido se pueden colocar, por ejemplo, en serie o en paralelo. De preferencia, cuando la etapa **(a)** de cultivo se realiza en la superficie de una pluralidad de elementos de contacto de membrana de aire/líquido, los elementos de contacto de membrana de aire/líquido se colocan en paralelo.

El método puede comprender además una etapa de separación del biotensioactivo del medio de cultivo que lo contiene. Esta etapa de separación se puede realizar con cualquier medio conocido por la persona con experiencia en la materia que permita separar una sustancia contenida en un medio líquido del mismo.

Por ejemplo, la etapa de separación del biotensioactivo del medio de cultivo que lo contiene puede comprender una o varias etapas, elegidas entre el grupo que comprende una microfiltración, una ultrafiltración, una nanofiltración y una centrifugación.

Por ejemplo, la etapa de separación del biotensioactivo del medio de cultivo que lo contiene comprende las siguientes etapas:

(b) microfiltración del medio de cultivo obtenido en la etapa **(a),** que permite separar el microorganismo del medio de cultivo, y/o
(c) ultrafiltración del medio de cultivo obtenido en la etapa **(a)** o **(b),** que permite separar el biotensioactivo del medio de cultivo obtenido en la etapa **(a)** o **(b).**

De preferencia, la etapa de separación comprende cada una de las etapas **(b)** y **(c).**

Las etapas **(b)** de microfiltración y **(c)** de ultrafiltración permiten extraer en modo continuo el biotensioactivo del medio de cultivo obtenido en la etapa **(a)** y/o **(b).**

Por lo tanto, la combinación del elemento de contacto de membrana de aire/líquido con las etapas **(b)** de microfiltración y **(c)** de ultrafiltración permite producir y extraer en modo continuo un biotensioactivo a partir de un microorganismo capaz de producirlo.

La etapa **(b)** de microfiltración se puede realizar con cualquier medio de microfiltración que permita separar el microorganismo del medio de cultivo que lo contiene. Por ejemplo, el medio de microfiltración puede ser una membrana de microfiltración. Por ejemplo, el medio de microfiltración puede ser una membrana de microfiltración orgánica o mineral, por ejemplo una membrana de fibras huecas.

La etapa **(b)** de microfiltración se puede realizar por ejemplo con una membrana de fibras huecas que tenga tamaños de poro de 0,1 a 0,45 micrómetros (µm). De preferencia, la membrana de fibras huecas utilizada en la etapa **(b)** tiene un tamaño de poro de 0,2 µm.

A modo de ejemplo de membranas que se pueden utilizar para realizar la etapa **(b)** de microfiltración se pueden mencionar las siguientes membranas:

- fibras huecas de polisulfona o de polietersulfona de tamaño de poro de 0,2 µm de referencia CFP-2-E-4X2MA (GE-Healthcare Europe GmbH, Munich, Alemania),
- fibras huecas de polisulfona o de polietersulfona de tamaño de poro de 0,45 µm de referencia CFP-4-E-4X2MA o de tamaño de poro de 0,65 µm de referencia CFP-2-E-6X2MA (GE-Healthcare Europe GmbH, Munich, Alemania),
- módulo de microfiltración o de ultrafiltración de fibras huecas (Cartuchos de fibra hueca) de GE Healthcare de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por CFP,
- módulo de filtración de fibras huecas (Módulos de fibra hueca) de Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA, U.S.A.) de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por KM,
- casetes Sartocon de microfiltración de Sartorius Stedim (Aubagne, Francia) de acuerdo con los modelos definidos por las referencias que comienzan por SPC20.

La etapa **(c)** de ultrafiltración se puede realizar con cualquier medio de ultrafiltración que permita separar el le biotensioactivo del medio de cultivo que lo contiene, y concentrar el biotensioactivo. Por ejemplo, el medio de ultrafiltración puede ser una membrana de ultrafiltración, por ejemplo una membrana de ultrafiltración de celulosa regenerada.

La etapa **(c)** de ultrafiltración se puede realizar por ejemplo con una membrana que tenga un umbral de corte de comprendido entre 5 y 50 kilodaltons (kDa), por ejemplo entre 5 kDa y 30 kDa, por ejemplo entre 5 y 20 kDa. De

preferencia, la membrana utilizada en la etapa **(c)** tiene un umbral de corte de 10 kDa.

A modo de ejemplo de membranas que se pueden utilizar para realizar la etapa **(c)** de ultrafiltración, se pueden mencionar las siguientes membranas:

- Membrana de ultrafiltración de umbral de corte de 10 KDa de celulosa regenerada de referencia 3051443901E-SW (Sartorius, Göttingen, Alemania),
- Membrana de ultrafiltración de umbral de corte de 10 kDa De celulosa regenerada de referencia P2C010C01 (Millipore Headquarters, 290 Concord Road, Billerica, MA, U.S.A.).

De preferencia, las membranas utilizadas en las etapas **(a), (b)** y **(c)** se pueden esterilizar a 121 ºC durante 20 minutos.

El método se diferencia de los métodos conocidos de degradación biológica de materias orgánicas por microorganismos que secretan biotensioactivos en que se puede reciclar o no la totalidad de los microorganismos después de haberles retirado de los residuos de materias orgánicas del medio de cultivo y de los biotensioactivos producidos. Esto permite obtener una tasa de concentración de microorganismos elevada en el biorreactor.

También se diferencia de los métodos conocidos de degradación biológica de materias orgánicas por microorganismos que secretan biotensioactivos en que aproximadamente un 95 % de los biotensioactivos producidos quedan en el medio de cultivo sin la menor formación de espuma. Aproximadamente un 5 % de los biotensioactivos se adsorben en la superficie de contacto de aire/líquido del elemento de contacto de membrana, pero también se pueden desorber, por ejemplo mediante un lavado de la membrana.

El elemento de contacto de membrana de aire/líquido se puede lavar con cualquier medio conocido por el experto en la materia con el fin de recuperar los biotensioactivos producidos y adsorbidos en la superficie de contacto de aire/líquido del elemento de contacto de membrana. Por ejemplo, el lavado del elemento de contacto de membrana de aire/líquido se puede realizar con una o varias soluciones de lavado elegidas entre el grupo que comprende agua destilada, una solución de NaOH, una solución de NaOCl, una solución de hidrogenocarbonato de sodio o de potasio, una solución de carbonato de sodio o de potasio. La solución de lavado se puede llevar a cualquier pH que permita aumentar la cantidad de biotensioactivos recuperados. Por ejemplo, la solución de lavado se lleva a un pH = 10.

La solución de lavado se puede llevar a cualquier temperatura que permita aumentar la cantidad de biotensioactivos recuperados. Por ejemplo, la solución de lavado se lleva a una temperatura comprendida entre 20 y 50 ºC.

La temperatura del medio de cultivo se puede regular con cualquier medio de calentamiento conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, el medio de calentamiento puede ser un intercambiador térmico. Por ejemplo, el intercambiador térmico se puede elegir entre el grupo que comprende un intercambiador térmico de tubo en U, un intercambiador térmico de haz tubular horizontal, un intercambiador térmico de haz tubular vertical, un intercambiador térmico en espiral, un intercambiador térmico de placas, una columna Bouhy, un intercambiador térmico de bloques. De preferencia, el medio de calentamiento es un intercambiador térmico tubular.

Por lo tanto, el método se puede realizar a cualquier temperatura que permita producir un biotensioactivo a partir de un microorganismo capaz de producirlo. Por ejemplo, el método se puede realizar a una temperatura comprendida entre 0 ºC y 70 ºC, de forma ventajosa entre 20 ºC y 37 ºC. De preferencia, el método se puede realizar a una temperatura de 22 ºC para la producción de micosubtilina. De preferencia, el método se puede realizar a una temperatura de 30 ºC para la producción de fengicina. De preferencia, el método se puede realizar a una temperatura de 37 ºC para la producción de surfactina.

Además, el método se puede realizar a cualquier pH que permita producir un biotensioactivo a partir de un microorganismo capaz de producirlo. El pH se puede regular gracias a la adición controlada de solución básica o de solución ácida en el medio de cultivo.

La solución básica se puede elegir, por ejemplo, entre el grupo que comprende sosa, potasa y amoniaco.

La solución ácida se puede elegir, por ejemplo, entre el grupo que comprende ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido nítrico.

El pH se puede regular por ejemplo a cualquier valor que permita la supervivencia de los microorganismos capaces de producir un biotensioactivo. Por ejemplo se puede regular a un valor comprendido entre pH 6 y pH 8, de preferencia a un valor de pH 7. El experto en la materia tiene la capacidad de determinar las cantidades de solución básica y de solución ácida para regular el pH a un valor deseado.

El método se puede realizar de forma ventajosa en modo continuo, es decir, que la alimentación del elemento de contacto de membrana de aire/líquido y la extracción de los biotensioactivos producidos por los microorganismos se

puede realizar sin interrupción. El método se puede realizar en cualquier caudal horario que permita extraer un biotensioactivo a partir de un microorganismo capaz de producirlo. El caudal con el que se puede realizar el método, es decir, el caudal de medio de cultivo añadido en el elemento de contacto de membrana de aire/líquido puede ser fácilmente adaptado por el experto en la materia. Los inventores han observado que la realización del método continuo a una tasa de dilución entre 0,05 h^{-1} y 0,5 h^{-1} es particularmente eficaz para producir biotensioactivos a partir de microorganismos. La tasa de dilución se define como el cociente del caudal de alimentación o de extracción entre el volumen de cultivo. Por lo tanto, el método se puede realizar, por ejemplo, con un caudal horario circulante que corresponde a una tasa de dilución comprendida entre 0,05 h^{-1} y 0,5 h^{-1}, de forma ventajosa con un caudal horario de 0,1 h^{-1}.

El dispositivo para la realización del método que se describe en la presente comprende un elemento de contacto de membrana de aire/líquido. Por ejemplo, el dispositivo comprende al menos un elemento de contacto de aire/líquido que comprende un elemento de contacto de membrana de aire/líquido.

El elemento de contacto de membrana de aire/líquido y el elemento de contacto de aire/líquido pueden ser los que se han definido anteriormente.

El número de elementos de contacto de membrana de aire/líquido y de elementos de contacto del aire/líquido puede ser como se ha definido anteriormente.

El dispositivo no comprende medio de ventilación distinto a la membrana o la pluralidad de elementos de contacto de membrana de aire/líquido. En otros términos, el dispositivo no comprende un sistema de burbujeo situado en un reactor. Tampoco comprende un sistema de oxigenación situado en el exterior del reactor de cultivo de los microorganismos. Además con el dispositivo puede comprender un medio de microfiltración y/o un medio de ultrafiltración. De preferencia, el dispositivo comprende un medio de microfiltración y un medio de ultrafiltración. El medio de microfiltración y el medio de ultrafiltración pueden ser por ejemplo los que se han descrito anteriormente.

De forma ventajosa, el dispositivo comprende los medios necesarios para la realización en modo continuo del método descrito. En otros términos, el dispositivo comprende de forma ventajosa un medio de introducción de medio de cultivo y un medio de extracción del biotensioactivo producido por el microorganismo. Se puede utilizar cualquier medio de introducción y cualquier medio de extracción conocidos por el experto en la materia para obtener un dispositivo que permita la realización en modo continuo del método descrito.

El dispositivo puede comprender además un medio de evaporación. En la presente, por « medio de evaporación » se hace referencia a cualquier medio que permita concentrar un biotensioactivo en un medio que lo contenga. Por ejemplo, se puede tratar de un medio de evaporación elegido entre el grupo que comprende un evaporador de vacío de tipo Rotavapor VV2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Alemania) y un evaporador de película con pendiente. El dispositivo puede comprender además un medio de calentamiento que permita regular la temperatura del medio de cultivo. El medio de calentamiento puede ser por ejemplo el que se ha descrito anteriormente. El sistema de calentamiento se puede unir al elemento de contacto de aire/líquido a través de un sistema de conductos.

Por « sistema de conductos » se hace referencia a cualquier medio en el que pueda circular un fluido o un gas. Por ejemplo el fluido puede ser un líquido o un gel. El sistema de conductos permite en particular unir entre ellos, diferentes elementos del dispositivo de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el sistema de conductos puede ser cualquier tipo de tubería flexible o rígida de tipo silicona (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, U.S.A.) o de acero inoxidable 316S (Swagelok Company, Solon, OH, U.S.A.).

La circulación del fluido o gas en el sistema de conducción se puede regular con una o varias bombas y/o una o varias válvulas.

Además, el dispositivo puede comprender al menos una bomba.

Por « bomba » en el sentido de la presente invención, se hace referencia a un medio que permita a imponer un caudal a un líquido, por ejemplo a un medio de cultivo en el dispositivo. Por ejemplo, se puede tratar de una bomba peristáltica, una bomba de lóbulos o una bomba de membrana. Por ejemplo, se pueden mencionar las bombas peristálticas del modelo de conducción compacta Masterflex L/S (Cole Parmer Vernon Hills, IL, U.S.A.), Millipore Corporation (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.), bomba Sartojet (Sartorius, Sartorius Stedim France SAS, Aubagne) y Watson-Marlow 323 (Watson Marlow, Falmouth, Cornwall, Reino Unido). Además, la bomba se puede controlar de forma manual o de forma automática.

Además, el dispositivo puede comprender al menos una válvula.

En la presente, por « válvula » se hace referencia a un medio que permita detener o modificar el caudal de un líquido, por ejemplo del medio de cultivo en el dispositivo de la presente invención. Por ejemplo, se puede tratar de una válvula de regulación, una válvula de « todo o nada », una electroválvula. Por ejemplo, se pueden mencionar las

válvulas de regulación de fluoruro de polivinilideno (PVDF), de polipropileno (PP), de perfluoroalcoxi (PFA) o de acero inoxidable. Además, la válvula se puede controlar de forma manual o de forma automática.

En la presente los inventores describen la utilización del dispositivo para la realización del método descrito.

La presente divulgación también describe una cepa de *Bacillus subtilis* obtenida a partir de la cepa ATTC 6633 de *Bacillus subtilis* en la que el operón *srfA* que codifica la surfactina sintetasa se ha interrumpido y en el que el promotor del operón *myc* que codifica la micosubtilina sintetasa se ha sustituido por un promotor fuerte constitutivo P_{repU}.

De preferencia, esta cepa de *Bacillus subtilis* es la cepa de *Bacillus subtilis* depositada el 10 de marzo de 2011 con el número CNCM I-4451 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganisos (CNCM) del Instituto Pasteur (París, Francia). Esta cepa también se denomina BBG125 de *Bacillus subtilis*.

El método de producción de micosubtilinas comprende una etapa de cultivo de una cepa de *Bacillus subtilis* y una etapa de recuperación de las micosubtilinas obtenidas.

La cepa BBG125 de *Bacillus subtilis* se puede utilizar por ejemplo en cualquier método de producción de biotensioactivos, en particular en un método de producción de las micosubtilinas C18 y Gln3 C17 que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, el método de producción de biotensioactivos puede comprender una etapa de cultivo de la cepa BBG125 de *Bacillus subtilis* y una etapa de recuperación de los biotensioactivos obtenidos. Por ejemplo, el método de producción de biotensioactivos puede ser el que se ha descrito anteriormente en la presente.

La cepa BBG125 de *Bacillus subtilis* desarrollada por los inventores es particularmente sorprendente. Esta cepa permite producir micosubtilinas sin producción de surfactina. Además, permite producir micosubtilinas que jamás se han descrito.

Por lo tanto, los inventores proporcionan un método de producción en modo continuo de biotensioactivos que permite evitar la formación de espuma y aumentar los rendimientos de producción. También han proporcionado un dispositivo que permite realizar este método así como una cepa de *Bacillus subtilis* notable por que es capaz de producir en este método micosubtilinas que jamás se han descrito y que presentan efectos antifúngicos equivalentes o incluso superiores a los de las micosubtilinas utilizadas en la actualidad como agente antifúngico. Los inventores también han proporcionado una composición antifúngica que presenta efectos antifúngicos superiores a los efectos de las micosubtilinas utilizadas en la actualidad.

Para el experto en la materia podrán aparecer incluso otras ventajas con la lectura de los ejemplos que siguen a continuación, ilustrados con las figuras adjuntas, proporcionados a modo ilustrativo.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 es un esquema que representa un dispositivo de producción en modo continuo sin formación de espuma y de extracción de los lipopéptidos producidos por un microorganismo. En esta figura, M1 representa un elemento de contacto de aire/líquido de membrana de fibras huecas que tienen los compartimentos C1 y C2 que representan respectivamente un compartimento externo, en el que circula el aire, y un compartimento interno, en el que circula un medio de cultivo. M2 representa la membrana de microfiltración de un medio de microfiltración que tiene los compartimentos C3 y C4. M3 representa la membrana de ultrafiltración de un medio de ultrafiltración que tiene los compartimentos C5 y C6. B1, B2 y B3 representan cada uno una balanza. B representa un motor que permite accionar un medio de agitación en el Tanque 2. P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7 representan bombas volumétricas. « Mi » significa « medio de cultivo », « De » significa « residuos » y « Et » significa « intercambiador térmico ».
- La figura 2 es un esquema que representa un dispositivo de producción en modo continuo sin formación de espuma, de extracción y de purificación de los lipopéptidos producidos por un microorganismo. En esta figura, C1, C2, C3, C4, C5, C6, M1, M2, M3, B1, B2, B3, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, « Mi », « De » y « Et » tienen el mismo significado que para la figura 1. M4 representa la membrana de ultrafiltración de un medio de ultrafiltración que tiene los compartimentos C7 y C8. B4, B5, B6 y B7 representan cada uno una balanza. B representa un motor que permite accionar un medio de agitación en el Tanque 2 o en el Tanque 4. P8, P9, P10, P11 y P12 representan bombas volumétricas. V1, V2, V3, V4 y V5 representan válvulas. « Co » significa « condensador » y « X » corresponde a una solución líquida que comprende los lipopéptidos producidos por el microorganismo.
- La figura 3 es un esquema que representa el dispositivo de la figura 1 en el que un circuito alternativo se representa con línea de puntos. P13 y P14 representan bombas volumétricas. V6, V7 y V8 representan válvulas. B7 representa una balanza.
- La figura 4 es un esquema que representa el dispositivo de la figura 2 en el que un circuito alternativo se representa con línea de puntos. P13 y P14 representan bombas volumétricas. V6, V7 y V8 representan válvulas. B7 representa una balanza. La figura 5 representa las primeras partes del dispositivo que se describe en las figuras 1 a 4, en el que hay una pluralidad de elementos de contacto de aire/líquido que están colocados en

paralelo. En este esquema, se representan tres elementos de contacto de aire/líquido.

- La figura 6 es una representación esquemática de la recombinación homóloga de un fragmento de 2,6 kb, que tiene la secuencia *εpbp-P_{repU}-neo-εfenF* del plásmido pBG106 en el que los fragmentos *εpbp* y *εfenF* se obtienen a partir de PCR de la cepa ATCC 6633 de *Bacillus subtilis*, formando de ese modo el plásmido pBG200. En esta figura, « *SphI* », «*XbaI* », « *Bsp*EI » y « *XmaI* » representan los sitios de restricción de las respectivas enzimas epónimas. « *εpbp* » y « *εfenF* » representan casetes que permiten la recombinación homóloga. « *pbp* » representa el gen que codifica una proteína que se une a la penicilina. « P_{myc} » representa el promotor original de la cepa ATCC 6633 de *B. subtilis*. « *fenF* », « *mycA* », « *mycB* » y « *mycC* » representan los cuatro genes que constituyen el operón de la micosubtilina. « *yngL* » representa el gen que codifica una proteína que tiene una función desconocida. « P_{repU} » representa el promotor del gen de replicación de pUB110. « *neo* » representa un gen que confiere una resistencia a la neomicina/kanamicina.
- La figura 7 es una representación esquemática de la recombinación homóloga de un plásmido pBG144 al nivel del operón *srfA* de la cepa BBG116, que conduce a la cepa BBG125. « *Eco*RI », « *Bst*EII » y « *MfeI* » representan los sitios de restricción de las respectivas enzimas epónimas. « *εsrfAA* » y « *εsrfAA'*» representan casetes que permiten la recombinación homóloga. « *hxIR* » representa un gen situado cadena arriba del operón *srfA.* « P_{srfA} » representa el promotor nativo del operón *srfA.* « *cat* » representa un genes de resistencia al cloranfenicol. « *tet* » representa un genes de resistencia a la tetraciclina.

Ejemplos

Ejemplo 1 : Construcción de la cepa BBG125 de *Bacillus subtilis*

La cepa BBG125 de *Bacillus subtilis* se depositó el 10 de marzo de 2011 con el número CNCM I-4451 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganisos (CNCM) del Instituto Pasteur (París, Francia).

Se construyó a partir de la cepa ATCC 6633 de *Bacillus subtilis* de tipo silvestre (Duitman et ál., 1999. The mycosubtilin synthetase of Bacillus subtilis ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 13294-13299 **[12]**) de acuerdo con el protocolo que se describe a continuación.

1.1 Protocolo de construcción del plásmido híbrido pBG200 que contiene *εpbp-P_{repU}-neo-εfenF* y *rep*(R6K).

El plásmido pBG106 (Leclère et ál., 2005. Mycosubtilin overproduction by BBG100 by *Bacillus subtilis* enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Environ. Microbiol., 71, 4577-4584 **[13]**), se digirió con las enzimas de restricción *SphI* (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER0601) y SacI (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER1131) con el fin de aislar y purificar un fragmento de *εpbp-P_{repU}-neo-εfenF* de 2,6 kilo-pares de bases (kb) de secuencia SEQ ID NO: 11, de acuerdo con el protocolo que se describe en: Sambrook y Russell, 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York **[14].**

Esta secuencia porta dos casetes *(εpbp* y *εfenF)* que permiten la realización de recombinación es homóloga son el cromosoma de la cepa ATCC 6633 de *Bacillus subtilis*.

En paralelo, el plasposón pTnMod-RKm' (Dennis y Zylstra, 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2710-2715 **[15]**) se trató con las enzimas de restricción *NspI* (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER1471) y SacI (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER1131) generando una mezcla de cinco fragmentos, entre los cuales se aisló y se purificó la secuencia del fragmento que porta *rep*(R6K) de 451 pares de bases (pb) (Sambrook y Russell, 2001 **[14]**).

A continuación, los fragmentos que contienen las secuencias *εpbp-P_{repU}-neo-εfenF* y rep(R6K) se ligaron en conjunto (Sambrook y Russell, 2001 **[14]**).

Los sitios de las enzimas de restricción utilizadas fueron los que siguen a continuación:

- *SphI* : GCATGC (en La posición 1 de la secuencia SEQ ID NO: 11),
- *XbaI* : TCTAGA (en las posiciones 743 y 2088 de la secuencia SEQ ID NO: 11) y
- *SacI* : GAGCTC ((en la posición 2630 de la secuencia SEQ ID NO: 11).

Los casetes *εpbp,* P_{repU}-*neo* y *εfenF* se formaron de la manera que sigue a continuación:

- Casete *εpbp:* de *SphI* a *XbaI* (SEQ ID NO: 12),
- Casete P_{repU}-*neo*: de *XbaI* a *XbaI* (SEQ ID NO: 13)
- Casete *εfenF*: de *XbaI* a *SacI* (SEQ ID NO: 14).

La ligadura obtenida se utilizó para transformar la cepa CC118 (λ*pir*) de *Escherichia coli* (Herrero, de Lorenzo y Timmis, 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172: 6557-67 **[16]**), con una selección en medio de Luria-Bertani (o medio de LB o Caldo de Cultivo de Luria) (Bertani, 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. J. Bacteriol. 186, 595-600 **[17]**) que contenía 20 µg/ml de neomicina. El plásmido obtenido a partir de *CC*11*8 (λpir)* de *E. coli* se denominó pBG200 (3,1 kb).

La figura 6 representa esta construcción de forma esquemática.

1.2 Protocolo de obtención de BBG116.

La cepa RFB102 de *B. subtilis* (felpa obtenida a partir de la cepa ATCC 6633 de *B. subtilis* obtenida por inserción del casete *Pspac-comK* en *amyE. Pspac* se refiere al promotor obtenido a partir del plásmido pA-spac (Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH, U.S.A.) inducible por IPTG, *comK* se refiere un gen esencial para la competencia natural en *Bacillus.* Está asociado a un gen de resistencia a la espectinomicina *(Pspac-comK-spc),* que está integrado en el gen cromosómico *amyE.* La cepa RFB102 presenta un aumento de la capacidad para la transformación por competencia natural, que está inducida por IPTG (isopropil-β-D-galactopiranósido). Se transformó por pBG200 previamente tratado con el sistema de amplificación de plásmido dos TempliPhi (GE Healthcare), y a continuación se seleccionó gracias a la resistencia a la neomicina, de acuerdo con el protocolo que se describe en Dubnau, 1982 (Genetic transformation of Bacillus subtilis p148-178. En D. Dubnau (Ed) The molecular biology of the Bacilli, vol I. Bacillus subtilis. Academic Press, Inc. New York **[18]**).

Entre los clones Nm-R, la inserción por doble cruzamiento del casete *ɛpbp*-P_{repU}-*neo*-*ɛfenF* en el cromosoma de RFB102, se verificó por PCR con la ayuda de los cebadores PBP-FO2: AATAACGGACATGCCGAAGTG (SEQ ID NO: 1) y FENF-REV2: AATAGGCCGACCAAGACGTTC (SEQ ID NO: 2).

La producción excesiva de micosubtilina en medio de Landy/MOPS a 22 ºC se verificó de acuerdo con el modo de operación que se describe en el ejemplo 2 que sigue a continuación.

Por lo tanto, se obtuvo la cepa BBG116 de *B. subtilis*.

1.3 Protocolo de construcción del plásmido pBG144

Un plásmido pBG212 de 6,5 kb asignado a la inactivación e inserción («desactivación genética») del operón *srfA* de *B. subtilis* se construyó de la siguiente manera:

Un casete *ɛsrfAA* (2,2 kb) se generó por PCR con la ayuda de los cebadores SRF-FO ACAGGAATATGCTCAATCGAAG (SEQ ID NO: 3) y SRF-REV AAATTCGCTTCCAGGCTTCTG (SEQ ID NO: 4), a partir del ADN genómico de la cepa 168 de la subesp. *subtilis* de *B. subtilis* (Registro NCBI PRJNA76) insertado previamente en el plásmido pGEM-T Easy (Promega Corp., Charbonnières, Francia).

A continuación, este amplicón se subclonó en el sitio *Eco*RI (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER0271) del vector pUC19 (New England Biolabs, Ipswich, MA, U.S.A.).

A continuación, el casete *ɛsrfAA* se interrumpió en el sitio *MfeI* (Fermentas referencia ER0751) por la inserción del gen *tet,* generado previamente por PCR con la ayuda de los cebadores TETP1 GTTGTATCGATGATGAAATACTGAATTTTAAACTTAG (SEQ ID NO: 5) y TETT1 TTTAATGGATCTAGAAGATTTGAATTCCTGTTAT (SEQ ID NO: 6), a partir del plásmido pBC16 (DSMZ G mbH, Braunschweig, Alemania), originaria de *Bacillus cereus* (Registro: NC_001705.1).

El plásmido pBG144 se obtuvo por inserción, en el sitio *BstE*II (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER0391) situado al final del gen *tet,* del gen *cat* generado previamente por PCR con la ayuda de los cebadores pC194cmfwd AGAAAGCAGACAGGTAACCCTCCTAA (SEQ ID NO: 7) y pC194cmrev GCAGGTTAGTGACATTAGGTAACCGA (SEQ ID NO: 8) del plásmido pC194 obtenido a partir de *Staphylococcus aureus* (DSMZ GmbH, Braunschweig, Alemania, Registro: NC_002013.1).

La figura 7 representa esta construcción de forma esquemática.

1.4 Protocolo de obtención de la cepa BBG125 de *B. subtilis*

Nuevas transformaciones de la cepa BBG116 de *B. subtilis* con el plásmido pBG144 linealizado previamente por *Aat*II (Fermentas, Villebon sur Yvette, Francia; referencia ER0991) de acuerdo con el protocolo que se describe en Dubnau, 1982 (Genetic transformation of Bacillus subtilis p148-178. In D.A. Dubnau (Ed) The molecular biology of the Bacilli, vol I. Bacillus subtilis. Academic Press, Inc. New York **[18]**).

Se aislaron seis clones Cm-R Tc-R sobre medio LB de gelosa que contenía los antibióticos apropiados. Se realizaron verificaciones por PCR con la ayuda de los cebadores SRFAA5-FWD; AAGGAATCTCGCAATCATTTATCG (SEQ ID NO: 9) y SRFAA5REV; CTTGGTGTAAGCGGAATTTCTGTC (SEQ ID NO: 10). La no producción de surfactina en medio de Landy/MOPS a 37 ºC se verificó de acuerdo con el modo de operación que se describe en ejemplo 2 que sigue a continuación.

El mutante BBG125 de *B. subtilis* se retuvo como cepa monoproductora de micosubtilina.

Las dos cepas, BBG116 y BBG125, de *B. subtilis* presentan actividades hemolíticas sobre gelosa que contiene un 5 % de sangre así como actividades antifúngicas en levaduras y hongos en medio PDA.

Estas actividades son más notables en el caso de la cepa BBG116 de *B. subtilis*, como consecuencia de la sinergia entre la surfactina producida y una producción excesiva de micosubtilinas. Estas propiedades están en relación estrecha con su capacidad para colonizar la superficie de los medios de gelosa, gracias a la disminución de su tensión superficial.

Las características resumidas de la cepa BBG125 de *B. subtilis* y de sus cepas parentales se presentan en la tabla 1 que sigue a continuación:

Tabla 1 : Características resumidas de BBG125 de *B. subtilis* y de sus cepas parentales

B. subtilis	**Cepa madre**	**Genotipo**	**Fenotipo**
ATCC 6633	-	Silvestre	Com^{-} Myc^{+} Srf^{+}
RFB102	ATCC 6633	*amyE::Pspac-comK-spc*	Com^{++} Amy^{-} Myc^{+} Srf^{+} Spc^{R}
BBG116	RFB102	*amyE::Pspac-comK-spc, myc::*P_{repU}*-neo*	Com^{++} Amy^{-} Myc^{+++} Srf^{+} Spc^{R} Nm^{R}
BBG125	BBG116	*amyE::Pspac-comK-spc, myc::*P_{repU}*-neo, srfAA:: at-tet*	Com^{++} Amy^{-} Myc^{++} Srf^{-} Spc^{R} Nm^{R} Tc^{R} Cm^{R}

[Com : competencia natural para la transformación; Myc: producción de micosubtilina; Srf: producción de surfactina; Amy: actividad amilolítica; Spc^{R}, Nm^{R}, Tc^{R}, Cm^{R} : resistencias a la espectinomicina, la neomicina/kanamicina, la tetraciclina y al cloranfenicol, respectivamente.]

En comparación con la cepa ATCC 6633 de *Bacillus subtilis*, la cepa BBG125 de *Bacillus subtilis* produce una cantidad más importante de micosubtilinas y no produce surfactina.

Ejemplo 2: Preparación de los medios de cultivo

2.1 Medio de Landy

La composición del medio de Landy es la siguiente: glucosa, 20 g/l; ácido glutámico, 5 g/l; extracto de levadura, 1 g/l, K_2HPO_4, 1 g/l; $MgSO_4$, 0,5 g/l; KCl, 0,5 g/l; $CuSO_4$, 1,6 mg/l; $Fe_2(SO_4)_3$, 1,2 mg/l; $MnSO_4$, 0,4 mg/l.

2.2 Soluciones de reserva

Para asegurar una reproducibilidad de la composición del medio, se prepararon soluciones concentradas estériles. Una solución de glucosa 10X (200 g/l) se esterilizó mediante tratamiento en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos. Una solución de ácido glutámico 4X (20 g/l) se ajustó a pH 8 con una solución de KOH 5 M y se esterilizó por filtración sobre filtro con una porosidad de 0,2 µm. Una solución de extracto de levadura 20X (20 g/l) se esterilizó mediante tratamiento en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos. Una solución de minerales n.º 1 40X (K_2HPO_4, 40 g/l; $MgSO_4$, 20 g/l, KCl, 20 g/l) se acidificó con H_2SO_4 concentrado hasta una disolución total de las sales y se esterilizó por filtración sobre filtro de 0,2 µm. Una solución de sales minerales n.º 2 40X ($CuSO_4$, 64 mg/l; $Fe_2(SO_4)_3$, 48 mg/l; $MnSO_4$, 16 mg/l) se acidificó con ácido sulfúrico concentrado hasta una disolución total de las sales y se esterilizó por filtración sobre filtro con una porosidad de 0,2 µm.

2.3 Preparación de un litro de medio de Landy

El material utilizado, a excepción de las pipetas, que se esterilizan y que tienen un uso único, se esterilizó previamente mediante tratamiento en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos. De forma estéril se retiraron 250 ml de la solución de ácido glutámico y a continuación se vertieron en un frasco de Erlenmeyer. De forma estéril se añadieron en el mismo 100 ml de la solución de glucosa, a continuación 50 ml de la solución de extracto de levadura

y Por último 25 ml de cada una de las soluciones de minerales. El pH se ajustó a 7,0 con la ayuda de una solución de KOH 5 M estéril. El volumen se completó a 1 l con agua estéril.

2.4 Preparación de un medio de Landy tamponado a 100 mM de MOPS

Un tampón MOPS 20X (2 M) se preparó disolviendo 20,93 g de ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico (MOPS) (M1254, Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) en 50 ml de agua. La solución se esterilizó sobre filtro con una porosidad de 0,2 µm bajo una campana de flujo laminar. Para preparar 1 l de medio de Landy tamponado a 100 mM con MOPS, se añadieron 50 ml de MOPS 20X a la mezcla preparada en el ejemplo 2.3.

Ejemplo 3: Cultivo de la cepa BBG125 de *B. subtilis* en frascos de Erlenmeyer

3.1 Preparación de un banco de cepas

Un tubo con rosca que contiene 5 ml de medio E modificado (el medio E de Clark se modifica disminuyendo la concentración de glucosa de 40 a 20 g/l. La composición del medio es la siguiente : KH_2PO_4, 2,7 g/l; K_2HPO_4, 18,9 g/l; Extracto de levadura, 0,5 g/l; Glucosa, 20 g/l; EDTA, 0,05 g/l; $MgSO_4$, 0,61 g/l; $MnSO_4$, 0,056 g/l; NaCl, 0,1 g/l; $CaCl_2$, 0,012 g/l; $ZnSO_4$, 0,018 g/l; $FeSO_4$, 0,018 g/l; $CuSO_4$, 0,002 g/l; Na_2MoO_4 0,001 g/l; H_3BO_3, 0,001 g/l; Na_2SO_3, 0,001 g/l; $NiCl_2$, 0,0037 g/l; NH_4NO_3, 4 g/l; $MgSO_4$, 1 g/l. El pH de la solución se ajusta a 6,5 con una solución de HCl a un 10 %) se inóculo con una colonia del banco de cepas primario de BBG125 de *B. subtilis* y se puso a incubar a 30 ºC durante 48 h con una agitación de 300 revoluciones por minuto (rpm). A continuación el tubo se homogeneizó con agitación vorticial. Un volumen de 1,5 ml del cultivo obtenido anteriormente se añadió a 48,5 ml de medio E modificado contenido en un frasco de Erlenmeyer de 500 ml. El conjunto se puso a incubar a 30 ºC de 12 a 24 h con una agitación de 120 rpm. Este primer precultivo P1 se duplicó.

A continuación, el cultivo se homogeneizó con agitación vorticial, la $DO_{600\ nm}$ a continuación se midió con un espectrofotómetro (SECOMAN Prim (SECOMAN, Domont, Francia) hasta que la cepa BBG125 de *B. subtilis* se encontraba al principio/parte media de la fase exponencial de crecimiento.

Un precultivo P2 se inoculó con 1,5 ml del cultivo 1 del mejor frasco de P1 y se duplicó. Los frascos de Erlenmeyer de 500 ml contenían, como volumen final, 50 ml de medio E modificado y se incubaron a 30 ºC con una agitación de 120 rpm. El crecimiento se detuvo cuando la $DO_{600\ nm}$ indicaba que el cultivo estaba al comienzo/parte media de la fase exponencial de crecimiento ($1 < DO_{600\ nm} < 5$). La pureza y la calidad de P2 se controlaron, mediante una observación al microscopio y mediante siembra de una gelosa nutritiva de Luria-Bertani (Triptona, 10 g/l; Extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 10 g/l; pH 7,2. y de una gelosa de Mossel (Extracto de carne, 1 g/l; Peptona, 10 g/l; D-manitol, 10 g/l; NaCl, 10 g/l; Rojo de fenol, 0,025 g/l; Agar, 12 g/l; Yema de huevo, 10 ml/l; Polimixina, 5 ml/l; pH 7,1)), más específico de los bacilos, complementado con espectinomicina a 100 µg/ml. Las placas se pusieron a incubar a 30 ºC durante 24 h.

Se debe indicar que *B. subtilis* produce colonias de formas irregulares (los contornos son ondulados y pueden de sentar filamentos), de consistencia extremosa y cuyo diámetro está comprendido entre 2 y 4 mm. En los cultivos viejos, las colonias adquieren un aspecto seco, rugoso y se incrustan en la gelosa.

Para finalizar, un frasco de 2 l que contiene 200 ml de medio E modificado definido anteriormente se inoculó a un 5 % con el mejor frasco de P2. Este frasco se incubó a 30 ºC con una agitación de 120 rpm y el crecimiento se detuvo cuando la $DO_{600\ nm}$ indicaba que el cultivo estaba al comienzo/parte media de la fase exponencial de crecimiento ($1 < DO_{600\ nm} < 5$). La calidad y la pureza del cultivo se controlaron como se ha indicado para P2. El cultivo se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 25 ºC. Los residuos se lavaron con agua fisiológica estéril y a continuación las suspensiones se centrifugaron a 2000 g durante 10 min a 25 ºC. Los residuos se volvieron a llevar a un volumen de medio E sin antibiótico, con el fin de obtener una $DO_{600\ nm}$ final de 25 por tubo. La suspensión se repartió en criotubos a razón de 0,9 ml de cultivo y 0,6 ml de glicerol. Los tubos se homogeneizaron con agitación vorticial y se conservaron a -80 ºC. El medio E se complementó con espectinomicina a 100 µg/ml.

3.2 Preparación de un inóculo

El inóculo se preparó a partir de un banco de cepas que contenía células conservadas a -80 ºC en un 40 % de glicerol. Un tubo que contenía 5 ml de medio E modificado que se define a continuación se ajustó a pH 7,0 con una solución de HCl al 10 % (v/v) se inoculó con 0,5 ml de suspensión bacteriana del banco de cepas. El conjunto se puso a incubar a 30 ºC de 10 a 14 h con una agitación de 300 rpm. A continuación, el tubo se homogeneizó con agitación vorticial y la $DO_{600\ nm}$ se midió. A continuación se prepara un precultivo P1 en un volumen final de 50 ml de medio E modificado a pH 7,0 contenido en un frasco de Erlenmeyer de 500 ml. El conjunto se puso a incubar a 30 ºC con una agitación de 140 rpm, el precultivo se detuvo cuando la cepa se sitúa al comienzo/parte media de la fase exponencial de crecimiento ($1 < DO_{600\ nm} < 5$). Este primer precultivo P1 se duplicó.

Un segundo precultivo P2 se preparó de la misma manera que el precultivo P1, éste se inóculo a partir del mejor frasco de P1 y se duplicó. El volumen necesario para poner en marcha los cultivos en frascos se centrifugó a

continuación a 2000 g durante 10 min a 25 ºC. El residuo se volvió a poner en suspensión en 10 ml de agua fisiológica estéril. La suspensión obtenida se centrifugó de nuevo a 2000 g durante 10 min. Por último, el residuo se volvió a usar en 10 ml de agua fisiológica estéril. La suspensión estaba entonces lista para inoculación.

3.3 Cultivos en frascos de Erlenmeyer

Los experimentos duraron un máximo de 72 h y se realizaron varias tomas de muestras sobre estos cultivos. La $DO_{600\ nm}$ inicial está comprendida entre 0,1 y 0,4. El volumen de los frascos de Erlenmeyer era de 500 ml y el volumen del medio nutritivo de 100 ml. Sobre las muestras de ensayo tomadas previamente de forma estéril bajo la campana de flujo laminar se realizaron las siguientes medidas: un control de la pureza por aislamiento sobre gelosa nutritiva y gelosa Mossel + espectinomicina (100 µg/ml), una medición de la densidad óptica a 600 nm, una medición del pH, una medición del peso seco y una retirada del sobrenadante de cultivo para la dosificación de los lipopéptidos por CLHP: se centrifugan 3 ml de de cultivo 10 min a 10000 g a 4 ºC y el sobrenadante de cultivo se conservó a -20 ºC.

Ejemplo 4: Purificación y análisis de los lipopéptidos

4.1 Purificación de los lipopéptidos

La extracción de los lipopéptidos se realizó sobre cartuchos de 1 g de gel C18 Maxi-clean (Grace Davison-Alltech, Deerfield, IL, U.S.A.). Un cartucho de 1 g de ODS se acondicionó con metanol al 100 %, con 20 ml en el primer paso y a continuación con 8 ml. El cartucho se aclaró a continuación con 8 ml de agua milli-Q (Millipore). A continuación se cargó en la columna 1 ml de sobrenadante de cultivo cuyo pH es igual a pH 6,5 +/-0,1. El cartucho se lavó a continuación con 8 ml de agua milli-Q. Después de secar el cartucho con 20 ml de aire, los lipopéptidos se eluyeron con 4 ml de metanol al 100 %. El eluato se llevó al estado seco con la ayuda de un concentradora vacío. La muestra de ensayo se volvió a tomar a continuación en 200 µl de metanol al 100 % a 4 ºC para permitir la dosificación en CLHP.

4.2. Análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP)

La muestra de ensayo se analizó gracias a un sistema completo de CLHP de la marca Waters (Desgasificador En Línea, Automuestreador 717, Controlador 660S, Bomba 626, Matriz de FotoDiodo 2996) (Waters SAS, Guyancourt, Francia) usando una columna C18 (5 µm, 250 x 2,5 mm, VYDAC 218 TP). Se realizaron dos dosificaciones.

La primera dosificación fue la de las micosubtilinas: se inyectaron 10 µl de muestra de ensayo purificada y se compararon con un patrón de iturina A a 500 mg/l (11774, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.) con un caudal de 0,6 ml/min. La elución se realizó en modo isocrático con la ayuda de un disolvente de agua / acetonitrilo / ácido trifluoroacético a 60/40/0,1 (v/v/v).

La segunda dosificación fue la de las surfactinas. Se inyectaron 10 µl de muestra de ensayo purificada y se compararon con un patrón de surfactina a 500 mg/l (S3523, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.) con un caudal de 0,6 ml/min. La elución se realizó en modo isocrático con la ayuda de un disolvente de agua / acetonitrilo / ácido trifluoroacético a 20/80/0,1 (v/v/v).

El tiempo de retención y la segunda derivada del espectro entre 200 y 400 nm de cada pico (regleta de diodos, PDA 2996, Waters) se analizaron de forma automática con la ayuda del software Millenium para la identificación de las moléculas eluidas.

4.3 Análisis por CLHP semi-preparativa

La muestra de ensayo se preparó aplicando el protocolo de purificación que se ha descrito anteriormente en el ejemplo 4.1 usando cartuchos de gel C18 Maxi-clean (Grace Davison-Alltech, Deerfield, IL, U.S.A.) de 10 g. La utilización de cartuchos de 10 g permitió cargar 10 ml de sobrenadante de cultivo en lugar de 1 ml mencionado anteriormente. Todos los volúmenes se multiplicaron por un factor de 10, excepto los volúmenes de metanol. El volumen mínimo de metanol utilizado para el acondicionamiento del cartucho más la elución de los lipopéptidos fue de 10 ml. La muestra de ensayo se cargó de forma manual (100 µl) en el sistema de inyección de la CLHP semi-preparativa de marca Waters (Controlador 660, Bomba 626, Detector de Absorbancia 486). La columna empleada era una C18 (5 µm, 300 x 10 mm, ACE). La elución se realizó con un caudal de 3 mL/min de acuerdo con el gradiente que se presentan en la tabla 2 que sigue a continuación:

Tabla 2 : Elución en función de las concentraciones respectivas de los tampones A y B

Tiempo (min)	Tampón A (%)	Tampón B (%)
0	65	35

Tiempo (min)	Tampón A (%)	Tampón B (%)
4	65	35
54	50	50
60	0	100
61	65	35
65	65	35

Los disolventes utilizados fueron los siguientes: el disolvente A formado por agua y ácido trifluoroacético, 99,9/ 0,1 (v/v) y el disolvente B formado por acetonitrilo y ácido trifluoroacético, 99,9/ 0,1 (v/v).

4.4 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Los análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Ultraflex) se realizaron en función de las necesidades a partir: ya sea de sobrenadantes de cultivo, ya sea de muestras de ensayo purificadas sobre cartucho ODS (Grace Davison-Alltech, Deerfield, IL, U.S.A.) o ya sea a partir de muestras de ensayo purifadas sobre cartucho ODS y a continuación por CLHP semi-preparativa. Un tampón TA se preparó realizando una mezcla de CH_3CN / agua / ácido trifluoroacético, 33/67/0,1 (v/v/v). Un tampón CHCA es una solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en tampón TA. Este tampón se preparó recuperando sobrenadante después de centrifugación de la mezcla de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico / tampón TA. Las muestras de ensayo a analizar se prepararon mezclando 1 µl de la muestra de ensayo con 9 µl de tampón CHCA. La solución de muestra de ensayo depositada para el análisis MALDI-TOF representaba un volumen de 0,5 µl. El secado se realizó al aire libre. La calibración de las masas se realizó con una mezcla de patrones de péptidos.

Las masas calculadas de los iones $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ de los diferentes homólogos de micosubtilinas y de surfactinas obtenidas se especifican en la tabla 3 que sigue a continuación:

Tabla 3: Masas calculadas de los iones $[M+H]^+$, $[M+Na^+]$, $[M+K^+]$ de los diferentes homólogos de micosubtilinas y de surfactinas

Lipopéptidos	Masas		
	$[M+H]^+$	**$[M+Na]^+$**	**$[M+K]^+$**
Surfactina C_{13}	1008,66	1030,64	1046,61
Surfactina C_{14}	1022,67	1044,66	1060,63
Surfactina C_{15}	1036,69	1058,67	1074,65
Micosubtilina C_{15}	1057,57	1079,55	1095,52
Micosubtilina C_{16}	1071,58	1093,56	1109,54
Micosubtilina C_{17}	1085,60	1107,58	1123,55

El análisis de HPLC desveló diez picos en los que las masas moleculares de las moléculas detectadas se presentan en la tabla 4 que sigue a continuación:

Tabla 4: Masas de los 10 picos detectados por el análisis de HPLC

Pico n.º	Masa		Pico n.º	Masa
1	1056		**6**	1098
2	1084		**7**	1098
3	1084		**8**	1084
4	1070		**9**	1084
5	1070		**10**	1098

4.5 Análisis de la estructura de las nuevas micosubtilinas por MS-MS

Con el fin de determinar de forma precisa la estructura de las diferentes formas de las micosubtilinas producidas por la cepa BBG125, un análisis de las muestras de ensayo purificadas se realizó por espectrometría de masas en tándem (MS-MS) con una ionización de tipo electronebulización (Ion Trap Finnigan MAT LCQ) en modo infusión directa después de apertura del ciclo peptídico por medio de un tratamiento con N-bromosuccinimida con una concentración equivalente a la micosubtilina en una solución de ácido acético al 70 %.

Un primer análisis se realizó en la micosubtilina *anteiso* C17 purificada (pico 8). El espectro obtenido (MS1) se complica por los dos 2 isótopos del Br. El espectro MS2 se complica por la presencia de fragmentos con 1, 2 o 3 grupos $-NH_3$ menos, debidos a la presencia de los aminoácidos Asn y Gln. El espectro de MS del producto de partida proporciona los picos 1085 $(M+H)^+$, 1107 $(M+Na)^+$ y 1123 $(M+K)^+$ que se corresponden bien con la micosubtilina C17.

Al ver la presencia de los isótopos 79Br y de 81 Br en cantidades bastante parecidas, se observa una distribución de picos alrededor de 1260 que se corresponderían con el derivado esperado. Por ejemplo, el pico en 1257,4 corresponde a $[M+H]^+$ con dos 79Br, el pico en 1259,4 corresponde a $[M+H]^+$ con 79Br y 81 Br o a $[M+H]^+$ con dos 13C y dos 79Br, etc...

El orden de las masas crecientes obtenidas a partir de la fragmentación del ion en 1257,4 se repite en la tabla 5 que sigue a continuación:

Tabla 5 : Masas crecientes obtenidas a partir de la fragmentación del ion en 1257,4

m/z	Fragmento de ion		m/z	Fragmento de ion
365	vN-NH3		**717,1**	y3
382,4	vN		**814,0**	y4-NH3
391,6	b4-H2O-NH3		**831,1**	y4
432	y2-NH3		**918**	y5
434,4	SNv-H2O-NH3		**664**	y6-3NH3
452,3	SNv-NH3		**981,1**	y6-2NH3
462,3	NvN-2NH3		**998,1**	y6-NH3
496,4	NvN		**1015,1**	y6
506,2	b5-2NH3		**1091,9**	y7-3NH3
531,3	SNvN-H2O-2NH3 o PSNv-H2O-NH3		**1109,1**	y7-2NH3
549,4	SNvN-2NH3 o PSNv-NH3		**1126,0**	y7-NH3
566,3	PSNv o SNvN-NH3		**1143**	y7
583,4	SNvN		**1240,0**	M-H2O
700	y3-NH3		-	-

En la tabla mencionada anteriormente, « *m*/*z* » significa proporción de masa con respecto a carga.

4.6 Análisis de MS-MS del pico en 1274,4 contenido en el pico 6

Masa isotópica antes del tratamiento : M = 1098,6
Masa isotópica después del tratamiento, con 79Br2 : M = 1270,4

Fragmentos y, idénticos a la micosubtilina *anteiso* C_{17}.

Fragmentos b, superiores de 14 con respecto a los fragmentos b de la micosubtilina *anteiso* C_{17}.

Esto significa que muy probablemente se modificó uno de los 2 primeros aminoácidos de la secuencia abierta (N o Q de NQPSNvNw).

4.7 Análisis de MS/MS del pico en 1274,4 contenido en el pico 10

Masa isotópica antes del tratamiento : M = 1098,6
Masa isotópica después del tratamiento, con 79Br2 : M = 1270,4

Fragmentos y, idénticos a la micosubtilina *anteiso* C_{17} pero con 14 de más, en los que el pico y6 intenso en 1029 en lugar de 1015 para las otras muestras de ensayo.

Fragmentos b, inferiores a b6 idénticos a la micosubtilina *anteiso* C17.

Fragmentos b, superiores o iguales a b6 idénticos a la micosubtilina pero con 14 de más.

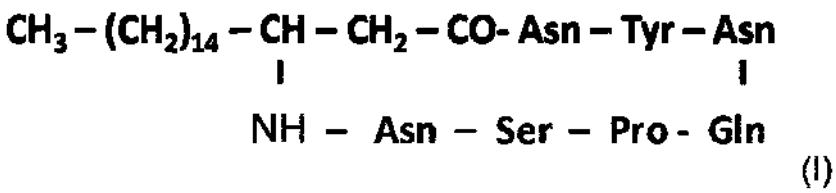
Estos resultados muestran a los inventores que la molécula podría ser la micosubtilina con un ácido graso en C_{18} y no en C_{17}.

Sobre la base del orden de elución de los diferentes picos, los inventores dedujeron la existencia de 5 nuevas formas de micosubtilina: las formas de Gln3: *iso* C_{16}, nC16, *anteiso* C_{17}, *iso* C_{17} y una forma en C_{18}. La correspondencia de estas formas con los diez picos en las que las masas moleculares de las moléculas detectadas por análisis de HPLC del ejemplo 4.5 se presentan en la tabla 6 que sigue a continuación:

Tabla 6: Correspondencia entre las masas de los 10 picos detectados por análisis HPLC y las formas de micosubtilina

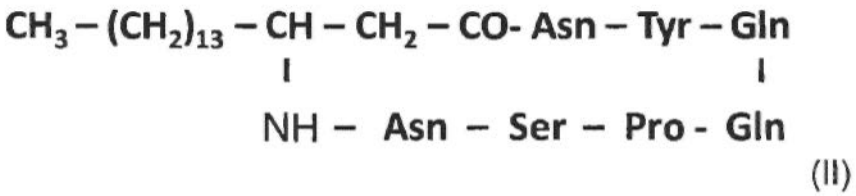
Pico n.º	Masa	Forma		Pico n.º	Masa	Forma
1	1056	C_{15}		**6**	1098	*anteiso*IC_{17},
						GLN
2	1084	*iso*C_{16} GLN		**7**	1098	*i so*C_{17} GLN
3	1084	$_nC_{16}$ GLN		**8**	1084	*anteiso*C_{17}
4	1070	*iso*C_{16}		**9**	1084	*iso*C_{17}
5	1070	*n*C_{16}		**10**	1098	C_{18}

La fórmula de esta nueva micosubtilina C_{18} es la siguiente:



(I)

La fórmula de esta nueva micosubtilina Gln3 C_{17} es la siguiente:



(II)

Ejemplo 5: Actividad biológica de diferentes isoformas de micosubtilina (MS) con respecto a diversos microorganismos

Se realizaron ensayos de actividades antifúngicas mediante dilución en sucesivas de la isoforma C_{18} (MS C_{18}) en medio líquido de acuerdo con el protocolo que se describe en Besson et ál., (Besson et ál., 1979. Antifungal activity upon Saccharomyces cerevisiae of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. J. Antibiot. (Tokyo) 32, 828-833 **[19]**). Los cultivos en microplacas de 96

pocillos se realizaron en un medio rico en: glucosa, 40 g/l; Peptona, 10 g/l; Extracto de levadura, 2 g/l; pH = 7,2. Una siembra de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó a una $DO_{600\ nm}$ de 0,55 y la lectura de absorbancia se realiza después de 24 h y a continuación se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Este experimento también se realizó con las siguientes isoformas de micosubtilina (MS): MS *iso*-C_{16}, MS *n*-C_{16}, MS *anteiso*-C_{17}, MS *iso*-C_{17}. También se realizó con una composición de micosubtilinas (MS comp.) que comprende, en porcentaje con respecto al peso de la composición, 26 % de MS *iso*-C_{16}, 1 % de MS Gln3 C_{17}, 2 % de MS *n*-C_{16}, 44 % de MS *anteiso*-C_{17}, 23 % de MS *iso*-C_{17} y 1 % de MS C_{18}.

Este experimento también se realizó para cada una de las isoformas de micosubtilinas y composición mencionadas anteriormente en los siguientes microorganismos: *Botrytis cinerea, Aspergillus niger, Sclerotinia sclerotium, Candida albicans.*

Las CMI obtenidas para cada uno de estos experimentos se presentan en la tabla 7 que sigue a continuación:

Tabla 7: CMI de diferentes isoformas de micosubtilina y de una composición con respecto a diversos microorganismos

Microorganismos	**CMI (µM)**				
	MS *iso*-C_{16}	MS *n*-C_{16}	MS *anteiso*-C_{17}	MS *iso*-C_{17}	MS comp.
B. cinerea	32	16	8	16	8
A. niger	32	16	8	16	8
C. albicans	> 32	8	32	16	8

Estos resultados muestran que la composición **MS comp.** presenta efectos equivalentes, incluso superiores, A las micosubtilinas que se utilizan en la actualidad.

Ejemplo 6: Realización de un método integrado de producción, extracción y concentración de los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* en elemento de contacto de membrana de aire/líquido

La descripción de este ejemplo se refiere a las figuras 1 a 5.

En este ejemplo:

- las bombas **P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13** y **P14** eran bombas peristálticas del modelo de conducción compacta Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, U.S.A.),
- la bomba **P11** era del tipo N820.3 FT.18 (KNF Neuberger Laboport, Freiburg, Alemania),
- las válvulas **V1, V4** y **V5,** eran válvulas de parada de PTFE, (W3250Y, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania),
- Las válvulas **V2, V3, V6** y **V7** eran válvulas de parada de tres vías de PTFE (W3250Z, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania),
- los tanques, **Tanque 2** y **Tanque 4,** eran tanques Nalgene de polipropileno de alta densidad con un volumen útil de 4 l (2125-4000 Heavy Duty Bottles, Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania), los tanques, **Tanque 1, Tanque 3, Tanque 5, Tanque 6** y **Tanque 7,** eran tanques Nalgene de polipropileno de alta densidad con un volumen útil de 10 o 20 l (2250 Autoclavable Carboys, Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania),
- las balanzas **B1, B2, B3, B4, B5, B6,** y **B7** eran del tipo (CKW-55; Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, U.S.A.),
- la cepa de *Bacillus subtilis* era la cepa BBG125 de *B. subtilis*.

6.1 Condiciones ambientales y sondas utilizadas para el cultivo

Salvo indicación al contrario, el pH se reguló a un valor de 7+/-0,1 gracias a la adición controlada respectivamente con las bombas **P2** y **P3** de soluciones de H_3PO_4 0,66 M o de NaOH 3 M esterilizadas previamente mediante tratamiento en autoclave a 121 ºC durante 20 min.

Un electrodo de pH se calibró antes del tratamiento en autoclave del tanque utilizando soluciones comerciales tamponadas a pH 4,0 y pH 7,0 y conservadas a 4 ºC. El proceso se realizó 22 +/-0,1 ºC por medio de un intercambiador térmico tubular de 1 m^2 Alpha Laval (104878, Alpha Laval Corporate AB, Lund, Suecia). La concentración de oxígeno disuelto pO_2 se midió gracias a una sonda de oxígeno (Mettler Toledo, Viroflay, Francia). El electrolito de la sonda de oxígeno se renovaba en cada experimento. La sonda de oxígeno se calibró después del tratamiento en autoclave del tanque cuando el medio de cultivo alcanzaba la temperatura y el pH de registro del experimento. El 0 % de pO_2 se obtuvo relacionando el cable de la sonda con la masa y el 100 % de pO_2 saturando

el medio con aire (1000 rpm y 1 vvm).

El caudal de ventilación (Fe) se fijó a cero, en cinco volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto (vvm), es decir 0,75 l/min para 3 l de medio de Landy (ejemplo 2.1). El aire que entra se filtró a través de un filtro esterilizante de 0,2 µm.

El software utilizado para el control del método y la adquisición de los datos era AFS Biocommand (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, U.S.A.). La pureza del cultivo se verificó después de 48 h y al final del cultivo. Las muestras de ensayo de cultivo de 10 ml se tomaron de forma regular y se centrifugaron, la densidad óptica y el peso seco se determinaron, le el sobrenadante se conservó antes del análisis. Los gases que entran y salen se analizaron con el fin de obtener datos con respecto a la respiración del microorganismo. Un sensor paramagnético permitió analizar la cantidad de oxígeno y un sensor de infrarrojos la del dióxido de carbono (Xentra 4400; Servomex Compagny Inc., Sugar Land, TX, U.S.A.). El analizador se integró en un dispositivo multiplexado que permitió un análisis secuencial sobre seis vías, un secado de gases sobre membrana de Naflon (Permapur, Saint-Léonard, Québec) y una calibración automática.

6.2 El elemento de contacto de membrana de aire/líquido

El elemento de contacto de membrana de aire/líquido **M1** utilizado en este ejemplo lo proporciona GE-Healthcare con la referencia CFP-6-D-45 (GE-Healthcare Europe GmbH, Munich, Alemania). Está formado por un módulo externo que comprende dos compartimentos **C1** y **C2.** En el compartimento **C1,** circula un gas estéril que contiene oxígeno. En el compartimento **C2,** circula el medio de cultivo que contiene el inóculo a un caudal de 24 l/h/m^2 de membrana impuesto por la bomba **P4.**

La membrana **M1** tiene una superficie de 2,5 m^2 y ser esterilizantes de la utilización mediante tratamiento en autoclave a 121 ºC durante 20 min (este criterio no es exhaustivo). La membrana está formada por un conjunto de fibras huecas de polietersulfona que tienen una porosidad de 0,65 µm.

6.3 Dispositivo que permite un cultivo en modo continuo de *Bacillus subtilis* : Acoplamiento de un sistema de extracción/concentración de los biotensioactivos al elemento de contacto de membrana de aire/líquido

6.3.1. Acoplamiento de un sistema de extracción/concentración de los lipopéptidos al elemento de contacto de membrana de aire/líquido

El dispositivo usado para el cultivo en modo continuo de *B. subtilis* comprende un elemento de contacto de membrana de aire/líquido **M1** de fibras huecas en el que la cepa BBG125 de *B. subtilis* se cultivo en medio de Landy. La cepa BBG125 de *B. subtilis* inmovilizada en la superficie de la membrana M1 degrada este sustrato secretando biotensioactivos. El dispositivo también comprende medios para alimentar y extraer en modo continuo en el dispositivo de producción que comprende la membrana **M1** un caudal determinado de dicho sustrato.

La membrana **M1** proporciona, en un entorno estéril, el oxígeno necesario para el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo, gracias a la difusión del oxígeno a través de sus poros.

Una bomba peristáltica **P1** permite alimentar en modo continuo la membrana **M1,** con un caudal **F1,** en medio de Landy recién preparado almacenado en un **Tanque 1,** además una bomba peristáltica **P5** permite extraer en modo continuo el medio de cultivo del dispositivo de producción que comprende la membrana **M1** descrita anteriormente con un caudal **F2.**

El inóculo y las condiciones de fermentación permanecen equivalentes a las descritas anteriormente. Con el fin de mantener el entorno estéril. Conjunto de los componentes del dispositivo así como las diferentes membranas utilizadas se esterilizan a 121 ºC durante 20 min.

Una característica de este dispositivo reside en el hecho de que se puede reciclar o no en el dispositivo de producción que comprende la membrana **M1** la totalidad de las células de microorganismo después de haberlas separado de los residuos de materias orgánicas y de los biotensioactivos, lo que permite obtener una tasa elevada de crecimiento de microorganismos en el dispositivo de producción.

Además, este dispositivo permite la difusión del oxígeno en el medio de cultivo sin formación de burbujas o espuma.

6.3.2. Extracción de los lipopéptidos y reciclaje de las células por microfiltración

Por lo tanto, el dispositivo descrito anteriormente se caracteriza por el hecho de que comprenden medios de microfiltración y de ultrafiltración tangencial, situados en la salida del dispositivo de producción que separa el líquido en varias fracciones.

Una primera etapa de microfiltración se realiza sobre una membrana **M2** de fibras huecas de polietersulfona de tamaño de poro de 0,2 µm (GE Healthcare) de una superficie de 0,4 m^2, en la que el medio de cultivo que contienen las células circula, gracias a la bomba volumétrica **P4** descrita anteriormente, en el compartimento **C3** de la membrana **M2** denominado retenido. Bajo el efecto de una bomba volumétrica **P5** el medio pasa por filtración tangencial a través de los poros de la membrana **M2** hacia el compartimento **C4** de la membrana **M2.** Mediante este sesgo, el medio de cultivo que contiene los biotensioactivos se separa de las células y se extrae y a continuación se recoge en un **Tanque 2** agitado con palas movidas por un motor **B** o por agitación magnética (Agitador magnético, W10512, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania) a una velocidad de 160 rpm.

El medio de cultivo del dispositivo de producción que comprende la membrana **M1** se extrae en modo continuo hacia el **Tanque 2.** Para compensar esta extracción y guardar un volumen constante en la membrana **M1,** la bomba **P1** alimenta el biorreactor en medio nuevo contenido en el **Tanque 1.**

Además, el **Tanque 2** y el **Tanque 3** se colocan respectivamente sobre las balanzas **B2** y **B3.** Estas últimas son las que controlan el caudal de la bomba peristáltica **P1** (CKW-55; Ohaus Corporation, Pine Brook, U.S.A.), permitiendo mantener un volumen constante en el interior de la membrana **M1** y de este modo obtener F1 = F2. . En cada uno de los experimentos realizados, la tasa de dilución cambia después del paso de al menos cuatro volúmenes de elemento de contacto de membrana de aire/líquido que comprende la membrana **M1.**

Los caudales de las bombas **P1** y **P5** son iguales y se regulan para obtener en el dispositivo que comprende la membrana **M1** una tasa de dilución de 0,1 h^{-1}, es decir, un caudal horario igual a 0,1 veces el volumen de la fase acuosa contenida en el dispositivo de producción que comprende la membrana **M1.**

También se realizó una variante de este método. Reside en el hecho de reciclar o no las células en el interior de la membrana **M1.** Por lo tanto se trata de un modo continuo abierto presentado en lía discontinua en las figuras 3 y 4. En el caso de un no reciclaje por el juego de las bombas **V6, V7** y **V8** el medio de cultivo se puede bombear con la bomba **P13** desde la membrana **M1** y se puede recoger en el **Tanque 7.** Una válvula de purga permite eliminar el concentrado celular por intermitencia. En este caso, la etapa de microfiltración con la membrana **M2** se realiza directamente sobre el medio contenido en el **Tanque 7** y las células se concentran a continuación el **Tanque 7** y ya no más en el dispositivo de producción que comprende la membrana **M1.**

6.3.3. Concentración de los lipopéptidos mediante ultrafiltración

Por último, el filtrado contenido en el **Tanque 2** producido, gracias a una bomba **P6,** en el compartimento **C5** de un sistema de ultrafiltración tangencial de acero inoxidable (Sartocon 2 plus, 17546---202, Sartorius, Göttingen, Alemania), que comprende una membrana de ultrafiltración **M3** de umbral de corte de 10 kDa de celulosa regenerada (Ultrafiltro Hydrosart, 3021443930E-BSW, Sartorius, Göttingen, Alemania). Por encima de la concentración micelar crítica, los biotensioactivos se concentran en el compartimento **C5,** denominado retenido y vuelven de ese modo al **Tanque 2.** El medio de cultivo se extrae, con el control de una bomba **P7** a un caudal equivalente al de la bomba **P5,** hacia un compartimento **C6,** denominado ultrafiltrado, y se recoge en un **Tanque 3.** El caudal será función del caudal impuesto por la bomba **P7** y se regula gracias a las informaciones recogidas por las diferentes balanzas **B2, B3** y **B4.**

6.4 Purificación de los lipopéptidos

6.4.1. Purificación mediante ultrafiltración/diafiltración

La purificación de los lipopéptidos presentada en este ejemplo ser reformulada sobre el encadenamiento de las etapas de a través de un sistema de ultrafiltración tangencial de acero inoxidable (Sartocon 2 plus, 17546---202, Sartorius, Göttingen, Alemania), que comprende una membrana de ultrafiltración **M4** de umbral de corte de 10 kDa de celulosa regenerada (Ultrafiltro Hydrosart, 3021443930E-BSW, Sartorius, Göttingen, Alemania). Esta etapa tiene como objeto eliminar del caldo de cultivo una gran parte de las sustancias residuales tales como glucosa, glutamato y los diferentes metabolitos primarios. La formación de micelas y de complejos micelares con la micosubtilina, cuando se encuentra por encima de su CMC, permite retenerla y por lo tanto concentrar en el retenido, gracias a la utilización de la membrana de ultrafiltración **M4.**

Esta etapa se desarrolla a 25 ºC y con una presión de 500 kPa. Esta etapa de purificación se realiza sobre los lipopéptidos concentrados en el **Tanque 2.** Después de la apertura de la válvula **V1,** la bomba **P8** arrastra el concentrado hacia el **Tanque 4** (Nalgene de polipropileno de alta densidad con un volumen útil de 4 l (2125-4000 Heavy Duty Bottles, Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania)) agitado con palas movidas por un motor **C** o mediante agitación magnética (Agitador magnético, W10512, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania) idéntico al motor **B**.

Las etapas que siguen se realizan de forma secuencial:

- Una ultrafiltración : el concentrado se transfiere al **Tanque 4,** bajo el control de una bomba **P8** peristáltica del modelo de conducción compacta Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA), a continuación se purifica sobre la membrana **M4,** bajo el control de una bomba **P9** peristáltica del modelo de conducción compacta Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) y se recoge en el **Tanque 4.** La bomba **P10** peristáltica del modelo de conducción compacta Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) permite hacer pasar el resto de los componentes del medio hacia el compartimento **C8** y el **Tanque 5** (Nalgene de polipropileno de alta densidad con un volumen útil de 10 o 20 l (2250 Autoclavable Carboys, Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania)). Este proceso se realiza bien hasta que el volumen contenido en el **Tanque 4** se reduzca a un 10 % del volumen inicialmente en el **Tanque 4.**
- Una diafiltración : esta etapa, permite diluir el caldo de cultivo con el fin de facilitar el paso de las sustancias residuales a través de la membrana de ultrafiltración **M4.** A continuación se añade agua en el **Tanque 4** gracias a la apertura de la válvula **V2** hasta que el volumen del **Tanque 4** encuentra su nivel de origen. A continuación sigue una etapa de ultrafiltración como se ha descrito anteriormente. Esta etapa de diafiltración se realiza 4 veces inmediatamente.
- Una ultrafiltración en presencia de metanol (MeOH) : A continuación de las etapas de diafiltración del MeOH se añade desde el tanque **Tanque 6** (Nalgene de polipropileno de alta densidad con un volumen útil de 10 o 20 l (2250 Autoclavable Carboys, Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Alemania) hacia el **Tanque 4** a través de la bomba **P12** peristáltica del modelo de conducción compacta Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) y la válvula **V2.** Esta adición de MeOH se controla con las balanzas **B4, B5** y **B6** para que la solución presente en ese momento en el **Tanque 4** contenga un 70 % de MeOH (v/v). A continuación sigue una etapa de ultrafiltración como se ha descrito anteriormente. Esta etapa va a permitir la destrucción de las micelas y el paso de los monómeros de micosubtilina a través de los poros de la membrana **M4.**

Después de la filtración, una solución formada por micosubtilina y metanol al 70 % se recoge por la parte del ultrafiltrado, pero en esta ocasión el ultrafiltrado se recoge en el tanque de un evaporador **(Evapo)** Rotavapor VV2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Alemania) gracias al juego de las válvulas **V3** y **V4.**

Al final de cada etapa, las muestras de ensayo se extraen de la parte del filtrado y de la parte del retenido. De ese modo se puede establecer el equilibrio de la purificación. Esto permite determinar las pérdidas de micosubtilina provocadas por las etapas de ultrafiltración y de diafiltración, al hacer la proporción de la cantidad de micosubtilina concentrada obtenida después de ultrafiltración y de la cantidad de micosubtilina inicialmente presente en el **Tanque 4.** El rendimiento de estas etapas es superior a un 70 %.

6.4.2. Concentración de los lipopéptidos por evaporación

El evaporador **(Evapo)** permite concentrar las micosubtilinas retirando todo el metanol y una parte del agua. Esta evaporación se realiza bajo una presión residual de 5 kPa impuesta por la bomba de vacío **P11,** de tipo N820.3 FT.18 (KNF Neuberger Laboport, Freiburg, Alemania) y a 50 ºC. Durante esta etapa, el metanol se evapora y sus vapores se condensan gracias al condensador y esto se recicla en el **Tanque 6.**

6.4.3. Liofilización de los lipopéptidos

Para mejorar la conservación del producto se añadió a este método una etapa opcional de liofilización. La liofilización de los lipopéptidos se realiza directamente a partir de la solución concentrada **X** obtenida a partir de la evaporación y recuperada por la válvula **V5.** En primer lugar esto se congela a -20 ºC, a continuación se liofiliza gracias a un liofilizador Heto Power Dry PL 9000 (Jouan Nordic, Allerod, Dinamarca), de acuerdo con las siguientes etapas: 1 h a -30 ºC; 5 h a -10 ºC; 5 h a 0 ºC; 5 h a -20 ºC; 5 h a 35 ºC. La liofilización se realizó bajo una presión residual de 2 kPa.

Ejemplo 7 : Lavado de las membranas y recuperación de los lipopéptidos

Teniendo en cuenta la afinidad de los lipopéptidos para las superficies de contacto, el protocolo de lavado de las membranas se estudió y se optimizó. Éste tiene en cuenta la naturaleza de las membranas y está de acuerdo con los recientes trabajos publicados sobre este tema (Chen, Chen y Juang, 2007. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. J. Membr. Sci. 299, 114-121 **[20];** Chen, Chen, y Juang, 2008. Flux decline and membrane cleaning in cross-flow ultrafiltration of treated fermentation broths for surfactin recovery. Sep. Purif. Technol. 62, 47-55 **[21]**). Estos lavados no desnaturalizan ni los lipopéptidos ni las membranas. La utilización de disolventes está excluida aunque algunos, como el metanol, sean muy eficaces para obtener los lipopéptidos. Los ensayos de sensibilidad al pH permitieron determinar que un pH = 10 es el límite de capacidad de degradación de los lipopéptidos. Los lavados se realizan en las condiciones de agitación de la fermentación. El protocolo se desarrolla en siete etapas de lavado a base de agua.

- Se realizaron dos lavados con 3 l de agua destilada a 30 ºC durante 30 min. Éstos permitieron obtener la biomasa débilmente inmovilizada.
- El segundo lavado con agua destilada a 30 ºC permitió realizar una medición del coeficiente de transferencia de oxígeno.

- Se realizaron dos lavados con 3 l de NaOH 0,1 M a 50 ºC durante 1 h. Estos permitieron obtener la biomasa fuertemente inmovilizada y desorber la mayor parte de los lipopéptidos.
- La membrana se regeneró a continuación con una solución de NaOH 0,5 M a 50 ºC durante 1 h y a continuación con una solución de NaOCl de 100 ppm a 50 ºC durante 1 h, de continuación se lavó con agua destilada a 25 ºC hasta alcanzar la neutralidad en la membrana.

El conjunto del método mencionado anteriormente también se realizó duplicando cada membrana, con el fin de que se pudiera lavar y regenerar de forma secuencial. Esto permitió realizar el método sin interrupción. Con el fin de realizar este método alternativo, se añadieron al dispositivo tanques (no representados) que contenían la solución de sosa a 0,1 y 0,5 M.

Ejemplo 8: Cuantificación de los biotensioactivos producidos

En este ejemplo, se realizaron varios ensayos para producir biotensioactivos con *B. subtilis* por fermentación de la glucosa a una concentración de 20 g/l, en un dispositivo de producción que contenía 3 l de medio de cultivo y una superficie total de elemento de contacto de membrana de aire/líquido de 2,5 m^2, de acuerdo con el elemento de contacto de membrana de aire/líquido que se describe en el ejemplo 6. Cada uno de los experimentos se repitió dos veces. A continuación solamente se presenta la media de estos duplicados. La desviación estándar está comprendida entre un 5 % y un 15 %.

Las condiciones de experimentación se regularon de la siguiente forma:

- el pH Se mantuvo a 7,
- el caudal de aire en el elemento de contacto de membrana de aire/líquido era de 1 vvm,
- el volumen de medio de cultivo era de 3 l circulando en el interior de las fibras de dicha membrana a una velocidad de 0,021 m/s,
- la presión del conjunto del sistema era la presionamos perica, excepto a nivel de la entrada de aire, que puede está ligeramente por encima de la presión atmosférica a 0,4 kPa,
- las condiciones de oxigenación del medio de cultivo se fijaron con un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de aproximadamente 40 h^{-1}.

El análisis de cromatografía por HPLC permitió la cuantificación de los sustratos y de los biotensioactivos en los diferentes tanques.

El análisis del oxígeno consumido permitió determinar la cantidad de células inmovilizadas en la membrana.

La fórmula que sigue a continuación se utilizó para determinar la biomasa inmovilizada sobre la membrana en el transcurso del tiempo en (g m^{-2}) considerando que las células libres e inmovilizadas tienen una velocidad específica de consumo de oxígeno diferente, siendo el oxígeno más accesible para las células inmovilizadas sobre la membrana que para las que se encuentran en suspensión:

biomasa inmovilizada sobre la membrana en un tiempo dado

$$\text{en (g m}^{-2}) = (OUR-(X^* OUR_{espe\ cl}))^*V/(OUR_{espe\ ci}{}^*a)$$

en la que:

OUR = Velocidad de consumo de oxígeno

$OUR_{spe\ cl}$ = Velocidad específica de consumo de oxígeno de las células libres

$OUR_{spe\ ci}$ = Velocidad específica de consumo de oxígeno de las células inmovilizadas

V = Volumen de reacción

X = Concentración de biomasa libre

a = superficie de la membrana

Las etapas de lavado de las membranas descritas en estos ejemplos se realizaron de acuerdo con el método que se ha descrito en el ejemplo 7.

8.1 Producción de micosubtilina con la cepa BBG125 de *B. subtilis*, modo discontinuo

En este ejemplo, la cepa BBG125 de *B. subtilis* se cultivó en modo discontinuo a 30 ºC durante 48 h en un elemento de contacto de membrana de aire/líquido **M1.**

8.1.1 Análisis de la biomasa producida

En este método se observaron dos tipos de biomasa, uno en suspensión libre en el medio de cultivo y el otro inmovilizado en el elemento de contacto de membrana de aire/líquido.

Las células libres se cultivaron de forma exponencial a 0,2 h^{-1} de tasa de crecimiento específico hasta la 18ª hora. La biomasa libre alcanzó un máximo de 2,6 g l^{-1} después de un día de cultivo, a continuación se mantuvo constante hasta el final del cultivo.

El análisis de los gases desveló la presencia de una biomasa inmovilizada sobre la membrana. El crecimiento de esta biomasa se desarrolla durante el primer día de cultivo para alcanzar 1,2 g m^{-2}. Una velocidad de consumo de la glucosa de 0,61 g l^{-1} h^{-1} se midió durante el primer día de cultivo, a continuación ésta disminuyó en razón del agotamiento de esta última en el medio.

8.1.2 Análisis de la micosubtilina producida

La producción de micosubtilina alcanzó 10 mg l^{-1} después de dos días de cultivo. 45 mg se desorbieron durante el lavado de la membrana dando como resultado una producción total de 25 mg l^{-1} y una productividad media de 0,5 mg l^{-1} h^{-1}. Después de purificación con las etapas de microfiltración, ultrafiltración/diafiltración y secado, se obtuvo una mezcla de micosubtilina en polvo que contenía las nuevas formas de micosubtilina. La pureza de esta mezcla era superior a un 94 %.

8.2 Producción, extracción y purificación en modo continuo de micosubtilina con la cepa BBG125 de *B. subtilis* con células totalmente recicladas

En este ejemplo, la cepa BBG125 de *B. subtilis* (depositada el 10 de marzo de 2011 con el número CNCM I-4451 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganisos (CNCM) del Instituto Pasteur (París, Francia)), capaz de producir únicamente micosubtilina de manera constitutiva, se cultivó en modo continuo a 22 ºC durante 72 h en un elemento de contacto de membrana de aire/líquido **M1.**

Además del elemento de contacto de membrana de aire/líquido que permite el crecimiento y la inmovilización de las células, el método presentado en este ejemplo se caracteriza también por la presencia de:

- dispositivos para alimentar y para extraer en modo continuo en dicho reactor un caudal determinado de dicho sustrato, de acuerdo con los que se han descrito en el ejemplo 6,
- una membrana de microfiltración **M2** de superficie de 0,45 m^2 y de tamaño de poro de 0,2 µm, de acuerdo con la que se ha descrito en el ejemplo 6,
- tres tanques: de alimentación **(Tanque 1)**, de concentración **(Tanque 2)** y de residuos **(Tanque 3),** de acuerdo con los que se han descrito en el ejemplo 6, y
- una membrana de ultrafiltración **M3** de superficies de 0,1 m^2 y de umbral de corte de 10 kDa, de acuerdo con la que se ha descrito en el ejemplo 6.

Además, los caudales de alimentación y de extracción de las bombas **P1** y **P5** de acuerdo con los que se describen en este ejemplo eran iguales y se regularon para obtener una tasa de dilución del orden de 0,1 h^{-1}, es decir, un caudal horario igual a 0,1 veces el volumen de la fase acuosa contenida en el dispositivo de producción.

Una característica de este método, de acuerdo con la presente invención, reside en el hecho de que se recicla la totalidad de las células de microorganismos en el dispositivo de producción después de haberlos separado de los residuos de materias orgánicas y de los biotensioactivos, lo que permite obtener una tasa de crecimiento elevada de los microorganismos sobre la membrana. El cultivo continuo iba precedido por 20 h de cultivo discontinuo.

8.2.1 Análisis de la biomasa

Durante las 40 primeras horas del cultivo continuo a 0,1 h^{-1} de tasa de dilución, la biomasa libre no paró de aumentar en el caldo de cultivo hasta 7,2 g l^{-1}. A continuación, su concentración permaneció constante, lo que desvelaba seguramente la presencia de un inhibidor. Por el contrario, el análisis de los gases desveló una inmovilización importante de las células sobre la membrana que alcanzaba 3,1 g m^{-2} después de 3 días de cultivo. En el transcurso de los 2 primeros días de cultivo, la concentración de glucosa disminuyo con una velocidad de consumo de glucosa de 1,5 g l^{-1} h^{-1}.

8.2.2 Análisis de la surfactina producida

La micosubtilina extraída de este modo a través de la membrana de microfiltración y se concentró bien con la membrana de ultrafiltración de 10 kDa; se observó su acumulación en el tanque intermedio. La productividad de micosubtilina aumentó en el transcurso de las 40 primeras horas del cultivo y alcanzó un máximo de 1,5 mg l^{-1} h^{-1}. Después de este experimento, el lavado de las membranas permite recuperar 84 mg de micosubtilina. Al final de este experimento, el cultivo en modo continuo permitió la producción de 895 mg de micosubtilina en solución, es decir, una concentración media producida de 48 mg de micosubtilina producida por litro de medio consumido. Las etapas de ultrafiltración/diafiltración permitieron la obtención de surfactina en solución con una pureza de un 90 %. Este método continuo muestra una productividad 3 veces superior a la obtenida con el modo discontinuo que se ha descrito en el ejemplo 8.1

Listados de referencias

[1] Ongena, M. y Jacques, P. 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115-125.

[2] Documento CZ20011620

[3] Documento DE102005050123

[4] Documento FR2578552

[5] Guez, J.S. et ál., 2007. Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of Bacillus subtilis for the production and continuous removal of lipopeptides, J. Biotechnol., 131, 67-75.

[6] Davis, D. A., Lynch, H. C. y Varley, J., 1999. The production of Surfactin in batch culture by Bacillus subtilis ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enzyme Microb. Technol. 25, 322-329.

[7] Documento WO0226961

[8] Documento EP1320595

[9] Landy M. et al. 1948. Bacillomycin ; an antibiotic from Bacillus subtilis active against pathogenic fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67, 539-541.

[10] Guez, J.S. et ál., 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by Bacillus subtilis. J. Biotechnol. 134, 121-126.

[11] Remize, P.J. y Cabassud, C. 2003. Un nouveau réacteur d'oxydation sans bulles : le contacteur à membrane G/L. Récents progrès en génie des procédés. Intégration des membranes dans les procédés 2. Lavoisier Tec et Doc.

[12] Duitman, E.H. et ál., 1999. The mycosubtilin synthetase of Bacillus subtilis ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 13294-13299.

[13] Leclère, V. et ál., 2005. Mycosubtilin overproduction by Bacillus subtilis BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4577-4584.

[14] Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

[15] Dennis, J.J. y Zylstra, G.J. 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2710-2715.

[16] Herrero, M., de Lorenzo, V., y Timmis, K. N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria, J. Bacteriol. 172, 6557-6567.

[17] Bertani, G. 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. J. Bacteriol. 186, 595-600.

[18] Dubnau, D.A. 1982. Genetic transformation of Bacillus subtilis p148-178. In D.A. Dubnau (Ed) The molecular biology of the Bacilli, vol I. Bacillus subtilis. Academic Press, Inc. New York.

[19] Besson, F. et ál. 1979. Antifungal activity upon Saccharomyces cerevisiae of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. J. Antibiot. (Tokyo) 32, 828-833.

[20] Chen, H.L., Chen, Y.S., y Juang, R.S. 2007. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. J. Membr. Sci. 299, 114-121.

[21] Chen, H.L., Chen, Y.S., y Juang, R.S. 2008. Flux decline and membrane cleaning in cross-flow ultrafiltration of treated fermentation broths for surfactin recovery. Sep. Purif. Technol. 62, 47-55.

[22] Coutte, F., et ál.,. 2010, Effect of pps disruption and constitutive expression of srfA on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of Bacillus subtilis 168 derivatives. J. Appl. Microbiol. 109, 480-491.

Listado de secuencias

<110> Universite de Lille 1

<120> Biotensioactivos de Bacilus sp., composición que los comprende, método de obtención y aplicación

<130> BIP206917PC00

<150> FR 11/58922
<151> 03-10-2011

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador PBP-FO2

<400> 1
aataacggac atgccgaagtg 21

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador FENF-REV2

<400> 2
aataggccga ccaagacgtt c 21

<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador SRF-FO

<400> 3
acaggaatat gctcaatcga ag 22

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador SRF-REV

<400> 4
aaattcgctt ccaggcttct g 21

<210> 5
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador TETP1

<400> 5
gttgtatcga tgatgaaata ctgaatttta aacttag 37

<210> 6
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador TETT1

<400> 6
tttaatggat ctagaagatt tgaattcctg ttat 34

<210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador pC194cmfwd

<400> 7
agaaagcaga caggtaaccc tcctaa 26

<210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador pC194cmrev

<400> 8
gcaggttagt gacattaggt aaccga 26

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador SRFAA5-FWD

<400> 9
aaggaatctc gcaatcattt atcg 24

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador SRFAA5REV

<400> 10
cttggtgtaa gcggaatttc tgtc 24

<210> 11
<211> 2635
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento SphI-SacI de pBG106 que sirvió para la construcción de BBG116 (operón myc bajo el control de PrepU-neo)

<400> 11

gcatgcaaaa aatggtactt tcatcacttc atgttcaaaa ttacgacaaa aaacgaaacg 60

aaaactaaag aaataatact attttcaaaa aagtacaatg aaaaatttac attttttatt 120

gtactttaat aaatatacgt taatatagtg catatatgga ttatatagcc atataattta 180

tttttctgtc attatttcac tttcttaacc tcttatttta gaactgaggg aattgttgag 240

ccgaacatct tattctttac cttgcccaaa agaaagtaca gtttatcgac ctgttggttg 300

ttccagtgtt ttttgcaggt gattccagca ttcatagttg cagaagtatt atctaagtca 360

ttgttaaacc tgtatcgtct tagccagcct tattttggcg tggtaattat aggccaatct 420

caagactagc aggacaagct tccgcaaaca atagcttcta aagtagaaac tccatatgtc 480

gcgttgctca atcaagtaaa gtttttggc gagttgcaac gtcatctgtg tccgtccctg 540

gcagttttat ctgccgcggg cttctcaccc ttgctcttgt tttgttttcc tccacctaga 600

gctattcaac tataatcaaa cgcaatcaaa tcttgaacac cctcagagac atacaaacgc 660

atcaattaaa aaaagacgtt taatcgttag gcttccatta tttgagctgc aattatgaca 720

atgatcccat atgcaggtcg actctagagc ttgggctgca ggtcgagatc agggaatgag 780

tttataaaat aaaaaaagca cctgaaaagg tgtctttttt tgatggtttt gaacttgttc 840

tttcttatct tgatacatat agaaataacg tcatttttat tttagttgct gaaaggtgcg 900

ttgaagtgtt ggtatgtatg tgttttaaag tattgaaaac ccttaaaatt ggttgcacag 960

aaaaacccca tctgttaaag ttataagtga ctaaacaaat aactaaatag atgggggttt 1020

cttttaatat tatgtgtcct aatagtagca tttattcaga tgaaaaatca agggttttag 1080

tggacaagac aaaaagtgga aaagtgagac catgagctta tgcttaggaa gacgagttat 1140

taatagctga ataagaacgg tgctctccaa atattcttat ttagaaaagc aaatctaaaa 1200

ttatctgaaa agggaatgag aatagtgaat ggaccaataa taatgactag agaagaaaga 1260

atgaagattg ttcatgaaat taaggaacga atattggata aatatgggga tgatgttaag 1320

gctattggtg tttatggctc tcttggtcgt cagactgatg ggccctattc ggatattgag 1380

atgatgtgtg tcatgtcaac agaggaagca gagttcagcc atgaatggac aaccggtgag 1440

tggaaggtgg aagtgaattt tgatagcgaa gagattctac tagattatgc atctcaggtg 1500

gaatcagatt ggccgcttac acatggtcaa tttttctcta ttttgccgat ttatgattca 1560

ggtggatact tagagaaagt gtatcaaact gctaaatcgg tagaagccca aacgttccac 1620

gatgcgattt gtgcccttat cgtagaagag ctgtttgaat atgcaggcaa atggcgtaat 1680

attcgtgtgc aaggaccgac aacatttcta ccatccttga ctgtacaggt agcaatggca 1740

ggtgccatgt tgattggtct gcatcatcgc atctgttata cgacgagcgc ttcggtctta 1800

actgaagcag ttaagcaatc agatcttcct tcaggttatg accatctgtg ccagttcgta 1860

atgtctggtc aactttccga ctctgagaaa cttctggaat cgctagagaa tttctggaat 1920

gggattcagg agtggacaga acgacacgga tatatagtgg atgtgtcaaa acgcatacca 1980

ttttgaacga tgacctctaa taattgttaa tcatgttggt tacgtattta ttaacttctc 2040

ctagtattag taattatcag aattgatctg cggccgcgaa ttcaagctct agaagattgg 2100

agggagctaa tgaataatct tgccttttta tttccgggac aaggttctca gtttgttggg 2160

atgggtaaaa gtttttggaa tgattttgtg ctggcgaaga gattatttga agaggcaagc 2220

gatgccatct ccatggatgt aaaaaagttg tgctttgatg gcgatatgac tgaattgaca 2280

aggacaatga atgcacagcc tgccatttta acggttagtg ttatcgctta tcaagtatat 2340

atgcaggaaa taggaattaa accgcacttt ttggcaggtc acagcttggg cgaatattca 2400

gcgcttgtct gtgcaggtgt cctttctttt caagaagccg ttaagcttat aaggcagcga 2460

ggaatactca tgcaaaatgc agatcctgag caactgggca cgatggccgc aatcacacag 2520

gtttatatcc aaccgctaca agacctgtgt acggaaattt cgacggaaga cttcccggta 2580

ggcgtggcgt gcatgaactc ggatcaacag catgtcatct ccgggtaccg agctc 2635

<210> 12
<211> 736
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete "e"pbp

<400> 12

aaaaaatggt actttcatca cttcatgttc aaaattacga caaaaaacga aacgaaaact 60

aaagaaataa tactattttc aaaaaagtac aatgaaaaat ttacattttt tattgtactt 120

taataaatat acgttaatat agtgcatata tggattatat agccatataa tttatttttc 180

tgtcattatt tcactttctt aacctcttat tttagaactg agggaattgt tgagccgaac 240

atcttattct ttaccttgcc caaaagaaag tacagtttat cgacctgttg gttgttccag 300

tgttttttgc aggtgattcc agcattcata gttgcagaag tattatctaa gtcattgtta 360

aacctgtatc gtcttagcca gccttatttt ggcgtggtaa ttataggcca atctcaagac 420

tagcaggaca agcttccgca aacaatagct tctaaagtag aaactccata tgtcgcgttg 480

ctcaatcaag taaagttttt tggcgagttg caacgtcatc tgtgtccgtc cctggcagtt 540

ttatctgccg cgggcttctc acccttgctc ttgttttgtt ttcctccacc tagagctatt 600

caactataat caaacgcaat caaatcttga acaccctcag agacatacaa acgcatcaat 660

taaaaaaaga cgtttaatcg ttaggcttcc attatttgag ctgcaattat gacaatgatc 720

ccatatgcag gtcgac 736

<210> 13
<211> 1339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete PrepU-neo

<400> 13

gcttgggctg caggtcgaga tcagggaatg agtttataaa ataaaaaaag cacctgaaaa 60

ggtgtctttt tttgatggtt ttgaacttgt tctttcttat cttgatacat atagaaataa 120

cgtcattttt attttagttg ctgaaaggtg cgttgaagtg ttggtatgta tgtgttttaa 180

agtattgaaa acccttaaaa ttggttgcac agaaaaaccc catctgttaa agttataagt 240

gactaaacaa ataactaaat agatgggggt ttcttttaat attatgtgtc ctaatagtag 300

catttattca gatgaaaaat caagggtttt agtggacaag acaaaaagtg gaaaagtgag 360

accatgagct tatgcttagg aagacgagtt attaatagct gaataagaac ggtgctctcc 420

aaatattctt atttagaaaa gcaaatctaa aattatctga aaagggaatg agaatagtga 480

atggaccaat aataatgact agagaagaaa gaatgaagat tgttcatgaa attaaggaac 540

gaatattgga taaatatggg gatgatgtta aggctattgg tgtttatggc tctcttggtc 600

gtcagactga tgggccctat tcggatattg agatgatgtg tgtcatgtca acagaggaag 660

cagagttcag ccatgaatgg acaaccggtg agtggaaggt ggaagtgaat tttgatagcg 720

aagagattct actagattat gcatctcagg tggaatcaga ttggccgctt acacatggtc 780

aatttttctc tattttgccg atttatgatt caggtggata cttagagaaa gtgtatcaaa 840

ctgctaaatc ggtagaagcc caaacgttcc acgatgcgat ttgtgccctt atcgtagaag 900

agctgtttga atatgcaggc aaatggcgta atattcgtgt gcaaggaccg acaacatttc 960

taccatcctt gactgtacag gtagcaatgg caggtgccat gttgattggt ctgcatcatc 1020

gcatctgtta tacgacgagc gcttcggtct taactgaagc agttaagcaa tcagatcttc 1080

cttcaggtta tgaccatctg tgccagttcg taatgtctgg tcaactttcc gactctgaga 1140

aacttctgga atcgctagag aatttctgga atgggattca ggagtggaca gaacgacacg 1200

gatatatagt ggatgtgtca aaacgcatac cattttgaac gatgacctct aataattgtt 1260

aatcatgttg gttacgtatt tattaacttc tcctagtatt agtaattatc agaattgatc 1320

tgcggccgcg aattcaagc 1339

<210> 14
<211> 536
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete "e"fenF

<400> 14

agattggagg gagctaatga ataatcttgc ctttttattt ccgggacaag gttctcagtt 60

tgttgggatg ggtaaaagtt tttggaatga ttttgtgctg gcgaagagat tatttgaaga 120

ggcaagcgat gccatctcca tggatgtaaa aaagttgtgc tttgatggcg atatgactga 180

attgacaagg acaatgaatg cacagcctgc cattttaacg gttagtgtta tcgcttatca 240

agtatatatg caggaaatag gaattaaacc gcacttttg gcaggtcaca gcttgggcga 300

atattcagcg cttgtctgtg caggtgtcct ttcttttcaa gaagccgtta agcttataag 360

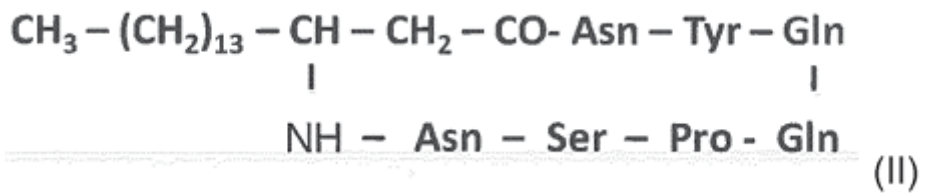
gcagcgagga atactcatgc aaaatgcaga tcctgagcaa ctgggcacga tggccgcaat 420

cacacaggtt tatatccaac cgctacaaga cctgtgtacg gaaatttcga cggaagactt 480

cccggtaggc gtggcgtgca tgaactcgga tcaacagcat gtcatctccg ggtacc 536

REIVINDICACIONES

1. Micosubtilina cuya cadena de ácido graso comprende 17 carbonos y que tiene una glutamina en el lugar de la asparagina en la posición 3 en su ciclo peptídico (micosubtilina Gln3 C17) y representada por la fórmula (II) que sigue a continuación:



(II)

2. Composición que comprende al menos una micosubtilina Gln3 C17 de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además al menos una micosubtilina elegida entre el grupo que comprende una micosubtilina *iso*-C16, una micosubtilina n-C16, una micosubtilina *anteiso*-C17, una micosubtilina *iso*-C17, una micosubtilina C18 y sus mezclas.

4. Composición de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 que comprende entre 1 y un 60 % de micosubtilina *iso*-16, entre 1 y un 20 % de micosubtilina Gln3 C17, entre 1 y un 10 % de micosubtilina n-C16, entre un 20 y 95 % de micosubtilina *anteiso*-C17, entre un 5 y un 30 % de micosubtilina *iso*-C17 y entre un 1 y un 5 % de micosubtilina C18.

5. Micosubtilina de acuerdo con la reivindicación 1, o composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para utilización como agente antifúngico.

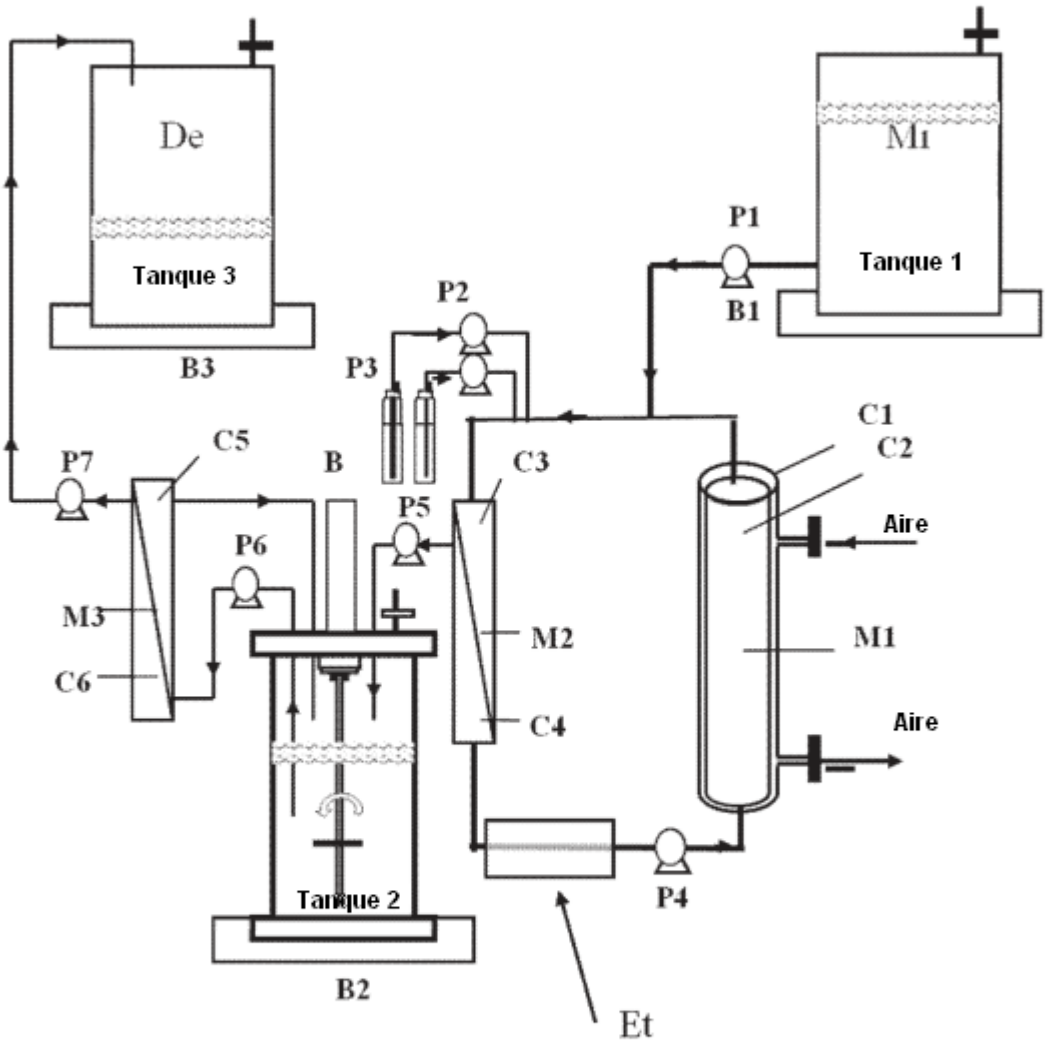

De
Tanque 3
B3
M1
Tanque 1
B1
P1
P2
P3
C1
C2
Aire
C5
P7
B
C3
P5
P6
M3
C6
M2
C4
M1
Aire
Tanque 2
B2
P4
Et

FIGURA 1

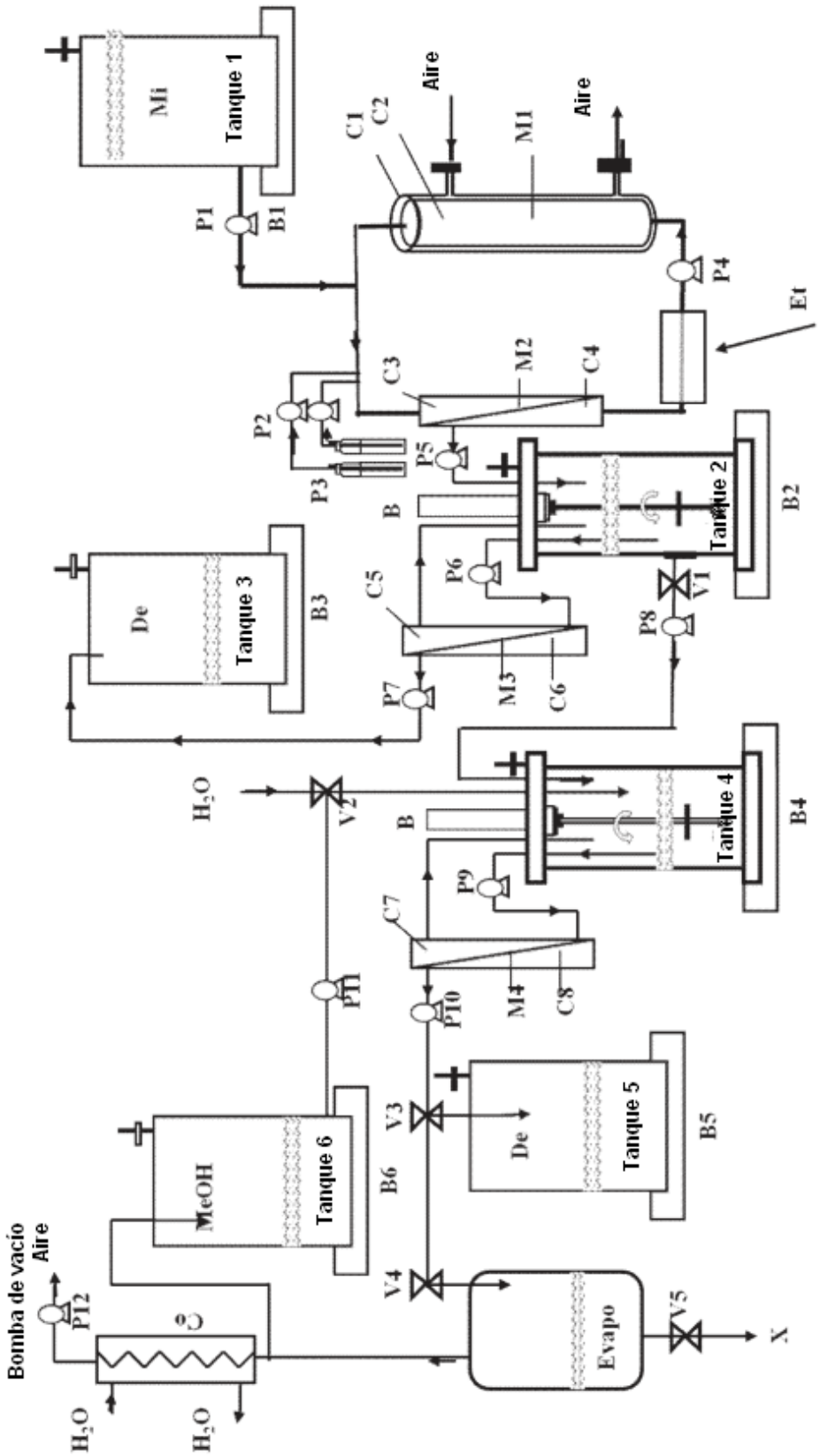

Mi
Tanque 1
P1
B1
C1
C2
Aire
M1
Aire
P4
Et
C3
M2
C4
P2
P3
P5
B
Tanque 2
B2
De
Tanque 3
B3
C5
P6
V1
P8
P7
M3
C6
H2O
V2
B
Tanque 4
B4
P9
C7
PT
P10
M4
C8
MeOH
Tanque 6
B6
V3
De
Tanque 5
B5
V4
Evapo
V5
X
Bomba de vacío
Aire
P12
Ce
H2O
H2O

FIGURA 2

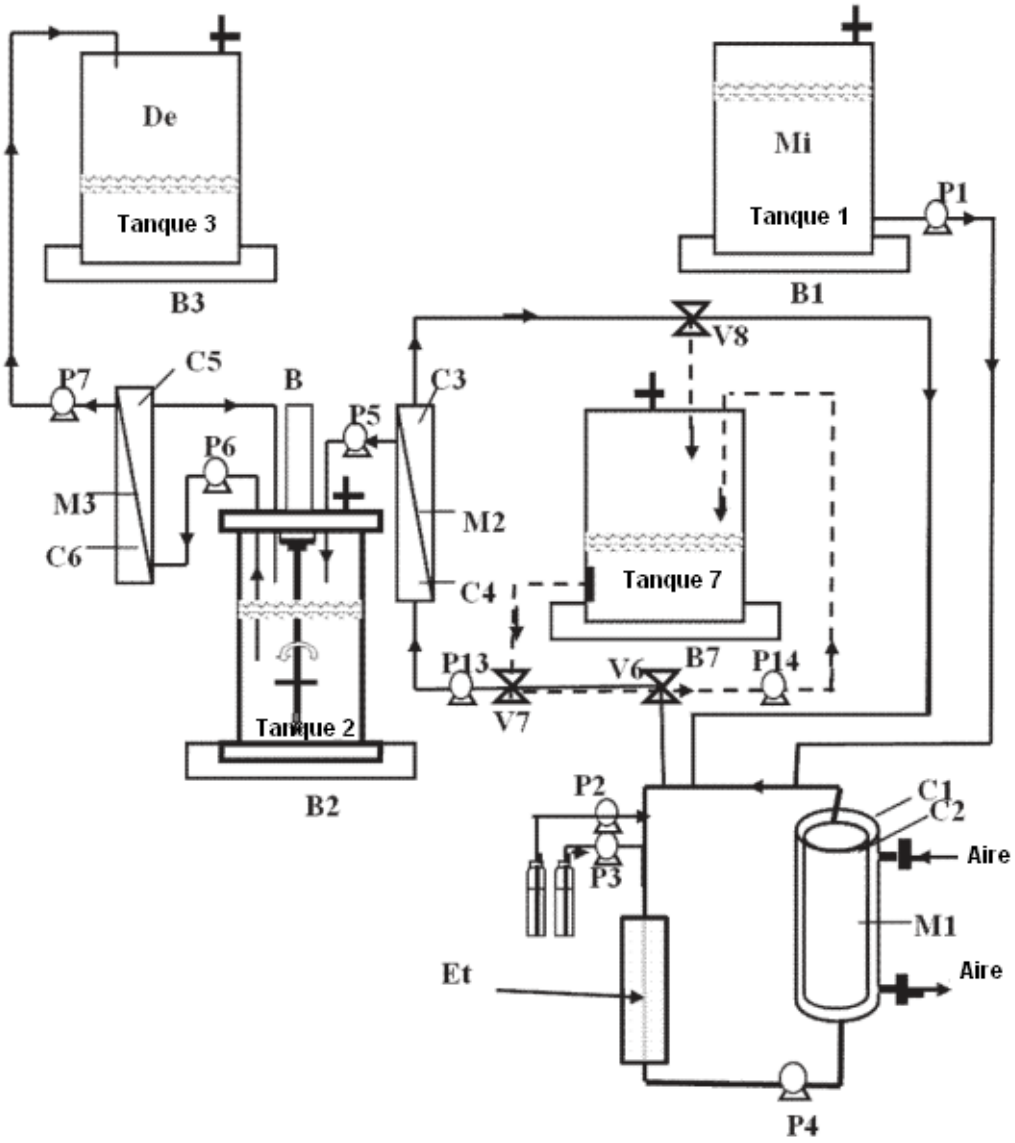

De
Tanque 3
B3
Mi
Tanque 1
B1
P1
V8
P7
C5
B
C3
P5
P6
M3
C6
M2
C4
Tanque 7
P13
V6
B7
P14
V7
Tanque 2
B2
P2
P3
C1
C2
Aire
M1
Et
Aire
P4

FIGURA 3

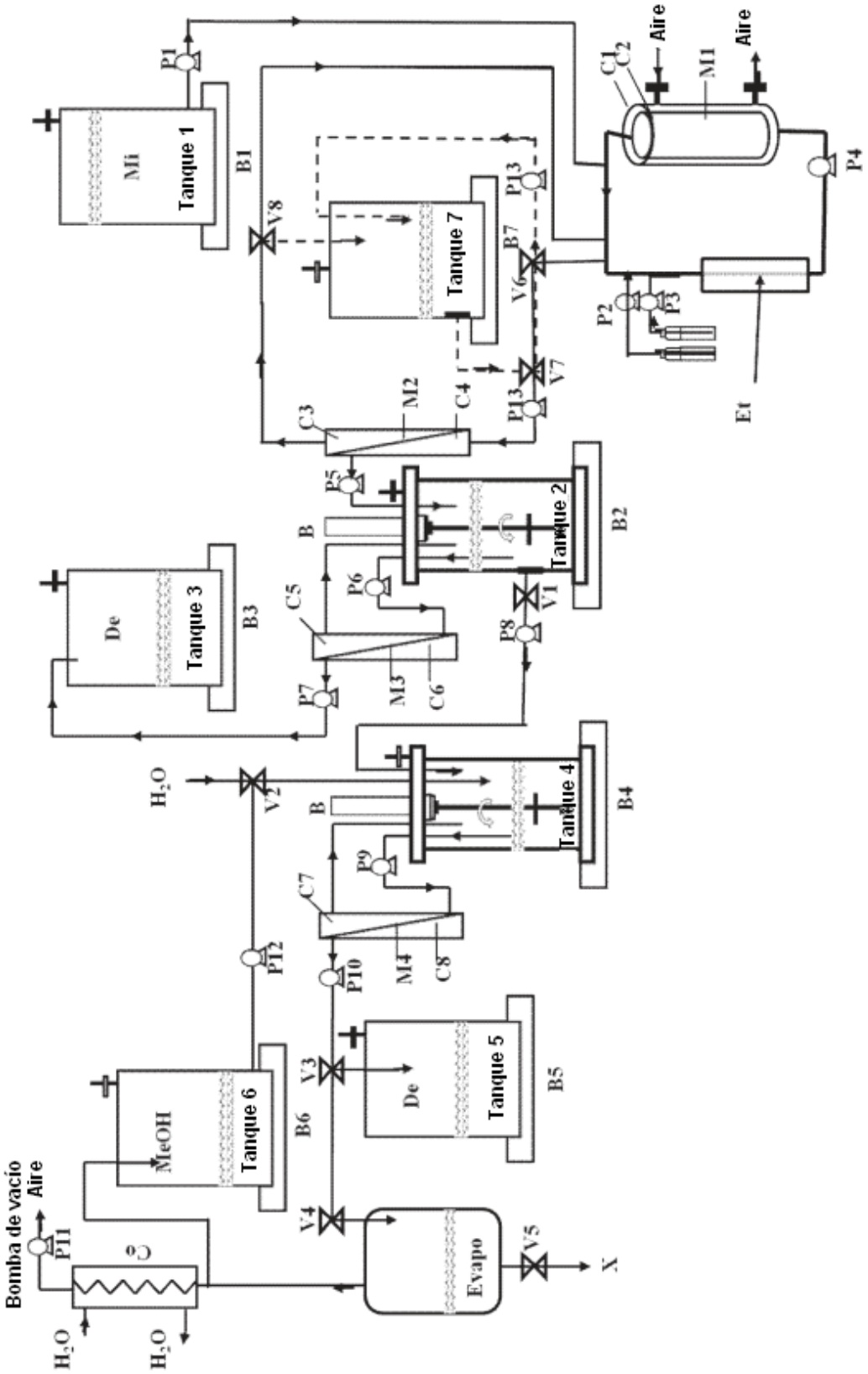

Mi
Tanque 1
B1
P1
V8
Tanque 7
P13
B7
V6
V7
C1
C2
Aire
M1
Aire
P4
P2
P3
Et
C3
M2
C4
P5
B
Tanque 2
B2
De
Tanque 3
B3
C5
P6
V1
P8
P7
M3
C6
H2O
V2
Tanque 4
B4
P9
C7
PT2
P10
M4
C8
V3
De
Tanque 5
B5
MeOH
Tanque 6
B6
V4
Evapo
V5
X
Bomba de vacio
Aire
PT1
Ce
H2O
H2O

FIGURA 4

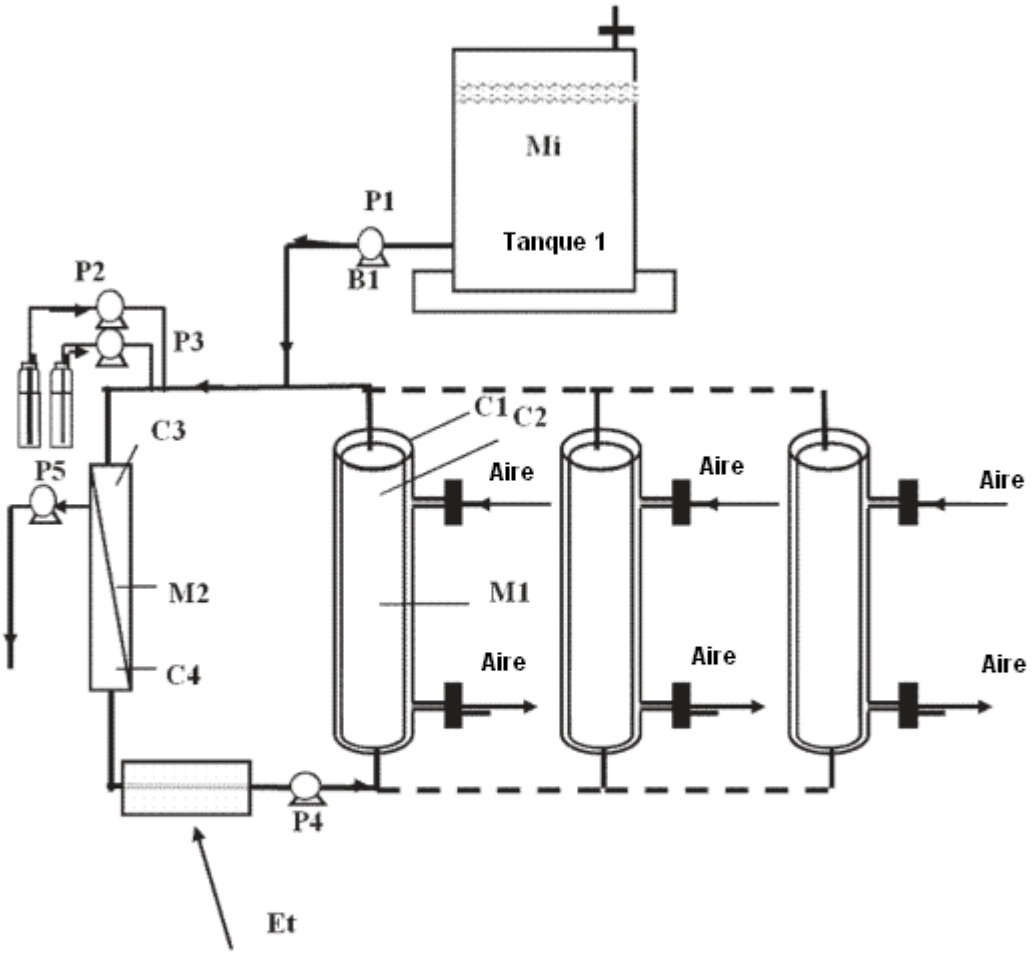

Mi
Tanque 1
P1
B1
P2
P3
C1
C2
C3
P5
Aire
Aire
Aire
M2
M1
C4
Aire
Aire
Aire
P4
Et

FIGURA 5

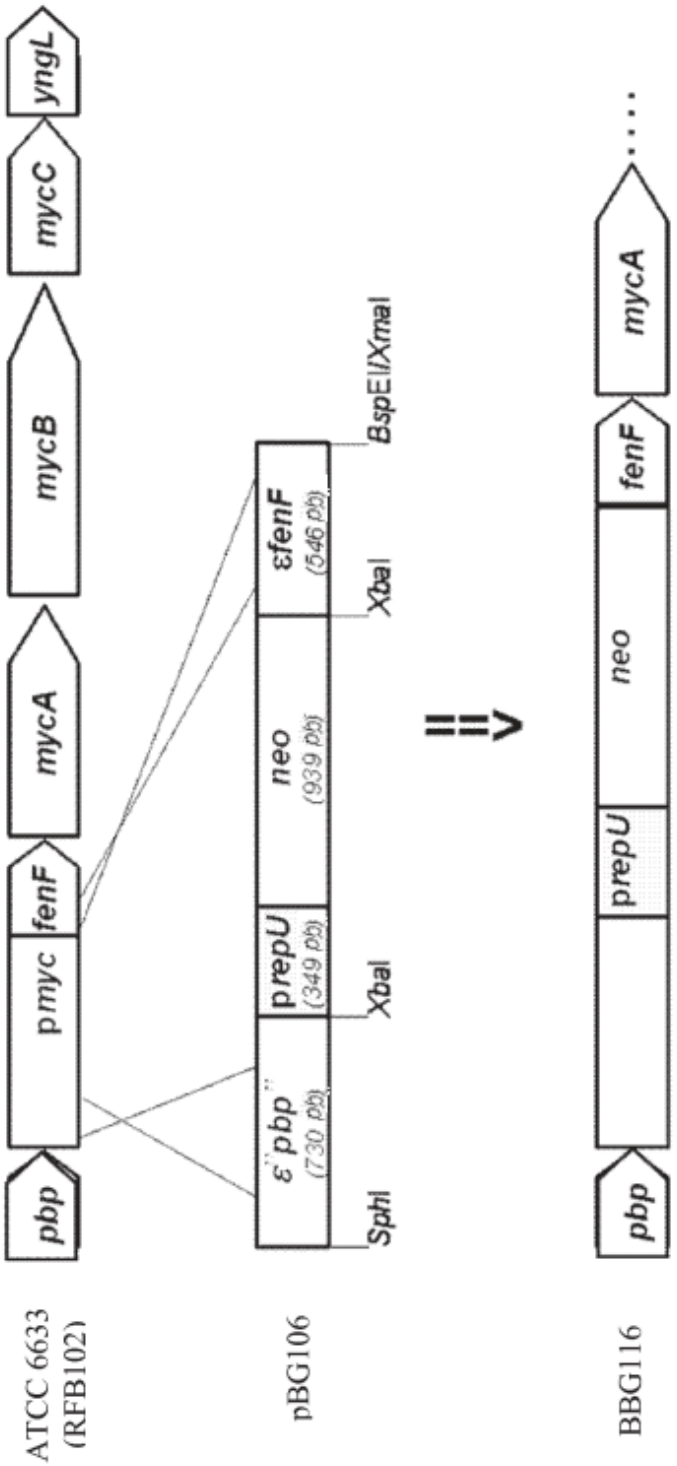

yngL
mycC
mycB
mycA
fenF
pmyc
pbp
ATCC 6633
(RFB102)
ε''pbp''
(730 pb)
SphI
prepU
(349 pb)
XbaI
neo
(939 pb)
XbaI
εfenF
(546 pb)
BspEI/XmaI
pbp
prepU
neo
fenF
mycA
pBG106
BBG116

FIGURA 6

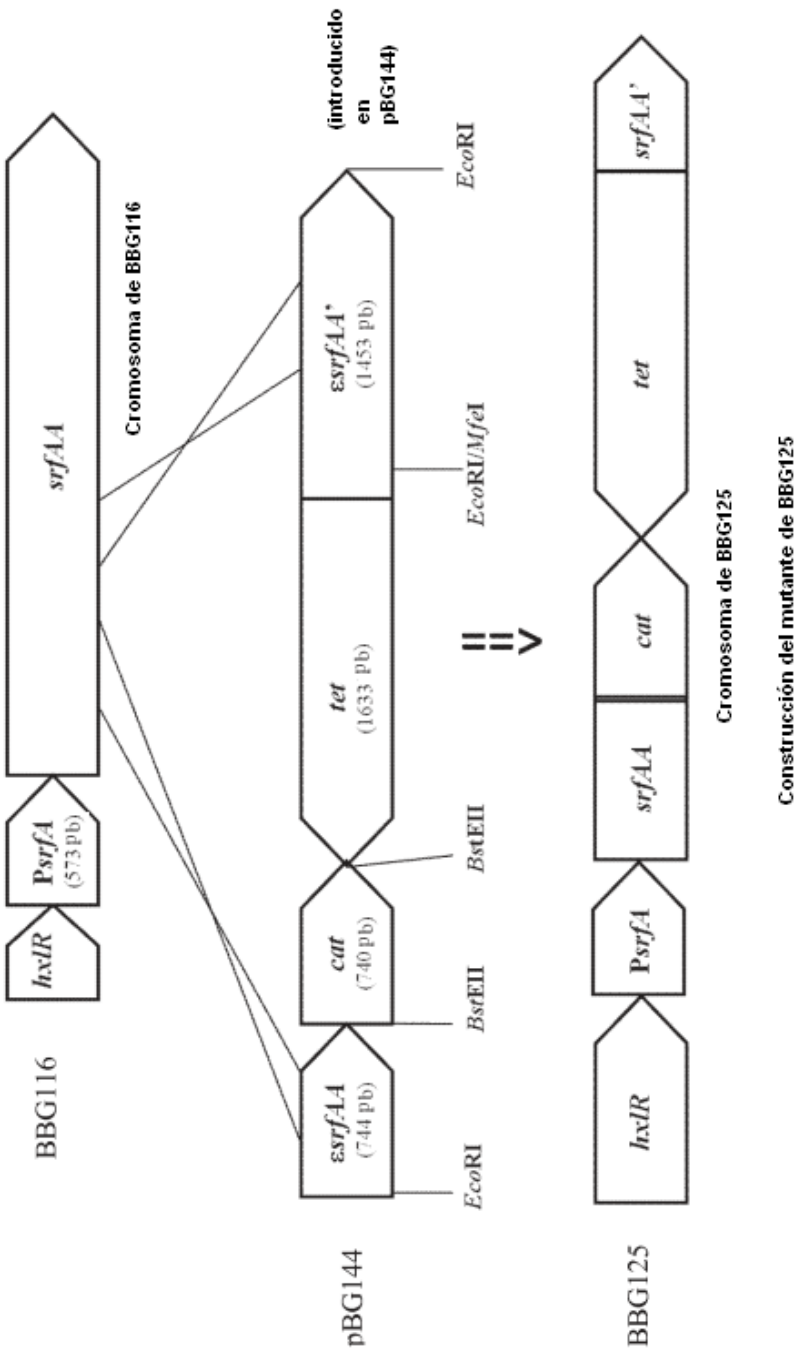

BBG116
hxlR
PsrfA
(573 pb)
srfAA
Cromosoma de BBG116
pBG144
εsrfAA
(744 pb)
EcoRI
cat
(740 pb)
BstEII
tet
(1633 pb)
BstEII
εsrfAA'
(1453 pb)
EcoRI/MfeI
(introducido en pBG144)
EcoRI
BBG125
hxlR
Psrf-A
srfAA
cat
tet
srf-AA'
Cromosoma de BBG125
Construcción del mutante de BBG125

FIGURA 7