

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 067 047**

21 Número de solicitud: 202400084

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C07K 7/66** (2006.01)  
**B01D 11/02** (2006.01)  
**C12R 1/07** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**12.11.2024**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.05.2026**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100,00%)**  
**Campus Universitario de Vigo s/n**  
**36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**LVOVA KSENIA, Aleksandrovna;**  
**VECINO BELLO, Xanel;**  
**PÉREZ CID, Benita;**  
**CRUZ FREIRE, José Manuel y**  
**MOLDES MENDUIÑA, Ana Belén**

54 Título: **Proceso para la extracción gramicidina S a partir de biomasa microbiana y obtención de nuevas fórmulas utilizando disolventes alternativos para su uso como antimicrobianos o antibióticos**

57 Resumen:

En esta invención se describen varios procesos para la extracción del antibiótico gramicidina S, a partir de biomasa microbiana de *Aneurinibacillus* utilizando como agentes de extracción ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante obtenido a partir de los licores de lavado de maíz. Estos procesos presentan la ventaja frente a la extracción convencional con etanol que están exentos de ácido clorhídrico. Además, la gramicidina S producida bajo esta invención está exenta de ácido trifluoroacético (TFA).

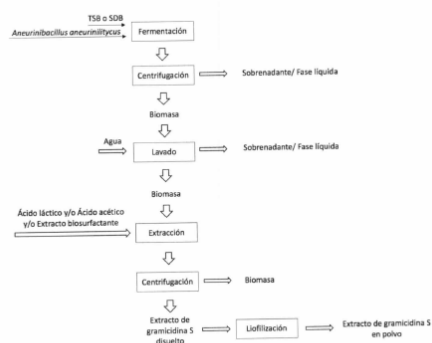


Figura 1

ES 3 067 047 A1

## DESCRIPCIÓN

Proceso para la extracción gramicidina S a partir de biomasa microbiana y obtención de nuevas fórmulas utilizando disolventes alternativos para su uso como antimicrobianos o antibióticos

5 En esta invención se describen varios procesos para la extracción de gramicidina S a partir de biomasa microbiana de *AneuriniBacillus aneurinilyticus* aislado a partir de los licores de lavado de maíz, utilizando diferentes disolventes que comprenden ácido láctico, ácido acético y extracto biosurfactante producido a partir de los licores de lavado de maíz, generándose nuevas fórmulas  
10 que contienen gramicidina S producida biotecnológicamente con uso potencial como antibiótico o antimicrobiano.

### Sector de la técnica

15 La presente invención pertenece al sector de la obtención de antibióticos y agentes antimicrobianos producidos biotecnológicamente.

El objeto principal de la invención es la obtención de gramicidina S a partir de la biomasa microbiana de un *Bacillus* esporulado con capacidad de producir gramicidina S como el  
20 *AneuriniBacillus aneurinilyticus*, perteneciente al género *AneuriniBacillus*, mediante el uso de ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante obtenido a partir de los licores de lavado de maíz.

### Antecedentes de la Invención

25 La gramicidina S es un antibiótico polipeptídico efectivo contra diversas bacterias. Principalmente ataca bacterias grampositivas, excluyendo los bacilos, aunque también muestra actividad contra algunas cepas de bacterias gramnegativas como *Escherichia coli*. Descubierta hace más de ocho décadas por Georgyi Gause y Maria Brazhnikova en 1942, la gramicidina S sigue siendo  
30 relevante en la lucha contra infecciones bacterianas, principalmente en estos momentos donde se están creando resistencias por parte de las bacterias contra numerosos antibióticos convencionales.

La gramicidina S es un decapeptido cíclico catiónico compuesto por diez aminoácidos que  
35 comprenden 2 secuencias de valina (Val), ornitina (Orn), leucina (Leu), fenilalanina (Phe) y prolina (Pro) (Val-Orn-Leu-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-Phe-Pro) con un peso molecular de 1141 Da, sin embargo, este peso molecular puede variar cuando algunos de estos aminoácidos, principalmente la ornitina (Orn), es sustituida por otros aminoácidos como la lisina (Lys). Así por ejemplo Alezeni y su equipo en 2017 descubrieron que *AneuriniBacillus migulanus*, cepa  
40 Nagano, produce dos análogos adicionales de gramicidina S con pesos moleculares de 1155 y 1169 Da, además del conocido análogo de 1141 Da. Estos análogos sustituyen uno o dos residuos de ornitina por lisina. Otros investigadores (Hori y Kurotsu, 1997) también identificaron análogos de gramicidina S en *Bacillus brevis* Nagano, donde ornitina es sustituida por lisina. Respecto a la producción biotecnológica de gramicidina S esta comprende el uso de *Bacillus*  
45 esporulados como: *Bacillus brevis* (Fang, 1997), *AneuriniBacillus migulanus* (Berditsch y col., 2007, 2017; Alenezi y col., 2017; Nesteruk y Syrov, 2020); que almacenan la gramicidina S en vacuolas. Para la extracción de la gramicidina S es necesario por tanto separar la biomasa microbiana del medio de fermentación, lavarla y proceder a la extracción de la gramicidina S pudiendo utilizarse diferentes técnicas. A continuación, se realiza un repaso de los distintos  
50 procesos recogidos en la bibliografía para la extracción de gramicidina S a partir de la biomasa microbiana de diferentes *Bacillus* esporulados.

Además, la gramicidina S actúa como un ionóforo, lo que significa que facilita el transporte de iones a través de las membranas biológicas. Esta capacidad de transporte de iones está estrechamente relacionada con su estructura y su interacción con iones específicos como el potasio ( $K^+$ ) y el sodio ( $Na^+$ ). Cuando la gramicidina S interactúa con iones  $K^+$  o  $Na^+$ , forma complejos de inclusión en los cuales el ion metálico está encapsulado por la estructura del antibiótico variando el peso molecular de la misma. Estos complejos pueden influir en la actividad biológica de la gramicidina S, así como en su capacidad para alterar la permeabilidad de las membranas celulares (Prosser y col., 1998), lo que se puede traducir en variabilidades de su capacidad antibiótica y antimicrobiana.

El disolvente más utilizado y estudiado para la extracción de gramicidina S es el etanol. El primero en utilizarlo fue Hotchkiss y col. en 1941, seguido por Berditsch y col., 2007, 2015; Alenezi y col., 2017 y más recientemente Nesteruk y Syrov, 2020 (PATENTE EP3660141A1). Estos últimos autores han patentado la producción biotecnológica y extracción de gramicidina S a partir de una cepa mutada *AneuriniBacillus migulanus*, VKPM B-10212 que posteriormente ha sido extraída con etanol.

Nesteruk y Syrov, 2020 refieren el uso de ácido láctico en el desarrollo de su patente, pero no en el proceso de extracción, sino como suplemento nutricional durante el proceso fermentativo. De hecho, estos autores se refieren al ácido láctico dentro del apartado de metodología que comprenden las condiciones y el medio de fermentación concluyendo que el medio óptimo para producir gramicidina S con la estudiada debería estar formado por: 30 mL de glicerol, 24.6 mL de ácido láctico; 2 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g de NaCl; 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 12 g de oxalato de amonio; hasta 10 mg de autolisado de levadura; hasta 20 mg de hidrolizado de caseína; 2 mL de Laprol. En cuanto al proceso de extracción de la gramicidina S propuesto por Nesteruk y Syrov, 2020, este se lleva a cabo en ausencia de ácido láctico. Así la biomasa obtenida se filtra mediante una unidad de filtro cerámico usando ultrafiltración y se lava con agua desionizada para eliminar impurezas. Luego, se seca la biomasa concentrada en un secador por aspersion a  $180^\circ C$ . Posteriormente, la biomasa seca se lava con acetona a  $40^\circ C$  para eliminar las impurezas coloreadas. La acetona se retira purgando con nitrógeno, seguido de un enjuague adicional con acetona y un secado al vacío a  $45^\circ C$ . Seguidamente, la gramicidina S se extrae utilizando etanol y ajustando el pH a 3.0-4.0 con ácido clorhídrico diluido (HCl:etanol=1:2). Esta extracción se repite varias veces, eliminando los extractos con nitrógeno presurizado. Después de separar el etanol, la biomasa se seca al vacío a aproximadamente  $47^\circ C$ . Posteriormente la biomasa seca se disuelve en agua y se decolora usando carbón activado, seguida de una filtración en una prensa de filtro y un enjuague con etanol para minimizar la pérdida del producto por sorción en el carbón. Tras estos procesos el extracto resultante se transfiere a un cristizador, se diluye con agua desionizada y se añade una solución concentrada de cloruro de sodio. Se calienta a una temperatura de 55 a  $65^\circ C$ . Tras la clarificación, la solución se enfría a una temperatura inferior a  $5^\circ C$ . Los cristales formados se separan en una centrifuga y se secan al vacío a una temperatura máxima de  $65^\circ C$ .

Por otra parte, Alenezi y colaboradores en 2017 proponen el uso de etanol con ácido clorhídrico, siendo el etanol el disolvente más estudiado en la bibliografía para para la extracción de gramicidina S en combinación con otros procesos de separación. Otros autores también han contemplado el uso de otros disolventes para la extracción y purificación de gramicidina diferentes de etanol como la acetona o el eter (Hotchkis y Dubos, 1940, 1941), principalmente para la extracción de gramicidina lineal compuesta por 15 aminoácidos con un peso molecular en torno a los 1882 Da, dependiendo de la variabilidad de alguno de sus aminoácidos. Dammak y col., 2017 también contemplaron la extracción de gramicidina S a partir de biomasa microbiana utilizando acetato de etilo.

Si se hace una búsqueda en Scopus sin utilizar ninguna restricción y empleando como palabras clave "Gramicidin S" y "Lactic acid" la búsqueda arroja 4 publicaciones: Tran y col., 2022; MacPhee y col., 2005; Demain, 2004 y Haynes y col., 1974, que nada tienen que ver con el proceso de extracción de la gramicidina S a partir de biomasa microbiana. De forma análoga si se realiza esta misma búsqueda utilizando como palabras clave: "Gramicidin S" y "Acetic acid" la búsqueda arroja un total de 18 publicaciones entre las que se encuentran: Sarabando y col., 2023; Ishikawa y Tanabe, 2023; Hiraoka y col., 2022; Frikha y col., 2017; Dammak y col., 2017, Tuin y col., 2009; Mogi y col., 2009; Hiraoka y col., 2006; Smirnova y col., 2003; Yang y col., 1999, Helle y col., 1992; Bulgakova y col., 1988; Hancock y Wong, 1984; Tochikubo y col., 1981; Shol'ts y col., 1975 y Kotelnikova y Slojjeva, 1974. De todas las publicaciones mencionadas la más relacionada con la extracción de gramicidina S utilizando disolventes es el trabajo publicado por Dammak y col en la revista Biomed Research International en el año 2017, donde se recoge la extracción de compuestos antimicrobianos, entre los que se detectó gramicidina S, a partir de *Paludifilum halophilum* utilizando acetato de etilo.

Por otra parte, si se realiza una búsqueda avanzada en PubMed utilizando como palabras clave "Gramicidin S" y "Lactic acid" la búsqueda arroja un total de 2 publicaciones mientras que con la "Gramicidin S" y "Acetic acid" la búsqueda arroja un total de 3 publicaciones. La más relacionada con la extracción de gramicidina S es el trabajo de Ninomiya y col. en 2024 que refiere el uso de ácido acético en conjunto con otros disolventes para detectar péptidos mediante espectrometría de masas para lo cual procedieron a la disolución de la gramicidina S en ácido acético entre otros disolventes, pero una vez extraída. Por tanto, el ácido acético no fue utilizado, en este caso, como agente de extracción de la gramicidina S a partir de la biomasa microbiana, sino como solvente para análisis.

Más recientemente se ha recogido la extracción de gramicidina S a partir de biomasa microbiana de *AneuriniBacillus* utilizando tampón fosfato salino (López-Prieto y col., 2012; Lvova y col., 2024), no habiéndose contemplado hasta la fecha la extracción de gramicidina S utilizando biosurfactantes y más específicamente extractos de biosurfactante extraídos de los licores de lavado de maíz.

Por otra parte, en el año 2023, Moldes y col. ha presentado un trabajo en el Congreso organizado por la Sociedad Americana de Químicos en San Francisco (EE. UU.) titulado "Promising green solvents for the production of Gramicidin S biosurfactant extract from *AneuriniBacillus aneurinilyticus* isolated from corn steep liquor" que comprende el uso de etanol o tampón fosfato salino conocido habitualmente como PBS o etanol, no incluyéndose ninguna mención a los agentes extractantes que comprenden ácido láctico, ácido acético o biosurfactantes para la extracción de gramicidina S.

#### 40 **Explicación de la invención**

Se proponen varios procesos para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados tomando como modelo la biomasa de *AneuriniBacillus aneuriniliticus*. El proceso se basa en una extracción física que comprende el uso de distintos disolventes biodegradables y biocompatibles que comprenden ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante obtenido a partir de los licores de lavado de maíz.

#### **Explicación detallada de la invención**

50 En esta invención se ha llevado a cabo la extracción de gramicidina S a partir de biomasa microbiana de *AneuriniBacillus aneuriniliticus* perteneciente al género *AneuriniBacillus* en el que se engloban también otras especies productoras de gramicidina S que comprenden *Bacillus brevis* o *AneuriniBacillus migulanus*. Este microorganismo ha sido aislado de los licores de lavado

de maíz y se encuentra almacenado en la colección española de cultivos tipo de Valencia para uso exclusivo de la Universidad de Vigo.

5 El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la biomasa microbiana consistió en caldo de soja con tripticaseína (TSB) o caldo Sabouraud con dextrosa (SDB). La fermentación se llevó a cabo a 37°C con una agitación de 150 pm.

10 Tras el crecimiento de la biomasa microbiana esta se separó de forma mecánica mediante filtración y/o centrifugación y se lavó con agua hasta obtener un agua exenta de color, para posteriormente proceder a la extracción de gramicidina S con ácido láctico, ácido acético y/o biosurfactantes extraídos de los licores de lavado de maíz. Este extracto se obtuvo siguiendo el protocolo establecido en la patente WO2014/044876.

15 El proceso de extracción se realizó entre 5 minutos y 24 h con una agitación que permitió la completa homogeneización del disolvente con la biomasa microbiana. El proceso se realizó a varias temperaturas hasta 40°C, observándose que a 40°C ya se empieza a producir la polimerización y desnaturalización de la gramicidina S.

20 Los disolventes utilizados comprenden desde disoluciones acuosas de los disolventes (ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante) al 1% v/v, de forma separada o combinados entre ellos hasta el uso de los disolventes puros solos o en combinación. Se observa que disoluciones al 1% v/v, de los disolventes testados (ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante) dar lugar a rendimientos comparables a los obtenidos con etanol puro.

25 En la **Tabla 1** se recogen las condiciones de extracción ensayadas en las que se confirmó la presencia de gramicidina S. Las extracciones se llevaron a cabo en disolución acuosa.

**Tabla 1.** Condiciones de extracción de la gramicidina S

Extractante	Concentración mínima, %	Concentración, máxima, %	Temperatura, °C	Tiempo, min
Ácido láctico	1	85.5	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120
Ácido acético	1	99.7	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120
Extracto biosurfactante	1	5	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120
Ácido láctico + ácido acético	1	85.5 - 100	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120
Ácido láctico + extracto biosurfactante	1	85.5 - 100	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120
Ácido acético + extracto biosurfactante	1	85.5 - 100	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120
Ácido acético + ácido láctico + extracto biosurfactante	01	85.5 - 100	15 - 40	5; 10; 20; 30; 50; 60; 120

30

Para la determinación y caracterización de la gramicidina S se utilizó espectrometría de masas acoplada con cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC), además de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

- 5 Como controles se ha utilizado la gramicidina S comercial (Byosinth), así como la gramicidina S producida a partir de *AneuriniBacillus aneurinilyticus* utilizando como disolvente etanol o etanol combinado con HCl.

La **Fig. 1** recoge de modo general el protocolo seguido y la **Fig. 2** recoge a modo de ejemplo los espectros de masas obtenidos mediante extracción con ácido acético (**Fig. 2A**), láctico (**Fig. 2B**) y extracto biosurfactante (**Fig. 2C**) que se corresponden con extractos de gramicidina S protegidos en esta invención. Además, la **Fig. 3A** contiene los espectros de masas de la gramicidina S comercial y la **Fig. 3B** del extracto de gramicidina S producido con etanol+HCl. Además, a modo de ejemplo en la **Fig. 4A** se recoge el FTIR del extracto de gramicidina S obtenido con ácido acético o ácido láctico al 1% y en la **Fig. 4B** se recoge el FTIR de la gramicidina S donde se puede ver la banda característica del TFA entre 1000 y 1250  $\text{cm}^{-1}$  en comparación con el extracto de gramicidina convencional obtenido con etanol y HCl.

### Breve descripción de los dibujos

20 Para complementar la descripción realizada y para una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos, en los que, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

25 **Fig. 1.** Esquema del proceso propuesto para la obtención de gramicidina S a partir de biomasa de *AneuriniBacillus aneurinilyticus*. En dicho esquema se comienza con un proceso de fermentación de medio TSB o SDB inoculado con *AneuriniBacillus aneurinilyticus* entre 24-168 h a 37°C. Tras el proceso de fermentación se recupera la biomasa microbiana mediante centrifugación y se lava con agua. Posteriormente la biomasa microbiana lavada se somete a un proceso de extracción con ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante obtenido a partir de los licores de lavado de maíz con acetato de etilo. Tras el proceso de extracción la biomasa se separa por centrifugación o filtración obtenido un extracto de gramicidina S disuelto en la matriz extractante que podría ser utilizado directamente disuelto o proceder a su liofilización para obtener un extracto en polvo.

35 **Fig. 2.** Dibujos correspondientes al espectro de masas de extractos de gramicidina S extraídos con: A) ácido láctico (1% v/v); B) ácido acético (1% v/v) y C) extracto biosurfactante (1% v/v) obtenido a partir de los licores de lavado de maíz mediante extracción con acetato de etilo.

40 **Fig. 3.** Dibujos correspondientes a los espectros de masas de: A) gramicidina S comercial y B) extracto de gramicidina S obtenido con la mezcla etanol+HCl.

**Fig. 4.** Espectro de infrarrojo obtenido por transformada de Fourier (FTIR), a modo de ejemplo, de las muestras del: A) extracto de gramicidina S obtenido con los disolventes no convencionales que comprenden ácido acético y ácido láctico y B) de las muestras convencionales de gramicidina S comercial y de la extraída con etanol y HCl (B).

### Realización preferente de la invención

50 Se propone como metodología preferente para la extracción de gramicidina S a partir de biomasa microbiana de *AneuriniBacillus aneurinilyticus* el uso de ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante obtenido según la patente WO2014/044876 con acetato de etilo a concentración de 1%, siendo el tiempo de extracción de 10 minutos, a temperatura ambiente, con una agitación

de 300 rpm, aunque incluso sin agitación se ha observado la presencia de gramicidina S en los extractos, aunque con menor proporción.

5 También de forma alternativa se contemplan combinaciones de ácido láctico (1% v/v), ácido acético (1% v/v) y/o extracto biosurfactante (1% v/v) este último obtenido según lo reivindicando en la patente WO2014/044876 y extraído con acetato de etilo, para la extracción de gramicidina S.

10 El extracto de gramicidina S obtenido tras extracción con ácido láctico comprende además de ácido láctico, gramicidina S y derivados de gramicidina S.

Por otra parte, el extracto de gramicidina S extraído con ácido acético contiene ácido acético, gramicidina S y derivados de gramicidina S.

15 El extracto de gramicidina S producido con el extracto biosurfactante, obtenido a su vez a partir de los licores de lavado de maíz, además de biosurfactante contiene gramicidina S y derivados de gramicidina S.

20 Los extractos de gramicidina S extraídos con combinaciones de ácido acético, ácido láctico y/extracto biosurfactante están compuestos por los agentes extractantes usados, en la proporción seleccionada, a no ser que se lleve a cabo una precipitación ácida para la recuperación de la gramicidina S y derivados excepto cuando se lleva a cabo una precipitación ácida posterior con HCl a 40°C. Los extractos de ácido láctico, ácido acético y/o extracto biosurfactante, que contienen gramicidina S, pueden ser sometidos a precipitación ácida con  
25 ácido clorhídrico siguiendo los métodos de precipitación regulares con el fin de eliminar el disolvente o puede ser liofilizados con el fin de obtener los extractos en polvo.

Respecto a esta invención, los extractos de gramicidina S fueron producidos mediante procesos de extracción novedosos, y dichos extractos contienen componentes diferentes a los obtenidos  
30 con etanol, y en distintas proporciones (véase **Fig. 2 y 3**). Por lo tanto, se pueden considerar todos ellos como extractos distintos, ya que las proporciones de gramicidina S y sus derivados varían, lo que podría resultar en efectos terapéuticos diferentes. Algunos autores señalan que los extractos de gramicidina S producidos biotecnológicamente tienen distinta actividad antimicrobiana según la proporción de estos componentes. Por ejemplo, Alezeni y col. (2017)  
35 descubrieron que la biomasa microbiana de *AneuriniBacillus migulanus* produce dos análogos adicionales de gramicidina S con masas de 1155 y 1169 Da, además de la variante reconocida de gramicidina S con una masa de 1141 Da. En estos análogos, uno o dos residuos de ornitina son sustituidos por lisina en la secuencia peptídica. Estos autores observaron que aquellas cepas de *AneuriniBacillus migulanus* que mostraron una menor eficacia en la inhibición de patógenos  
40 de plantas presentaban una menor proporción del derivado de gramicidina S que contiene lisina.

**REIVINDICACIONES**

1. El procedimiento para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados perteneciente al género *AneuriniBacillus* mediante extracción sólido-líquido utilizando como disolvente ácido láctico a temperatura ambiente preferiblemente menor de 40°C.
2. El procedimiento para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados perteneciente al género *AneuriniBacillus* mediante extracción sólido-líquido utilizando como disolvente ácido acético a temperatura ambiente preferiblemente menor de 40°C.
3. El procedimiento para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados perteneciente al género *AneuriniBacillus* mediante extracción sólido-líquido utilizando como disolvente extracto biosurfactante, obtenido a partir de los licores de lavado de maíz, a temperatura ambiente preferiblemente menor de 40°C.
4. El procedimiento para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados perteneciente al género *AneuriniBacillus* mediante extracción sólido-líquido utilizando como disolvente ácido láctico combinado con ácido acético a temperatura ambiente preferiblemente menor de 40°C.
5. El procedimiento para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados perteneciente al género *AneuriniBacillus* mediante extracción sólido-líquido utilizando como disolvente ácido láctico combinado con extracto biosurfactante, obtenido a partir de los licores de lavado de maíz, a temperatura ambiente menor de 40°C.
6. El procedimiento para la extracción de gramicidina S a partir de *Bacillus* esporulados perteneciente al género *AneuriniBacillus* mediante extracción sólido-líquido utilizando como disolvente ácido acético combinado con extracto biosurfactante, obtenido a partir de los licores de lavado de maíz, a temperatura ambiente preferiblemente menor de 40°C.
7. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con ácido láctico referido en la reivindicación 1 como agente antimicrobiano en la industria cosmética, o agroquímica.
8. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con ácido acético referido en la reivindicación 2 como agente antimicrobiano en la industria cosmética, o agroquímica.
9. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con extracto biosurfactante obtenido de los licores de lavado de maíz, referido en la reivindicación 3 como agente antimicrobiano en la industria cosmética, o agroquímica.
10. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con ácido láctico referido en la reivindicación 1 como antibiótico en la industria farmacéutica.
11. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con ácido acético referido en la reivindicación 2 como antibiótico en la industria farmacéutica.
12. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con extracto biosurfactante obtenido de los licores de lavado de maíz, referido en la reivindicación 3 como antibiótico en la industria farmacéutica.

13. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con ácido acético, ácido láctico y/o extracto biosurfactante extraídos según lo referido en las reivindicaciones 4, 5 y 6 como agente antimicrobiano en la industria cosmética, o agroquímica.
- 5
14. El uso del extracto que contiene el complejo de gramicidina S combinado con ácido acético, ácido láctico y/o extracto biosurfactante extraídos según lo referido en las reivindicaciones 4, 5 y 6 como antibiótico en la industria farmacéutica.
- 10
15. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 1, 2 o 3, tras precipitación ácida, como agente antimicrobiano en la industria cosmética o agroquímica.
- 15
16. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 1, 2 o 3, tras liofilización, como agente antimicrobiano, en la industria cosmética o agroquímica.
17. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 4, 5 o 6, tras precipitación ácida, como agente antimicrobiano en la industria cosmética o agroquímica.
- 20
18. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 4, 5 o 6 tras liofilización, como agente antimicrobiano, en la industria cosmética o agroquímica.
19. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 1, 2 o 3, tras precipitación ácida, como agente antimicrobiano en la industria farmacéutica.
- 25
20. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 1, 2 o 3, tras liofilización, como agente antimicrobiano, en la industria farmacéutica.
- 30
21. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 4, 5 o 6, tras precipitación ácida, como agente antimicrobiano en la industria farmacéutica.
22. El uso del extracto consistente en un complejo de gramicidina S obtenido según reivindicación 4, 5 o 6, tras liofilización, como agente antimicrobiano, en la industria farmacéutica.
- 35

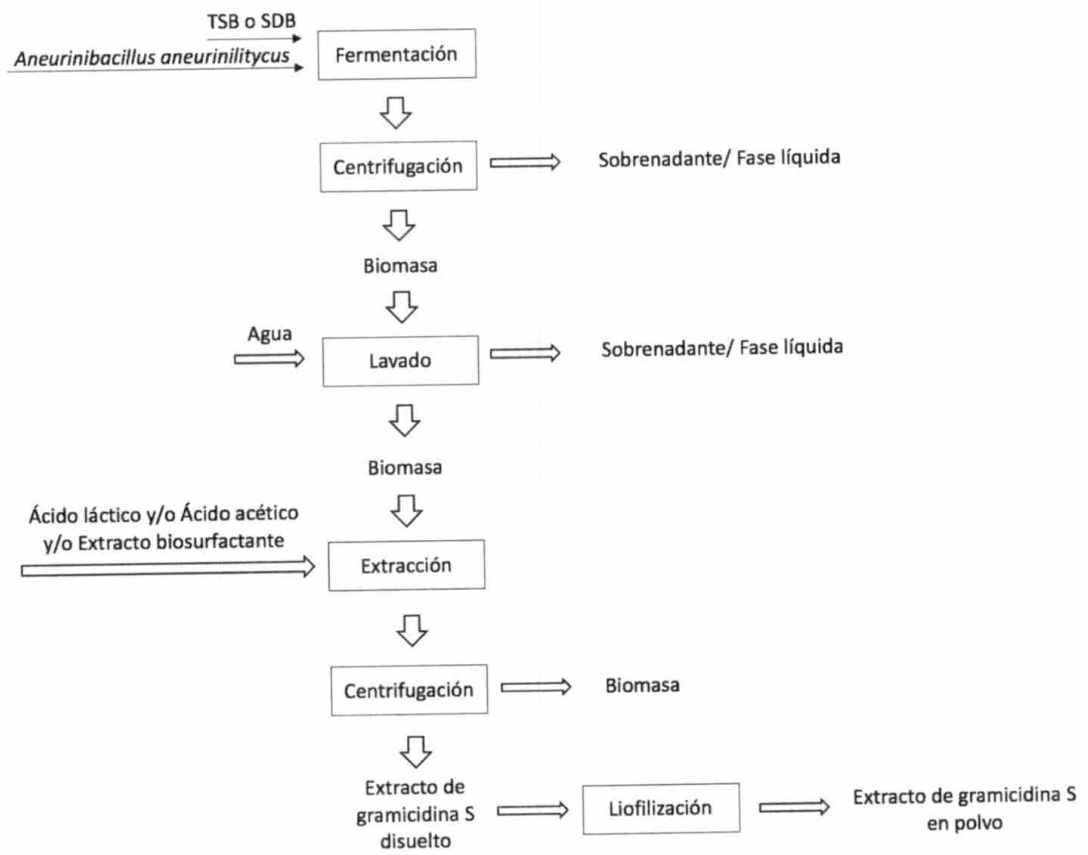


Figura 1

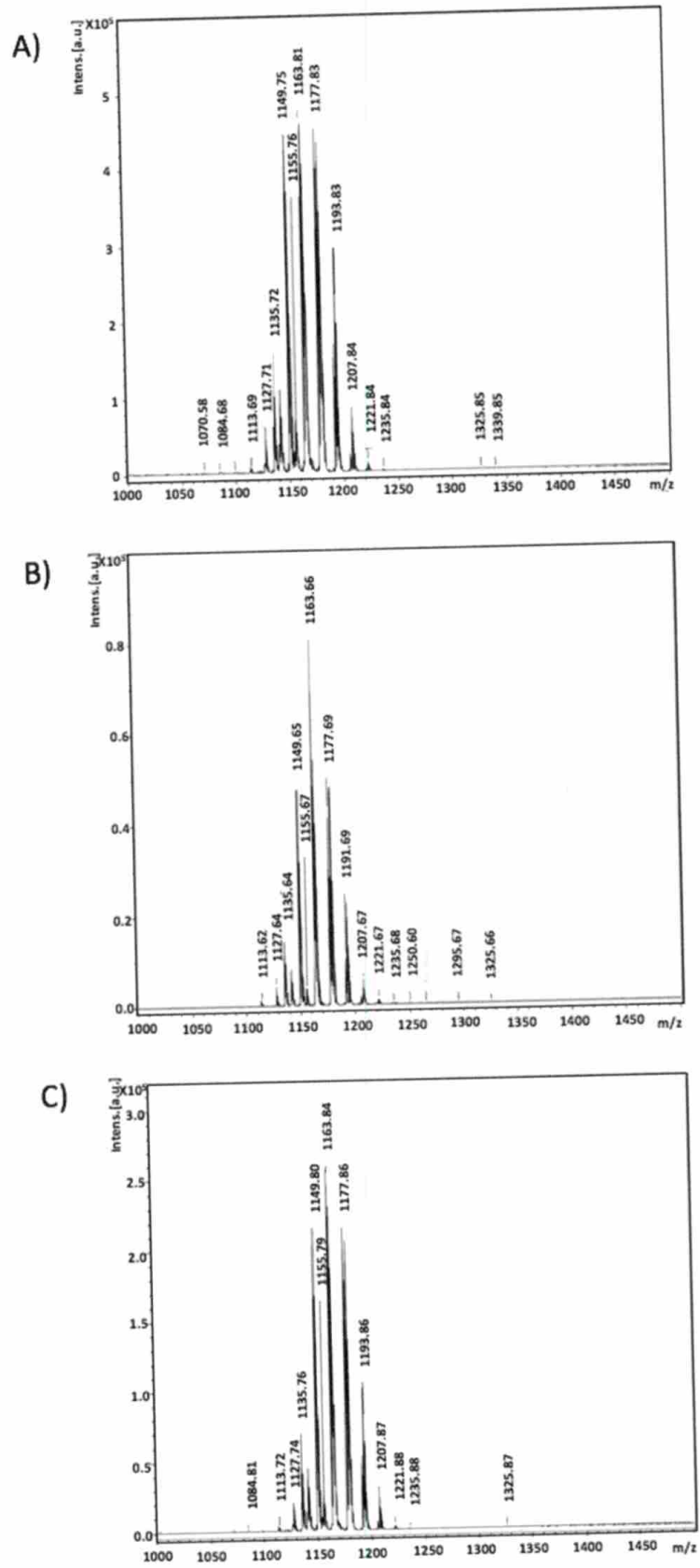


Figura 2

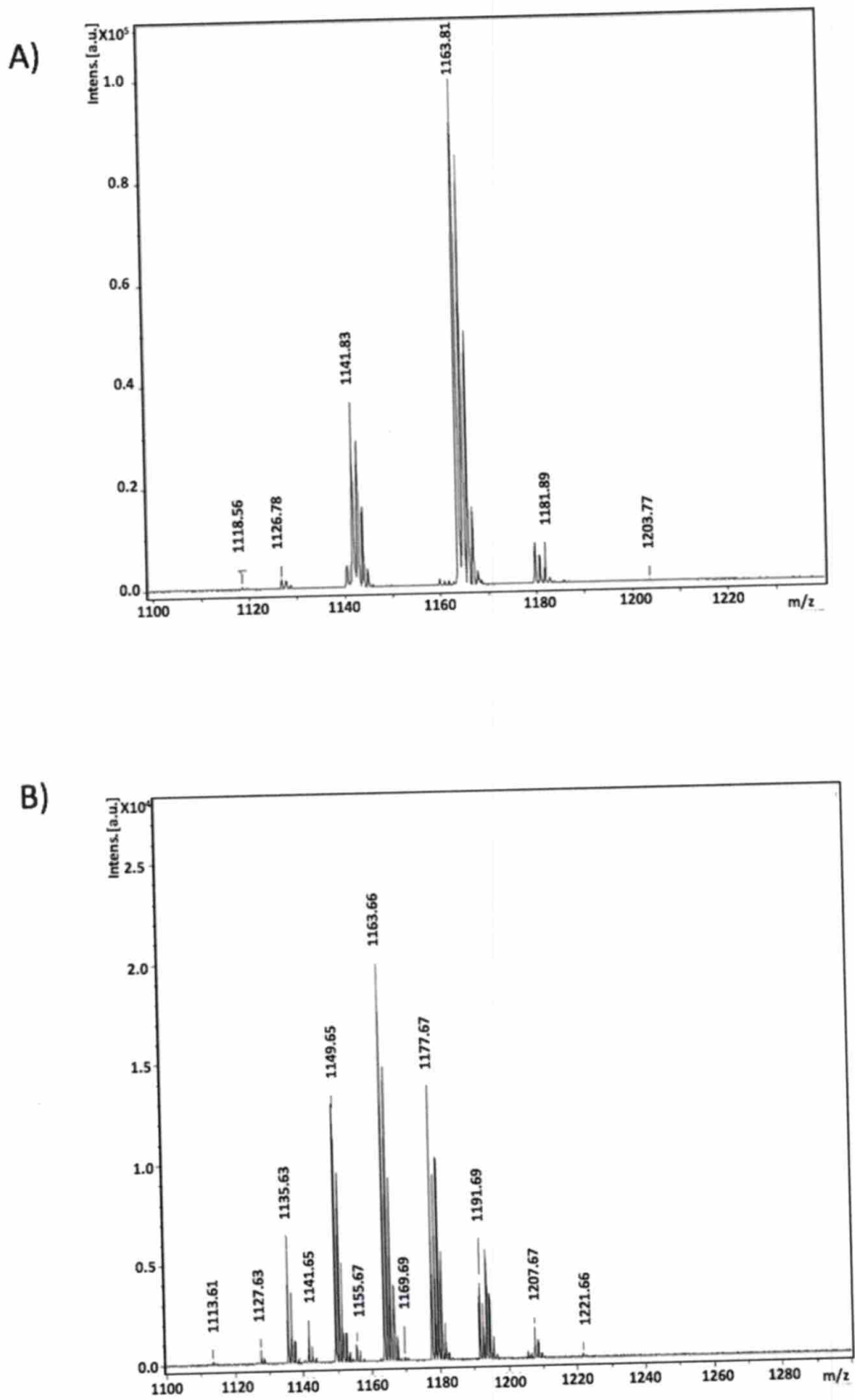


Figura 3

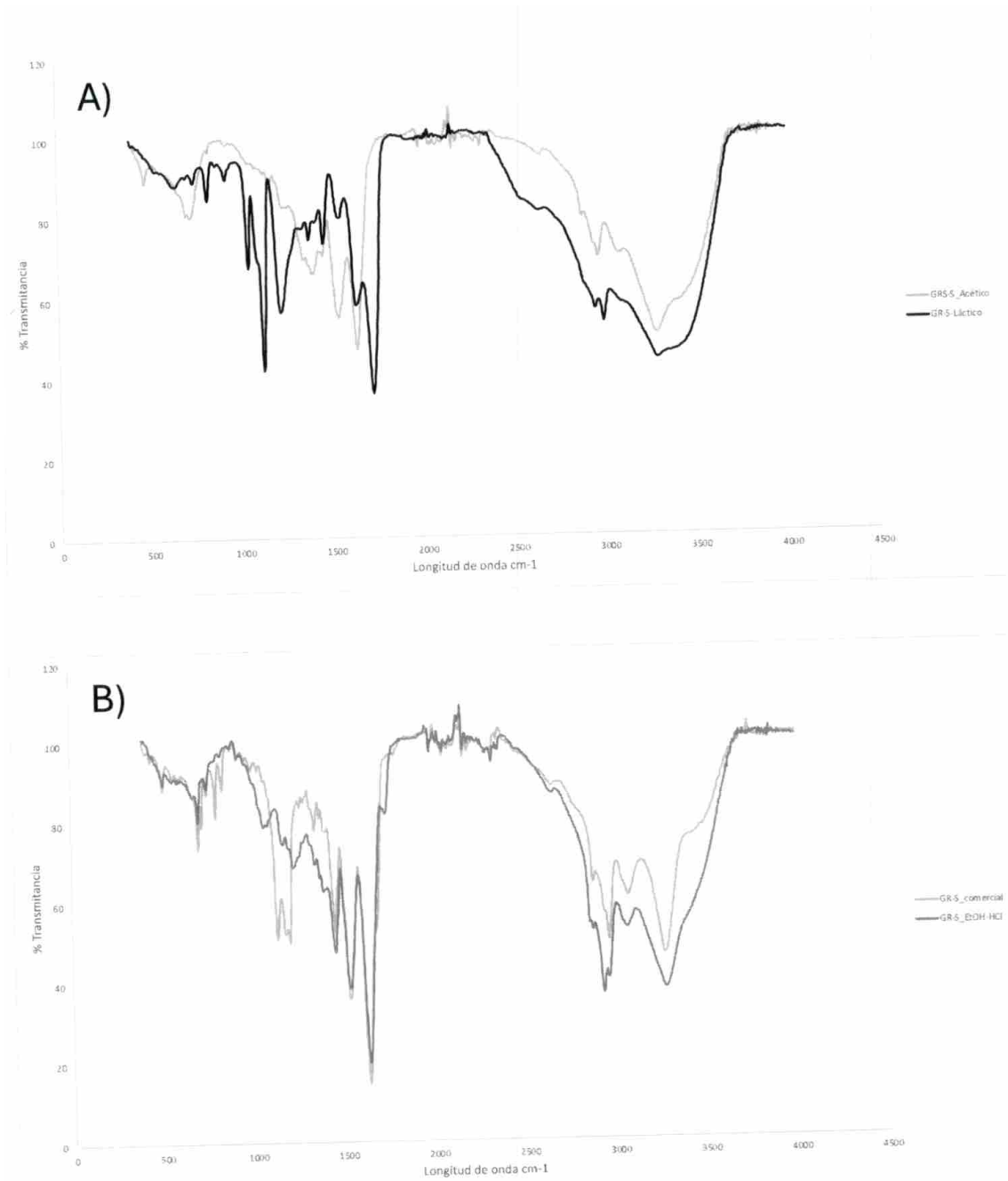


Figura 4



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202400084  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 12.11.2024  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LVOVA, K. et al. Efficient one step extraction process of Gramicidin S from <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> biomass. <i>Frontiers in Bioengineering and Biotechnology</i> , 29/08/2024, vol. 12, artículo n.º: 1452796, ISSN 2296-4185, ISSN 2296-4185 (electronic), DOI: 10.3389/fbioe.2024.1452796 figura 1, sección experimental.	7-22
A		1-6
X	ALENEZI, F. N. et al. Increased biological activity of <i>Aneurinibacillus migulanus</i> strains correlates with the production of new gramicidin secondary metabolites. <i>Frontiers in Microbiology</i> , 2017, vol. 8, artículo n.º 517, ISSN 1664-302X (electronic), DOI: 10.3389/fmicb.2017.00517 apartado "extacción de Gramicidina S de cultivos de <i>A. migulanus</i> ".	7-22
A		1-6
X	LÓPEZ-PRIETO, A. et al. Characterization of extracellular and cell bound biosurfactants produced by <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> isolated from commercial corn steep liquor. <i>Microbiological Research</i> , 2021, vol. 242, artículo n.º 126614, ISSN 0944-5013, DOI: 10.1016/j.micres.2020.126614 apartados 2.3, 3.2	7-22
A		1-6
X	EP 3660141 A1 (JOINT STOCK COMPANY VALENTA PHARMACEUTICALS) 03/06/2020 ejemplo 2.	7-22
A		1-6
A	OKUDA, K. et al. Biosynthesis of gramicidin and tryocidine in the Dubos strain of <i>Bacillus brevis</i> . I. Experiments with growing cultures. <i>Journal of Bacteriology</i> , 1963, vol. 85, páginas 329-338, ISSN 0021-9193.	1-22

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
29.08.2025

Examinador  
A. I. Polo Diez

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12P21/00** (2006.01)

**C12N1/20** (2006.01)

**C07K7/66** (2006.01)

**B01D11/02** (2006.01)

**C12R1/07** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12N, C07K, B01D, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, INTERNET