

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 623**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 15/01** (2006.01)  
**A23K 1/00** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**A23L 1/226** (2006.01)  
**C12R 1/125** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07111939 .0**  
96 Fecha de presentación: **06.07.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2011858**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Composición de bacilos resistente a la bilis con altos niveles de secreción de fitasa**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.09.2012**

73 Titular/es:  
**Chr. Hansen A/S**  
**Boge Allé 10-12 P.O. Box 407**  
**2970 Horsholm, DK**

72 Inventor/es:  
**Knap, Inge;**  
**Knarreborg, Ane;**  
**Leser, Thomas Dyrmann y**  
**Lund, Bente**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 387 623 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición de bacilos resistente a la bilis con altos niveles de secreción de fitasa.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a una composición de bacilos caracterizada por la rápida germinación y crecimiento en las sales de bilis (entorno intestinal simulado) y por el alto nivel de secreción de fitasa. La composición de bacilos se puede utilizar como suplemento en el pienso de animales donde éste tiene un efecto probiótico (promoción de salud y crecimiento) y mejora la digestión y la disponibilidad de nutrientes de los piensos para animales.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 [0002] Las bacterias probióticas tales como el *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se usan en la industria de piensos para animales como complemento de la dieta. Su uso está relacionado con la capacidad de bacilos para reemplazar o reducir el uso de antibióticos, que se usan como promotores de crecimiento en la industria de piensos para animales.

20 [0003] Christian Hansen A/S, Dinamarca comercializa un ejemplo de tal producto de promoción de crecimiento probiótico bajo el nombre comercial GalliPro® (depositado como DSM 17231). GalliPro® es una composición de esporas de *Bacillus subtilis*.

25 [0004] Además del modo sugerido de acciones (p. Ej. modulación inmunológica, modificador de flora intestinal) los probióticos bacilos son capaces de producir muchos componentes beneficiosos, tales como enzimas, que se excretan en el tubo gastrointestinal (GI) cuando se usan como suplemento de pienso para animales. Las enzimas como la fitasa se excretan y mejoran la digestión y la absorción del pienso animal (facilitan la digestión). La dieta (pienso) es principalmente de origen vegetal como granos, maíz, semillas de soja, aceite de soja y aminoácidos. Todos estos efectos contribuyen a la producción de productos para animales rentables. Uno de las muchas enzimas usadas en la industria del pienso para animales es la fitasa. La fitasa se aplica para mejorar la digestión del fósforo en dietas de animales. El fitato es la forma predominante del fósforo en cereales, semillas oleaginosas y leguminosas. No obstante, los animales monogástricos, tales como los cerdos, las aves y los peces, utilizan mal esta fuente de fosfato ya que les falta la enzima de tracto gastrointestinal requerida para liberar el fosfato del compuesto orgánico del fitato. En consecuencia, una gran proporción de fitato en el pienso consumido pasa a través del tracto GI y se excreta en el abono. En entornos de suelo y agua se efectúa la liberación catalizada del fosfato, y el fitato del abono posee un serio problema de contaminación de fósforo contribuyendo a la eutrofización de las aguas de superficie. Además, los productores deben usar un suplemento de fósforo para pienso costoso para satisfacer las necesidades dietéticas de los animales. Además, el fitato tiene propiedades anti-nutritivas que incluyen la formación de compuestos con proteínas y cationes bivalentes, que reducen su biodisponibilidad. Existe documentación sobre el hecho de que la suplementación de fitasa mejora el uso de fosfato en la producción de animales monogástricos, y que tiene un efecto positivo en la biodisponibilidad de los minerales. Las esporas de bacilos pueden pasar la barrera ácidogástrica y germinar y crecer en el tubo gastrointestinal (GI) de los animales. Esto tiene grandes ventajas, ya que cuando se ingieren éstas pueden segregarse numerosos tipos de componentes beneficiosos, por ejemplo bacteriocinas y también excretar enzimas útiles tales como la fitasa. Por otra parte, las esporas de bacilos son termoestables durante el proceso de granulación del pienso y son en consecuencia un excelente sistema de entrega para introducir ambas bacteriocinas y enzimas en el GI.

50 [0005] En el proceso de supervivencia y de proliferación de bacilos en el GI, la función de la bilis es importante. La bilis se produce en el hígado y se almacena en la vesícula biliar. La bilis contiene agua, lecitina, bilirrubina y biliverdina y sales de bilis.

[0006] Se conoce por la literatura que la bilis tiene algunas influencias negativas en la supervivencia y germinación y segregación de las esporas de bacilos en las células vegetativas en el GI de los animales. Por lo que se sigue investigando para encontrar probióticos de bilis resistentes a las cepas de bacilos.

55 [0007] El artículo (Antoine Van Leeuwenhoek. Agosto 2006; 90(2): 139-46. Epub 4 Julio, 2006) describe el aislamiento de un número de muestras/célula de bacilos procedentes directamente del intestino de pollos. Las células aisladas de bacilos fueron probadas para determinar la actividad probiótica. Los seis bacilos de mayor actividad probiótica se probaron para determinar la resistencia a sales biliares y se descubrió que un bacilo específico altamente probiótico tiene un nivel relativamente alto de resistencia a sales biliares. En este artículo no se presta especial atención a cualquier período de tiempo para la prueba de resistencia a bilis. En la parte experimental las células de esporas de bacilos se probaron simplemente para evaluar la resistencia después de 5 días de presencia en sal biliar (ver párrafo "Pequeña prueba de tolerancia en fluido intestinal simulado" en página 141).

65 [0008] El documento estadounidense 2003/0124104A describe que las endosporas probióticas convencionales de bacilos son sensibles a la baja concentración de sales biliares, es decir que la germinación y/o rehidratación de

5 esporas se inhibe por la presencia de concentraciones incluso bajas de sales biliares. Esto se contradice con otras bacterias tales como patógenos entéricos, tales como *E coli* o el *S. aureus* (ver sección [0014] a [0015]). En vista de esto se sugiere examinar/seleccionar las células de esporas de bacilos que son resistentes a la actividad inhibitoria de las sales biliares, y como resultado, germinan en células vegetativas, para colonizar después el colon (ver [0019]). Los ejemplos prácticos están todos presentes y no se proveen datos experimentales reales de células específicas de bacilos examinadas realmente en la descripción. Además las condiciones de selección de sales biliares se describen relativa y genéricamente. En particular no se proveen indicaciones de ningún período de tiempo para las selecciones de resistencia a bilis. En otras palabras, en base a la única enseñanza amplia/genérica de este documento, se pueden seleccionar células de bacilos que sólo pueden crecer (germinar) lentamente, es decir que son capaces de germinar de esporas en células vegetativas por ejemplo después de 20 horas en presencia de una cantidad importante de sal biliar.

15 [0009] En este documento no hay descripción o sugerencia para seleccionar células de bacilos que puedan crecer (germinar) rápidamente, es decir capaces de germinar y crecer de esporas en células vegetativas alcanzando un punto de crecimiento definido en un intervalo de tiempo determinado en presencia de una cantidad importante de sal biliar.

20 [0010] En resumen, las referencias a la técnica anterior acerca de la selección/visión de células de bacilos resistentes a la bilis no se centran en el rápido crecimiento/germinación de células de esporas en células bacilos vegetativas.

25 [0011] La técnica anterior describe varios sistemas de pruebas/selección para la selección de cepas de bacilos que producen enzimas de fitasa. Un ejemplo es el documento estadounidense 6255098 en el que se identifican las cepas de bacilos que producen enzimas de fitasa. No se menciona nada sobre la resistencia biliar de las cepas de bacilos identificadas.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

30 [0012] El problema a resolver por la presente invención es proporcionar una composición de bacilos que segregue altas cantidades de fitasa en el tubo gastrointestinal (GI) de un animal.

[0013] La solución se basa en que los presentes inventores han desarrollado un método de selección nuevo para la identificación de nuevas composiciones de bacilos mejoradas.

35 [0014] Un nuevo paso importante del nuevo método de selección descrito aquí es específicamente examinar/seleccionar las células de esporas de bacilos con una velocidad mejorada/rápida de germinación y crecimiento a partir de esporas en células vegetativas en presencia de sales biliares.

40 [0015] Como se ha descrito anteriormente, la técnica anterior ha descrito métodos para la selección de células de bacilos capaces de crecer en presencia de sales biliares, pero los métodos de examen/selección de técnica anterior no se centran en la velocidad de germinación y crecimiento en presencia de sal biliar. Por consiguiente, las células de bacilos resistentes a la bilis seleccionadas según la técnica anterior no germinan y crecen lo suficientemente rápido para cumplir la velocidad de germinación y el criterios de crecimiento tal y como se describe aquí. Por ejemplo, las células de bacilos aisladas directamente del intestino de pollos por ejemplo (como descrito por ejemplo en el artículo de Antoine Van Leeuwenhoek mencionado anteriormente) en el entorno del intestino no se seleccionaron (bajo presión natural) para germinar y crecer rápidamente en el intestino.

50 [0016] Como se muestra en estos ejemplos prácticos esto también es real para la composición comercial disponible de Bacillus GalliPro<sup>®</sup>, que simplemente germina y crece demasiado despacio y no alcanza el punto de crecimiento definido en las 20 primeras horas en presencia de niveles fisiológicos de sales biliares para cumplir con los criterios de velocidad de germinación y crecimiento tal y como se ha descrito aquí. GalliPro<sup>®</sup> es una composición de *Bacillus subtilis* comercialmente exitosa.

55 [0017] El nuevo DSM 19467 descrito aquí se seleccionó usando GalliPro<sup>®</sup> como cepa de inicio y un método de presión selectiva y un aislamiento posterior para la rápida germinación y crecimiento de esporas en células vegetativas en presencia de sal biliar como se describe en la presente. Ver por ejemplo la tabla 1 para más detalles (GalliPro<sup>®</sup> puede se también denominar aquí DSM 17231). En la Figura 1 esto se ilustra esquemáticamente.

60 [0018] En resumen, se cree que ninguna técnica anterior describe una composición de bacilos aislada, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g de células de bacilos, donde las células de la composición de bacilos cumplen con la rápida germinación y crecimiento en presencia del criterio de sal biliar descrito aquí.

65 [0019] Sin limitarse a la teoría, los presentes inventores han identificado que la rápida germinación y crecimiento es un aspecto muy importante de la invención ya que las esporas de bacilos, que son resistentes a la bilis pero no germinan ni crecen lo suficientemente rápido, serán excretadas antes de cualquier característica positiva, tal como la producción de fitasa, que se puede realizar en cantidades significativas por las células vegetativas de bacilos. Las

esporas de bacilos de germinación demasiado lenta pasarán simplemente por el tubo gastrointestinal (GI) antes de que las bacterias puedan producir cualquier cantidad significativa por ejemplo de fitasa.

[0020] Después de un número de pruebas y análisis detallados, los inventores eligen por lo tanto trabajar con un intervalo de tiempo de hasta 20 horas y seleccionan las esporas de mayor germinación y crecimiento en este período de tiempo en presencia de altas concentraciones fisiológicas de sales biliares. Sin limitarse a la teoría y en base al trabajo experimental detallado descrito aquí, los presentes inventores han identificado que es importante tener una rápida germinación y crecimiento en las primeras 18 y 19 horas en presencia de 4 y 6 mM de sales biliares, respectivamente.

[0021] Los presentes inventores identificaron después que un vez que las células de bacilos, de rápida germinación y crecimiento en el medio de sal biliar, se seleccionaron, estas células son extremadamente útiles como células de inicio en la mutagénesis para obtener nuevas células con una producción mejorada de fitasa.

[0022] Como se muestra en la figura 1 y la tabla 2, la cepa seleccionada resistente a la bilis de crecimiento rápido, DSM 19467, se utilizó como cepa de inicio para una mutación tradicional y se seleccionó la cepa de alta producción de fitasa DSM 19489. De forma similar, se creó una cepa DSM 19466 de Organismo Modificado Genéticamente (OMG) usando la DSM 19467 como cepa de inicio. Como se puede observar en la tabla 2 y la descripción relacionada del ejemplo 4, DSM 19489 y DSM 19466 producen significativamente más fitasa que la DSM 19467 y GalliPro®. Las cepas de alta producción de fitasa DSM 19489 y DSM 19466 fueron controladas de nuevo por su capacidad para germinar y crecer rápidamente tal y como se describe aquí y éstas mantenían la rápida germinación y crecimiento de la cepa seleccionada resistente a la bilis de rápido crecimiento DSM 19467 (véase el ejemplo 5). En la figura 1 esto se ilustra esquemáticamente.

[0023] Las nuevas células probióticas de bacilos descritas son por lo tanto las que son resistentes a la bilis, de germinación y crecimiento rápidos, y éstas excretan altas cantidades de fitasa. Las cepas obtenidas son extremadamente útiles como composiciones probióticas de bacilos para la adición al pienso para animales. Combina todas las aptitudes beneficiosas de las bacterias probióticas para sobrevivir y proliferar en el intestino de los animales (con altos niveles de sales biliares presentes), para inhibir bacterias patógenas (producción de bacteriocinas), y adicionalmente para excretar altas cantidades de fitasa y útiles también para la digestión y absorción de fósforo disponible a partir de fitato.

[0024] Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición de bacilos, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g de células de esporas de bacilos, donde la composición de bacilos se caracteriza por el hecho de que:

(i): las esporas de bacilos tienen una rápida germinación y crecimiento de espора en célula vegetativa en presencia de un medio de sal biliar comprendiendo 4 mM de sales biliares y en presencia de un medio de sal biliar comprendiendo 6 mM de sales biliares, definido por el hecho de que las esporas de bacilos alcanzan un punto de crecimiento celular vegetativo de 0,4  $DO_{630}$  en menos de 18 y 19 horas, respectivamente, donde el punto de crecimiento celular vegetativo es el punto en la curva de crecimiento donde el valor DO empieza a aumentar (debido al crecimiento de las células vegetativas) de forma continua y alcanza un  $DO_{630}$  de 0,4;

(I): donde el medio de sal biliar es el medio no selectivo de Caldo de Infusión de Ternera (VIB) del ejemplo 1 con un suplemento de una mezcla de sales biliares comprendiendo sales biliares conjugadas con taurodeoxicolato y glicodeoxicolato y el deoxicolato de sales biliares desconjugadas en las proporciones de 60% de taurodeoxicolato, 30% de glicodeoxicolato y 10% de deoxicolato; y

(II): donde el análisis de ensayo OD se realiza según las siguientes fases:

(a): rellenado de un pocillo en una placa de microtitulación con 0,150 ml de medio de sales biliares con  $10^8$  esporas de bacilos por ml de medio (es decir en tiempo cero); y

(b): incubación de la placa a 37°C en condiciones atmosféricas y medida de los valores  $OD_{630}$ , usando un espectrofotómetro y la agitación antes de cada lectura, para obtener una curva de crecimiento representativa a lo largo del tiempo;

y

(ii) las células vegetativas de bacilos están produciendo fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más que la célula de bacilos de referencia DSM 19467, donde la cantidad de fitasa producida se mide por el ensayo estándar de fitasa del ejemplo 2 después de 4 horas de crecimiento a 37°C en el conocido medio estándar de Caldo de Infusión de Corazón (HIB) no selectivo del ejemplo 2; y donde el análisis del ensayo de fitasa se realiza según las siguientes fases:

a): realización de un cultivo durante toda la noche de células vegetativas de bacilos en un medio de cultivo enriquecido; y

(b): transferencia de un 1% inóculo del cultivo dejado toda la noche al medio HIB (es decir en tiempo cero) e incubación a 37°C hasta la medición de la actividad de fitasa.

5 [0025] Como se ha mencionado anteriormente, la célula de bacilos de referencia DSM 19467 se selecciona para la rápida germinación y crecimiento en presencia de sales biliares usando GalliPro® como cepa de inicio. La DSM 19467 no se selecciona para la producción mejorada de fitasa. Sin limitarse a la teoría, se cree que la producción relevante de fitasa de DSM 19467 corresponde a GalliPro®. En relación con el punto (i), el punto de crecimiento celular vegetativo del GalliPro® es de al menos 20 horas después de la incubación en 4 y 6 mM de sales biliares y para la nueva cepa DSM 19489, como descrita aquí, después de 14 y 15 horas en 4 y 6 mM de sales biliares, respectivamente (ver Figura 2 y ejemplo práctico 3 de la presente).

10 [0026] Conviene aquí observar que los presentes inventores probaron también el producto CALSPORIN®  
 15 comercialmente disponible (Calpis Co., Ltd., Japón) para determinar el punto de crecimiento celular vegetativo en las condiciones del punto (i) del primer aspecto. Al igual que GalliPro®, el producto comercial CALSPORIN® es una composición de *Bacillus subtilis* utilizada como aditivo de pienso probiótico. El punto de crecimiento celular vegetativo en las condiciones del punto (i) del primer aspecto para el CALSPORIN® era superior a 20 horas en 4 y  
 20 6mM de sales biliares, respectivamente. Esto es considerablemente superior a las 18 y 19 horas requeridas en el punto (i) y esto ilustra que los productos comercialmente disponibles no se han seleccionado hasta ahora para la rápida germinación y crecimiento. Como se ha mencionado anteriormente, las células "naturales" de bacilos no se han sometido a ninguna presión selectiva para obtener una rápida germinación y crecimiento. Sin limitarse a la teoría, se cree que las células "naturales" de bacilos no están cumpliendo con las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

25 [0027] Ambos, la resistencia a la bilis [del punto (i)] y el ensayo de fitasa [del punto (ii)] se basan en elementos estándar conocidos comercialmente disponibles (tales como por ejemplo medios estándar, sales biliares; mediciones estándar OD y pruebas estándar). La célula de bacilos de referencia se registra como DSM 19467 y por lo tanto es disponible al público. La célula de *Bacillus subtilis* GalliPro® se registra como DSM 17231 (llamada "GalliPro®") y por lo tanto es disponible al público.

30 [0028] Por consiguiente, en base a la descripción detallada de ensayo (véase por ejemplo el ejemplo 1 sobre el ensayo de resistencia a la bilis y el ejemplo 2 sobre el ensayo de fitasa) el experto en la materia es habitualmente capaz de repetir estos ensayos para determinar objetivamente si una célula de bacilos específica de interés cumple con los niveles de resistencia a la bilis [del punto (i)] y niveles de fitasa [del punto (ii)] del primer aspecto de la invención.

35 [0029] La nueva composición de bacilos tal como descrita aquí se puede utilizar como un suplemento probiótico para el pienso para animales. La dosis y la administración se puede obtener según la técnica como se realiza por ejemplo en la técnica anterior de composiciones de *Bacillus* GalliPro®.

40 [0030] Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar a un animal comprendiendo la administración de la composición de bacilos del primer aspecto y formas de realización relativas descritas aquí para un animal conjuntamente con otros ingredientes de piensos para animales.

[0031] Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para seleccionar y aislar una nueva célula de bacilos comprendiendo las siguientes fases de:

- 45 (a): selección y aislamiento de una agrupación de esporas de bacilos individuales de una nueva célula de esporas de bacilos capaz de germinar y crecer tan rápidamente que puede alcanzar un punto de crecimiento de célula vegetativa en menos de 18 y 19 horas en las condiciones del punto (i) del primer aspecto;
- 50 (b): realización de una célula de bacilos vegetativa a partir de la célula de esporas aislada de fase (a) y mutación de la nueva célula aislada y seleccionada para obtener una agrupación de nuevas células vegetativas de bacilos individuales;
- (c): selección y aislamiento a partir de la agrupación de nuevas células vegetativas de bacilos individuales de fase (b) de una nueva célula vegetativa de bacilos capaz de producir fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más que la célula de bacilos de referencia registrada como DSM número de registración 19467  
 55 en las condiciones del punto (ii) del primer aspecto; y
- (d): análisis de la alta producción de células vegetativas de bacilos de fase (c) para confirmar que se ha mantenido la rápida germinación y crecimiento de fase (a) y aislamiento de la célula de bacilos seleccionada.

60 [0032] Es evidente para el experto en la materia que una vez que los inventores han revelado los ensayos de prueba pertinentes (en particular el ensayo para probar la rápida germinación y crecimiento del ejemplo 1) además de la cepa de referencia DSM 19467, será un trabajo rutinario para el experto en la materia seleccionar otras nuevas células de bacilos que cumplan con el criterio del primer aspecto citado.

65 [0033] Como se ha citado anteriormente, usando el nuevo método de examen/selección descrito aquí, los inventores han seleccionado y aislado un número de células nuevas de bacilos mejoradas, que han sido registradas.

[0034] Por consiguiente, un cuarto aspecto de la invención se refiere a una célula de bacilos seleccionada en el grupo que consiste en:

- (a) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19467;
- (b) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19489 y
- (c) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19466;

o una cepa mutante de éstas, donde la cepa mutante se obtiene usando una de las cepas registradas como materia prima y donde la cepa mutante retiene las propiedades esenciales de la cepa registrada donde, en caso de mutantes de la célula de *Bacillus subtilis* de (a), dichas propiedades esenciales son:

- (i): la característica de rápida germinación y crecimiento del punto (i) del primer aspecto de la invención; y
- (ii): la producción de fitasa en una cantidad al menos del nivel de DSM 19467 y donde, en caso de mutantes de la célula de *Bacillus subtilis* de (b) y (c), dichas propiedades esenciales son:

- (i): la característica de rápida germinación y crecimiento del punto (i) del primer aspecto de la invención; y
- (ii): la producción de fitasa en una cantidad del punto (ii) del primer aspecto de la invención.

[0035] La forma de realización de la presente invención se describe más abajo, sólo en forma de ejemplos.

#### DEFINICIONES

[0036] Todas las definiciones de los términos relevantes corresponden a lo que el experto en la materia entenderá con respecto al contexto técnico pertinente.

[0037] El término “célula de bacilos” se refiere a una espora de bacilos y a una célula vegetativa de bacilos.

[0038] El término “espora de bacilos” en relación con la espora de bacilos se refiere a una espora que según la técnica se puede caracterizar por una estructura aletargada, resistente, no reproductiva producida por bacterias de bacilos. La función primaria de las esporas es generalmente asegurar la supervivencia de una bacteria en los períodos de estrés ambiental. Son por lo tanto resistentes a radiación gamma y ultravioleta, deshidratación, liozima, temperatura, inanición, y desinfectantes químicos. Las esporas se encuentran comúnmente en el suelo y el agua, donde pueden sobrevivir largo períodos de tiempo. El revestimiento de la espora es impermeable a muchas moléculas tóxicas y puede también contener enzimas que se implican en la germinación. El núcleo tiene estructuras celulares normales, tales como ADN y ribosomas, pero está metabólicamente inactivo. Cuando una bacteria detecta que las condiciones medioambientales se vuelven desfavorables esta puede iniciar el proceso de esporulación, que dura sobre ocho horas.

[0039] El término “célula vegetativa de bacilos” se refiere a células de bacilos vegetativas funcionales, que puede dividirse para producir más células vegetativas.

[0040] El término “germinación y crecimiento” se refiere a que las esporas de bacilos germinan y crecen para convertirse en células vegetativas de bacilos. Como sabe el experto en la materia la reactivación de la espora se produce cuando las condiciones son favorables e implica la germinación y el crecimiento. La germinación implica que la espora latente empieza la actividad metabólica y entra así en estado de hibernación. Está comúnmente caracterizado por la rotura o absorción del revestimiento de la espora, hinchamiento de la espora, un aumento en la actividad metabólica, y la pérdida de resistencia a la tensión ambiental. El crecimiento le sigue a la germinación e implica al núcleo de la espora en la fabricación de nuevos componentes químicos y se retira el revestimiento de la antigua espora para desarrollarse en una célula bacteriológica vegetativa funcional, que puede dividirse para producir más células. Las curvas de crecimiento (DO a lo largo del tiempo) de células de bacilos presentan diferentes fases de crecimiento. Cuando las esporas se transfieren a un medio nutriente rico la germinación se inicia seguida de una reducción temporal en la DO (fase I), que se debe a la liberación de ácido dipicolínico y consecuentemente la hidratación del revestimiento de espora. En la segunda fase (fase II = fase de crecimiento) hay un período con un cambio relativamente pequeño en la DO, hasta que las esporas se desarrollan en células bacteriológicas funcionales vegetativas, que se pueden dividir para producir más células y dar así un aumento continuo en el valor DO. El punto cuando una comienza a obtener el aumento continuo en los valores DO que alcanzan una DO de 0,4, aquí se denomina “punto de crecimiento celular vegetativo”.

[0041] El término “densidad óptica” se define como una medida de la absorbancia óptica usando un espectrofotómetro. La densidad óptica (DO) ¿es la absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada? por distancia de unidad. Si la DO por ejemplo la longitud de onda medida es 630 mM se puede referir a ella como OD<sub>630</sub>.

## DIBUJOS

[0042]

Figura 1: en esta figura se ilustran los pasos para obtener nuevas cepas mejoradas. Los ejemplos prácticos empezaron con DSM 17231 (GalliPro®), que se mutó tradicionalmente y se revisó/seleccionó para la rápida germinación y crecimiento en presencia de sal biliar para obtener la nueva cepa seleccionada DSM 19467. La DSM 19467 se utilizó como cepa de inicio para la mutación tradicional y la cepa de alta producción de fitasa DSM 19489 fue seleccionada. De forma similar se generó una cepa DSM 19466 de un organismo genéticamente modificado (OGM) usando la DSM 19467 como cepa de inicio.

Figura 2a y 2b: estas figuras muestran claramente la rápida germinación mejorada y crecimiento de las esporas de bacilos DSM 19489 de la presente invención comparadas con la DSM 17231 en presencia de 4 y 6 mM sal biliar como se describe en este caso.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Composición de bacilos:

[0043] El término “composición de bacilos” debe ser entendido según la técnica. Aquí es entendido como una composición de Bacillus que comprende un número de esporas de Bacillus con una característica de interés.

[0044] La composición de bacilos puede comprender diferentes tipos de células de bacilos (p. Ej. B. subtilis y *Bacillus licheniformis*). En esencia, la composición debe simplemente comprender la cantidad de esporas de bacilos dadas en el primer aspecto, donde las células de bacilos cumplen el criterio dado en el primer aspecto.

[0045] Como sabe el experto en la materia, las composiciones de espora de bacilos comercialmente relevantes se generan normalmente por fermentación. Las esporas obtenidas generalmente se concentran, se deshidratan, se mezclan con un portador y se meten en un contenedor adecuado.

[0046] Las células de bacilos relevantes por ejemplo de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g en la composición pueden estar presentes de una forma comercialmente relevante para el experto en la materia.

[0047] Por consiguiente, en una forma de realización las esporas de bacilos  $10^6$  a  $10^{12}$  UFC/g en la composición están presentes como células deshidratadas (p. Ej. Deshidratación por pulverización). También puede estar presentes como esporas congeladas.

[0048] La composición de bacilos puede también comprender de  $10^6$  a  $10^{12}$  UFC/g esporas de bacilos, más preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{12}$  UFC/g esporas de bacilos. El término “UFC/g” se refiere al peso del gramo de la composición así como, incluyendo aditivos adecuados pertinentes presentes en la composición. No incluye el peso de un contenedor adecuado usado para guardar la composición de bacilos.

[0049] La composición de bacilos se puede guardar en un contenedor adecuado.

[0050] Como sabe el experto en la materia una composición bacteriológica comercialmente pertinente generalmente también comprende otros aditivos pertinentes tales como por ejemplo un portador/ingrediente del grupo de lactosuero, lactosuero permeado, carbonato/caliza de calcio y antiaglomerantes tales como silicatos de aluminio y diatomita (tierra de diatomeas).

[0051] Junto a las células de bacilos relevantes la composición también puede comprender otros microorganismos pertinentes de interés tales como por ejemplo bacterias del ácido láctico de interés.

Célula de bacilo

[0052] La célula de bacilo puede ser cualquier célula de bacilo pertinente de interés.

[0053] La célula de bacilo puede al menos ser una célula de bacilo seleccionada de unas cepas de bacilo seleccionadas del grupo que consiste en:

*Bacillus subtilis*, *Bacillus uniflagellatus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laterosporus BOD*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, y *Bacillus sterothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Thermophilus de bacillus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus circulans*.

[0054] En una forma de realización preferida la célula de bacilo es una célula B. subtilis.

Ensayo para seleccionar la rápida germinación y crecimiento en presencia de sal biliar.

[0055] Como se ha mencionado anteriormente el ensayo de resistencia a la bilis del punto (i) del primer aspecto se

basa en los elementos estándar conocidos comercialmente disponibles (tales como por ejemplo medios estándar, sales biliares; mediciones DO estándar).

5 [0056] Por consiguiente, basado en la descripción del ensayo detallado aquí (ver por ejemplo 1) el experto en la materia es rutinariamente capaz de repetir este ensayo para determinar objetivamente si una espora de bacilos específica de interés cumple con el criterio de la rápida germinación y crecimiento de espora a célula vegetativa como se describe en el punto (i).

10 [0057] En el punto (i) se explica que el punto de crecimiento celular vegetativo es el punto en un inicio de curva de crecimiento con  $10^8$  esporas/ml que corresponde a una DO de alrededor de 0,2-0,3 hasta que el tiempo donde el valor DO ha aumentado (debido al crecimiento de las células vegetativas) de forma continua y ha alcanzado una DO 0,4. Esto es conforme a como un experto en la materia entendería tal punto de crecimiento celular vegetativo y en base a una curva de crecimiento el experto en la materia puede rutinariamente determinar esto, dentro de una variabilidad limitada de alrededor de  $\pm 30$  minutos, como se explica aquí.

15 [0058] El ejemplo práctico 1 proporciona una descripción detallada de un ensayo de resistencia a la bilis adecuado para seleccionar la rápida germinación y crecimiento en presencia de sal biliar. Las condiciones detalladas de este ejemplo 1 constituyen un ensayo preferido para determinar si una espora de bacilo de interés cumple con el criterio del punto (i) del primer aspecto.

20 [0059] El término "sal biliar" se refiere a la sal de los ácidos biliares. Los ácidos biliares son ácidos esteroides encontrados predominantemente en la bilis de mamíferos. Se producen en el hígado por la oxidación de colesterol, y se almacenan en la vesícula biliar y segregados en el intestino en forma de sales. Actúan como tensoactivos, lípidos emulsionantes y asisten con su absorción y digestión. Las sales biliares usadas en el ejemplo 1 fueron preparadas imitando las concentraciones fisiológicas y composiciones de las sales biliares porcinas. Como sabe el experto en la materia las composiciones de sales biliares porcinas pueden ser consideradas como de condiciones relativamente "fuertes" en comparación con las composiciones de sal biliar aviar.

25 [0060] El término "medio de sal biliar" se refiere a un medio que comprende ingredientes de crecimiento de bacilos relevantes tales como nutrientes relevantes y sal biliar.

#### Punto de crecimiento celular vegetativo - en el ensayo de sal biliar del punto (i) del primer aspecto

35 [0061] Como se ha dicho anteriormente, en relación con el punto (i) del primer aspecto las esporas de bacilos, como se describe en este caso, tienen una germinación y crecimiento de espora a célula vegetativa que es tan rápida que éstas alcanzan un punto de crecimiento celular vegetativo de 0,4 DO en menos de 18 y 19 horas a 4 y 6 mM de sales biliares, respectivamente.

40 [0062] Como se ha dicho anteriormente, la cepa nueva DSM 19467 alcanza el punto de crecimiento celular vegetativo después 14 y 15 horas de incubación en 4 y 6 mM sal biliar, respectivamente.

45 [0063] Por consiguiente, las células de esporas de bacilos puede alcanzar el punto de crecimiento celular vegetativo después de 17 y 18 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal biliar respectivamente bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto, más preferiblemente las células de esporas de bacilos pueden alcanzar el punto de crecimiento celular vegetativo después de 15 y 16 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal biliar bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

50 [0064] Como se ha explicado arriba y mostrado esquemáticamente en la figura 1 la aquí descrita nueva cepa DSM 19467 fue seleccionada usando el GalliPro® disponible comercialmente como una cepa de inicio para la mutagénesis y selección para el rápido crecimiento en presencia de sal biliar como se describe en este caso. GalliPro® es una composición que comprende células de *Bacillus subtilis* y el bacillus subtilis se deposita como DSM 17231. Por consiguiente, GalliPro® puede considerarse en este caso como una cepa de referencia.

55 [0065] Como se ha dicho anteriormente, el punto de partida de crecimiento celular vegetativo para GalliPro® es después de 20 horas de incubación en 4 y en 6 mM de sales biliares bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto. Por consiguiente, en una forma de realización las células de esporas de bacilos alcanzan el punto de crecimiento celular vegetativo como mínimo 3 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto. Las células de esporas de bacilos pueden alcanzar el punto de crecimiento celular vegetativo como mínimo 4 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto. Las células de esporas de bacilos también pueden alcanzar el punto de partida de crecimiento celular vegetativo al menos 5 horas antes que las células de esporas *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.



Ensayo de fitasa

[0066] Como se ha mencionado anteriormente el ensayo de fitasa del punto (ii) del primer aspecto se basa en elementos estándar conocidos comercialmente disponibles (tales como por ejemplo medios estándar, prueba estándar).

5 [0067] Por consiguiente, en base a la descripción detallada del ensayo (ver por ejemplo 2) el experto en la materia es rutinariamente capaz de repetir este ensayo para determinar objetivamente si una célula vegetativa específica de bacilos de interés cumple con la cantidad de fitasa producida como se describe en el punto (ii).

10 [0068] El ejemplo práctico 2 proporciona una descripción detallada de un ensayo de fitasa. Las condiciones detalladas de este ejemplo 2 son un ensayo de fitasa preferido para determinar si una célula vegetativa de bacilos de interés cumple con el criterio del punto (ii) del primer aspecto.

Cantidad producida de fitasa - punto (ii) del primer aspecto.

15 [0069] Como se ha dicho anteriormente, en relación con el punto (ii) del primer aspecto, las células vegetativas de bacilos están produciendo fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más que la célula de bacilo de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

20 [0070] En una forma de realización preferida, las células vegetativas de bacilos están produciendo fitasa en una cantidad de al menos 1,5 veces más que la célula de bacilo de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto, más preferiblemente las células vegetativas de bacilo están produciendo fitasa en una cantidad de al menos 1,75 veces más que la célula de bacilos de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

25 Método para la alimentación/administración de células de esporas de bacilos a un animal

[0071] Como se ha dicho anteriormente un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar a un animal que comprende administrar la composición de bacilo del primer aspecto y las formas de realización relacionadas aquí descritas para un animal conjuntamente con otros ingredientes de pienso de animales.

[0072] El animal puede ser cualquier animal de interés. Preferiblemente, el animal es un animal seleccionado del grupo que comprende aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, peces y animales domésticos.

35 [0073] Cuando se administra GalliPro® según la técnica se hace normalmente en una dosis de alrededor de  $10^4$  -  $10^8$  UFC/g de pienso, comúnmente  $10^5$  -  $10^6$  UFC/g de pienso o en dosis equivalentes al peso del animal vivo en la ingestión/kg normal de pienso.

[0074] Alternativamente las células de esporas de bacilo se pueden administrar al animal de unas de las siguientes maneras:

- (1): ponerlas en el agua potable para animales;
- (2): pulverizarlas sobre los animales; o
- (3): aplicarlas mediante pasta, gel o bolo.

45 Método para la selección y aislamiento de una nueva célula de bacilos

[0075] Como se ha dicho anteriormente, el tercer aspecto se refiere a un método para la selección y aislamiento de una nueva célula de bacilos.

50 [0076] En el método del tercer aspecto se selecciona una célula de bacilo capaz de cumplir las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto. Como entiende el experto en la materia, la resistencia a la bilis específica aquí descrita detalladamente y el ensayo de cantidad de fitasa (ver por ejemplo 1 aquí para el ensayo de resistencia a la bilis y ejemplo 2 para el ensayo de fitasa) los parámetros se pueden cambiar para hacer un método de selección alternativo que todavía obtiene los objetivos principales como se describe en este caso, es decir una célula de bacilos que es capaz de cumplir las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

[0077] El ensayo de resistencia a la bilis del ejemplo 1 se puede usar en la fase (a) del método de selección de tercer aspecto y el ensayo de fitasa del ejemplo 2 se usa en la fase (c) del método de selección del tercer aspecto.

60 [0078] En la fase (d) del método de selección del tercer aspecto se aísla una célula de bacilo vegetativa. Esta célula de bacilo vegetativa se puede utilizar para hacer células de esporas de bacilos.

65 [0079] Por consiguiente, al método de selección del tercer aspecto le puede seguir un paso extra (e), donde la célula vegetativa de bacillos aislada del paso (d) se fermenta para hacer de  $10^5$  a  $10^{12}$  de células vegetativas de

bacilos y éstas  $10^5$  a  $10^{12}$  de células vegetativas de bacilos se usan por hacer  $10^5$  a  $10^{12}$  esporas de bacilo, que se aíslan para dar una composición de bacilos, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g de esporas de *Bacillus*.

5 [0080] El resultado final del paso (e) es una composición de bacilos nueva, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g de esporas de bacilos, y donde las células de bacilos son capaces de cumplir con las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

10 [0081] Por consiguiente, también se describe una composición de bacilos, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g de células de esporas de bacilos, y donde las células de bacilos son capaces de cumplir con las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto obtenible por el método de selección del tercer aspecto seguido del paso extra (f) anteriormente descrito.

15 [0082] En la fase (b) del método de selección del tercer aspecto se hacen mutaciones de la primera célula de bacilo resistente a la bilis seleccionada para seleccionar células de alta producción de fitasa en la fase (c). Como entiende la persona experta, ésta puede por ejemplo por mutación tradicional (p. Ej. por tratamientos químicos o UV) de intercambio específico de genes hacer un llamado organismo genéticamente modificado (OGM). Por ejemplo, la aquí descrita nueva cepa GMO, DSM 19466 fue derivada de GalliPro® y fue la primera resistente a la bilis como se describe en el ejemplo práctico para obtener DSM 19467. Luego, el promotor de fitasa en la cepa DSM 19467 fue intercambiado por otro promotor de bacilo para hacer que éste fuese un alto productor de enzima de fitasa y así se obtuvo DSM 19466. De modo similar, la nueva cepa de alta producción de fitasa DSM 19489 se obtuvo mediante la mutación tradicional empezando con DSM 19467. Ver por ejemplo Figura 1.

#### Cepas depositadas

25 [0083] Como se dijo anteriormente un cuarto aspecto de la invención se refiere a una célula de bacilo seleccionada del grupo que consiste en:

- 30 (a) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19467;  
 (b) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19489 y  
 (c) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19466;

o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene usando una de las cepas depositadas como materia prima y donde la cepa mutante retiene las propiedades esenciales de la cepa depositada donde, en caso de mutantes de la célula de *Bacillus subtilis* de (a), dichas propiedades esenciales son:

- 35 (i): la característica de rápida germinación y de crecimiento del punto (i) del primer aspecto de la invención;  
 y  
 (ii): la producción de fitasa en una cantidad como mínimo al nivel de DSM 19467 y donde, en caso de mutantes de la célula de *Bacillus subtilis* de (b) y (c), dichas propiedades esenciales son:

- 40 (i): la característica de rápida germinación y de crecimiento del punto (i) del primer aspecto de la invención; y  
 (ii): la producción de fitasa en una cantidad del punto (ii) del primer aspecto de la invención.

45 [0084] El cuarto aspecto de la invención se refiere a la nueva cepa aquí descrita o "un mutante de la misma".

[0085] Está claro para el experto en la materia que usando la cepa depositada como materia prima, el lector experto pueden rutinariamente, por mutagénesis convencional o técnicas de reaislamiento, obtener otros mutantes o derivados de los mismos que retienen las características pertinentes y ventajas descritas. Por consiguiente, el término "un mutante de la misma" del primer aspecto se refiere a cepas mutantes obtenidas usando la cepa depositada como materia prima.

55 [0086] Este puede alternativamente ser formulado como un método para obtener una cepa, comprendiendo el uso de una de las cepas aquí depositadas como cepa de inicio, haciendo mutantes de la cepa depositada y aislando una nueva cepa donde el mutante ha retenido las propiedades esenciales de la cepa depositada.

[0087] La prueba A de la nueva cepa de *Bacillus subtilis* ha sido depositada en el DSMZ (Laboratorio de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) bajo el número de acceso DSM 19467 con una fecha de depósito del 27 de junio de 2007. El depósito se ha hecho bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

65 [0088] La prueba A de la nueva cepa de *Bacillus subtilis* se ha depositado en el DSMZ (Laboratorio de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) bajo el número de acceso DSM 19489 con una fecha de depósito del 27 de junio de 2007. El depósito se ha hecho bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de

Patentes.

[0089] La prueba A de la nueva cepa de *Bacillus subtilis* DSM 19466 se ha depositado en el DSMZ (Laboratorio de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) bajo el número de acceso DSM 19466 con una fecha de depósito del 27 de junio de 2007. El depósito se ha hecho bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Ensayo de resistencia a la bilis

*Medio:*

[0090] El medio fue un caldo estándar de infusión de ternera no selectivo comercial disponible (VIB) (Difco, 234420), 234420). En la fecha de depósito de la presente solicitud el catálogo del producto ("Difco™ & BBL™ Manual") del proveedor BD sistemas de diagnóstico ([www.bd.com](http://www.bd.com)) dice en relación al caldo infusión de carne de ternero:

"La infusión de carne de ternero magra y peptona proporcionan el nitrógeno, vitaminas, carbono y aminoácidos en los medios de infusión de carne de ternero. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico de las formulaciones"; y

[0091] El medio fue preparado según las instrucciones de producción diluyendo 25 g del polvo de caldo infusión de carne de ternero en 1 L de agua purificada (2,5% solución) y calentado con agitación frecuente y llevado a ebullición durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Un 2,5% de solución de caldo infusión de carne de ternero comprende por litro:

Infusión de carne de ternero magra: 10g  
 Proteosa peptona: 10 g  
 Cloruro sódico 5 g

[0092] El medio fue distribuido en botellas estériles y esterilizadas durante 15 min. a 121°C.

*Soluciones/medio de sal biliar:*

[0093] Las mezclas de sales biliares se prepararon imitando la composición fisiológica y concentración de sales biliares en la bilis de un cerdo y las sales biliares se disolvieron en un caldo infusión de carne de ternero preparado como se expone arriba para dar una concentración final de sal biliar de 8 mM. Las sales biliares conjugadas fueron taurodeoxicholate (Sigma T-0875, EEUU) y glicodeoxicholate (Sigma G-9910, EEUU) y el deoxicolato de sal biliar desconjugada (Sigma D-5670 EEUU) y la solución final mezclada de sal biliar 8 mM contenía un 60% del taurodeoxicholate, 30% del glicodeoxicholate y 10% de deoxicolato. Antes de la esterilización durante 15 minutos a 121° C, las soluciones fueron ajustadas a pH 7.4 utilizando hidróxido sódico. Los medios preparados de sal biliar 8, fueron diluidos para obtener concentraciones de sal biliares de 0, 1, 2, 4, 6 y 8 mM.

[0094] Las sales biliares se añadieron al medio de caldo infusión de carne de ternero en una forma concentrada. Por consiguiente, la cantidad final de infusión de carne de ternero magra, Proteosa peptona y cloruro sódico fue esencialmente con respecto al 2,5% del medio de caldo infusión de carne de ternero antes de que se añadiesen las sales biliares.

*Suspensiones de esporas*

[0095] Para distinguir entre células vegetativas y esporas y para asegurar productos de espora puros para la inoculación, las cuentas de esporas del producto de bacilos fueron determinadas utilizando +/- un tratamiento térmico a 80° C durante 10 min. Después del tratamiento térmico y el enfriamiento posterior a temperatura ambiente, se condujo una serie de 10 diluciones al agua de peptona salina. Los duplicados de placas de sangre-agar de triptosa (Difco 0232-01) se incubaron con 0,1 ml de las diluciones de decimal apropiadas. Las placas se incubaron a 37° C hasta el día siguiente. En base a determinaciones de la cuenta de esporas de los productos precedente, las suspensiones de esporas se prepararon en el agua destilada estéril para alcanzar una concentración final de espora calculada de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Las cuentas de células vegetativas y esporas en el final inoculado fueron determinadas usando el método anteriormente descrito. La concentración final de 10<sup>8</sup> UFC/ml correspondía a un inicio DO<sub>630</sub> en 0,2-0,3.

*Medición de crecimiento: mediciones de densidad óptica*

[0096] Se utilizaron las placas del pocillo de microvaloración con la parte plana de abajo estéril 96 (Greiner Bio One

GmbH, Alemania). Cada pocillo se llenó con 0,150 ml VIB inoculado con esporas ( $\sim 1 \times 10^8$  esporas por ml equivalente/correspondiente a un inicio  $DO_{630} \sim 0,2-0,3$ ) y las placas se incubaron durante 20 horas a 37° C con un ciclo de agitación de 1 minuto de intensidad 4 (alta) antes de cada lectura.

5 [0097] Para evitar la condensación en el interior de la cobertura de la plaqueta, los tapas se expusieron a una solución diluida de Tritón X -100.

[0098] La germinación y crecimiento cinético de las cepas de bacilos se midieron usando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 630 nm ( $DO_{630}$ ) (bio-tek instruments, Inc. VE). Las lecturas se realizaron con intervalos de 10 minutos y se analizaron usando el software KC4™ (bio-tek instruments, Inc., USA). Después de 20 h, los datos se exportaron a una hoja de cálculo de Ex-cel® para más análisis, importados en SAS versión 9.0 y estadísticamente analizados.

#### EJEMPLO 2: Ensayo de actividad de fitasa

15 [0099] El método para medir y cuantificar las unidades de enzimas de fitasa producidas por las células de bacilos usadas en este estudio fue adaptado por Walsh et al. 2004, Biochemistry & Molecular Biology Education vol. 32 no 5 (336- 340). Esencialmente, la única adaptación significativa que se hizo para estandarizar el método con motivo del crecimiento cinético, fue midiendo la actividad de fitasa en relación al número de células de bacilos viables usando un espectrofotómetro y midiendo la densidad óptica (DO) con una longitud de onda de 600 nm diluyendo las células 1:4 con agua de dilución si fuese necesario. Usando este método, se obtiene una desviación estándar relativamente limitada.

#### Crecimiento de Células de Bacilos

25 [0100] Las Células de bacilos se inoculan y crecen en un medio de crecimiento de bacilos rico a 37°C y el crecimiento de las cepas de bacilos y la actividad de fitasa seguidas por intervalos de tiempo de hasta 24 horas.

[0101] Las esporas de bacilos se propagan en un medio en base a un caldo infusión de corazón (HIB) con la siguiente composición:

HIB (Bacto 238400)	25 g/l
0,5% extracto de levadura bacto (Difco 212750)	5 g/l
2mM de $CaCl_2$ (Merck 1.02382)	0,294g/l

35 Sometido a autoclave durante 15 min. a 121°C y se le añade un 1% de manosa y un 1% de glucosa estériles filtradas.

[0102] El HIB es un medio disponible comercialmente no selectivo conocido. En la fecha de depósito de la presente solicitud el catálogo de producto del proveedor BD Diagnostic Systems ([www.bd.com](http://www.bd.com)) descrito con composición/fórmula de Bacto™ infusión de corazón Rrnh por litro fue

Corazón de vaca, infusión 500 g:	10,0 g
Tryptosa:	10,0 g
Cloruro sódico:	5,0 g

45 [0103] El HIB suplementado es un medio con contenido de fosfato bajo y es por lo tanto adecuado para ensayos de fitasa. Después de toda una noche de cultivo el 1% inóculo se usa en un medio fresco HIB e se incubaba a 37°C hasta la actividad de medición (por ejemplo después de 4,6,8 y 24 horas). La incubación del medio se hizo o en cobertura azul Nunc 50 ml o en cantidades más pequeñas (0,150 ml) en 96- placas de pocillos ELISA con buena aireación.

#### Ensayo de fitasa

55 [0104] El ensayo de fitasa se realiza en células sobrenadantes, ya que la enzima se segrega a los medios. Las placas de microtitulación se centrifugan a 3600 rpm. durante 15 min. Los volúmenes más grandes se centrifugan a 2400-3600 rpm. durante 15 min. en un centrifugador Eppendorf. Eliminan cuidadosamente el sobrenadante, omitiendo células antes del ensayo de fitasa.

#### Soluciones:

60 [0105] 0,1 M tris/malato pH 7.0

Solución A: 0,1 M tris/malato (ácido L-málico, Sigma M1000) pH 7.0 + 0,1 p/v de ácido fítico de sal de sodio de maíz (sigma P8810)+ 2 mM  $CaCl_2$  (recientemente preparado antes del ensayo)= sustrato  
 Solución B: 8 g de Molibdato de amonio (Sigma A7302) + 50 ml de  $H_2O$  + 27 ml de 10 M  $H_2SO_4$  +  $H_2O$  hasta 100ml.  
 Solución C: 5 g de  $FeSO_4$  (sigma F7002) + 90 ml  $H_2O$  (agitado hasta su disolución) + 10 ml de la solución

B (recientemente hecha)

0,5 M de ATC (Merck 1.00807.1000) 8% p/v  
1 mM de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>

5 [0106] El ensayo se realizó en 96 - pocillos de placas de microtitulación con 0,020 ml de bacilos sobrenadante donde 0,080 ml de 0,1M tris/ácido málico pH 7,0 de solución tamponadora con un 0,1% de ácido fítico y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> (solución A) fueron añadidas. La placa se incubó a 50 ° C durante 30 min. (placa cubierta para evitar evaporación).

10 Reacción por colores:

[0107]

Añadir 0,100 ml 0,5 M de ácido tricloroacético ATC  
Añadir 0,100 ml de Fe<sup>++</sup> a la solución (solución C)  
15 Dejar durante 5 minutos a temperatura ambiente.  
Aparecerá un color azul.  
Leer absorbancia a 600 mM.

20 [0108] Este ensayo está totalmente libre de medición de fosfato en el sobrenadante. Para determinar la cantidad de antecedentes de fosfato libre, el ensayo de fitato también tiene que realizarse sin la presencia del sustrato (ácido fítico) para la enzima de fitasa. Esto significa que la solución A en el ensayo (ver arriba) se sustituye por un simple tampón de tris/malato pH 7,0.

*Cálculo de la actividad de fitasa*

25 [0109] La absorbancia medida en el ensayo representará tanto el fosfato libre en el medio como el fosfato liberado de la actividad de fitasa y por lo tanto el fosfato libre en el medio necesita ser sustraído. Para hacer esto, la muestra se mide en un tampón con y sin ácido fítico, y los dos son sustraídos, para obtener actividad de fitasa pura. Corregida para densidad celular (DO600) la actividad de fitasa del cultivo de bacilos se expresa como la actividad (absorbancia de unidades) como ha se ha hecho en este caso:

Muestra con tampón + Ácido fítico – muestra y tampón – ácido fítico  
Medición de DO antes del centrifugado

35 EJEMPLO 3: Selección de célula de *Bacillus subtilis* resistente a la bilis DSM 19467

[0110] La célula de bacilos de inicio fue la célula de *Bacillus subtilis* GalliPro®.

40 [0111] GalliPro® fue mutagenizado para obtener una agrupación de nuevas células individuales de bacilos. Las esporas se hicieron y seleccionaron por la germinación y crecimiento rápido de espora a célula vegetativa en presencia de un medio de sal biliar que comprenda 4 y 6 mM de sal biliar como se describe en el ejemplo 1 de arriba.

[0112] Se seleccionó la célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467.

[0113] La tabla 1 de abajo muestra la germinación y el crecimiento de los datos.

45 [0114] El tiempo (horas) desde 10<sup>8</sup> UFC/ml correspondiente a DO 0,2-0,3 hasta DO 0,4 se alcanza (un medio de 3 duplicados).

<i>Subtilis</i>	4 mM bilis	6mM bilis
Producto existente GalliPro® (DSM 17231)	>20	>20
Tolerante a la bilis y fitasa sobreexpresada (DSM 19489)	13h 40m	15h
Producto comercial: Calsporin	>20	>20

[0115] Se describe la selección de tolerante a la bilis y fitasa sobreexpresada DSM 19489 en el ejemplo 4 de abajo. DSM 19467 tiene germinación y crecimiento aproximadamente como DSM 19489.

50 Conclusión

[0116] DSM 19489 y DSM 19467 son unas cepas resistentes a la bilis y claramente germinan y crecen más rápido que GalliPro®.

55 EJEMPLO 4: Selección de células de bacilos con una alta producción de fitasa DSM 19489 (clásica) y DSM 19466 (OGM).

[0117] La célula de bacilos de inicio fue la célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467 seleccionada en el ejemplo 3.

5 [0118] DSM 19467 mutó por mutación tradicional para obtener una agrupación de nuevas células vegetativas de bacilos individuales. Las células vegetativas fueron seleccionadas por producir una alta cantidad de fitasa usando el ensayo de fitasa descrito en el ejemplo 2 de arriba. Se seleccionó la célula de *Bacillus subtilis* de alta producción de fitasa DSM 19489 (clásica).

10 [0119] El promotor de fitasa en la cepa DSM 19467 fue intercambiado por otro promotor de bacilo haciendo de él un alto productor de enzima de fitasa y así se obtuvo DSM 19466 (OGM).

Resultados de mediciones de fitasa

Cepas

15 [0120]

DSM 19489 *Bacillus subtilis* resistente a la bilis y alto productor de fitasa  
 DSM 19467 cepa madre de DSM 19489 *Bacillus subtilis* resistente a la bilis  
 20 DSM 19466 *Bacillus subtilis* resistente a la bilis y genéticamente modificado  
 codificación de genes para fitasa (alto productor de fitasa)

Tabla 2. Resultados de fitasa producida por las cepas seleccionadas medidos como se describe en el ejemplo 2 de arriba.

Tiempo (horas)	4	6	8	24
DSM 19489	2,68	0,83	1,06	0,44
DSM 19467	1,10	0,57	0,68	0,59
DSM 19466	2,30	1,07	1,37	0,44

25 [0121] La cepa DSM 19489 produce 2,68 unidades de fitasa comparada con 1,10 unidades para DSM 19467 (que es la cepa madre resistente a la bilis de referencia). Un nivel similar al de DSM 19489 se consigue por la cepa genéticamente modificada DSM 19466 resistente a la bilis (2,30) y así es también un alto productor de fitasa.

30 Conclusión

[0122] DSM 19489 es resistente a la bilis y una célula de bacilo con una alta producción de fitasa y en este ejemplo produce 2 veces más fitasa en comparación con DSM 19467, después de 4 horas de crecimiento en el medio.

35 [0123] DSM 19466 (OGM) es la cepa resistente a la bilis, donde el gen de fitasa es genéticamente modificado para ser un alto productor de fitasa, y al igual que DSM 19489 éste produce 2 veces más fitasa que la cepa madre (DSM 19467), medido después de 4 horas de crecimiento en el medio.

40 [0124] DSM 19467 se origina a partir de GalliPro® y no está seleccionada por la alta producción de fitasa. Por consiguiente, se cree que GalliPro® produce aproximadamente la misma cantidad de fitasa que DSM 19467.

EJEMPLO 5: "Control" de resistencia a la bilis de células de bacilos con alta producción de fitasa DSM 19489 (clásica) y DSM 19466 (OGM).

45 [0125] Las células de bacilos de alta producción de fitasa DSM 19489 (clásica) y DSM 19466 (OGM) seleccionadas en el ejemplo 4 fueron recontroladas por su capacidad de germinación y crecimiento rápido de espora a células vegetativas como se describe en el ejemplo 1.

50 [0126] Los resultados fueron tales que tanto DSM 19489 como DSM 19466 mantuvieron aproximadamente la misma buena rápida germinación y crecimiento como la célula de inicio DSM 19467 utilizada para obtener éstas.

REFERENCIAS

55 [0127]

1. Antoine Van Leeuwenhoek 90(2):139-46 4 de julio de 2006
2. Documento estadounidense 2003/124104A
3. Documento estadounidense 6255098

## REIVINDICACIONES

1. Composición de bacilos, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g de células de esporas de bacilos donde la composición de bacilos **se caracteriza por**:

5 (i): las esporas de bacilos tienen una germinación y crecimiento rápidos desde la espora hasta la célula vegetativa en presencia de un medio de sal biliar que comprende 4 mM de sales biliares y en presencia de un medio de sal biliar que comprende 6 mM de sales biliares, definido por el hecho de que las esporas de bacilos alcanzan un punto de crecimiento celular vegetativo de 0,4 DO<sub>630</sub> en menos de 18 y 19 horas, respectivamente, donde el punto de crecimiento celular vegetativo es el punto en la curva de crecimiento donde el valor DO comienza a aumentar (debido al crecimiento de las células vegetativas) de forma continua y alcanza una DO<sub>630</sub> de 0,4;

15 (I): donde el medio de sal biliar es el caldo infusión de carne de ternero (CIT) no selectiva del ejemplo 1 suplementado aquí con una mezcla de sal biliar que comprende las sales biliares conjugadas taurodeoxicholate y glicodeoxicholate y la sal biliar desconjugada deoxicolato en unas proporciones del 60% de taurodeoxicholate, 30% de glicodeoxicholate y 10% de deoxicolato; y  
(II): donde se realiza el análisis de ensayo DO por los siguientes pasos:

20 (a): rellenar un pocillo en una placa de microtitulación con 0,150 ml de medio de sal biliar con  $10^8$  esporas de bacilos por ml de medio (es decir tiempo cero); y  
(b): incubar la placa a 37°C bajo condiciones atmosféricas y medir los valores DO<sub>630</sub>, utilizando un espectrofotómetro y con agitación antes de cada lectura, para obtener una curva de crecimiento representativa a lo largo del tiempo;  
y

25 (ii) las células vegetativas de bacilos producen fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más que la célula de bacilo de referencia DSM 19467, y la cantidad de fitasa producida se mide por el ensayo de fitasa del ejemplo 2 aquí, después de 4 horas de crecimiento a 37°C en el caldo infusión de corazón no selectiva (CIC) no selectivo del ejemplo 2; y  
30 donde el análisis de ensayo de fitasa se realiza por los siguientes pasos:

(a): hacer durante toda la noche cultivo de células vegetativas de bacilos en un medio de cultivo enriquecido; y  
35 (b): transferir un inóculo del 1% del cultivo hecho durante la noche en el medio HIB (es decir tiempo cero) e incubar a 37°C hasta la medición de la actividad de fitasa.

2. Composición de bacilos según la reivindicación 1, donde las células de espora de bacilos de la composición se deshidratan (p. Ej. deshidratadas por pulverización).

40 3. Composición de bacilos de las reivindicaciones 1 o 2, donde la célula de bacilo es una célula de *B. subtilis*.

4. Composición de bacilos de una de las reivindicaciones de 1 a 3, donde las esporas de bacilos alcanzan el crecimiento celular vegetativo al menos 3 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) de la reivindicación 1.

45 5. Composición de bacilos según una de las reivindicaciones de 1 a 4, donde las células vegetativas de bacilos producen fitasa en una cantidad de al menos 1,5 veces más que la célula de bacilo de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) de la reivindicación 1.

50 6. Método para alimentar un animal que comprende la administración de la composición de bacilos de una de las reivindicaciones de 1 a 5 a un animal conjuntamente con otros ingredientes de pienso para animales.

7. Método para alimentar un animal según la reivindicación 6, donde el animal es un animal seleccionado del grupo compuesto por aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, peces y animales domésticos.

55 8. Método para la selección y el aislamiento de una célula de bacilo nueva que comprende los siguientes pasos:

a): seleccionar y aislar de una agrupación de células de espora de bacilos individuales una nueva célula de espora de bacilo que sea capaz de germinar y crecer tan rápidamente que esta alcanza un punto de crecimiento celular vegetativo en menos de 18 y 19 horas bajo las condiciones del punto (i) de la reivindicación 1;

(b): producir una célula de bacilo vegetativa a partir de la célula de espora aislada del paso (a) y mutar la célula aislada y seleccionada nueva para obtener una agrupación de células vegetativas de bacilos individuales nuevas;

65 (c): seleccionar y aislar de la agrupación de células vegetativas de bacilos individuales nuevas del paso (b)

una nueva célula vegetativa de bacilo que es capaz de producir fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más que la célula de bacilo de referencia depositada como DSM número de registro 19467 bajo las condiciones del punto (ii) de la reivindicación 1 y

5 (d): analizar la célula de bacilo vegetativa de alta producción del paso (c) para confirmar que ésta haya mantenido la germinación y el crecimiento rápida del paso (a) y aislar la célula de bacilo seleccionada.

9. Método para seleccionar y aislar una célula de bacilo nueva de la reivindicación 8, donde la célula de bacilo es un célula de *B. subtilis*.

10 10. Célula de bacilo seleccionada del grupo compuesto por:

(a) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19467;

(b) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19489 y

15 (c) una célula de *Bacillus subtilis* con número de registro DSM 19466 o una cepa mutante de la misma, donde la cepa mutante se obtiene utilizando una de las cepas depositadas como materia prima y donde la cepa mutante retiene las propiedades esenciales de la cepa depositada, donde, en caso de mutantes de la célula de bacillus subtilis de (a), dichas propiedades esenciales son:

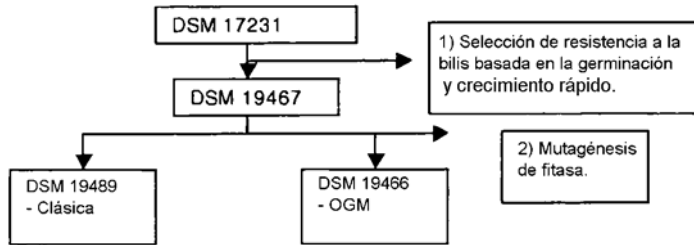
20 (i): la característica de germinación y de crecimiento rápidos del punto (i) de la reivindicación 1 y  
(ii): la producción de fitasa en una cantidad al menos al nivel de DSM 19467;

y donde, en caso de mutantes de la célula de *Bacillus subtilis* de (b) y (c), dichas propiedades esenciales son:

25 (i): la característica de germinación y de crecimiento rápidos del punto (i) de la reivindicación 1 y  
(ii): la producción de fitasa en una cantidad del punto (ii) de la reivindicación 1.

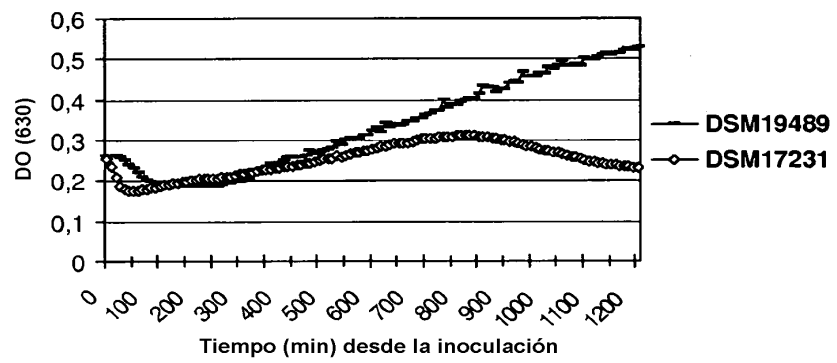


Figura 1: Cepas de *B. subtilis*



FIGURAS 2A Y 2B

Curvas de crecimiento en 4mM de sales biliares



Curvas de crecimiento en 6mM de sales biliares

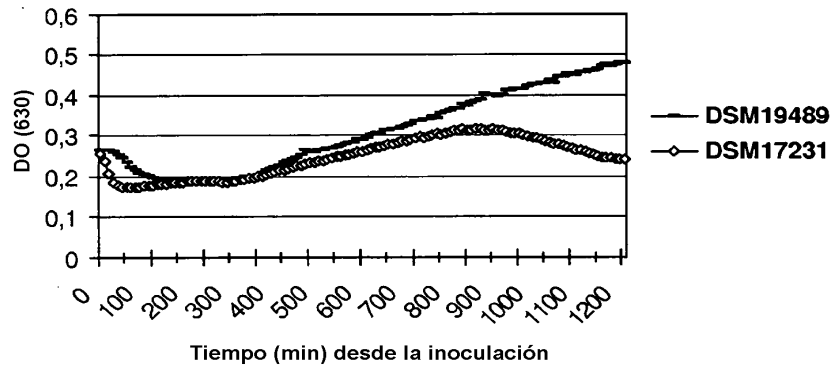


Figura 2A (4mM) y 2B (6mM) Tiempo (min) desde 10° esporas/ml hasta alcanzar DO 0,4 630/s.