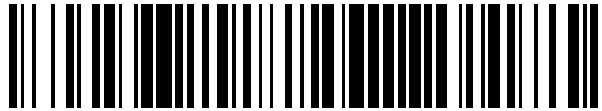


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 137**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 1/36** (2006.01)  
**C12N 15/01** (2006.01)  
**C12R 1/125** (2006.01)  
**A23K 1/00** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009 E 09795406 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 2379704**

54 Título: **Composición de Bacillus resistente a la bilis que secreta altos niveles de aminoácidos esenciales**

30 Prioridad:

**19.12.2008 EP 08172353**

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

**24.05.2013**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)  
Boege Alle 10-12  
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**CANTOR, METTE, DINES;  
DERKX, PATRICK;  
KNAP, INGE;  
KNARREBORG, ANE;  
LESER, THOMAS, DYRMANN y  
BENTE, LUND**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 404 137 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

5 Composición de *Bacillus* resistente a la bilis que secreta altos niveles de aminoácidos esenciales

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a una composición de *Bacillus* caracterizada por una germinación y crecimiento rápidos en las sales de bilis (entorno intestinal simulado) y por una secreción de alto nivel de aminoácidos esenciales. La composición de *Bacillus* se puede utilizar como suplemento en alimentos para animales, donde tiene un efecto probiótico (estimulando la salud y el crecimiento) y aumenta la digestión y la disponibilidad de nutrientes a partir de los alimentos para animales.

15 Estado de la técnica

[0002] Bacterias probióticas tales como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se usan en la industria del alimento para animales como suplemento para la dieta. Su uso se refiere a la capacidad del *Bacillus* para reemplazar o reducir el uso de antibióticos, que se usan como estimuladores del crecimiento en la industria del alimento para animales.

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

25 [0004] Además del modo sugerido de acciones (p. ej. modulación inmunológica, modificador de flora intestinal), los *Bacillus* probióticos son capaces de producir muchos componentes beneficiosos, tales como enzimas, que se excretan en el tracto gastro intestinal (GIT) cuando se usan como suplemento de alimento para animales. Enzimas tales como fitasa se excretan y mejoran la digestión y la asimilación del alimento para animales (mayor digestibilidad). La dieta (alimento) está compuesta, principalmente, por elementos de origen vegetal tales como granos, maíz, semilla de soja, aceite de soja y aminoácidos. En general, estos efectos contribuyen a la producción de productos para animales rentables.

30 [0005] Los *Bacillus* probióticos también son capaces de producir otros componentes beneficiosos tales como aminoácidos esenciales.

35 [0006] Las esporas de *Bacillus* pueden pasar la barrera ácida gástrica y germinar y crecer dentro del tracto gastrointestinal (GIT) de los animales. Esto tiene grandes ventajas, dado que cuando se ingieren pueden excretar numerosos tipos de componentes beneficiosos, por ejemplo bacteriocinas, y también excretan aminoácidos esenciales útiles. Por otra parte, las esporas de *Bacillus* son termoestables durante un proceso de paletización del alimento y de este modo son un excelente sistema de entrega para obtener tanto bacteriocinas como, por ejemplo, aminoácidos esenciales en el GIT.

40 [0007] En el proceso de supervivencia y proliferación de *Bacillus* en el GIT, la función de la bilis es importante. La bilis se produce en el hígado y se almacenada en la vesícula biliar. La bilis contiene agua, lecitina, bilirrubina y biliverdina y sales de bilis.

45 [0008] Se conoce por la bibliografía que la bilis tiene algunas influencias negativas en la supervivencia y germinación y crecimiento de células de espora de *Bacillus* a células vegetativas en el GIT de los animales. Por lo tanto, se está investigando para encontrar cepas de *Bacillus* resistentes a la bilis probiótica.

50 [0009] El artículo (Antonie Van Leeuwenhoek. 2006 Aug; 90(2): 139-46. Epub 2006 Jul 4) describe el aislamiento de un número de muestras/células de *Bacillus* directamente del intestino de pollos. Las células de *Bacillus* aisladas se evaluaron para actividad probiótica. Los seis bacilos con la actividad probiótica más alta se evaluaron para resistencia a la sal de bilis y se descubrió que un *Bacillus* específico altamente probiótico tiene un nivel relativamente alto de resistencia a la sal de bilis. En este artículo no hay un enfoque especial sobre cualquier período de tiempo para la prueba de resistencia a la bilis. En la parte experimental, las células de espora de *Bacillus* simplemente se evalúan para resistencia después de 5 días de presencia en la sal de bilis (véase el párrafo "Simulated small intestinal fluid tolerance test" en la página 141).

55 [0010] La US2003/0124104A describe que las endoesporas de *Bacillus* probiótico convencional son sensibles a la baja concentración de sales de bilis, es decir, la germinación y/o rehidratación de la espora se inhibe por la presencia de concentraciones incluso bajas de sales de bilis. Esto es lo contrario de otras bacterias tales como los patógenos entéricos, tales como *E. coli* o *S. aureus* (véase la sección [0014] a [0015]). Visto esto, se sugiere filtrar/seleccionar para esporas de *Bacillus* que sean resistentes a la actividad inhibidora de las sales de bilis y, como resultado, germinen en células vegetativas, que después colonizan el colon (véase [0019]). Los ejemplos prácticos están todos presentes y no se aportan datos experimentales reales de células de *Bacillus* específicas seleccionadas en la descripción. Además, las

condiciones de selección de la sal de bilis se describen de manera relativamente genérica. En particular, no se indican períodos de tiempo para las selecciones de la resistencia a la bilis. Dicho en otras palabras, basado en el enseñanza únicamente amplia/genérica de este documento, se pueden seleccionar células de *Bacillus* que sólo pueden crecer (germinar) lentamente, es decir, que son capaces de germinar a partir de esporas a células vegetativas después de, por ejemplo, 20 horas en presencia de una cantidad importante de sal de bilis.

[0011] En este documento no hay una descripción o sugerencia para seleccionar células de *Bacillus* que puedan crecer (germinar) rápidamente, es decir, capaces de germinar y crecer a partir de esporas a células vegetativas que alcancen un punto de crecimiento definido dentro de un determinado intervalo de tiempo en presencia de una cantidad importante de sal de bilis.

[0012] En resumen, las referencias de la técnica anterior acerca de la selección/filtrado de células de *Bacillus* resistentes a la bilis no se centran en el rápido crecimiento/germinación a partir de células de esporas a células de *Bacillus* vegetativas.

[0013] La solicitud internacional PCT, con número de solicitud PCT/EP2008/057296 se solicitó el 11/06/2008. El solicitante es Chr. Hansen A/S y NO ESTABA PUBLICADA en la fecha de depósito de la presente solicitud.

[0014] La PCT/EP2008/057296 describe esporas de *Bacillus* nuevas caracterizadas por tener una velocidad mejorada/rápida de germinación y crecimiento a partir de esporas a célula vegetativa en presencia de un medio de sal de bilis. Las esporas de *Bacillus*, como se describen en este caso, tienen la misma velocidad mejorada/rápida de germinación y crecimiento a partir de espóra a célula vegetativa según se describe en la PCT/EP2008/057296.

[0015] La PCT/EP2008/057296 sólo describe células vegetativas de *Bacillus* que producen fitasa en una cantidad aumentada en comparación con la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467. NO se describe ni se sugiere buscar una célula vegetativa de *Bacillus* que produzca aminoácidos esenciales en una cantidad aumentada en comparación con la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467.

[0016] Cuando más adelante se hace referencia al estado de la técnica, se debe entender como el estado de la técnica disponible al público (p. ej. artículos/patentes publicados) en la fecha de depósito de la presente solicitud.

#### Resumen de la invención

[0017] El problema que debe resolver la presente invención es proporcionar una composición de *Bacillus* que excrete cantidades altas de aminoácidos esenciales en el tracto gastrointestinal (GIT) de un animal.

[0018] La solución se basa en que los presentes inventores han desarrollado un método de selección nuevo para identificar composiciones de *Bacillus* mejoradas nuevas. Un paso nuevo importante del nuevo método de selección descrito en la presente es la filtración/selección específica de células de espóra de *Bacillus* con velocidad mejorada/rápida de germinación y crecimiento de esporas a células vegetativas en presencia de sales de bilis.

[0019] Como se ha descrito anteriormente, el estado de la técnica ha descrito métodos para seleccionar células de *Bacillus* capaces de crecer en presencia de sales de bilis, pero los métodos de filtración/selección del estado de la técnica no se centran en la velocidad de germinación y crecimiento en presencia de sal de bilis. Por consiguiente, las células de *Bacillus* resistentes a la bilis seleccionadas por la técnica anterior no germinan ni crecen suficientemente rápido para cumplir los criterios de velocidad de germinación y crecimiento según se describe en este caso. Por ejemplo, células de *Bacillus* aisladas directamente del intestino de, por ejemplo, pollos (como se describe por ejemplo en el artículo de Antonie Van Leeuwenhoek mencionado anteriormente) en el entorno intestinal no se seleccionan (bajo presión natural) para germinar y crecer rápidamente en el intestino.

[0020] Como se muestra en los ejemplos prácticos de la presente, esto también se cumple para la composición de *Bacillus* GalliPro<sup>®</sup> disponible comercialmente, que simplemente germina y crece demasiado lentamente y no alcanza el punto de crecimiento definido en las primeras 20 horas en presencia de niveles fisiológicos de sales de bilis para cumplir con los criterios de velocidad de germinación y de crecimiento como se describe en este caso. GalliPro<sup>®</sup> es una composición de *Bacillus subtilis* que es un éxito comercial.

[0021] La cepa descrita en la presente, depositada como DSM 19467, se seleccionó usando GalliPro<sup>®</sup> como cepa de inicio y un método de presión selectiva y un aislamiento posterior para germinación y crecimiento rápido a partir de esporas a células vegetativas en presencia de sal de bilis, como se describe en este caso. Véase, por ejemplo, la tabla 1 para más detalles (GalliPro<sup>®</sup> también se puede denominar DSM 17231). En la figura 1 se ilustra esquemáticamente.

[0022] En resumen, se cree que ningún estado de la técnica describe una composición de *Bacillus* aislada, que comprenda de 10<sup>5</sup> a 10<sup>12</sup> CFU/g de células de *Bacillus*, donde las células de la composición de *Bacillus* cumpla con la germinación y el crecimiento rápidos en presencia de criterios de sal de bilis, como se describe en este caso.

[0023] Sin estar limitados por la teoría, los presentes inventores han identificado que la germinación y el crecimiento rápidos son un aspecto muy importante de la invención ya que las esporas de *Bacillus*, que son resistente a la bilis pero que no germinan y crecen lo suficientemente rápido, se excretarán antes de que cualquier característica positiva, tal como la producción de aminoácidos esenciales, se pueda realizar en cantidades significativas por las células de *Bacillus* vegetativas. Las esporas de *Bacillus* que germinan demasiado lentamente pasarán simplemente el tracto gastrointestinal (GIT) antes de que las bacterias puedan producir cualquier cantidad significativa de, por ejemplo, aminoácidos esenciales.

[0024] Después de un número de pruebas y análisis detallados, los inventores han elegido trabajar con un intervalo de tiempo de hasta 20 horas y seleccionar las esporas que germinan y crecen más rápidamente dentro de este período de tiempo, en presencia de altas concentraciones fisiológicas de sales de bilis. Sin estar limitados por la teoría y basándose en el trabajo experimental que se detalla en este documento, los presentes inventores han identificado que es importante tener una germinación y un crecimiento rápidos en las primeras 18 y 19 horas en presencia de 4 y 6 mM de sal de bilis, respectivamente.

[0025] Los presentes inventores identificaron que una vez que se han seleccionado células de *Bacillus* con germinación y crecimiento rápidos en el medio de sal de bilis, estas células son altamente útiles como células de inicio para mutagénesis para obtener células nuevas con producción mejorada de aminoácidos esenciales.

[0026] Como se ilustra esquemáticamente en la figura 1 y en el ejemplo 4, se usó la cepa seleccionada resistente a la bilis y de crecimiento rápido DSM 19467 como cepa de inicio para mutación tradicional y se seleccionaron cepas de alta producción de aminoácidos esenciales. Como se puede observar en el ejemplo 4, algunas de las cepas seleccionadas producen al menos 5 veces más aminoácido esencial leucina que DSM 19467 y GalliPro®.

[0027] Las células de *Bacillus* probiótico nuevas descritas en la presente son, así, las resistentes a la bilis que germinan y crecen rápido y que excretan cantidades altas de aminoácidos esenciales. Las cepas obtenidas son extremadamente útiles como composiciones de *Bacillus* probiótico para su adición a alimentos para animales. Combinan todas las capacidades beneficiosas de las bacterias probióticas para sobrevivir y proliferar en el intestino de los animales (con altos niveles de sal de bilis presentes), inhibir las bacterias patógenas (producción de bacteriocinas) y además excretar cantidades altas de aminoácidos esenciales beneficiosos.

[0028] Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición de *Bacillus* que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espора de *Bacillus*, donde la composición de *Bacillus* se caracteriza por el hecho de que: (i): las esporas de *Bacillus* tienen una germinación y un crecimiento rápidos a partir de esporas a célula vegetativa en presencia de un medio de sal de bilis que comprende 4 y 6 mM de sales de bilis, caracterizado por el hecho de que las esporas de *Bacillus* alcanzan un punto de crecimiento celular vegetativo de 0,4 OD<sub>630</sub> en menos de 18 y 19 horas, respectivamente, donde el punto de crecimiento celular vegetativo es el punto de la curva de crecimiento en el que el valor OD comienza a aumentar (debido al crecimiento de las células vegetativas) de manera continua y alcanza un OD<sub>630</sub> de 0,4;

(I): donde el medio de sal de bilis es el medio estándar conocido de caldo de infusión de ternera (VIB) no selectivo suplementado con una mezcla de sal de bilis que comprende las sales de bilis conjugadas taurodesoxicolato y glicodeoxicolato y la sale de bilis desconjugada deoxicolato en las proporciones: 60% de taurodesoxicolato, 30% de glicodeoxicolato y 10% de deoxicolato; y

donde el análisis de ensayo OD se realiza por los siguientes pasos:

(a): rellenando un pocillo de una placa de microtitulación con 0,150 ml de medio de sal de bilis con  $10^8$  esporas de *Bacillus* por ml de medio (es decir, este es el tiempo cero), e

(b): incubando la placa a 37°C bajo condiciones atmosféricas y midiendo los valores OD<sub>630</sub>, usando un espectrofotómetro y con agitación antes de cada lectura, para obtener una curva de crecimiento representativa en el tiempo;

y

(ii) las células vegetativas de *Bacillus* producen al menos un aminoácido esencial en una cantidad que es al menos 2 veces más que la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467, donde la cantidad de aminoácido esencial producido se mide en el sobrenadante por el método GC-MS estándar basado en ensayo de aminoácidos para muestras acuosas usando cloroformato de metilo como agente de derivatización después de dos días de crecimiento de las células de *Bacillus* a 37°C y 150 r.p.m., incubadas en tubos con 10 ml de medio de un medio estándar conocido de crecimiento de sales mínimo con la siguiente composición:

65

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck 1:01217.1000)	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck 1.05101.1000).	7 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck 1.04873.1000)	3 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Merck 1.05886.1000)	0,1 g/l

5

que se ha sometido a autoclave durante 15 min a 121°C y se ha añadido glucosa sometida a autoclave en una concentración final de 0,5 %.

10

[0029] Como se ha mencionado anteriormente, la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 se selecciona para germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis usando GalliPro<sup>®</sup> como cepa de inicio. DSM 19467 no se selecciona para producción de aminoácidos esenciales mejorados. Sin estar limitados por la teoría, se cree que la producción de aminoácidos esenciales pertinente en este caso de DSM 19467 corresponde a GalliPro<sup>®</sup>. Con respecto al punto (i), el punto de crecimiento celular vegetativo para GalliPro<sup>®</sup> es de al menos 20 horas tras la incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis y para la cepa DSM 19467 nueva, como se describe en este caso, es de 14 y 15 horas en 4 y 6 mM de sales de bilis, respectivamente (véase la figura 2 y el ejemplo práctico 3 de la presente).

15

20

[0030] Aquí es pertinente mencionar que los presentes inventores también evaluaron el producto comercialmente disponible CALSPORIN<sup>®</sup> (Calpis Co., Ltd., Japón) para determinar el punto de crecimiento de célula vegetativa bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto. En cuanto a GalliPro<sup>®</sup>, el producto comercial CALSPORIN<sup>®</sup> es una composición de *Bacillus subtilis* usada como aditivo para alimento probiótico. El punto de crecimiento de célula vegetativa bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto para CALSPORIN<sup>®</sup> fue de más de 20 horas en 4 y 6mM de sales de bilis, respectivamente. Esto es considerablemente superior a las 18 y 19 horas requeridas bajo el punto (i) e ilustra que los productos disponibles comercialmente no se han seleccionado hasta ahora para germinación y crecimiento rápidos. Como se ha mencionado anteriormente, las células de *Bacillus* "natural" no han estado bajo ninguna presión selectiva para obtener germinación y crecimiento rápidos. Sin estar limitados por la teoría, por lo tanto, se cree que las células de *Bacillus* "natural" no cumplen con las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

25

30

[0031] La resistencia a la bilis [del punto (i)] y el ensayo de aminoácido esencial [del punto (ii)] se basan en elementos estándar conocidos, disponibles comercialmente (tales como por ejemplo medios estándar, sales de bilis, mediciones estándar de OD y pruebas estándar). La célula de *Bacillus* de referencia está depositada como DSM 19467 y por lo tanto está públicamente disponible.

35

[0032] La célula de *Bacillus subtilis* GalliPro<sup>®</sup> está depositada para usos de patente como DSM 17231 (denominada GalliPro<sup>®</sup>) y por lo tanto está públicamente disponible.

40

[0033] Por consiguiente, basándose en la descripción de ensayo detallada en la presente (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 de este documento para ensayo de resistencia a la bilis y el ejemplo 2 de este documento para ensayo de aminoácido esencial), el experto en la materia es rutinariamente capaz de repetir estos ensayos para determinar objetivamente si una célula de *Bacillus* específica de interés cumple con la resistencia a la bilis [del punto (i)] y los niveles de aminoácido esencial [del punto (ii)] del primer aspecto de la invención.

45

[0034] La composición de *Bacillus* nueva, como se describe en este caso, se puede utilizar como suplemento probiótico en alimento para animales. La dosis y administración puede establecerse según la técnica, como por ejemplo se ha hecho en la técnica anterior con las composiciones de *Bacillus* GalliPro<sup>®</sup>.

50

[0035] Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar a un animal que comprende la administración de la composición de *Bacillus* del primer aspecto y las formas de realización relacionadas descritas en este documento a un animal junto con otros ingredientes de alimento para animales.

55

[0036] Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para seleccionar y aislar una célula de *Bacillus* nueva que comprende los pasos siguientes:

(a): selección y aislamiento, a partir de una agrupación de células de espora de *Bacillus* individuales, de una nueva célula de espora de *Bacillus* que es capaz de germinar y crecer tan rápidamente que alcanza un punto de crecimiento de célula vegetativa en menos de 18 y 19 horas bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto;

60

(b): conversión de una célula de *Bacillus* vegetativa a partir de la célula de espora aislada del paso (a) y mutación de la nueva célula aislada y seleccionada para obtener una agrupación de nuevas células vegetativas de *Bacillus* individuales;

65

(c): selección y aislamiento, a partir de la agrupación de nuevas células vegetativas de *Bacillus* individuales del paso (b), de una nueva célula vegetativa de *Bacillus* que es capaz de producir al menos un aminoácido esencial en una cantidad superior a la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto; y (d): análisis de la célula de *Bacillus* vegetativa de alta producción del paso

(c) para confirmar que ésta ha mantenido la germinación y el crecimiento rápidos del paso (a) y aislamiento de la célula de *Bacillus* seleccionada.

5 [0037] Es evidente para el experto en la materia que una vez que los presentes inventores han descrito los ensayos de prueba pertinentes (en particular el ensayo para germinación y crecimiento rápidos del ejemplo 1) más la cepa de referencia DSM 19467, la selección de otras células de *Bacillus* nuevas que cumplan con el criterio del primer aspecto de la presente será trabajo de rutina.

10 [0038] Como se discute en este caso, usando el nuevo método de filtración/selección tal y como se describe en este caso los inventores han seleccionado y aislado un número de nuevas células de *Bacillus* mejoradas.

[0039] La forma de realización de la presente invención se describe más adelante, sólo a modo de ejemplo.

#### Definiciones

15 [0040] Todas las definiciones de los términos importantes de la presente concuerdan con lo que entendería el experto en la materia con respecto al contexto técnico pertinente en este caso.

20 [0041] El término "célula de *Bacillus*" se refiere en este caso tanto a una célula de espора de *Bacillus* como a una célula vegetativa de *Bacillus*.

25 [0042] El término "espора de *Bacillus*", en relación con la célula de espора de *Bacillus*, se refiere en este caso a una espора que, según la técnica, se puede caracterizar como una estructura no reproductiva, resistente, durmiente, producida por bacterias de *Bacillus*. La función primaria de las esporas es generalmente asegurar la supervivencia de una bacteria durante períodos de estrés ambiental. Por lo tanto, son resistentes a la radiación gamma y ultravioleta, la desecación, la lisozima, la temperatura, la inanición y los desinfectantes químicos. Las esporas se encuentran comúnmente en el suelo y el agua, donde pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo. El revestimiento de la espора es impermeable a muchas moléculas tóxicas y también puede contener enzimas que están implicadas en la germinación. El núcleo tiene estructuras celulares normales, tal como ADN y ribosomas, pero metabólicamente es inactivo. Cuando una bacteria detecta que las condiciones ambientales se están haciendo desfavorables puede iniciar el proceso de esporulación, que dura alrededor de ocho horas.

35 [0043] El término "célula vegetativa de *Bacillus*" se refiere a las células de *Bacillus* vegetativas funcionales, que se pueden dividir para producir más células vegetativas.

40 [0044] El término "germinación y crecimiento" se refiere a las esporas de *Bacillus* que germinan y crecen a células vegetativas de *Bacillus*. Como bien sabe el experto en la materia, la reactivación de la espора ocurre cuando las condiciones son favorables e implica germinación y crecimiento. La germinación precisa que la espора durmiente inicie la actividad metabólica y rompa así la hibernación. Comúnmente se caracteriza por ruptura o absorción del revestimiento de la espора, hinchazón de la espора, un aumento en la actividad metabólica y pérdida de resistencia al estrés ambiental. El crecimiento sigue a la germinación y precisa que el núcleo de la espора produzca nuevos componentes químicos y que salga del revestimiento de la espора vieja para evolucionar a una célula bacteriana vegetativa funcional, que se puede dividir para producir más células:

45 Las curvas de crecimiento (OD versus tiempo) de las células de *Bacillus* muestran fases de crecimiento diferentes. Como las esporas se transfieren a un medio rico en nutrientes, la germinación se inicia seguida de una reducción temporal de OD (fase I), que se debe a la liberación de ácido dipicolínico y consecuentemente a la hidratación del revestimiento de la espора. En la segunda fase (fase II = fase de crecimiento) hay un periodo con un cambio relativamente pequeño en OD, hasta que las esporas evolucionan a células bacterianas vegetativas funcionales, que se pueden dividir para producir más células y dar así un aumento continuo en el valor de OD. El punto en el que una empieza a obtener el aumento continuo de los valores OD alcanzando un OD de 0,4 se denomina, en este caso, "punto de crecimiento de célula vegetativa".

55 [0045] El término "densidad óptica" se define como una medida de absorbancia óptica usando un espectrofotómetro. La densidad óptica (OD) es la absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda dada A por distancia de unidad. Si OD se mide, por ejemplo, a 630 nm de longitud de onda se puede denominar OD<sub>630</sub>.

#### Dibujos

60 [0046]

65 Figura 1: en esta figura se ilustran los pasos para llegar a las nuevas cepas mejoradas de la presente. Estos ejemplos prácticos se iniciaron a partir de DSM 17231 (GalliPro®), que se mutó de manera tradicional y se filtró/seleccionó para germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis para obtener la nueva cepa seleccionada DSM 19467. DSM 19467 se usó como cepa de inicio para mutación tradicional y se seleccionaron cepas de alta producción de aminoácidos esenciales.

Figura 2a y 2b: estas figuras muestran claramente la germinación y el crecimiento rápidos mejorados de las esporas de *Bacillus* de DSM 19467 de la presente invención en comparación con DSM 17231 en presencia de 4 y 6 mM de sal de bilis, como se describe en este caso.

5

Descripción detallada de la invención

Composición de *Bacillus*:

10 [0047] El término "composición de *Bacillus*" debe entenderse según la técnica. Aquí se entiende como una composición de *Bacillus* que comprende un número de células de esporas de *Bacillus* con una característica de interés.

15 [0048] La composición de *Bacillus* puede comprender diferentes tipos de células de *Bacillus* (p. ej. *B. subtilis* y *Bacillus licheniformis*). En esencia, la composición debe simplemente comprender la cantidad de células de espora de *Bacillus* dada en el primer aspecto de la presente, en el que las células de *Bacillus* cumplen con el criterio dado en el primer aspecto.

20 [0049] Como bien sabe el experto en la materia, las composiciones de célula de espora de *Bacillus* comercialmente importantes de la presente se hacen generalmente por fermentación. Las células de espora obtenidas generalmente se concentran, se secan, se mezclan con un portador y se guardan en un recipiente adecuado.

[0050] Por ejemplo, de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de *Bacillus* de la composición puede estar presente en una forma comercialmente relevante conocida por el experto en la materia.

25 [0051] Por consiguiente, en una forma de realización, de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus* de la composición están presentes como células secas (p. ej. secado por pulverización) o como células de espora congeladas.

30 [0052] En una forma de realización preferida, la composición de *Bacillus* comprende de  $10^6$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus*, más preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus*. El término "CFU/g" se refiere al peso en gramos de la composición como tal, incluyendo aditivos pertinentes adecuados presentes en la composición. No incluye el peso de un recipiente adecuado usado para envasar la composición de *Bacillus*.

35 [0053] Una forma de realización se refiere a que la composición de *Bacillus* se envasa en un recipiente adecuado.

[0054] Como sabe el experto en la materia, una composición bacteriana comercialmente pertinente generalmente también comprende otros aditivos pertinentes tales como por ejemplo un portador/ingrediente del grupo de lactosuero, permeato de lactosuero, carbonato de calcio/calizo y agentes antiendurecimiento tales como silicatos de aluminio y kieselgur (tierra de diatomeas).

40

[0055] Además de las células de *Bacillus* pertinentes en este caso, la composición también puede comprender otros microorganismos pertinentes de interés tales como, por ejemplo, bacterias de ácido láctico de interés.

Célula de *Bacillus*

45

[0056] La célula de *Bacillus* puede ser cualquier célula de *Bacillus* pertinente de interés.

[0057] En una forma de realización preferida, la célula de *Bacillus* es al menos una célula de *Bacillus* seleccionada de una especie de *Bacillus* seleccionada del grupo que consiste en:

50

*Bacillus subtilis*, *Bacillus uniflagellatus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laterosporus BOD*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus sterothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus thermophilus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus* y *Bacillus circulans*.

55 [0058] En una forma de realización más preferida la célula de *Bacillus* es una célula de *B. subtilis* o una célula de *Bacillus licheniformis*.

[0059] La forma más preferida es cuando la célula de *Bacillus* es una célula de *B. subtilis*.

60 Ensayo para seleccionar para germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis

[0060] Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo de resistencia a la bilis del punto (i) del primer aspecto se basa en elementos estándar conocidos disponibles comercialmente (tales como, por ejemplo, medios estándar, sales de bilis, mediciones estándar de OD).

65

[0061] Por consiguiente, sobre la base de la descripción del ensayo que se detalla aquí (véase por ejemplo el ejemplo 1) el experto en la materia es rutinariamente capaz de repetir este ensayo para determinar objetivamente si una célula de espora de *Bacillus* específica de interés cumple con los criterios de germinación y crecimiento rápidos a partir de espora a célula vegetativa, como se describe en el punto (i).

[0062] En el punto (i) se explica que el punto de crecimiento de célula vegetativa es el punto en una curva de crecimiento que parte con  $10^8$  esporas/ml que corresponden a un OD de alrededor de 0,2-0,3 hasta que el tiempo en el que el valor de OD ha aumentado (debido al crecimiento de las células vegetativas) de manera continua y ha alcanzado OD 0,4. Esto es conforme a lo que entendería un experto en la materia, tal punto de crecimiento de célula vegetativa, y basado en una curva de crecimiento, el experto en la materia puede determinarlo rutinariamente, dentro de una variabilidad limitada de alrededor de  $\pm 30$  minutos, como se explica aquí.

[0063] El ejemplo práctico 1 proporciona una descripción detallada de un ensayo de resistencia a la bilis adecuado para seleccionar para germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis. Las condiciones detalladas de este ejemplo 1 son un ensayo preferido para determinar si una célula de espora de *Bacillus* de interés cumple con el criterio del punto (i) del primer aspecto.

[0064] El término "sal de bilis" se refiere a la sal de ácidos biliares. Los ácidos biliares son ácidos esteroides que se encuentran predominantemente en la bilis de los mamíferos. Se producen en el hígado por la oxidación del colesterol y se almacenan en la vesícula biliar y se segregan en el intestino en forma de sales. Actúan como tensioactivos, emulsionando lípidos y ayudando con su absorción y digestión. Las sales de bilis usadas en ejemplo 1 se prepararon imitando las concentraciones fisiológicas y composiciones de sales de bilis porcina. Como bien sabe el experto en la materia, las composiciones de sales de bilis porcinas se pueden considerar condiciones relativamente "duras" en comparación con las composiciones de sal de bilis aviar.

[0065] El término "medio de sal de bilis" se refiere a un medio que comprende ingredientes de crecimiento de *Bacillus* pertinentes, tales como nutrientes pertinentes y sal de bilis.

Punto de crecimiento de célula vegetativa - en ensayo de sal de bilis - del punto (i) del primer aspecto

[0066] Como se ha mencionado anteriormente, en relación con el punto (i) del primer aspecto, las células de espora de *Bacillus*, como se describe en este caso, tienen una germinación y un crecimiento a partir de espora a célula vegetativa que es tan rápido que éstas alcanzan un punto de crecimiento de célula vegetativa de 0,4 OD en menos de 18 y 19 horas en 4 y 6 mM de sales de bilis, respectivamente. Como se ha dicho anteriormente, la nueva cepa DSM 19467 alcanza el punto de crecimiento de célula vegetativa después de 14 y 15 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis, respectivamente.

[0067] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, las esporas de *Bacillus* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa después de 17 y 18 horas de incubación en 4 y mM de sal de bilis bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto, más preferiblemente, las esporas de *Bacillus* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa después de 15 y 16 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

[0068] Como se ha explicado anteriormente y se ha mostrado esquemáticamente en la figura, la nueva cepa aquí descrita DSM 19467 se seleccionó usando la cepa disponible comercialmente GalliPro<sup>®</sup> como cepa de inicio para mutagénesis y selección para crecimiento rápido en presencia de sal de bilis, como se describe en este caso. GalliPro<sup>®</sup> es una composición que comprende células de *Bacillus subtilis* y el *Bacillus subtilis* está depositado para fines de patente como DSM 17231. Por consiguiente, GalliPro<sup>®</sup> se puede ver aquí como una cepa de referencia.

[0069] Como se ha mencionado anteriormente, el punto de inicio de crecimiento de célula vegetativa para GalliPro<sup>®</sup> es después de 20 horas de incubación en 4 y 6 mM de sales de bilis bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto. Por consiguiente, en una forma de realización, las esporas de *Bacillus* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa al menos 3 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro<sup>®</sup>") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto, más preferiblemente, las esporas de *Bacillus* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa al menos 4 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro<sup>®</sup>") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto y, de la forma más preferible, las esporas de *Bacillus* alcanzan el punto de inicio de crecimiento de célula vegetativa al menos 5 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro<sup>®</sup>") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

Aminoácidos esenciales

[0070] Como sabe el experto en la materia, un aminoácido esencial puede ser un aminoácido esencial seleccionado del grupo que consiste en: fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina.



[0071] En una forma de realización preferida, el aminoácido esencial es al menos un aminoácido esencial seleccionado del grupo que consiste en: fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina y lisina.

5 [0072] En la forma de realización más preferida, el aminoácido esencial es al menos un aminoácido esencial seleccionado del grupo que consiste en: valina, isoleucina y leucina.

[0073] Un amino esencial muy pertinente aquí es leucina.

10 [0074] Como entiende el experto en la materia, las células vegetativas de *Bacillus* pueden producir mayor cantidad de más de un aminoácido esencial, tal como, por ejemplo, mayor cantidad de dos o tres o más aminoácidos esenciales diferentes.

Ensayo de aminoácidos

15 [0075] Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo de aminoácidos del punto (ii) del primer aspecto se basa en elementos conocidos estándar disponibles comercialmente (tales como, por ejemplo, medios estándar, pruebas estándar).

20 [0076] Por consiguiente, sobre la base de la descripción de ensayo detallada en la presente (véase por ejemplo el ejemplo 2), el experto en la materia es capaz de repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si una célula vegetativa de *Bacillus* específica de interés cumple con la cantidad de aminoácidos esenciales producida como se describe en el punto (ii).

25 [0077] El presente ejemplo práctico 2 proporciona una descripción detallada de un ensayo de aminoácido esencial. Las condiciones detalladas de este ejemplo 2 son un ensayo de aminoácidos esenciales preferidos para determinar si una célula vegetativa de *Bacillus* de interés cumple con el criterio del punto (ii) del primer aspecto.

Cantidad producida de aminoácido esencial - punto (ii) del primer aspecto

30 [0078] En relación con el punto (ii) del primer aspecto, las células vegetativas de *Bacillus* producen preferiblemente al menos un aminoácido esencial en una cantidad de al menos 2 veces más que la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

35 [0079] En una forma de realización más preferida, con respecto al punto (ii) del primer aspecto, las células vegetativas de *Bacillus* producen preferiblemente al menos un aminoácido esencial en una cantidad de al menos 4 veces más que la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

Un método para alimentar/administrar esporas de *Bacillus* a un animal

40 [0080] Como se ha dicho anteriormente, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar a un animal que comprende la administración de la composición de *Bacillus* del primer aspecto y las formas de realización relacionadas descritas aquí a un animal junto con otros ingredientes de alimento para animales.

45 [0081] El animal puede ser cualquier animal de interés. Preferiblemente, el animal es un animal seleccionado del grupo que consiste en aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, peces y animales domésticos.

50 [0082] Cuando se administra GalliPro<sup>®</sup> según la técnica, normalmente se hace en una dosis de alrededor de  $10^1$ - $10^8$  GFU/g de alimento, comúnmente  $10^5$ - $10^6$  CFU/g de alimento o en dosis equivalentes a la toma de alimento normal/kg de peso del animal vivo.

[0083] Alternativamente, las esporas de *Bacillus* se pueden administrar al animal de una de las siguientes maneras:

(1): poniéndolas en el agua potable para animales;

55 (2): pulverizándolas sobre los animales; o

(3): aplicándolas mediante pasta, gel o bolo.

[0084] Un método para seleccionar y aislar una nueva célula de *Bacillus*

60 [0085] Como se ha mencionado anteriormente, el tercer aspecto se refiere a un método para seleccionar y aislar una nueva célula de *Bacillus*.

65 [0086] En el método del tercer aspecto se selecciona para una célula de *Bacillus* capaz de cumplir las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto. Como bien entenderá el experto en la materia, los parámetros del ensayo específico, descritos aquí en detalle, de resistencia a la bilis y de cantidad de aminoácido esencial (véase, por ejemplo, el ejemplo 1

para ensayo de resistencia a la bilis y el ejemplo 2 para ensayo de aminoácido esencial) se pueden cambiar para hacer un método de selección alternativo que siga obteniendo los resultados principales, tal y como se describe en este caso, es decir, una célula de *Bacillus* que sea capaz de cumplir las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

5 [0087] En una forma de realización preferida, el ensayo de resistencia a la bilis del ejemplo 1 se usa en el paso (a) del método de selección del tercer aspecto y el ensayo de aminoácido esencial del ejemplo 2 se usa en el paso (c) del método de selección del tercer aspecto.

10 [0088] En el paso (d) del método de selección del tercer aspecto, se aísla una célula de *Bacillus* vegetativa. Esta célula de *Bacillus* vegetativa se puede utilizar para hacer esporas de *Bacillus* a partir de ella.

15 [0089] Por consiguiente, en una forma de realización, el método de selección del tercer aspecto está seguido de un paso extra (e), donde el *Bacillus* vegetativo aislado del paso (d) se fermenta para hacer de  $10^5$  a  $10^{12}$  células vegetativas de *Bacillus* y estas  $10^5$  a  $10^{12}$  células vegetativas de *Bacillus* se usan para hacer de  $10^5$  a  $10^{12}$  células de espora de *Bacillus*, que se aíslan para dar una composición de *Bacillus*, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus*.

20 [0090] El resultado final del paso (e) es una nueva composición de *Bacillus*, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus* y donde las células de *Bacillus* son capaces de cumplir las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

25 [0091] Por consiguiente, un aspecto separado de la invención se refiere a una composición de *Bacillus* que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus*, y donde las células de *Bacillus* son capaces de cumplir las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto obtenibles por el método de selección del tercer aspecto, seguido del paso extra (f) descrito anteriormente.

30 [0092] En el paso (b) del método de selección del tercer aspecto se hacen mutaciones de la célula de *Bacillus* resistente a la bilis anteriormente seleccionada para seleccionar células de alta producción de aminoácidos esenciales en el paso (c). Como bien entiende el experto en la materia esto se puede hacer, por ejemplo, por mutación tradicional (p. ej. por tratamientos químicos o UV) de intercambio específico de genes para hacer el llamado organismo modificado genéticamente (GMO).

Cepas depositadas

35 [0093] Se ha depositado una muestra de la cepa de *Bacillus subtilis* en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zeilkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) bajo el número de acceso DSM 19467, con fecha de depósito de 27 de junio, 2667. 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.

40

## Ejemplos

### Ejemplo 1: ensayo de resistencia a la bilis

45 Medio:

[0094] El medio fue un medio estándar no selectivo, comercialmente disponible, de caldo de infusión de ternera (VIB) (Difco, 234426). En fecha del depósito de la presente solicitud, el catálogo de productos (manual Difco™/BBL™) del proveedor BD Diagnostic Systems ([www.bd.com](http://www.bd.com)) dice con respecto al caldo de infusión de ternera:

50

"Infusión de carne de ternera magra y peptona, proporciona el nitrógeno, las vitaminas, el carbono y los aminoácidos en los medios de infusión de ternera. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico de las formulaciones".

55 [0095] El medio se preparó según las instrucciones de fabricación por suspensión de 25 g del polvo de caldo de infusión de ternera en 1 L de agua purificada (2,5% de solución) y calor con agitación frecuente y ebullición durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Un 2,5% de solución de caldo de infusión de ternera incluía por litro:

Carne de ternera magra, infusión: 10g  
 Proteosa Peptona: 10 g  
 Cloruro sódico: 5 g

60

[0096] El medio se distribuyó en botellas estériles y se sometió a autoclave durante 15 min a 121°C.

Soluciones de sal de bilis/medio:

65

5 [0097] Se prepararon mezclas de sales de bilis imitando la composición fisiológica y la concentración de sales de bilis de la bilis del cerdo y se disolvieron las sales de bilis en el medio de caldo de infusión de ternera según se preparó anteriormente para dar una concentración de sal de bilis final de 8 mM. Las sales de bilis conjugadas fueron taurodesoxicolato (Sigma T-0875, EEUU) y glicodeoxicolato (Sigma G-9910, EEUU) y la sal de bilis desconjugada deoxicolato (Sigma D-5670, EEUU) y la solución de sal de bilis mezclada final de 8 mM contenía 60% de taurodesoxicolato, 30% de glicodeoxicolato y 10% de deoxicolato. Antes del autoclave durante 15 minutos a 121°C, las soluciones se ajustaron a pH 7,4 usando hidróxido sódico. El medio de sal de bilis preparado de 8 mM se diluyó para obtener concentraciones de sal de bilis de 0, 1, 2, 4, 6 y 8 mM.

10 [0098] Las sales de bilis se agregaron al medio de caldo de infusión de ternera en forma concentrada. Por consiguiente, la cantidad final de infusión de carne de ternera magra, proteosa peptona y cloruro sódico fueron esencialmente como para el 2,5% de medio de caldo de infusión de ternera antes de agregar las sales de bilis.

15 Suspensiones de esporas

20 [0099] Para distinguir entre células vegetativas y esporas y garantizar productos de esporas puras para su inoculación, el recuento de esporas del producto de *Bacillus* se determinó usando +/- tratamiento térmico a 80 °C durante 10 min. Después del tratamiento térmico y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente, se llevaron a cabo una serie de diluciones de 10-veces en agua de peptona salina. Se inocularon duplicados de placas de agar-sangre triptosa (Difco 0232-01) con 0,1 ml de las diluciones decimales apropiadas. Las placas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente. Basándose en determinaciones anteriores de recuento de esporas de los productos, se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada estéril para alcanzar una concentración de esporas calculada final de 10<sup>8</sup> UFC/mL. El recuento de células vegetativas y esporas en los inóculos finales se determinó usando el método anteriormente descrito. La concentración final de 10<sup>8</sup> UFC/ml correspondía a un valor de OD<sub>630</sub> inicial en 0,2-0,3.

25 Medición del crecimiento: mediciones de la densidad óptica

30 [0100] Se usaron placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano estériles (Greiner Bio-one GmbH, Alemania). Cada pocillo se llenó con 0,150 ml de VIB inoculado con esporas (~1x10<sup>8</sup> esporas por ml equivalente/correspondiente a un OD<sub>630</sub> de inicio ~ 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 (alto) antes de cada lectura.

35 [0101] Para evitar la condensación en el interior de la cobertura de la placa, las tapas se expusieron a una solución diluida de Tritón X 100.

40 [0102] La cinética de germinación y de crecimiento de las cepas de *Bacillus* se midió usando un espectrofotómetro a longitud de onda 630nm (OD<sub>630</sub>) (Bio-tek Instruments, Inc. VE). Las lecturas se realizaron a intervalos de 10 minutos y se analizaron usando el programa informático KC4™ (Bio-tek Instruments, Inc., EEUU). Después de 20 h, se exportaron los datos a hojas de cálculo de Excel® para posterior análisis, se importaron en la versión SAS 9.0 y se analizaron estadísticamente.

### Ejemplo 2: ensayo de aminoácidos

45 [0103] El método para medir y cuantificar los aminoácidos producidos por las células de *Bacillus* usadas en este estudio es un método estándar GC-MS para muestras acuosas, usando clorofomato de metilo como agente de derivatización.

Crecimiento de Células de *Bacillus*

50 [0104] Las células de *Bacillus* se inoculan y cultivan en uno o más medios de crecimiento de sales mínimas a 37°C, 150 r.p.m. y se cultivan durante 2 días y después se mide la cantidad de aminoácidos en el sobrenadante, como se describe más adelante.

55 [0105] Las células de *Bacillus* se propagan en un medio mínimo de sales según Chapman (1972) con la siguiente composición:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck 1.01217.1000)	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck 1.05101.1000)	7 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck 1.04873.1000)	3 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Merck 1.05886.1000)	0,1 g/l

60 Se somete a autoclave durante 15 min a 121°C y se agrega glucosa sometida a autoclave en una concentración final de 0,5 %.

65 [0106] Se realiza la incubación en tubos con 10 ml de medio durante 2 días a 37 °C y 150 r.p.m.

Ensayo de aminoácidos

[0107] El ensayo de aminoácidos se realiza en sobrenadantes celulares, ya que los aminoácidos se segregan a los medios. Muestras se filtran estériles y se mantienen a -20 °C hasta el análisis.

5 Reactivos:

[0108]

Reactivo 1: solución estándar interna. Norvalina 1 mM: 0,0172 g de Norvalina + 100 ml MQW

Reactivo 2: metanol/piridina 32/8 (v/v) (catalizador)

Reactivo 3: cloroformato de metilo p.a. (MCF) (agente de derivatización)

Reactivo 4: 1 % MCF/CHCl<sub>3</sub> (v/v) (extracción): 1 ml de cloroformato de metilo p.a. + cloroformo hasta 1000 ml.

10

Preparación de la muestra:

15

[0109]

- Pipeta 150 µl (25 µl + 125 µl MQW) muestra en 2 ml frasco de inyección.
- Adición 150 µl IS
- Adición 200 µl 1-metanol/piridina 32/8 % (v/v). Mezcla pocillo.
- Adición 25 µl MCF (cloroformato de metilo).
- Mezcla pocillo hasta que ocurre desarrollo de gas.
- Adición 500 µl 1 % MCF/CHCl<sub>3</sub> (v/v), tapa y mezcla enérgicamente. Separación de fase ocurre en minutos. Si la separación de fase es demasiado lenta, se centrifuga el frasco (500 r.p.m./10 min).

20

[0110] Si se usa norvalina como antimetabolito, un estándar externo u otro estándar adecuado interno debería usarse en su lugar, y el 150 µl IS se sustituye bien con MQW o con muestra.

[0111] Muestras se ejecutan en GC-MS con un protocolo y una columna de aminoácido estándar.

30

**Ejemplo 3: selección de célula de *Bacillus subtilis* resistente a la bilis DSM 19467**

[0112] La célula de *Bacillus* de inicio fue la célula de *Bacillus subtilis* GalliPro®.

35

[0113] GalliPro® se mutagenizó para obtener una agrupación de nuevas células de *Bacillus* individuales. Se hicieron y seleccionaron esporas para germinación y crecimiento rápidos a partir de espora a célula vegetativa en presencia de un medio de sal de bilis que comprendía 4 y 6 mM de sal de bilis según se describe en el ejemplo 1 anteriormente.

[0114] Se seleccionó la célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467.

40

[0115] La tabla 1 que aparece más adelante muestra los datos de germinación y de crecimiento.

[0116] El tiempo (horas) a partir de 10<sup>8</sup> UFC/mL correspondiente a OD 0,2-0,3 hasta que se alcanza OD 0,4 (medio de 3 réplicas).

45

<i>B. subtilis</i>	4 mM bilis	6mM bilis
Producto existente GalliPro® (DSM 17231)	>20	>20
Tolerante a la bilis (DSM 19467)	13h 40m	15h
Producto comercial: Calsporin	>20	>20

50

55

[0117] Algunos de los datos de este ejemplo se obtuvieron por prueba de DSM 19489 de sobreexpresión de fitasa. Pero para el resultado técnico de este ejemplo esto es relativamente irrelevante ya que DSM 19467 tiene la germinación y el crecimiento aproximadamente como DSM 19489. Véase PCT/EP2008/057296 para más detalles.

60

Conclusión

[0118] DSM 19467 es una cepa resistente a la bilis y claramente germina y crece más rápido que GalliPro®.

65

**Ejemplo 4: selección de células de *Bacillus* que sobre-producen aminoácidos a partir de DSM 19467**

[0119] La célula de *Bacillus* de inicio fue la célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467 seleccionada en el ejemplo 3.

5 [0120] DSM 19467, bien de tipo salvaje o mutante, producida por, por ejemplo, mutagénesis de UV, se cultivó en agar de medio mínimo de sales, descrito en el ejemplo 2B anterior y se agregó 1,5 % de agar, conteniendo análogos de aminoácido en cantidades inhibitoras adecuadas. Dependiendo del aminoácido que se quiere sobreexpresar se pueden usar varios análogos de aminoácidos, por ejemplo, norvalina o 4-aza-DL-leucina para sobreproducir leucina (Bardos, 1974, Topics in Current Chemistry 52, 63-98). Se escogieron colonias resistente al análogo de aminoácido, se cultivaron en el medio mínimo de sales y se evaluaron para producción de aminoácidos. Las células vegetativas se seleccionaron para producir alta cantidad de aminoácidos usando el método GC-MS descrito en el ejemplo 2B anteriormente. Se seleccionó la célula de *Bacillus subtilis* de alta producción de aminoácidos.

Resultados de las mediciones de aminoácidos

15 [0121] Se seleccionaron varias cepas que estaban produciendo el aminoácido esencial leucina en una cantidad que era significativamente superior a la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467.

[0122] Varias de las cepas seleccionadas produjeron al menos 5 veces más leucina que DSM 19467.

Conclusiones:

20 [0123] Este ejemplo muestra que se puede seleccionar e identificar rutinariamente (basándose en estas instrucciones) una cepa que produce al menos un aminoácido esencial (aquí ejemplificado por leucina) en una cantidad que sea significativamente superior a la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467.

25 [0124] DSM 19467 se origina a partir de GalliPro® y no se selecciona para alta producción de aminoácido esencial. Por consiguiente, se cree que GalliPro® produce aproximadamente la misma cantidad de aminoácido esencial que DSM 19467.

30 **Ejemplo 5: comprobación de resistencia a la bilis de células de *Bacillus* de alta producción de aminoácido esencial**

35 [0125] Las células de *Bacillus* de alta producción de aminoácido esencial preferidas seleccionadas en el ejemplo 4 se vuelven a controlar para su capacidad de germinación y crecimiento rápidos a partir de esporas a células vegetativas, como se describe en el ejemplo 1.

[0126] Los resultados son que, como se esperaba, han mantenido aproximadamente la misma buena germinación y crecimiento rápidos que la célula de inicio DSM 19467 usada para obtenerlas.

Referencias

40 [0127]

- 45
1. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006 Aug; 90(2):139-46. Epub 2006 Jul 4
  2. US2003/0124104A
  3. US6255098
  4. PCT/EP2008/057296

## REIVINDICACIONES

1. Composición de *Bacillus*, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus*, donde la composición de *Bacillus* se caracteriza por el hecho de que:

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

(l): donde el medio de sal de bilis es el medio de caldo de infusión de ternera (VIB) no selectivo suplementado con una mezcla de sal de bilis que comprende las sales de bilis conjugadas taurodesoxicolato y glicodeoxicolato y la sal de bilis desconjugada deoxicolato en las proporciones 60% de taurodesoxicolato, 30% de glicodeoxicolato y 10% de deoxicolato; y

donde el análisis de ensayo OD se realiza mediante los siguientes pasos:

(a): rellenando un pocillo de una placa de microtitulación con 0,150 ml de medio de sal de bilis con  $10^8$  esporas de *Bacillus* por ml de medio (es decir, este es el tiempo cero); e

(b): incubando la placa a 37°C bajo condiciones atmosféricas y midiendo los valores OD<sub>630</sub>, usando un espectrofotómetro y con agitación antes de cada lectura, para obtener una curva de crecimiento representativa en el tiempo;

y

(ii) las células vegetativas de *Bacillus* producen al menos un aminoácido esencial en una cantidad que es al menos 2 veces más que la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467, donde la cantidad de aminoácido esencial producido se mide en el sobrenadante mediante el ensayo basado en aminoácido del método estándar GC-MS para muestras acuosas usando clorofomato de metilo como agente de derivatización después de dos días de crecimiento de las células de *Bacillus* a 37°C y 150 r.p.m., incubadas en tubos con 10 ml de medio de un medio de crecimiento de sales mínimo con la siguiente composición:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck 1:01217.1000)	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck 1.05101.1000)	7 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck 1.04873.1000)	3 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Merck 1.05886.1000)	0,1 g/l

que se ha sometido a autoclave durante 15 min a 121°C y se ha añadido glucosa sometida a autoclave en una concentración final de 0,5 %.

2. Composición de *Bacillus* de la reivindicación 1, donde las células de esporas de *Bacillus* de la composición están presentes como células de espora en forma seca (p. ej. secado por pulverización).

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

4. Composición de *Bacillus* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las esporas de *Bacillus* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa al menos 3 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231, que bajo las condiciones del punto (i) según la reivindicación 1 es al menos 20 horas después de la incubación.

5. Composición de *Bacillus* de cualquiera de reivindicaciones 1 a 4, donde el aminoácido esencial es un aminoácido esencial seleccionado del grupo que consiste en: fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina.

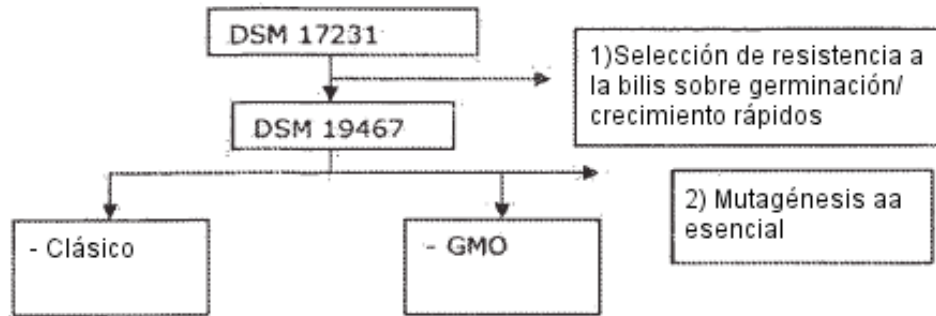
6. Composición de *Bacillus* de la reivindicación 5, donde el aminoácido esencial es al menos un aminoácido esencial seleccionado del grupo que consiste en: valina, isoleucina y leucina.

7. Composición de *Bacillus* de la reivindicación 6, donde el aminoácido esencial es leucina.

8. Composición de *Bacillus* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde las células vegetativas de *Bacillus* producen al menos un aminoácido esencial en una cantidad al menos 4 veces superior a la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) de la reivindicación 1.

9. Método para alimentar a un animal que comprende la administración de la composición de *Bacillus* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 a un animal conjuntamente con otros ingredientes de alimento para animales.
- 5 10. Método para alimentar a un animal según la reivindicación 9, donde el animal es un animal seleccionado del grupo que consiste en aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, peces y animales domésticos.
11. Método para seleccionar y aislar una célula de *Bacillus* nueva que comprende los pasos siguientes:
- 10 (a): selección y aislamiento, a partir de una agrupación de células de esporas de *Bacillus* individuales, de una nueva célula de espora de *Bacillus* que es capaz de germinar y de crecer tan rápidamente que alcanza un punto de crecimiento de célula vegetativa en menos de 18 y 19 horas bajo las condiciones del punto (i) de la reivindicación 1;
- 15 (b): producción de una célula de *Bacillus* vegetativa a partir de la célula de espora aislada del paso (a) y mutación de la célula aislada y seleccionada nueva para obtener una agrupación de células vegetativas de *Bacillus* individuales nuevas;
- (c): selección y aislamiento, a partir de la agrupación de células vegetativas de *Bacillus* individuales nuevas del paso (b), de una nueva célula vegetativa de *Bacillus* que es capaz de producir al menos un aminoácido esencial en una cantidad que es superior a la de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) de la reivindicación 1 y
- 20 (d): análisis de la célula de *Bacillus* vegetativa de alta producción del paso (c) para confirmar que ésta ha mantenido la germinación y el crecimiento rápidos del paso (a) y aislamiento de la célula de *Bacillus* seleccionada.
- 25 12. Método para seleccionar y aislar una célula de *Bacillus* nueva según la reivindicación 11, donde la célula de *Bacillus* es una célula de *B. subtilis*.

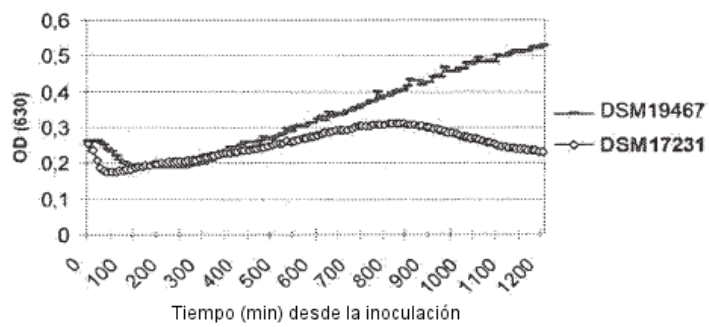
**Figura 1: cepas de *B. subtilis***





**Figura 2A y 2B**

**Curvas de crecimiento en 4 mM de sales de bilis**



**Curvas de crecimiento en 6 mM de sales de bilis**

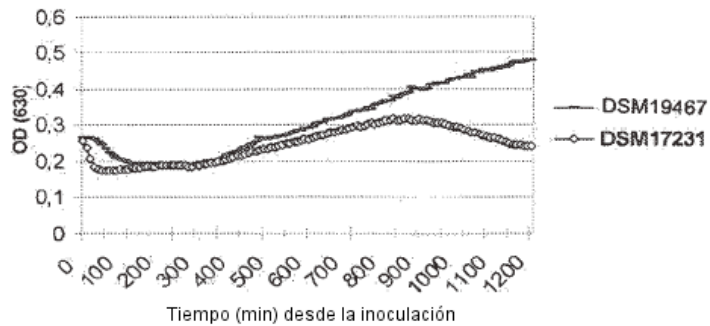


Figura 2A (4 mM) y 2B (6 mM). Tiempo (min) a partir de  $10^8$  esporas/ml hasta que se alcanza OD 0,4<sub>630</sub>