

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 089**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2007 E 07724762 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2020869**

54 Título: **Combinación de poli-3-hidroxiburirato y despolimerasa como componentes de piensos o aditivos para piensos**

30 Prioridad:

01.05.2006 US 796436 P
09.05.2006 EP 06009515
23.02.2007 EP 07003803

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2013

73 Titular/es:

RECTICEL N.V. (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent , BE

72 Inventor/es:

BOON, NICO;
DEFOIRD, TOM;
DE WINDT, WIM;
VAN DE WIELE, TOM y
VERSTRAETE, WILLY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 435 089 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

Combinación de poli-3-hidroxibutirato y despolimerasa como componentes de piensos o aditivos para piensos

Antecedentes de la invención

- 5 El documento EP 1661574A1 describe una composición para administrar un β -hidroxiácido graso de cadena corta-media o uno de sus oligómeros al intestino grueso, que comprende un polímero del β -hidroxiácido graso de cadena corta-media
- La solicitud de patente de EE.UU. 2006/210630A1 describe una forma de dosificación farmacéutica oral, que comprende un componente de liberación inmediata de ácido gamma-hidroxibutírico (GHB) y uno o más componentes de liberación retardada/controlada de ácido gamma-hidroxibutírico.
- 10 La patente de EE.UU. 5.461.073 describe un método para suprimir la septicemia de un paciente en un estado de deficiencia energética en el tracto intestinal, que comprende administrar a dicho paciente una preparación líquida de sustitución que consiste esencialmente en una cantidad eficaz de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido (R)-3-hidroxibutírico, ácido (RS)-3-hidroxibutírico y una de sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para suprimir la transferencia bacteriana desde el
- 15 tracto intestinal a la sangre de dicho paciente.
- El documento de patente WO 2005/056002A describe el uso de un inductor de la vía de degradación de la gamma-butirolactona para aumentar la degradación enzimática de la lactona de la N-acil-homoserina en bacterias patógenas gram-negativas sensibles a la lactona de N-acil-homoserina de señal, con la excepción del ácido butírico y ácido α -hidroxi-p-metilbutírico.
- 20 Esta invención se refiere al uso de poli-3-hidroxibutirato como componente de piensos o agua potable o de aditivos para piensos o para agua potable, así como a composiciones, aditivos para piensos, agua potable y piensos que lo contienen.
- El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuado para la ingesta por un animal o destinado a dicha ingesta.
- 25 Más en particular, la presente invención se refiere al uso de poli-3-hidroxibutirato (PHB) o una sal, éster o combinación de PHB, una sal de PHB y un éster de PHB como ingredientes activos de composiciones nutracéuticas para animales.
- El término "nutracéuticas" tal como se utiliza en la presente memoria representa una utilidad tanto en el campo de aplicación nutricional y farmacéutico. Por lo tanto, las composiciones nutracéuticas pueden encontrar uso como un
- 30 pienso completo (dieta), como complemento de piensos y como formulaciones farmacéuticas para aplicación enteral o parenteral, que pueden ser formulaciones sólidas o formulaciones líquidas.
- El término animal incluye todos los animales, incluidos seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado, por ejemplo, vacas, tales como vacas para carne y vacas lecheras. En una realización particular, el animal es un animal
- 35 no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales de compañía, por ejemplo, caballos, gatos y perros, animales monogástricos, por ejemplo, cerdos o puercos (incluyendo, aunque sin limitación, lechones, cerdos para engorde y cerdas); aves de corral, tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, aunque sin limitación, pollos para consumo, gallinas ponedoras); peces (incluyendo aunque sin limitación, salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas); y crustáceos (incluyendo, aunque sin limitación, camarones y gambas).
- 40 En los animales de granja se han logrado la supresión de enfermedades entéricas por un lado y la promoción del crecimiento por otro lado mediante la inclusión de antibióticos y/o agentes quimioterapéuticos en las dietas.
- Por un lado, se sabe que el ácido butírico es un agente antimicrobiano "suave" que muestra un efecto "prebiótico" cuando se tratan los animales. El ácido butírico tiene un fuerte efecto positivo sobre la proliferación y maduración de los enterocitos y colonocitos. Actualmente se añade ácido butírico (principalmente, junto con antibióticos) a piensos
- 45 como agente prebiótico después de que se sintetiza, se neutraliza con CaO y se trata con silicato. Pero una de las grandes desventajas de la utilización del ácido butírico en la nutrición animal es que los productos actuales de ácido butírico son pegajosos y huelen muy mal.
- Por otro lado, en los últimos años, se ha prestado una considerable atención también a los ácidos grasos de cadena corta (abreviadamente SCFA, por la expresión inglesa *Short Chain Fatty Acids*) como una alternativa a los
- 50 promotores tradicionales del crecimiento. Por ejemplo, la solicitud de patente europea 1661574 describe una composición que comprende polímeros de hidroxiácidos grasos de cadena corta a media, en lo sucesivo también denominados "polihidroxialcanoatos (PHA)", que se utilizan para administrar el hidroxiácido graso o uno de sus oligómeros al intestino grueso. En el caso de que la composición se administre por vía oral, la composición será administrada al intestino grueso, sin que se degrade en el estómago o intestino delgado, pero al ser degradada por

la abundante flora bacteriana intestinal da como resultado la liberación de los ácidos grasos de cadena corta a media o sus oligómeros. La solicitud de patente EP 1661574 describe además que los ácidos grasos de cadena corta a media o sus oligómeros liberados tienen actividades fisiológicas útiles y son eficaces para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias o cáncer en el intestino grueso.

5 **Sumario de la invención**

Los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que el poli-3-hidroxi-bu-ti-rato tiene un gran potencial para su uso en piensos o agua potable para la modulación de la flora intestinal. Más precisamente, se ha encontrado que el poli-3-hidroxi-bu-ti-rato o una cepa prebiótica capaz de producir poli-3-hidroxi-bu-ti-rato se puede usar como un promotor de crecimiento potencial o modulador de la flora intestinal por la liberación de SCFA, preferiblemente ácido 3-hidroxi-bu-ti-rico, ya en el intestino delgado. Además, los inventores encontraron que el poli-3-hidroxi-bu-ti-rato tiene un gran potencial para la supresión o la inhibición de bacterias patógenas, por ejemplo, tienen actividad antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, *Salmonella* y *Vibrio*.

Como se ha descrito anteriormente alimentar poli-3-hidroxi-bu-ti-rato a los organismos superiores permite la liberación de ácido butírico en el tracto gastrointestinal. Esta alimentación da como resultado un efecto bacteriostático atractivo, comparable con el ácido butírico actualmente añadido a la alimentación animal como agente prebiótico. Además, el PHB se formula mucho mejor, no huele y se puede añadir a piensos en forma de pequeñas partículas.

Alimentar con PHB organismos superiores de acuerdo con la presente invención permite, además, una liberación constante, preferiblemente lenta y controlada de los monómeros activos de SCFA en el tracto gastrointestinal.

El documento de la técnica anterior más próximo EP-A-1661574 no describe el uso de poli-3-hidroxi-bu-ti-rato para la adición a piensos o a agua potable para modular la microflora intestinal ni el uso de estos compuestos como agentes antimicrobianos contra *Vibrio*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y otros microorganismos patógenos.

Por lo tanto, en un primer objeto, la presente invención se refiere al uso de poli-3-hidroxi-bu-ti-rato o una cepa microbiana capaz de producir poli-3-hidroxi-bu-ti-rato (PHB) y que pertenece al grupo de las proteobacterias, junto con al menos un despolimerasa o con una cepa microbiana que expresa dicha despolimerasa, produciendo dicha despolimerasa la liberación de monómeros de 3-hidroxi-bu-ti-rato en el tracto gastrointestinal, para la fabricación de un medicamento como un componente de un pienso o aditivo para piensos para la modulación de la microflora intestinal en el animal.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para modular la microflora intestinal de un animal, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al animal un pienso que comprende poli-3-hidroxi-bu-ti-rato o que comprende cepas de microorganismos, que producen poli-3-hidroxi-bu-ti-rato.

El término "intestino" como se utiliza en la presente memoria designa el tracto gastrointestinal o digestivo (también denominado tubo digestivo) y se refiere al sistema de órganos dentro de los animales multicelulares, que recibe el alimento, lo digiere para extraer la energía y los nutrientes y expulsa los residuos restantes. En realizaciones particulares, el término "intestino" abarca el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. El "intestino superior" como se utiliza en la presente memoria se refiere al intestino excluyendo el intestino grueso.

El término "microflora" intestinal, alternativamente especificado como "microbiota" intestinal, como se usa en la presente memoria se refiere a cultivos microbianos naturales que residen en el intestino y que mantienen la salud ayudando a la digestión apropiada y/o manteniendo la función del sistema inmunitario.

El término "modular" tal como se utiliza en la presente memoria en relación con la microflora intestinal significa generalmente cambiar, manipular, alterar o ajustar la función o su estado en un animal sano y que funciona normalmente, es decir, un uso no terapéutico. La modulación se produce en respuesta a los diversos PHB de la invención.

Descripción detallada de la invención

En una realización preferida, la presente invención proporciona el uso de poli-3-hidroxi-bu-ti-rato. Por consiguiente, las realizaciones particulares de la invención se refieren a métodos de modulación de la microflora intestinal y/o la reducción o prevención de la infección bacteriana en un animal, que comprende administrar al animal poli-3-hidroxi-bu-ti-rato.

El poli-3-hidroxi-bu-ti-rato está disponible comercialmente o puede ser preparado fácilmente por un experto usando procesos y métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polihidroxi-bu-ti-rato se puede producir de acuerdo con las descripciones de los documentos de patentes WO95/20615, WO95/33064, WO97/07229, WO97/07230 y WO97/15681. También es conocida la forma de producir los PHB por células vegetales como se describe en los documentos WO92/19747 y WO93/02187.

El PHB se puede administrar a los animales como un componente de una composición nutracéutica que se alimenta convencionalmente a los animales. Por lo tanto, el PHB se puede administrar adecuadamente a los animales como

un componente del pienso y/o de su agua potable.

5 El poli-3-hidroxitirato se utiliza en combinación con al menos un despolimerasa que produce la liberación del monómero activo en el tracto gastrointestinal. Si se utiliza poli-3-hidroxitirato en una formulación de aditivo para piensos puede ser también utilizado en combinación con una cepa generalmente reconocida como segura (abreviadamente en lo sucesivo GRAS por la expresión inglesa *Generally Recognised As Safe*) que expresa dicha despolimerasa o un consorcio de cepas GRAS, que expresan dicha despolimerasa.

El término cepa GRAS tal como se utiliza en la presente memoria denota una "cepa inofensiva" o "cepa no patógena y no tóxica" o un "microorganismo con estatus de GRAS".

10 Alternativamente, el poli-3-hidroxitirato (PHB) y la despolimerasa se administran a los animales por separado, ya sea en una forma similar o diferente (por ejemplo, en formulaciones separadas de piensos o en formulaciones de piensos y/o agua potable). Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención proporciona dichas combinaciones y métodos para el uso de estas combinaciones.

15 Ejemplos de despolimerasas que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen (aunque sin limitación) enzimas PHB-despolimerasas extracelulares, enzimas hidrolasas de tipo endo extracelulares, enzimas hidrolasas oligómeras extracelulares y enzimas PHB-despolimerasas intracelulares o una combinación de las enzimas antes mencionadas.

20 El PHB se puede utilizar en combinación con ingredientes convencionales presentes en una composición de pienso, tales como carbonatos de calcio, electrolitos, tales como cloruro de amonio, proteínas, tales como harina de soja, trigo, almidón, harina de girasol, maíz, carne y harina de huesos, aminoácidos, grasa animal, vitaminas y minerales en cantidades trazas.

25 En solo un aspecto adicional, la invención se refiere al uso en piensos o agua potable de una cepa de un microorganismo, que produce PHB y a dichas cepas, para modulación de la microflora intestinal. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para modular la microflora intestinal de un animal, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al animal un pienso y/o agua potable que comprenden un microorganismo que produce PHB. La(s) cepa(s) microbiana(s) que produce(n) PHB para uso en los métodos de la presente invención es(son) productora(s) de PHB extracelular o intracelularmente.

30 Opcionalmente, dicha cepa microbiana se puede utilizar sola o en combinación con al menos una despolimerasa que produce la liberación controlada de los monómeros activos en el tracto gastrointestinal. De acuerdo con esta realización, la presente invención proporciona métodos para modular la microflora intestinal de un animal, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al animal un pienso y/o agua potable que comprende un microorganismo que produce PHB y una despolimerasa o una cepa de un microorganismo que produce la despolimerasa.

35 La(s) cepa(s) microbiana(s) que produce(n) PHB y/o despolimerasa para uso en los métodos de la presente invención se cultiva(n) de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, en un medio que contiene fuentes de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas, etc., que pueden ser asimiladas por el hospedante y bajo condiciones adecuadas de temperatura, pH y aireación para el cultivo eficaz y la expresión del producto, PHB y/o despolimerasa deseados.

40 En realizaciones particulares, el PHB se aísla de una o más cepas bacterianas para generación de un componente de pienso o agua potable o como un aditivo para piensos para uso en los métodos de la invención. El aislamiento del caldo de fermentación y/o el transformante y, si se desea, la purificación del PHB obtenido incluyendo su mezclado para uso humano o animal se puede efectuar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Para su uso en la salud y nutrición de animales, sin embargo, puede no ser necesaria una purificación específica. En este caso el PHB junto con la biomasa y/u otros componentes del caldo de fermentación pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo, mediante secado por pulverización, para obtener un producto comercialmente atractivo.

45 Los ejemplos de bacterias que son capaces de producir PHB intracelular en buenas cantidades incluyen cepas de los géneros de proteobacterias como, por ejemplo, *Ralstonia* o *Rhodobacter*. En otras realizaciones particulares, la cepa es una cepa de *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699) o *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC 35053).

50 Los ejemplos de bacterias que son capaces de producir PHB extracelular en buenas cantidades incluyen organismos genéticamente modificados, es decir, cepas recombinantes como, por ejemplo, una cepa como la descrita en el trabajo "*Mutation in a tesB-like hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalcanoates by Alcanivorax borkumensis SK2*", de Sabirova JS et al., *Journal of Bacteriology* 188 (24): 8452-8459, dec 2006".

55 De acuerdo con una realización particular, la(s) cepa(s) productora(s) de PHB utilizada(s) en el contexto de la presente invención se trata(n) adicionalmente con el fin de enriquecer la producción de PHB. Por consiguiente, la

presente invención proporciona cultivos de enriquecimiento de cepas productoras de PHB para su uso en los métodos de la invención. Más particularmente, las cepas enriquecidas de la presente invención contienen al menos 10%, más particularmente al menos 15%, de PHB en el total de sólidos en suspensión volátiles (abreviadamente VSS por la expresión inglesa *Volatile Suspended Solids*). Ejemplos de métodos de enriquecimiento incluyen ciclos de congelación y descongelación. En otras realizaciones, la biomasa de una o más bacterias productoras de PHB se utiliza en el pienso o agua potable o como un aditivo para piensos.

En el uso de acuerdo con la invención, el PHB y/o la biomasa pueden ser alimentados al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Se prefiere esto último.

Un segundo objeto de la presente invención es proporcionar composiciones, por ejemplo, pienso, agua potable y aditivos para piensos o para agua potable, que comprenden:

- PHB y al menos una despolimerasa o una cepa que expresa dicha despolimerasa o
- una cepa que produce PHB y al menos una despolimerasa o una cepa que expresa dicha despolimerasa.

Otras realizaciones particulares se refieren a combinaciones y kits de dos o más composiciones de piensos, agua potable y aditivos para piensos o para agua potable, en donde cada una de las composiciones comprende uno de: (1) un PHB o una cepa productora de PHB o (2) una despolimerasa o una cepa productora de despolimerasa. De acuerdo con esta realización las dos o más composiciones están empaquetadas por separado. Las dos o más composiciones de las combinaciones y kits de la presente invención se pueden combinar antes de la administración o se administran por separado (secuencial o simultáneamente) al animal en los métodos de la presente invención.

Ejemplos particulares de composiciones de la invención son los siguientes:

- Un aditivo para piensos o para agua potable que comprende: (a) PHB y una PHB-despolimerasa, (b) al menos una vitamina soluble en grasas, (c) al menos una vitamina soluble en agua, (d) al menos un mineral en cantidades trazas, y/o (e) al menos un macromineral;
- Una composición de pienso o agua potable que comprende: (a) PHB y una PHB-despolimerasa y (b) un contenido de proteína en bruto de 50 a 800 g/kg de pienso;
- Un aditivo para pienso o para agua potable que comprende: (a) una cepa del microorganismo como se ha definido anteriormente y una PHB-despolimerasa, (b) al menos una vitamina soluble en grasa, (c) al menos una vitamina soluble en agua, (d) al menos un mineral en cantidades trazas y/o (e) al menos un macromineral;
- Una composición de pienso que tiene un contenido de proteína en bruto de 50 a 800 g/kg y que comprende una cepa o un consorcio de microorganismos como se definió anteriormente y una PHB-despolimerasa.

La PHB-despolimerasa se añade a las composiciones de la presente invención en forma de una enzima pura o en forma de una biomasa de una cepa que produce PHB-despolimerasa intracelular o en forma de una cepa prebiótica que produce PHB-despolimerasa extracelular. Un ejemplo de una cepa prebiótica es *Comamonas testosteroni* (LMG19554).

Un segundo objeto de la presente invención es proporcionar piensos o aditivos para piensos, por ejemplo, pienso, agua potable y aditivos para piensos o agua potable, que comprenden como ingredientes activos:

- poli-3-hidroxitirato (PHB) y al menos una despolimerasa o una cepa microbiana que expresa dicha despolimerasa o
- una cepa microbiana capaz de producir poli-3-hidroxitirato (PHB) y al menos una despolimerasa o una cepa que expresa dicha despolimerasa.

Otras realizaciones particulares se refieren a combinaciones y kits de dos o más composiciones de pienso, agua potable y aditivos para pienso o agua potable, en donde cada una de las composiciones comprende uno de: (1) un PHB o una cepa productora de PHB o (2) una despolimerasa o una cepa productora de despolimerasa. De acuerdo con esta realización las dos o más composiciones están empaquetadas por separado. Las dos o más composiciones de las combinaciones y kits de la presente invención se pueden combinar antes de la administración o se administran por separado (secuencial o simultáneamente) al animal en los métodos de la presente invención.

Ejemplos particulares de composiciones de la invención son los siguientes:

- Un aditivo para piensos o agua potable que comprende: (a) PHB y una PHB-despolimerasa, (b) al menos una vitamina soluble en grasas, (c) al menos una vitamina soluble en agua, (d) al menos un mineral en cantidades trazas y/o (e) al menos un macromineral;

– Una composición de pienso o agua potable que comprende: (a) PHB y una PHB-despolimerasa y (b) un contenido de proteínas en bruto de 50 a 800 g/kg de pienso;

5 – Un aditivo para piensos o agua potable que comprende: (a) una cepa de microorganismo como se ha definido anteriormente y una PHB-despolimerasa, (b) al menos una vitamina soluble en grasas, (c) al menos una vitamina soluble en agua, (d) al menos un mineral en cantidades trazas y/o (e) al menos un macromineral;

– Una composición de pienso que tiene un contenido de proteínas en bruto de 50 a 800 g/kg y que comprende una cepa o un consorcio de microorganismos como se definió anteriormente y una PHB-despolimerasa.

10 La PHB-despolimerasa se añade a las composiciones de la presente invención en forma de una enzima pura o en forma de una biomasa de una cepa que sea productora de PHB-despolimerasa intracelular o como una cepa prebiótica que sea productora de PHB-despolimerasa extracelular. Un ejemplo de dicha cepa prebiótica es *Comamonas testosteroni* (LMGI 9554).

15 El PHB se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como un PHB relativamente puro o en una mezcla con otros componentes destinados para la adición a piensos, es decir, en forma de aditivos para piensos, tales como las denominadas pre-mezclas para piensos. Por ejemplo, el PHB o la biomasa que contiene PHB se puede añadir a una dieta animal en forma de pulverización seca como un *Dry Pulver*.

20 La cantidad de PHB administrada al animal está en el intervalo de 0,05 - 5% basado en el peso total de cada uno de los piensos suministrados a los animales, lo que corresponde a 500 - 50.000 ppm o mg/kg de pienso. En una realización preferida de la invención el PHB se utiliza en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis diaria de 5 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal del sujeto al que se ha de administrar.

En realizaciones preferidas, el PHB se administra en una o más de las siguientes cantidades (intervalos de dosificación): 0,01-500; 0,01-200; 0,01-100; 0,05-100; 0,1-10; 0,5-100; 0,5-50; 1-50, 1-10, 5-100, 10-100; estando todos estos intervalos en mg de PHB por kg de pienso (ppm).

25 Actualmente se considera que la cepa de *Ralstonia* o de *Rhodobacter* se administre en forma de biomasa seca que contenga 100 a 500, por ejemplo, 150 a 260 g de PHB/kg de biomasa.

Una cepa prebiótica que produce PHB-despolimerasa extracelular, como por ejemplo *Comamonas testosteroni* (LMG19554), se administra preferiblemente al animal en el intervalo de 10^6 - 10^8 UFC/kg de pienso.

Los siguientes son ejemplos particulares no limitativos del efecto de modulación de la microflora intestinal obtenido por el PHB de la invención (cambios en comparación con un control sin PHB de la invención):

30 (i) una disminución de la frecuencia con la que la *Salmonella* se presenta *in vivo*, por ejemplo en lechones o en pollos para consumo, determinada preferiblemente después de cultivo de contenidos íleo-rectales y/o cecales en: (1) selenito y cistina y en (2) medios *Rappaport Vassiliadis* a 41,5°C, bajo una ligera agitación durante 24 horas seguido por la transferencia de 10 µL de ambas incubaciones a medios Hektoen, SMID y XLT4 e incubación a 37°C durante 24 horas.

35 (ii) una disminución del número de *Escherichia coli in vivo*, por ejemplo en lechones y/o pollos para consumo, determinada preferiblemente después del cultivo de contenidos íleo-rectales y/o cecales, respectivamente, en medios cromógenos Coli-ID, aeróbicamente, a 37°C durante 24 horas;

40 (iii) una disminución del número de otras enterobacteriáceas (distintas de *E. coli*) *in vivo*, por ejemplo en lechones, determinada preferiblemente después del cultivo de contenidos íleo-rectales en medios cromógenos Coli-ID, aeróbicamente, a 37°C durante 24 horas;

(iv) una disminución del número de *Enterococcus spp. in vivo*, por ejemplo en lechones, determinada preferiblemente después del cultivo de contenidos íleo-rectales en un agar-agar de enterococos, aeróbicamente, a 44°C durante 48 horas, y/o

45 Aún más, también en relación con el efecto de modulación de la microflora intestinal y con referencia a un control sin PHB de la invención, el PHB de la invención preferiblemente:

(v) influye sustancialmente, por ejemplo, reduce el crecimiento *in vitro* de microorganismos dañinos, tales como bacterias, por ejemplo, como los aislados de los contenidos intestinales aislados de lechones y/o pollos para consumo.

50 El mantenimiento de un "microflora" intestinal equilibrada ayuda a una digestión apropiada y/o al mantenimiento de la función del sistema inmunitario y, por tanto, en general, da como resultado una mejor relación de conversión de piensos (abreviadamente FCR por la expresión inglesa *Feed Conversion Ratio*).

De acuerdo con la invención, la FCR se puede determinar sobre la base de un ensayo de engorde de pollos para consumo que comprende un primer tratamiento en el que se añade PHB al pienso en una concentración adecuada por kg de pienso, y un segundo tratamiento (control) sin adición al pienso de PHB o biomasa que contenga PHB.

- 5 Como es de conocimiento general, una mejor FCR es inferior a la FCR de control. En realizaciones particulares, la FCR se mejora (es decir, se reduce) en comparación con el control en al menos 1,0%, preferiblemente al menos 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4% o al menos 2,5%.

Una parte del PHB y/o la cepa bacteriana que produce PHB, los aditivos para piensos de la invención contienen opcionalmente al menos una vitamina soluble en grasas y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un mineral en cantidades trazas y/o al menos un macromineral.

- 10 Además, son ingredientes opcionales de aditivos para piensos: agentes colorantes, por ejemplo carotenoides, tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína; compuestos de aroma; estabilizantes; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o al menos una enzima seleccionada de fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32), fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (EC 3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados de C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosohexaenoico, ácido icosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

- 20 Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

Por lo general, las vitaminas solubles en grasas y en agua, así como los minerales en cantidades trazas forman parte de una denominada premezcla destinada a la adición al pienso, mientras que los macrominerales normalmente se añaden al pienso por separado. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando está enriquecido con PHB o una cepa bacteriana de la invención, es un aditivo para piensos de la invención.

- 25 Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas solubles en grasas son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas solubles en agua son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, D-pantotenato de Ca.

- 30 Ejemplos de minerales en cantidades trazas son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

Los requisitos nutricionales de estos componentes (ilustrados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A del documento de patente WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deben ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

- 35 Como alternativa, el aditivo para piensos de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A del documento de patente WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno o dos o tres o cuatro, y así sucesivamente hasta trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual está incluido en el aditivo de la invención en una cantidad tal que proporcione una concentración en el pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro o la columna cinco o la columna seis de la Tabla A.

Las composiciones de piensos o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteínas. Las dietas para aves de corral y cerdos pueden ser caracterizadas como se indica en la Tabla B del documento de patente WO 01/58275, Columnas 2-3. Las dietas para peces pueden ser caracterizadas como se indica en la columna 4 de dicha Tabla B. Además, dichas dietas para peces normalmente tienen un contenido de grasa en bruto de 200-310 g/kg.

- 45 La solicitud de patente WO 01/58275 corresponde a la solicitud de patente de EE.UU. 09/779334 que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Una composición de pienso según la invención tiene un contenido de proteínas en bruto de 50-800 g/kg y comprende, además, al menos HB, preferiblemente PHB y/o al menos una cepa como se describe y/o reivindica en la presente memoria.

- 50 Además o alternativamente (al contenido de proteínas en bruto indicado anteriormente), la composición de pienso de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200

g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

5 En realizaciones particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína en bruto, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de uno cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 de la Tabla B del documento de patente WO 01/58275(R. 2-5).

La proteína en bruto se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por el factor 6,25, es decir, la proteína en bruto (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C, 1984, *Official Method of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists*, Washington DC).

10 La energía metabolizable se puede calcular sobre la base de *NRC Publication Nutrient Requirements in Swine, Ninth revised edition, Subcommittee on Swine Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture National Research Council*. National Academy Press, Washington, D.C. pp 2-6, y *The European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt Centre for Poultry Research and Extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos, Grafisch bedrijf Ponsen & Looijen BV, Wageningen*. ISBN 90-71463-12-5.

15 El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula sobre la base de tablas de alimentación, tales como las contenidas en *Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad*. ISBN 90-72839-13-7.

20 En una realización particular, la composición de pienso de la invención contiene al menos una proteína o fuente de proteína vegetal. También puede contener proteínas de origen animal, tal como carne y harina de huesos y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. El término proteínas vegetales, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína procedente de un vegetal u originada de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas. En realizaciones particulares, el contenido en proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

25 Las proteínas vegetales pueden proceder de fuentes de proteínas vegetales, tales como legumbres y cereales, por ejemplo materiales procedentes de plantas de las familias Fabáceas (leguminosas), Crucíferas, Quenopodiáceas y Poáceas, tales como harina de soja, harina de altramuz y harina de colza.

En una realización particular, la fuente de proteínas vegetales es material de una o más plantas de la familia Fabáceas, por ejemplo soja, altramuz, guisante o alubia.

30 En otra realización particular, la fuente de proteínas vegetales es material procedente de una o más plantas de la familia Quenopodiáceas, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.

Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.

35 Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son cereales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.

Todavía en otras realizaciones particulares, la composición de pienso de la invención contiene: 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-30% de centeno; y/o harina de soja 0-40%; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de carne y harina de huesos; y/o 0-20% de suero de leche.

40 Se pueden fabricar por ejemplo, dietas de animales como un pienso en forma de puré (no peletizado) o pienso peletizado, típicamente se mezclan los materiales alimenticios molidos y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales de acuerdo con las especificaciones para las especies en cuestión. El(los) PHB y/o la cepa bacteriana se pueden añadir como formulaciones sólidas o líquidas.

45 Los medicamentos son formulaciones farmacéuticas utilizadas para tratar una enfermedad. Una enfermedad puede ser definida como un deterioro de la salud o un estado de funcionamiento anómalo; en otras palabras: un estado de sentirse enfermo debido a una causa particular.

El término "agente antimicrobiano" se define en la presente memoria como un compuesto químico o composición que tiene actividad antimicrobiana cuando se aplica al cuerpo del animal, es decir, que por sí mismo muestre actividad antimicrobiana o que - como un "profármaco" - genere actividad antimicrobiana después de modificación química, en el caso del PHB, después de despolimerización.

50 El término "actividad antimicrobiana" (o "efecto antimicrobiano") significa una capacidad de matar y/o inhibir o prevenir el crecimiento de células microbianas. Ejemplos de células microbianas son células de microorganismos.

El término "microorganismos" incluye bacterias, protozoos, algas, hongos (incluyendo levaduras) y virus.

- 5 La actividad antimicrobiana puede ser, por ejemplo, bactericida, bacteriostática, fungicida, fungistática y/o virucida. El término "bactericida" ha de entenderse como capaz de matar células bacterianas; el término "bacteriostática" como capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, es decir, inhibir el crecimiento de células bacterianas; el término "fungicida" como capaz de matar células fúngicas; el término "fungistática" como capaz de inhibir el crecimiento fúngico, es decir, inhibir el crecimiento de células fúngicas; y el término "virucida" ha de entenderse como capaz de inactivar virus.
- En el contexto de la presente invención, el término "inhibir el crecimiento de células microbianas" está destinado a significar que las células están en el estado de no crecimiento, es decir, que no son capaces de propagarse.
- 10 En realizaciones particulares de la invención, el PHB da lugar a los SCFA, que son: (i) capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, a saber, bacteriostáticos, y/o (ii) capaz de matar células bacterianas, a saber, bactericidas.
- Para los propósitos de la presente invención, la actividad antimicrobiana se puede determinar por el ensayo de la concentración inhibidora mínima (CIM), que está descrito por el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, en: *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standards* (M26-A), Vol. 19, 1999).
- 15 En pocas palabras, la CIM se determina inoculando diluciones dobles de PHB en caldo de Mueller-Hinton (abreviadamente MHB por la expresión inglesa *Mueller-Hinton Broth*) a un cultivo del microorganismo en crecimiento activo e incubando a 35°C. Las CIM se determinan después de 24 horas de incubación y se definen como la concentración mínima del PHB sin crecimiento visible.
- 20 Para los presentes fines, se reconoce actividad antimicrobiana frente a una determinada especie de microorganismo para compuestos que tienen un valor de la CIM inferior a 300 microgramos/mL.
- Los microbios de potencial interés incluyen, aunque sin limitación, bacterias gram-positivas como, por ejemplo, *Clostridium* o bacterias gram-negativas, por ejemplo, *Citrobacter sp.*; *Enterobacter sp.*, *Escherichia sp.*, por ejemplo, *E. coli*, *Klebsiella sp.*; *Morganella sp.*; *Proteus sp.*; *Providencia sp.*; *Salmonella sp.*, por ejemplo, *S. typhi*, *S. typhimurium*; *Serratia sp.*; *Shigella sp.*; *Pseudomonas sp.*, por ejemplo, *P. aeruginosa*, *Yersinia sp.*, por ejemplo, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*; *Franciscella sp.*; *Pasteurella sp.*, *Vibrio sp.*, por ejemplo, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*; *Campylobacter sp.*, por ejemplo, *C. jejuni*, *Haemophilus sp.*, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. ducreyi*; *sp Bordetella*, por ejemplo, *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*; *Brucella sp.*; *Neisseria sp.*, por ejemplo, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, etc. Otras bacterias de interés incluyen *Legionella sp.*, por ejemplo, *L. pneumophila*, *Listeria sp.*, por ejemplo, *L. monocytogenes*; *Mycoplasma sp.*, por ejemplo, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *Mycobacterium sp.*, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Treponema sp.*, por ejemplo, *T. pallidum*, *Borrelia sp.*, por ejemplo, *B. burgdorferi*; *Leptospirae sp.*; *Rickettsia sp.*, por ejemplo, *R. rickettsii*, *R. typhi*; *Chlamydia sp.*, por ejemplo, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Helicobacter sp.*, por ejemplo, *H. pylori*, etc.
- 25 *V. parahaemolyticus*; *Campylobacter sp.*, por ejemplo, *C. jejuni*, *Haemophilus sp.*, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. ducreyi*; *sp Bordetella*, por ejemplo, *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*; *Brucella sp.*; *Neisseria sp.*, por ejemplo, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, etc. Otras bacterias de interés incluyen *Legionella sp.*, por ejemplo, *L. pneumophila*, *Listeria sp.*, por ejemplo, *L. monocytogenes*; *Mycoplasma sp.*, por ejemplo, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *Mycobacterium sp.*, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Treponema sp.*, por ejemplo, *T. pallidum*, *Borrelia sp.*, por ejemplo, *B. burgdorferi*; *Leptospirae sp.*; *Rickettsia sp.*, por ejemplo, *R. rickettsii*, *R. typhi*; *Chlamydia sp.*, por ejemplo, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Helicobacter sp.*, por ejemplo, *H. pylori*, etc.
- 30 Los agentes patógenos no bacterianos de interés potencial incluyen patógenos fúngicos y protozoarios, por ejemplo, *Plasmodium sp.*, por ejemplo, *P. falciparum*; *Trypanosoma sp.*, por ejemplo, *T. brucei*; shistosomas; *Entamoeba sp.*, *Cryptococcus sp.*; *Candida sp.*, por ejemplo, *C. albicans*, etc.
- 35 En realizaciones particulares, el PHB o la biomasa que contiene PHB de la invención - cuando se aplica al animal - tiene actividad antimicrobiana contra al menos una de las siguientes especies y cepas de microorganismos específicos: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium jeikeium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio campbellii*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*.
- 40 En una realización particular específica, la invención se refiere al uso de PHB o biomasa que contiene PHB como agente antimicrobiano con el fin de evitar que los animales, preferiblemente animales acuáticos, más preferiblemente gambas, padezcan infecciones causadas por *Vibrio campbellii* patógeno.
- En otra realización particular específica, la invención se refiere al uso de PHB o biomasa que contiene PHB como agente antimicrobiano con el fin de evitar que animales monogástricos, por ejemplo pollos para consumo padezcan infecciones causadas por *Clostridium sp* y *Salmonella spp* patógenos y, por ejemplo, los lechones padezcan infecciones causadas por *Escherichia coli* patógena.
- 45 Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para la prevención y/o reducción de la infección en animales, más particularmente animales acuáticos y animales monogástricos, comprendiendo dichos métodos administrar al animal PHB o biomasa que contenga PHB, más en particular como componente del pienso o el agua potable.
- 50 Como se define en la parte introductoria, el término "nutracéuticos" como se utiliza en la presente memoria denota una utilidad tanto en el campo de aplicación nutricional como farmacéutico. Por lo tanto, se puede utilizar PHB o HB como agente antimicrobiano en piensos o en formulaciones farmacéuticas.
- 55 En general, la formulación farmacéutica de la invención comprende una cantidad eficaz del PHB antimicrobiano que

es suficiente para inhibir el crecimiento del microorganismo en cuestión y por lo tanto para mejorar el estado de salud general de los animales.

5 El PHB se puede utilizar: (i) en terapia, es decir, para el tratamiento de una enfermedad y/o (ii) para la profilaxis, es decir, el tratamiento para prevenir la aparición de una enfermedad en particular (profilaxis "primaria") y/o la recidiva de los síntomas de una infección existente que ha sido puesta bajo control (profilaxis "secundaria", terapia de mantenimiento).

El PHB se puede utilizar: (a) en medicina veterinaria, que es la aplicación de los principios médicos, de diagnóstico y terapéuticos a animales de compañía, domésticos, exóticos, salvajes y de producción; y/o (b) en medicina humana.

10 Por lo tanto, la invención también se refiere a medicamentos, incluyendo composiciones veterinarias que comprenden el PHB de la invención.

La invención se refiere además al uso de PHB en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana; y a un método de tratamiento médico que comprende administrar PHB a un individuo, tal como un ser humano o un animal, que necesite tratamiento médico.

15 La invención se refiere en particular al tratamiento de una enfermedad causada por microorganismos, por ejemplo, por infecciones microbianas. El tratamiento con PHB de la invención puede servir para controlar o combatir microorganismos como los definidos anteriormente, tales como hongos o bacterias, por ejemplo, bacterias gram-positivas o gram-negativas. En una realización particular de la invención, las infecciones microbianas previstas son infecciones que también o solamente afectan al intestino superior, más particularmente al intestino delgado.

20 Los compuestos de esta invención se pueden incorporar en una variedad de formulaciones farmacéuticas para administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes apropiados, farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en preparaciones de formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, cremas, espumas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores, geles, microesferas, lociones y aerosoles. Como tales, la administración de los compuestos puede conseguirse de varias maneras, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc.

25 La composición puede comprender además otro agente farmacéuticamente activo, tal como un agente biocida adicional, tal como un polipéptido antimicrobiano que presente actividad antimicrobiana, como se ha definido anteriormente. El agente biocida puede ser un antibiótico, como se conoce en la técnica. Las clases de antibióticos incluyen penicilinas, por ejemplo, penicilina G, penicilina V, metilicina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc.; penicilinas en combinación con inhibidores de beta-lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactama, etc.; carbapenemos; monobactamas, aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos; lincomicinas; polimixinas, sulfonamidas, quinolonas; cloramfenicol, metronidazol, espectinomocina, trimetoprima, vancomicina, etc. El agente biocida puede ser también un agente anti-micótico, incluyendo polienos, por ejemplo, anfotericina B, nistatina; 5-flucosina; y azoles, por ejemplo, miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol.

30 Las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un hospedante que padece o está predispuesto a una infección microbiana. La administración puede ser tópica, localizada o sistémica, dependiendo del microorganismo específico, preferiblemente será localizada. En general, la dosis del PHB antimicrobiano de la invención será suficiente para disminuir la población microbiana en al menos aproximadamente 50%, generalmente al menos un 1 logaritmo, y puede ser en 2 o más logaritmos de eliminación. El PHB (o compuestos) de la presente invención puede ser administrado a una dosificación que reduzca la población microbiana mientras se minimiza los efectos secundarios. Se contempla que la composición se obtendrá y se utilizará bajo la prescripción de un médico o veterinario para uso *in vivo*.

35 Se pueden emplear varios métodos para la administración. La formulación de PHB se puede administrar por vía oral, o se puede inyectar por vía intravascular, subcutánea, peritoneal, por aerosol, oftálmica, intra-vejiga, tópica, etc. Por ejemplo, los métodos de administración por inhalación son bien conocidos en la técnica. La dosificación de la formulación terapéutica variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, la forma de administración, la eliminación o aclaramiento del agente del hospedante y similares. La dosis inicial puede ser mayor, seguida de dosis de mantenimiento menores. La dosis se puede administrar con tan poca frecuencia como semanal o quincenalmente, o se puede fraccionar en dosis menores y ser administrada una vez o varias veces al día, dos veces por semana, etc., para mantener un nivel de dosificación eficaz. En muchos casos, la administración oral requerirá una dosis mayor que si se administra por vía intravenosa.

40 La invención descrita y reivindicada en la presente memoria no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en lo sucesivo, ya que estas realizaciones están destinadas a servir como ilustraciones de diversos aspectos de la invención.

55

EJEMPLOS (los ejemplos 1-6 y 9 son ilustrativos)**Ejemplo 1: Aditivo para piensos**

Se preparó un aditivo para piensos añadiendo 0,5 g de PHB cristalino (PHB comercial de Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido, concentración final 2,5 g/L) a la siguiente premezcla (por kg de premezcla):

1100000 EI	Vitamina A
300000 EI	Vitamina D3
4000 EI	Vitamina E
250 mg	Vitamina B1
800 mg	Vitamina B2
1200 mg	D-pantotenato de Ca
500 mg	Vitamina B6
2,5 mg	Vitamina B12
5000 mg	Niacina
10000 mg	Vitamina C
300 mg	Vitamina K3
15 mg	Biotina
150 mg	Ácido fólico
50004 mg	Cloruro de colina
6000 mg	Fe
3000 mg	Cu
5400 mg	Zn
8000 mg	Mn
124 mg	I
60 mg	Co
29,7 mg	Se
9000 mg	Lasalocid sódico (Avatec)
17,3%	Ca
0,8%	Mg
11,7%	Na

5

Ejemplo 2: Pienso

Se preparó una dieta engordante para pollos para consumo que tenía la siguiente composición (% p/p) mezclando los ingredientes. El trigo, el centeno y la SBM 48 fueron proporcionados por Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, Francia. Después de la mezcla, el pienso se peletizó a una temperatura deseada, por ejemplo, aproximadamente 70°C (3 x 25 mm).

10

Trigo	46,00
Centeno	15,00
Harina de soja (SBM 48)	30,73
Aceite de soja	4,90
DL-Metionina	0,04
DCP (fosfato dicálcico)	1,65
Caliza	0,43
Sal	0,15
TiO ₂	0,10
Aditivo para piensos (anterior)	1,00

El pienso resultante comprende 500 mg de PHB por kg (500 ppm).

Se prepararon de la misma manera composiciones de piensos y aditivos para piensos adicionales, sustituyendo sin embargo los 500 mg de PHB por una biomasa de una cepa de *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699) o *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC 35053) que contenía aproximadamente 250 g de PHB/kg de biomasa.

15

Ejemplo 3: Pienso para lechones que contiene PHB cristalino y una despolimerasa

Se puede preparar un pienso para lechones que contenga 0,5 g de PHB cristalino (PHB comercial de Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido, concentración final 2,5 g/L) mezclando los siguientes ingredientes, usando un aparato de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingredientes	Cantidad (kg)
Trigo	32,6
Maíz	18,7
Arroz	5,0
Salvado de trigo	9,0
Harina de soja	23,0
Aceite de soja	2,0
Almidón de trigo	4,5
Minerales*	2,9
Premezcla de aminoácidos sintéticos**	0,8
Vitaminas y premezcla de elementos en cantidades trazas***	1,0
Premezcla de poli-3-hidroxibutirato (10% en almidón de trigo)	0,5
<i>Comamonas testosteroni</i> prebiótica (LMG19554)****	10 ⁶ - 10 ⁸ UFC
* Sal de mar, fosfato dicálcico y carbonato de calcio;	
** Lisina, metionina y treonina;	
*** Vitaminas A, E, D3, K3, B1, B2, B6, B12, C, biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, cloruro de colina, sulfato de cobre, sulfato de hierro, óxido de manganeso, óxido de zinc, carbonato de cobalto, yoduro de calcio y selenito de sodio.	
**** <i>Comamonas testosteroni</i> (10 ⁸ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en forma de la cepa de <i>Comamonas testosteroni</i> (LMG19554))	

Ejemplo 4: Pienso para cerdos que contiene PHB y una despolimerasa producida por cepas microbianas

Se puede preparar un pienso para engordar cerdos que contenga poli-3-hidroxibutirato mezclando los siguientes ingredientes, usando un aparato de mezclamiento convencional a temperatura ambiente.

Ingredientes	Cantidad (kg)
Harina de soja	18,0
Maíz	52,3
Cebada	14,0
Harina de avena	6,0
Salvado de trigo	5,2
Aceite de soja	2,0
Minerales*	1,5
Premezcla de aminoácidos sintéticos**	0,5
Premezcla de vitaminas y elementos en cantidades trazas***	1,0
Biomasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (ATCC 35053)****	0,5
<i>Comamonas testosteroni</i> prebiótica (LMG19554)****	10 ⁶ - 10 ⁸ UFC
**** Biomasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> preparada como se describe en el Ejemplo 5.	

5

Ejemplo 5: Efecto del polihidroxibutirato (PHB) sobre el comportamiento del engorde de pollos para consumo durante dos semanas

Método Experimental

Preparación de PHB que contenía biomasa de *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC 35053)

- 10 Se obtuvo *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 35053 de The American Type Culture Collection (Manassas (VA), EE.UU.) y se clasificó como nivel de seguridad 1.

El cultivo se inició en suspensiones de células congeladas (conservadas como disoluciones madre en glicerol al 10-25% a -80°C). El inóculo para las fermentaciones por lotes alimentados se preparó en múltiples matraces de agitación con tabiques de 2 litros que contenían 400 mL de medio de inóculo que contenía (por litro de agua destilada): D-glucosa·H₂O, 33 g; extracto de levadura, 20 g; NaCl, 0,5 g; MgSO₄·7H₂O, 0,5 g y cantidades trazas de sales de Fe, Zn, Mn y Ni. Se usaron como inóculo para cada matraz dos mililitros de suspensión de células descongeladas. Los precultivos se incubaron a 30°C con agitación a 250 rpm durante 28 horas. Los cultivos principales se cultivaron como un proceso de lotes alimentados estándar en un biorreactor de 500 L (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) que contenía el medio 2 con la siguiente composición (por litro de agua destilada): D-glucosa·H₂O, 16 g; extracto de levadura, 13 g; NaCl, 0,9 g; MgSO₄·7H₂O, 0,9 g; (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, 0,72 g; CaCl₂·2H₂O, 0,675 g; FeCl₃·6H₂O, 0,09 g; (NH₄)₂SO₄, 1,44 g; ZnSO₄·7H₂O, 0,054 g; MnSO₄·H₂O, 0,018 g; NiSO₄·6H₂O, 0,002 g; antiespumante, 0,1 mL; solución de KP₂, 4,5 mL. La composición de la solución de KP₂ es (por litro de agua destilada): K₂HPO₄, 200 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 200 g. La solución de alimentación utilizada en todos los procesos tenía la siguiente composición (por litro de agua destilada): D-glucosa·H₂O, 770 g. El volumen inicial en el

15

20

biorreactor (después de la inoculación) era aproximadamente 200 L.

Inoculación: se retiraron cultivos de matraces en agitación con el fin de lograr un volumen de inóculo inicial del 5% en el biorreactor.

5 Condiciones del procedimiento: las condiciones de fermentación se controlaron automáticamente como sigue: 30°C, pH 7,1 (pH controlado con adición de NH₄OH gaseoso), oxígeno disuelto controlado a un mínimo del valor relativo del 10% (en cascada con agitación), agitación mínima de 300 rpm y una tasa de aireación de 0,5 v.v.m (en relación con el volumen inicial). Los cultivos procedieron en estas condiciones sin adición de solución de alimentación (fase de lote). Después de algún tiempo, una disminución de la velocidad de agitación, el cese del consumo base, un aumento brusco del pH y una disminución en la producción de CO₂ fueron la indicación de que se agotaba la glucosa inicial y se iniciaba la alimentación.

10 Perfil de la alimentación: un perfil de alimentación estándar se definió como sigue (desde el punto de inicio de la alimentación): incremento desde 2,5 kg/h hasta 3,8 kg/h en 10 horas, continuación con 3,8 kg/h durante el resto de la fermentación. El proceso de fermentación se terminó cuando se alcanzó el volumen de trabajo máximo de alrededor de 400 L.

15 Inactivación celular y secado: el caldo de fermentación resultante se pasteurizó a 85°C durante 1 hora dando como resultado la inactivación completa de los microorganismos. A continuación se secó por pulverización el caldo inactivado dando como resultado un polvo de fácil fluidez con un contenido de humedad de aproximadamente 5%. Se analizó la biomasa seca de *R. sphaeroides* resultante obtenida con el procedimiento descrito anteriormente para determinar el contenido de PHB. La concentración de PHB en la biomasa fue 253 g de PHB/kg de biomasa seca.

20 **Plan experimental A**

Prueba de engorde:	Desde el día 8 al día 22 (periodo pre-experimental desde el día 1 al día 8)
Dietas:	Dieta de trigo/centeno/SBM48 (véase composición del pienso)
Alimentación:	Pelets <i>ad libitum</i>
Tratamientos:	Control
	Avilamicina
	Biomasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (PHB) 1 g/kg
	Biomasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (PHB) 5 g/kg
	Después de mezclar el pienso se peletizó a aproximadamente 70°C (3 x 25 mm).
Duplicados:	6 grupos de 6 pollos machos (ROSS PM3) por tratamiento
Alojamiento:	En jaulas con suelo de alambre en batería en una sala de ambiente controlado
Productos:	Avilamicina, Maxus G 200, lote 836CR3,
	Biomasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , 253 g de PHB/kg, polvo seco, preparado como se ha descrito anteriormente

25 Se realizó un ensayo del comportamiento del engorde con pollos para consumo desde el día 8 hasta día 22. Los pollos fueron alojados en jaulas con suelo de alambre en batería. A pollos desde un día hasta el día 8 se les alimentó con una dieta pre-experimental a base de trigo, maíz y harina de soja. Durante el período experimental (días 8 a 22) los pollos recibieron dietas a base de trigo, centeno y harina de soja (véase la composición en la Tabla 1). Los días 8, 15 y 22 se pesaron grupos de aves. Se determinó el consumo de pienso durante los períodos intermedios y se calcularon la ganancia de peso y la relación de conversión del pienso.

30 Además de un tratamiento de control no complementado y un control positivo que contenía 10 mg del antibiótico avilamicina por kg de pienso, se incluyó biomasa de *Rhodobacter sphaeroides* en dosis de 1 y 5 g por kg de pienso, que correspondía a 0,253 y 1,265 g de PHB por kg de pienso, respectivamente.

Tabla 1: Composición del pienso de la dieta experimental

Ingredientes (%):	Periodo pre-experimental	Ensayo de engorde
Maíz	37,10	--
Trigo	20,00	27,30
Centeno	--	30,00
SBM 48	36,20	34,20
Aceite de soja	2,80	4,50
DL-Metionina	0,20	0,20
DCP	1,80	2,00
Caliza	0,80	0,70
Sal	0,10	0,10
Premezcla ¹	1,00	1,00

1: Incluye Avatec

Resultados

5 A una dosis de 1 g por kg, la proteína de la biomasa de *Rhodobacter sphaeroides* mejoró ligeramente la ganancia de peso de los pollos en comparación con el control negativo (Tabla 2). A una dosis de 5 g por kg, la biomasa de *Rhodobacter sphaeroides* mejoró la ganancia de peso y la relación de conversión del pienso de los pollos en comparación con el control negativo. Los efectos positivos de la más alta inclusión de biomasa de *Rhodobacter sphaeroides* estaban en el mismo intervalo que los del control positivo complementado con el antibiótico avilamicina.

Los resultados del presente ensayo demostraron que la biomasa de *Rhodobacter sphaeroides* que contenía aproximadamente 25% de PHB mejoró el comportamiento de pollos para consumo durante dos semanas.

10 Tabla 2: Comportamiento de pollos para consumo durante el ciclo de engorde (día 8 a día 22);
media \pm desviación típica

Producto	Control	Avilamicina	Biomasa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
Dosis	-	10 mg/kg	1,0 g/kg	5,0 g/kg
Jaulas x aves	6 x 6	6 x 6	6 x 6	6 x 6
Días 8-15				
Ganancia de peso (g/ave)	315 \pm 22	334 \pm 20	326 \pm 17	339 \pm 19
Ingesta de pienso (g/ave)	553 \pm 79	552 \pm 43	578 \pm 30	551 \pm 36
Conversión del pienso (g de pienso/g de ganancia)	1,750 \pm 0,155	1,652 \pm 0,090	1,776 \pm 0,115	1,629 \pm 0,105
Días 15-22				
Ganancia de peso (g/ave)	444 \pm 52	476 \pm 24	464 \pm 35	462 \pm 60
Ingesta de pienso (g/ave)	869 \pm 109	889 \pm 67	909 \pm 69	875 \pm 96
Conversión del pienso (g de pienso/g de ganancia)	1,956 \pm 0,117	1,867 \pm 0,078	1,967 \pm 0,154	1,904 \pm 0,160
Días 8-22				
Ganancia de peso (g/ave)	760 \pm 70	810 \pm 39	789 \pm 36	801 \pm 78
%	100,0	106,7	103,9	105,5
Ingesta de pienso (g/ave)	1426 \pm 181	1441 \pm 100	1487 \pm 89	1427 \pm 129
%	100,0	101,1	104,3	100,1
Conversión del pienso (g de pienso/g de ganancia)	1,874 \pm 0,117	1,778 \pm 0,072	1,886 \pm 0,132	1,786 \pm 0,129
%	100,0	94,9	100,7	95,3

15 En comparación con un segundo ensayo con PHB cristalino (polihidroxibutirato 98%/polihidroxivalerato 2% - Biopolymer Powder de Goodfellow), se necesitó una dosis mayor del material cristalino para obtener mejoras comparables como se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3: Comportamiento de pollos para consumo durante el ciclo de engorde (día 8 a día 29);
media \pm desviación típica

Producto	Control	Avilamicina	Polihidroxibutirato (PHB)			
Dosis	-	10 mg/kg	0,5 g/kg	1,0 g/kg	2,0 g/kg	4,0 g/kg
Jaulas x aves	6 x 6	6 x 6	12 x 6	12 x 6	12 x 6	12 x 6
Días 8-29						
Ganancia de peso (g/ave)	1283 \pm 84	1367 \pm 85	1273 \pm 99	1292 \pm 56	1306 \pm 97	1322 \pm 92
%	100,0	106,6	99,2	100,7	101,8	103,1
Ingesta de pienso (g/ave)	2379 \pm 155	2402 \pm 196	2370 \pm 153	2494 \pm 159	2453 \pm 235	2412 \pm 220
%	100,0	101,0	99,6	104,8	103,1	101,4
FCR (g de pienso/g de ganancia)	1,858 \pm 0,099	1,756 \pm 0,079	1,867 \pm 0,110	1,931 \pm 0,111	1,881 \pm 0,156	1,823 \pm 0,086
%	100,0	94,5	100,5	104,0	101,3	98,2

20 **Ejemplo 6: Efecto de PHB cristalino (como única fuente de carbono) sobre el perfil de ácidos grasos volátiles de una comunidad microbiana mixta del intestino**

Método experimental

PHB comercial (Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido, concentración final 2,5 g/L) se sometió a 1 hora de digestión simulada en el estómago y a 4 horas de digestión simulada en el duodeno en viales con penicilina.

25 Muestras de dos vasos del reactor SHIME (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*) se centrifugaron y lavaron con solución fisiológica (que contenía tioglicolato 1 g/L, para asegurar condiciones anóxicas) para eliminar

cualquier fuente de carbono. (Las características detalladas del denominado reactor SHIME se pueden encontrar en "De Boever, P., Deplancke, B. and Verstraete, W., 2000, *Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder*. *J Nutr* 130: 2599-2606").

5 Los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en 40 mL de solución fisiológica (sin tioglicolato) y se añadieron a las suspensiones de PHB digeridas. El control negativo consistió en 40 mL de solución fisiológica sin células añadidas. La etapa de lavado y la dilución en solución fisiológica se realizaron para simular un cultivo en condiciones de "privación de nutrientes", donde no estaba presente ninguna otra fuente de carbono, con inducción simultánea de PHB-despolimerasa.

Los viales se lavaron con N₂ y se incubaron a 37°C.

10 Resultados

1. Ácidos orgánicos (cuantificados por HPLC)

De los resultados mostrados en la Figura 1, se puede observar que la adición de PHB comercial, tratado previamente para simular la digestión en el estómago y en el duodeno, a la suspensión del reactor SHIME (vaso V1 y V2) dio lugar a cantidades significativamente mayores de ácido acético.

15 Como tratamiento con control positivo, un cultivo celular lavado de *Comamonas testosteroni* con actividad de PHB-despolimerasa se incubó con PHB (previamente digerido). El tratamiento con control negativo consistió en un tratamiento estéril de PHB previamente digerido (sin biomasa).

20 Se planteó la hipótesis de que PHB (previamente digerido) se convierte en primer lugar en ácido hidroxibutírico/butírico, por la acción de PHB-despolimerasa, que se convierte luego instantáneamente en acetato. De hecho, se encontró que el acetato se acumulaba durante el experimento.

2. VFA (cuantificados por cromatografía de gases con detector por ionización de llama)

La producción de ácidos grasos volátiles (abreviadamente VFA por la expresión inglesa *Volatile Fatty Acids*) a partir de PHB previamente digerido tanto en las suspensiones del reactor SHIME (V1 y V2) como en un cultivo puro de *Comamonas testosteroni*, se cuantificó adicionalmente por GC-FID.

25 En las Figuras 2a, b y c se puede observar que la tendencia a la producción de ácido acético (incluyendo butírico y propiónico) es similar a la observada por HPLC: mayor producción en el cultivo en *Comamonas*, algo menor producción por las dos muestras con PHB alcanzándose un valor meseta después de 24 horas y sin producción significativa de VFA en los controles negativos estériles (CT).

30 **Ejemplo 7: Las bacterias que acumulan 3-hidroxibutirato y poli-3-hidroxibutirato hidrolizado inhiben el crecimiento de patógenos entéricos y aumentan los niveles de butírico y acetato en el intestino humano *in vitro***

Método experimental

Microorganismos y medios de cultivo

35 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699) utilizada como bacteria acumuladora de PHB se enriqueció en un reactor de alimentación discontinua inoculado con sedimento activado en un reactor acumulador de polifosfato a escala de laboratorio, como el descrito por Serafim et al., *Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions*, *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145-160, 2004.

40 Todas las incubaciones se realizaron en viales con penicilina utilizando suspensiones fecales tomadas del vaso ascendente del reactor SHIME que funciona en condiciones de alimentación normales. La matriz de alimentación consistió en un medio a base de carbohidratos que contenía arabinogalactano (1 g/L), pectina (2 g/L), xilano (1 g/L), almidón (4,2 g/L), glucosa (0,4 g/L), extracto de levadura (3 g/L), peptona (1 g/L), mucina (4 g/L), cisteína (0,5 g/L), KH₂PO₄ (5,3 g/L) y Na₂HPO₄ (1,4 g/L). Las muestras se sellaron y se hizo pasar N₂ durante 30 minutos para asegurar condiciones anaeróbicas y se incubaron con agitación a 37°C. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Recuentos microbianos

45 Se cultivaron en placas diluciones decimales de las muestras y se incubaron a 37°C. Los recuentos de *Salmonella* y coliformes se realizaron sobre *Salmonella*-agar-agar (Chromagar, París, Francia) y McConkey-agar-agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), respectivamente. Se realizaron recuentos adicionales sobre MRS-agar-agar (Oxoid) (lactobacilos), Enterococcus-agar-agar (Difco, Sparks, MD, EE.UU.) (enterococos) o TSC-agar-agar (Merck, Darmstadt, Alemania) (clostridios).

50 *Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA)*

Los SCFA se extrajeron con éter dietílico y se determinaron con un cromatógrafo de gases Di200 (Shimadzu's-Hertogenbosch, Países Bajos). El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna capilar para ácidos grasos libres [columna EC-1000 Econo-Cap (Alltech, Laarne, Bélgica), de 25 m x 0,53 mm; espesor de la película 1,2 µm], un detector de ionización de llama y un integrador Delsi Nermag 31 (Thermo Separation Products, Wilrijk, Bélgica). Se utilizó nitrógeno como gas portador a un caudal de 20 mL/min. La temperatura de la columna y las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 130°C y 195°C, respectivamente. La cuantificación del 3HB y de ácido crotonico se realizó por HPLC usando una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) para ácidos orgánicos con H₂SO₄ 0,014 N a un caudal de 0,7 mL/min como disolvente. Los picos de elución se controlaron a 210 nm con un detector de UV Dionex (Tienen, Bélgica).

10 *Digestión en el estómago y en el intestino delgado*

PHB comercial (Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido), células con PHB o matriz de alimentación se pusieron en suspensión en viales con penicilina que contenían 20 mL de una solución de KHCO₃ (0,1 M) y NaCl (0,1 M) ajustada a pH 1,5 con HCl. A continuación, se añadieron 0,625 mL de solución de pepsina (320 mg/L) y la suspensión se incubó 2 horas a 37°C. Después de la digestión en el estómago, se añadieron 20 mL de jugo pancreático que contenía NaHCO₃ (12,5 g/L), bilis de buey (6 g/L) y pancreatina (0,9 g/L). El pH de la suspensión se ajustó a 6,3 y las muestras se incubaron con agitación durante 6 horas a 37°C.

Efecto de 3HB sobre la microbiota de colon

Muestras del compartimiento de colon ascendente del reactor SHIME se complementaron con 10 g/L de 3-hidroxibutirato (3HB) (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) y se incubaron a 37°C. Los recuentos microbianos y los niveles de SCFA se determinaron como se ha descrito anteriormente.

Efecto de 3HB y PHB como únicas fuentes de carbono

Suspensiones del reactor SHIME se centrifugaron durante 10 minutos a 7000 x g, se lavaron dos veces con solución fisiológica que contenía 1 g/L de tioglicolato, se volvieron a poner en suspensión en medio mineral que contenía 1 g/L de 3HB o 2,5 g/L de PHB comercial y se incubaron a 37°C. El medio de sales minerales contenía (por litro de agua destilada) 600 mg de MgSO₄·7H₂O, 160 mg de NH₄Cl, 100 mg de EDTA, 92 mg de K₂HPO₄, 45 mg de KH₂PO₄, 70 mg de CaCl₂·2 H₂O y 2 ml/L de solución de trazas. La solución de trazas consistía (por litro de agua destilada) en 1500 mg de FeCl₃·6 H₂O, 150 mg de H₃BO₃, 150 mg de CoCl₂·6 H₂O, 120 mg de MnCl₂·4 H₂O, 120 mg de ZnSO₄·7 H₂O, 60 mg de Na₂MoO₄·2 H₂O, 30 mg de CuSO₄·5 H₂O. La producción basal de acetato o butirato por las bacterias intestinales se descartó por incubación de un control sin 3HB o PHB.

30 *Efecto de células con PHB no tratadas sobre la microbiota de colon*

1,3 g de un cultivo metilotrófico liofilizado que contenía PHB (células con PHB) se sometió a digestión en el estómago y en el intestino delgado. Se añadieron 40 mL de suspensión del reactor SHIME y las muestras se incubaron a 37°C. La misma cantidad de un cultivo seco de bacterias que no contenían PHB (*Brachymonas denitrificans*) se añadió a muestras de control para equilibrar el efecto de la biomasa celular como un sustrato para las bacterias intestinales.

Hidrólisis de células con PHB

Células con PHB se sometieron a digestión con NaOH 0,5 M o HCl en diferentes tiempos y temperaturas. La cuantificación de los productos de degradación se determinó por HPLC como se ha descrito antes y se calculó el grado de hidrólisis respecto a la cantidad inicial de PHB.

40 *Efecto de células con PHB hidrolizado sobre la microbiota del íleon*

Células con PHB se sometieron a digestión con NaOH 0,5 M a 100°C durante 4 horas y la suspensión resultante se neutralizó con HCl. Se prepararon diferentes soluciones para alimentación sustituyendo parte de los nutrientes originales (100%, 50%, 20%, 10% o 0% en materia seca) por células con PHB digeridas, siendo la cantidad final de sólidos equivalentes para todas las soluciones de alimentación. Las muestras se sometieron a digestión en el estómago y en el intestino delgado como se ha descrito anteriormente. Después se añadió 1/10 del volumen total de la muestra tomada del recipiente del colon ascendente del reactor SHIME para imitar el medio ambiente microbiano del íleon. Con el fin de descartar cualquier efecto inhibitorio del NaCl presente debido al tratamiento con NaOH y neutralización con HCl, se añadió un control adicional que contenía alimentación no complementada con 2,6% de NaCl, equivalente a la cantidad presente en la muestra que contenía células con PHB al 100%. No se observó ningún efecto de la adición de NaCl.

Resultados

Efecto de 3HB sobre la microbiota de colon

La complementación de suspensiones de colon con 10 g/L de 3HB dio como resultado una disminución de $1,7 \pm 0,3$ y $1,1 \pm 0,28$ unidades logarítmicas para los recuentos viables de *Salmonella* y coliformes, respectivamente, después de 48 horas de incubación en comparación con muestras no complementadas (Fig. 3). La complementación con 3HB también dio como resultado un aumento significativo de los niveles de butirato y acetato de 110% y 50%, respectivamente, después de 48 horas de incubación (Fig. 4), lo que sugería una conversión de 3HB en estos SCFA. La incubación de 3HB en presencia de líquido sobrenadante del reactor SHIME no mostró ningún cambio en el perfil de los SCFA (datos no mostrados), lo que indicaba que no se produjo la transformación de 3HB en el ambiente extracelular pero podría ser producida intracelularmente por la microbiota intestinal. Esto se confirmó incubando bacterias intestinales lavadas en medio mineral en presencia de 3HB como la única fuente de carbono. En estas condiciones se observó una disminución en la concentración de 3HB correspondiente a un aumento equivalente de los niveles de acetato y butirato (Fig. 5).

Efecto de PHB sobre la microbiota de colon

PHB comercial se sometió a digestión simulada en el estómago y en el intestino delgado y se determinó por análisis por HPLC la liberación de los productos de degradación (es decir, 3HB, butirato o ácido crotónico). No se encontraron trazas de estos compuestos, lo que indicaba que no se produjo la degradación química de PHB.

La degradación biológica de PHB por la microbiota intestinal se estudió complementando suspensiones del reactor SHIME con 10 g/L de PHB comercial. Los resultados no mostraron ningún cambio significativo de los perfiles de los SCFA ni de los recuentos en placas de los grupos microbianos seleccionados (coliformes, enterococos, lactobacilos o clostridios) respecto a las muestras de control sin PHB (datos no mostrados). No se detectó la liberación de productos de degradación de PHB lo que sugería que no se produjo degradación microbiana. Este ensayo se repitió utilizando una suspensión de PHB previamente sometida a tratamiento con ultrasonidos durante 20 minutos a 4°C usando un aparato de ultrasonidos Labsonic (Braum Biotech International, Melsungen, Alemania) con el fin de mejorar la biodisponibilidad de PHB. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con estos experimentos (datos no mostrados).

Se realizó un ensayo alternativo utilizando bacterias intestinales lavadas puestas de nuevo en suspensión en medio mineral. En esta forma se eliminaron todas las fuentes de carbono adicionales que pudieran estar presentes en la suspensión, siendo PHB la única fuente de carbono disponible. Los resultados (Fig. 6) mostraron un ligero aumento (143 mg/L) de los niveles de acetato y ningún aumento significativo (5 mg/L) de ácido butírico. No se observaron trazas de 3HB.

Efecto de células no tratadas con PHB sobre la microbiota de colon

Se observó una producción significativamente menor de los SCFA en muestras complementadas con células con PHB liofilizadas en comparación con las muestras que contenían células exentas de PHB (Fig. 7). No se observaron diferencias significativas en los recuentos microbianos de los grupos seleccionados (coliformes, enterococos, clostridios y lactobacilos) (datos no mostrados).

Hidrólisis de células con PHB

Células con PHB se sometieron a diferentes tratamientos con el fin de encontrar las mejores condiciones para la hidrólisis de PHB (Tabla 4).

Tabla 4: Productos de hidrólisis de células con PHB después de diferentes tratamientos con ácido/base. Todos los tratamientos se realizaron con una concentración de ácido/base de 0,5 N.

Tratamiento	PHB hidrolizado (%)	Ácido hidroxibutírico (%)	Ácido crotónico (%)	Ácido hidroxivalérico (%)
NaOH (4h/100°C)	95,0	63,8	31,1	0,1
NaOH (24h/30°C)	8,6	5,7	2,8	0,0
HCl (4h/100°C)	0,4	0,1	0,0	0,0
HCl (24h/30°C)	0,0	0,0	0,0	0,0

Los tratamientos a 30°C o con HCl dieron como resultado un grado de hidrólisis muy bajo. El tratamiento con NaOH a 100°C durante 4 horas dio como resultado la hidrólisis de 95% del contenido total de PHB del cultivo celular produciendo 64% de 3HB, 31% de ácido crotónico y trazas de ácido hidroxivalérico.

Efecto de células con PHB hidrolizado sobre la microbiota del íleon

Se observaron recuentos iniciales similares para *Salmonella* en muestras de íleon (Tabla 5) y colon (Fig. 3).

Tabla 5: Recuentos microbianos y niveles de SCFA después de 48 horas de incubación de muestras simuladas de íleon en las que parte de la alimentación original fue sustituida por diferentes cantidades de células con PHB hidrolizado.

Células con PHB (%)	Salmonella (log UFC/mL) ^a	Coliformes (log UFC/mL) ^b	Ácido butírico (mg/L) ^c	Ácido acético (mg/L) ^d	3HB (g/L)	
					tiempo 0 h	tiempo 48 h
100	<3	<4	43,2 ± 6,1	254,3 ± 4,5	8,30 ± 0,22	8,22 ± 0,31
50	<3	<4	49,4 ± 11,1	269,6 ± 19,7	4,51 ± 0,69	4,43 ± 0,45
20	5,43 ± 0,07	8,12 ± 0,10	332,4 ± 13,4	3561,1 ± 46,1	1,62 ± 0,33	1,01 ± 0,05
10	5,61 ± 0,09	8,01 ± 0,05	106,6 ± 2,1	3379,8 ± 23,3	0,99 ± 0,07	0,42 ± 0,11
0	5,99 ± 0,14	7,56 ± 0,04	67,1 ± 6,2	2431,4 ± 36,1	ND	ND

^aSalmonella inicial: 6,12 ± 0,04 log UFC/mL
^bColiformes iniciales: 6,90 ± 0,11 log UFC/mL
^cButírico inicial: 48 ± 7,1 mg/L
^dAcético inicial: 257,4 ± 23,3 mg/L
 ND = no detectado

5 En muestras que contenían altas dosis de células con PHB hidrolizado, fue inhibido fuertemente el crecimiento de *Salmonella* y coliformes, mostrando una disminución en el número de recuentos viables de más de 3 unidades logarítmicas. De hecho, a estos elevados niveles de complementación no se detectaron recuentos viables de ningún grupo microbiano investigado, incluyendo clostridios, enterococos y lactobacilos (datos no mostrados) en la dilución más baja cultivada en placa, lo que sugería un fuerte efecto inhibitorio no específico de 3HB. En estas muestras no se observaron cambios en los niveles de butirato, acetato o 3HB, lo que indicaba una inactivación casi total de la actividad metabólica de la microbiota del íleon. La complementación de la alimentación con menores cantidades de células con PHB hidrolizado dio lugar a diferentes resultados. Los recuentos en placas para *Salmonella* mostraron una disminución respecto a las muestras no complementadas de 0,5 y 0,4 unidades logarítmicas para células con 20 y 10% de PHB, respectivamente, lo que indicaba un efecto ligeramente inhibitorio. Por otra parte, el crecimiento de coliformes aumentó con mayores cantidades de células con PHB (0,6 y 0,5 unidades logarítmicas para células con 20 y 10% de PHB, respectivamente). Se observó un efecto promotor del crecimiento similar de células con PHB hidrolizado en otros grupos microbianos, tales como clostridios, enterococos o lactobacilos (datos no mostrados). En ambos casos, la complementación con células con PHB hidrolizado dio como resultado niveles más altos de ácidos butírico y acético. En muestras que contenían células con 20% de PHB se observó un aumento de ácido butírico de 5 veces respecto a las muestras no complementadas, mientras que en el caso de alimentación que contenía células con 10% de PHB, el aumento fue 1,5 veces. El aumento de ácido acético fue similar en ambas muestras, lo que representaba un aumento medio de 1,5 veces respecto a las muestras de control. También se observó una disminución en los niveles iniciales de 3HB, lo que indicaba que se había consumido parte de este ácido y más probablemente se había convertido en acetato y butirato.

25 Ejemplo 8: 3-hidroxibutirato y poli-3-hidroxibutirato hidrolizado inhiben el crecimiento de *Vibrio campbellii*

Método experimental

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

30 Se obtuvieron *Vibrio campbellii* LMG21363 (= PN9801; Soto-Rodríguez et al., 2003) y *Comamonas testosteroni* LMG19554 (= I2; Boon et al., 2000) de BCCM/LMG Bacteria Collection (Ghent, Bélgica). Se cultivaron *Vibrio campbellii* LMG21363 y *Aeromonas hydrophila* LVS3 (Verschuere et al., 1999) en caldo Marine (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.). Se cultivó *Comamonas testosteroni* LMG19554 en medio LB [LB = caldo de Luria, por la expresión inglesa *Luria Broth*]. Todas las cepas se cultivaron a 28°C con agitación (100 min⁻¹).

Efecto de β-hidroxibutirato y butirato sobre el crecimiento de *Vibrio campbellii* LMG21363

35 Se cultivó *Vibrio campbellii* LMG21363 durante una noche en medio LB en un agitador a 28°C. Posteriormente, la suspensión se diluyó 1:50 (v/v) en medio LB complementado con butirato (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) o β-hidroxibutirato (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Para cada compuesto, se prepararon tres soluciones con las siguientes concentraciones: 25, 50 y 100 mM. El medio LB sin complementos se utilizó como control. El pH de todas las soluciones se ajustó a 6, 7 u 8. Después de inoculación, las suspensiones se incubaron a 28°C en un modo estático. El crecimiento se controló midiendo la densidad óptica (DO₆₀₀) durante 20 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Ensayo con PHB-despolimerasa extracelular

La producción extracelular de PHB-despolimerasa se analizó de forma cualitativa por extensión en franjas de cepas

en medio sólido que contenía PHB en polvo como la única fuente de carbono. La PHB-despolimerasa extracelular hidroliza el polímero PHB en productos solubles en agua y por lo tanto, las cepas que producen PHB-despolimerasa extracelular pueden ser reconocidas por el aspecto de zonas claras transparentes alrededor de las colonias (Jendrossek and Handrick, 2002). El medio utilizado en los experimentos contenía 500 mg/L de PHB en polvo (diámetro medio 30 μm ; Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido), 1 g/L de NH_4Cl , 1 g/L de KNO_3 , 5 g/L de sal marina artificial (Acuarium Systems Inc., Sarrebourg, Francia) y 15 g/L de agar-agar. Las placas se incubaron durante 4 días a 28°C y se examinaron diariamente para detectar la presencia de una zona clara alrededor de las colonias.

Incubación axénica de Artemia franciscana

Todos los ensayos de inoculación se realizaron con quistes de incubación de alta calidad de *Artemia franciscana* (tipo EG®, lote 6940, INVE Aquaculture, Baasrode, Bélgica). Doscientos mg de quistes se hidrataron en 18 ml de agua del grifo durante 1 hora. Se obtuvieron quistes y nauplios estériles por desencapsulamiento, adaptada al protocolo descrito por Marques et al., (2004). En pocas palabras, se añadieron 660 μL de NaOH (32%) y 10 mL de NaOCl (50%) a la suspensión de quistes hidratados. El desencapsulamiento se detuvo después de 2 minutos por adición de 14 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 g/L). Durante la reacción, se proporcionaron 0,22 μm de aireación filtrada. Los quistes desencapsulados se lavaron con agua de mar artificial esterilizada en autoclave que contenía 35 g/L de sal marina sintética de Instan Ocean (Acuarium Systems Inc., Sarrebourg, Francia). Los quistes se volvieron a poner en suspensión en un tubo de 50 mL que contenía 30 mL de agua de mar artificial filtrada y esterilizada en autoclave y se incubaron durante 24 horas en tubos mantenidos en un rotor (4 min^{-1}) a 28°C con iluminación constante (aproximadamente 2.000 lux).

Preparación de inóculos para ensayos de inoculación in vivo

Se conservó *Vibrio campbellii* LMG21363 en glicerol al 40% a -80°C. Diez μL de este cultivo conservado se inoculó en caldo Marine de nueva aportación (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.) y se incubó durante una noche a 28°C bajo agitación constante (100 min^{-1}). Los cultivos crecidos de *Vibrio campbellii* se lavaron en agua de mar artificial esterilizada en autoclave y las suspensiones se diluyeron hasta una DO_{600} de aproximadamente 0,1. Se inocularon 20 μL de las suspensiones diluidas, en agua de cultivo de *Artemia*.

Se usó *Aeromonas hydrophila* LVS3 como alimentación a los nauplios (Defoirdt et al., 2005). La cepa se cultivó durante una noche en agar-agar marino (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.), se puso en suspensión en agua de mar artificial estéril, se diluyó hasta una DO_{600} de aproximadamente 1 y se esterilizó en autoclave. Se añadieron 300 μL de la suspensión esterilizada en autoclave al agua de cultivo de *Artemia*.

Para el experimento con gránulos de PHB (PHB comercial de Goodfellow, Huntingdon, Reino Unido, concentración final 2,5 g/L), se cultivó *Comamonas testosteroni* LMG19554 durante 24 horas en caldo Marine (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.), se lavó en agua de mar artificial estéril y se diluyó hasta una DO_{600} de aproximadamente 1. Se añadieron 200 μL de la suspensión diluida al agua de cultivo de *Artemia*.

Ensayos de inoculación in vivo

Se realizaron ensayos de inoculación como ha sido descrito por Defoirdt et al., (2005) con ligeras modificaciones. En pocas palabras, después de la incubación, grupos de 20 nauplios se transfirieron a tubos nuevos estériles de 50 mL que contenían 20 mL de agua de mar artificial filtrada y esterilizada en autoclave. Los tubos se inocularon con *Vibrio campbellii* LMG21363 (excepto para el control, en donde no se añadió agente patógeno) y se alimentaron con LVS3. Para el experimento con ácidos grasos, se disolvieron los ácidos grasos en agua de mar artificial a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mM). El pH de las soluciones se llevó de nuevo a 7 y las soluciones se filtraron en condiciones estériles por un filtro de 0,22 μm (Millipore, Bedford, EE.UU.). Después de la alimentación y la adición de agentes químicos y/o bacterias apropiados, los tubos Falcon se pusieron de nuevo en el rotor y se mantuvieron a 28°C. La supervivencia de *Artemia* se puntuó 2 días después de la adición del agente patógeno. Todas las manipulaciones se realizaron bajo una campana de flujo laminar para mantener la esterilidad de los quistes y nauplios. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Resultados

Efecto de β -hidroxibutirato sobre el crecimiento de Vibrio campbellii LMG21363

Se analizó el ácido graso de cadena corta β -hidroxibutirato para comprobar su capacidad para inhibir el crecimiento de *Vibrio campbellii* LMG21363 aislado patógeno. A pH 6, el crecimiento de *Vibrio campbellii* fue inhibido fuertemente si el medio estaba complementado con β -hidroxibutirato 100 mM. El crecimiento de *Vibrio campbellii* no fue inhibido completamente en presencia de menores concentraciones del ácido graso. Sin embargo, la tasa de crecimiento fue claramente menor que la del control e inversamente relacionada con la concentración de β -hidroxibutirato. Se utilizó butirato como un ácido graso de referencia debido a que su efecto inhibitor del crecimiento está bien documentado y puesto que tiene el mismo valor de pKa que el β -hidroxibutirato. La inhibición del crecimiento por butirato fue más pronunciada que por β -hidroxibutirato. A pH 6, el crecimiento del agente patógeno fue inhibido completamente incluso para la concentración más baja analizada. El efecto inhibitor del crecimiento de ambos ácidos grasos era

claramente dependiente del pH, puesto que a pH 7, el crecimiento del agente patógeno sólo fue inhibido en el medio complementado con la concentración más alta de butirato y a pH de 8, no se observó inhibición.

Efecto de β -hidroxibutirato sobre la supervivencia de nauplios de *Artemia* infectados con *Vibrio campbellii* LMG21363

5 En un primer ensayo de inoculación *in vivo*, se investigó el efecto de la adición de β -hidroxibutirato sobre la supervivencia de nauplios de *Artemia* infectados con *Vibrio campbellii* LMG21363 aislado patógeno. El β -hidroxibutirato potenció significativamente la supervivencia de los nauplios infectados cuando se añadió a una concentración de 100 mM como se muestra en la Tabla 6.

10 Tabla 6: Porcentaje de supervivencia de nauplios de *Artemia* (media \pm error típico de tres repeticiones) después de 2 días de incubación con *Vibrio campbellii* LMG21363. Se añadieron β -hidroxibutirato o butirato 25 o 100 mM al agua de cultivo de *Artemia* al comienzo del experimento.

Tratamiento	Supervivencia (%)
Control	80 \pm 3
LMG21363	12 \pm 2
LMG21363 + β -hidroxibutirato (25 mM)	38 \pm 15
LMG21363 + β -hidroxibutirato (100 mM)	40 \pm 3*
LMG21363 + butirato (25 mM)	48 \pm 2*
LMG21363 + butirato (100 mM)	50 \pm 5*
*:Diferencia significativa en la supervivencia con nauplios infectados sin la adición de ácido graso (P<0,01)	

15 La supervivencia de los nauplios con β -hidroxibutirato 25 mM también fue mayor que la supervivencia de los nauplios infectados sin el ácido graso. Sin embargo, la diferencia no fue significativa debido a una variación alta. El butirato, que se utilizó de nuevo como referencia, potenció significativamente la supervivencia de los nauplios infectados para ambas concentraciones analizadas. Ambos ácidos grasos no tuvieron efecto sobre la supervivencia de nauplios no infectados en la concentración más alta analizada (datos no mostrados).

Despolimerización de gránulos de PHB

20 Se ha descrito *Comamonas testosteroni* antes de poder producir PHB-despolimerasa extracelular. Por consiguiente, se cribaron diferentes cepas de *Comamonas testosteroni* respecto a la despolimerización de PHB extendiéndolas en franjas sobre agar-agar que contenía gránulos de PHB como única fuente de carbono y comprobando la formación de una zona clara. Una de las cepas, *Comamonas testosteroni* LMG19554, mostró una excelente actividad de PHB-despolimerasa puesto que estaba presente una zona clara alrededor de las colonias ya después de 1 día de incubación. Después de 2 días de incubación, se observó una gran zona clara con aclaramiento del medio. La producción PHB-despolimerasa extracelular también se evaluó para *Vibrio campbellii* LMG21363. Sin embargo, no se pudo observar aclaramiento del medio.

Efecto de la despolimerización *in vivo* de PHB sobre la supervivencia de los nauplios de *Artemia* infectados con *Vibrio campbellii* LMG21363

30 Se realizó otro experimento *in vivo* para analizar si la adición de gránulos de PHB daría como resultado una protección contra el *Vibrio campbellii* patógeno. Se encontró que la supervivencia de los nauplios infectados de *Artemia* era proporcional a la concentración de PHB añadido al agua de cultivo como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de supervivencia de nauplios de *Artemia* (media \pm error típico de tres repeticiones) después de 2 días de inoculación con *Vibrio campbellii* LMG21363. Se añadieron partículas de PHB al agua de cultivo al inicio del experimento (con o sin la cepa de *Comamonas testosteroni* LMG 19554 productora de PHB-despolimerasa extracelular) o después de 1 día.

Tratamiento	Supervivencia (%)	
	Sin <i>Comamonas</i>	Con <i>Comamonas</i>
Control	87 \pm 3	NT
LMG21363	17 \pm 2	18 \pm 2
LMG21363 + PHB (10 mg/L; comienzo)	22 \pm 4	20 \pm 5
LMG21363 + PHB (100 mg/L; comienzo)	40 \pm 3*	62 \pm 4*
LMG21363 + PHB (1000 mg/L; comienzo)	90 \pm 3*	92 \pm 3*
LMG21363 + PHB (10 mg/L; día 1)	18 \pm 7	NT
LMG21363 + PHB (100 mg/L; día 1)	38 \pm 2*	NT
LMG21363 + PHB (1000 mg/L; día 1)	60 \pm 6*	NT
*:Diferencia significativa en la supervivencia con nauplios infectados sin la adición de PHB (P<0,01) NT: no ensayado		

La adición de PHB potenció significativamente la supervivencia de los nauplios infectados cuando se añadió a 100 mg/L y 1000 mg/L ($P < 0,01$). La cepa de *Comamonas testosteroni* LMG19554 despolimerizadora de PHB mejoró significativamente el rendimiento de los gránulos de PHB a 100 mg/L ($P < 0,05$). La cepa no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de nauplios infectados en ausencia de PHB.

- 5 Cuando se añadieron gránulos de PHB junto con el agente patógeno se observó una protección completa (sin diferencia significativa en la supervivencia con nauplios no infectados) en la concentración más alta ensayada, sin diferencia entre los tubos con y sin *Comamonas testosteroni* LMG19554. Cuando se añadieron los gránulos 1 día después de la adición del agente patógeno, se observó un efecto similar, pero menos pronunciado. La adición de PHB potenció significativamente la supervivencia de los nauplios infectados cuando se añadió a 100 mg/L y 1000 mg/L ($P < 0,01$) como fue el caso cuando se añadieron gránulos junto con *Vibrio campbellii* LMG21363. Sin embargo, en este caso, todavía había una mortalidad significativa de *Artemia* infectada y tratada con 1000 mg/L de PHB ($P < 0,01$).

Ejemplo 9: Efecto de bacterias que acumulan PHB en inhibir el crecimiento de *Vibrio campbellii*

Método experimental

- 15 *Enriquecimiento de bacterias que acumulan PHB*

Ralstonia eutropha (ATCC 17699) usadas como bacterias acumuladoras de PHB fueron enriquecidas en un reactor de alimentación discontinua secuencial inoculado con lodos activados procedentes de un reactor, a escala de laboratorio, que acumula polifosfato, como ha sido descrito por Serafim et al., *Optimization of polyhydroxybutirate by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions*, *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145-160, 2004.

- 20 *Aislamiento de cultivos puros de bacterias que acumulan PHB*

El aislamiento microbiológico de bacterias que acumulan PHB se llevó a cabo por un método de extensión en placa descrito previamente (Spiekermann et al., 1999), con ligeras modificaciones. Para preparar el medio sólido para el aislamiento, se añadieron 15 g de agar-agar técnico (Difco, Detroit, EE.UU.) a 1 litro de medio de sales minerales utilizado en el reactor de alimentación discontinua secuencial. Posteriormente, se añadió al medio esterilizado 0,002% (v/v) de una solución de 0,25 mg Azul Nilo A (Sigma, St. Louis, EE.UU.) por mL de DMSO para obtener una concentración final de 0,5 µg decolorante/mL de medio. Las placas de agar-agar se expusieron a luz ultravioleta (312 nm) después de un período de cultivo apropiado para detectar la acumulación de PHB en las colonias cultivadas.

30 Los aislados se cultivaron durante 24 horas en medio LB a 28°C con agitación. Después de incubación, las células se centrifugaron (8 minutos, 5000 rpm) y se volvieron a poner en suspensión en el medio de sales minerales utilizado en el reactor de alimentación discontinua secuencial. Los cultivos se airearon y se tomaron muestras cada hora con el fin de determinar el contenido de PHB.

Determinación del contenido de PHB

35 Las concentraciones de PHB se midieron con un cromatógrafo de gases Di200 (Shimadzu's-Hertogenbosch, Países Bajos) siguiendo el procedimiento descrito por Oehmen et al., (2005). El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna capilar rellena de ácidos grasos libres [columna Econo-Cap EC 1000 (Alltech, Laame, Bélgica), 25 m x 0,53 mm; espesor de película 1,2 µm], un detector de ionización de llama y un integrador Delsi Nermag 31 (Thermo Separation Products, Wilrijk, Bélgica). Se utilizó nitrógeno como gas portador a un caudal de 3 mL/min.

Preparación de inóculos para ensayos de inoculación in vivo.

40 Se conservó *Vibrio campbellii* LMG21363 en glicerol al 40% a -80°C. Se inocularon diez µL de este cultivo conservado en caldo Marine (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.) de nueva aportación y se incubaron durante 24 horas a 28°C con agitación constante (100 minutos). Los cultivos desarrollados de *Vibrio campbellii* se lavaron en agua de mar artificial filtrada y esterilizada en autoclave y se añadieron al agua de cultivo de *Artemia* a aproximadamente 10^5 UFC/mL.

45 Se utilizó *Aeromonas hydrophila* LVS3 (Verschuere et al., 1999) como alimentación para los nauplios (Defoirdt et al., 2005). La cepa se cultivó durante una noche en agar-agar Marine (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.), se puso en suspensión en agua de mar artificial estéril, se esterilizó en autoclave y se añadió al agua de cultivo de *Artemia* a aproximadamente 10^7 células/mL.

Ensayos de inoculación in vivo

50 Se realizaron ensayos de inoculación como se ha descrito por Defoirdt et al., (2005), con ligeras modificaciones. En pocas palabras, después de la incubación, grupos de 20 nauplios se transfirieron a nuevos tubos estériles de 50 mL que contenían 20 mL de agua de mar artificial filtrada y esterilizada en autoclave. Los tubos se inocularon con *Vibrio campbellii* LMG21363 (excepto el control, donde no se añadió ningún agente patógeno) y se alimentaron con LVS3.

Se añadieron bacterias que acumulaban PHB al agua de cultivo de *Artemia* a aproximadamente 10^7 UFC/mL.

Después de la alimentación y la adición de las bacterias apropiadas, los tubos Falcon se pusieron de nuevo en el rotor y se mantuvieron a 28°C. La supervivencia de *Artemia* se puntuó 2 días después de la adición del agente patógeno. Todas las manipulaciones se realizaron bajo una campana de flujo laminar con el fin de mantener la esterilidad de los quistes y nauplios. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Resultados

Efecto del cultivo de enriquecimiento de acumulación de PHB sobre la supervivencia de *Artemia* infectada.

En la Tabla 8 se ilustra el efecto del cultivo de enriquecimiento de acumulación de PHB sobre la supervivencia de nauplios de *Artemia* infectados con *Vibrio campbellii* LMG2363 aislado patógeno. La biomasa fue creciendo en forma de agregados en el reactor de alimentación discontinua secuencial y por lo tanto, el cultivo se sometió a diferentes tratamientos que pretendían que el PHB estuviera más disponible para *Artemia*. Cuando se sometió a 3 ciclos de congelación y descongelación antes de la adición al agua de cultivo, la adición del cultivo de enriquecimiento (que contenía de 15% de PHB en los VSS o más) potenció significativamente la supervivencia de los nauplios infectados. La adición del cultivo no tratado o después de pasteurización (30 minutos, 60%) no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de la *Artemia* infectada.

Tabla 8: Porcentaje de supervivencia de nauplios de *Artemia* (media \pm error típico de tres repeticiones) después de 2 días de inoculación con *Vibrio campbellii* LMG21363. El cultivo de enriquecimiento de acumulación de PHB se añadió al agua del cultivo de *Artemia* no tratado o después de pasteurización o congelación y descongelación. Se tomaron muestras del cultivo de enriquecimiento en tres momentos y contenían 2, 15 o 25% de PHB en los VSS.

Tratamiento	Supervivencia (%)
Control	83 \pm 2
LMG21363	10 \pm 3
LMG21363 + Cultivo (25% de PHB, no tratado)	12 \pm 4
LMG21363 + Cultivo (25% de PHB, pasteurizado)	18 \pm 3
LMG21363 + Cultivo (25% de PHB, congelado y descongelado)	67 \pm 7*
LMG21363 + Cultivo (15% de PHB, congelado y descongelado)	43 \pm 2*
LMG21363 + Cultivo (2% de PHB, congelado y descongelado)	7 \pm 2
*:Supervivencia significativamente diferente del tratamiento con agente patógeno y sin bacterias que acumulan PHB (P<0,01)	

Se tomaron muestras del cultivo de enriquecimiento después de 2 y 6 horas durante el enriquecimiento en PHB y después de 1 día privación de alimento. Al hacer esto, se obtuvo el mismo cultivo de enriquecimiento con diferentes concentraciones de PHB (25, 15 y 2% de VSS, respectivamente). Es importante destacar que la concentración de VSS fue la misma en los tres casos. La supervivencia de los nauplios infectados era claramente proporcional al contenido de PHB del cultivo de enriquecimiento (Tabla 8).

Referencias

Jendrossek and Handrick, *Microbial degradation of polyhydroxalkanoates*, *Annu. Rev. Microbiol.* 567, 403-432, 2002.

Verschuere, Rombaut, Huys, Dhont, Sorgeloos, and Verstraete, *Microbial control of the culture of Artemia juveniles through preceptive colonization by selected bacterial strains*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2527-2533, 1999.

Boon, N , Goris, J , De Vos, P , Verstraete, W and Top, E M (2000), *Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading Comamonas testosteroni strain, 12gfp*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2906-2913.

Defoirdt, T., Bossier, P, Sorgeloos, P and Verstraete, W. (2005) *The impact of mutations in the quorum sensing systems of Aeromonas hydrophila, Vibrio anguillarum and Vibrio harveyi on their virulence towards gnotobiotically cultured, Artemia franciscana*. *Environ. Microbiol.* 7(8), 1239-1247.

Marques, A , Francois, J. M., Dhont, J , Bossier, P, and Sorgeloos, P. (2004), *Influence of yeast quality on performance of gnotobiotically grown Artemia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310(2), 247-264.

Oehmen, A , Keller-iehmann, 8 , Zeng, R J. Yuan, Z G and Keller, E (2005), *Optimisation of poly-beta-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorous removal systems*. *J. Chromatogr.* 1070, 133-1363.

Serafim, S , Lemos, P. C., Oliveira, R. and Reis, M A M. (2004) *Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions*. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145-160.

Spiekermann, P., Rehrn, BFI A, Kalscheuer, R, Baumeister, D. and SteinbUchei, A, (1999), *A sensitive, viabre-colony*

staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. Arch. Microbiol. 271, 73-80.

Soto-Rodriguez et al., *Virulence of luminous vibrios to Artemia franciscana nauplii, Dis. Aquat. Org.* 53, 231-240, 2003.

- 5 De Boever, P., Deplancke, B., and Verstraete, W., 2000, *Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. J. Nutr.* 130: 2599-2606.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de poli-3-hidroxitirato o una cepa microbiana capaz de producir poli-3-hidroxitirato (PHB) y que pertenece al grupo de las proteobacterias, junto con al menos una despolimerasa o con una cepa microbiana que expresa dicha despolimerasa, produciendo dicha despolimerasa la liberación de monómeros de 3-hidroxitirato activos en el tracto gastrointestinal, para la fabricación de un medicamento como un componente de un pienso o aditivo para piensos para la modulación de la flora intestinal del animal.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa capaz de producir poli-3-hidroxitirato (PHB) es capaz de producir PHB intracelular y es una cepa de *Ralstonia* o *Rhodobacter*.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una despolimerasa se selecciona del grupo que consiste en una enzima PHB-despolimerasa extracelular, una enzima hidrolasa de tipo endo extracelular, una enzima hidrolasa oligómera extracelular y una enzima PHB-despolimerasa intracelular.
- 15 4. Un pienso o un aditivo para piensos, que comprende como ingredientes activos:
 - poli-3-hidroxitirato (PHB) y al menos una despolimerasa o una cepa microbiana que expresa dicha despolimerasa; o
 - una cepa microbiana capaz de producir poli-3-hidroxitirato y al menos una despolimerasa o una cepa que expresa dicha despolimerasa.
5. El pienso o aditivo para piensos de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una cepa microbiana capaz de producir PHB-despolimerasa extracelular.
- 20 6. El pienso o aditivo para piensos de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cepa microbiana capaz de producir PHB-despolimerasa extracelular es *Comamonas testosteroni* (LMG19554).
- 25 7. El aditivo para piensos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende:
 - (a) al menos una vitamina soluble en grasas,
 - (b) al menos una vitamina soluble en agua,
 - (c) al menos un mineral en cantidades trazas y/o
 - (d) al menos un macromineral.
- 30 8. Una combinación de al menos dos composiciones para uso en piensos, agua potable o aditivos para piensos, que comprende:
 - una primera composición que comprende un poli-3-hidroxitirato o una cepa microbiana capaz de producir poli-3-hidroxitirato; y
 - una segunda composición que comprende al menos una despolimerasa o una cepa que expresa dicha despolimerasa.
9. El pienso o aditivo para piensos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 o una combinación de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en la modulación de la flora intestinal de un animal.
- 35 10. El pienso o aditivo para piensos de acuerdo con la reivindicación 9, en donde se mejora la relación de conversión del pienso en el animal.

FIGURA 1

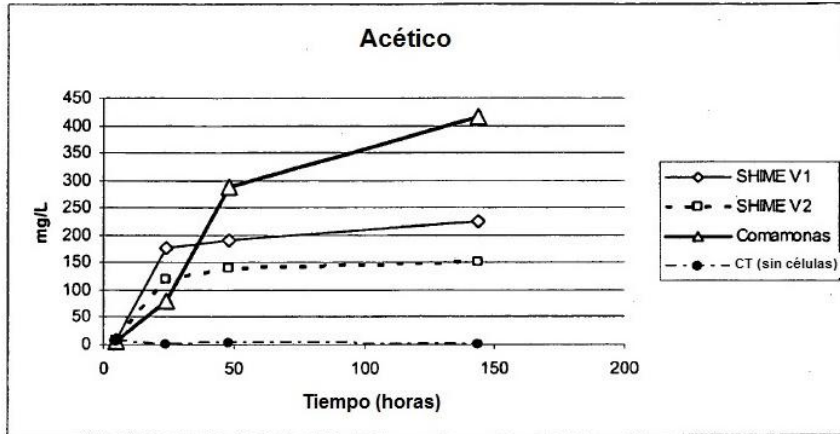


FIGURA 2A

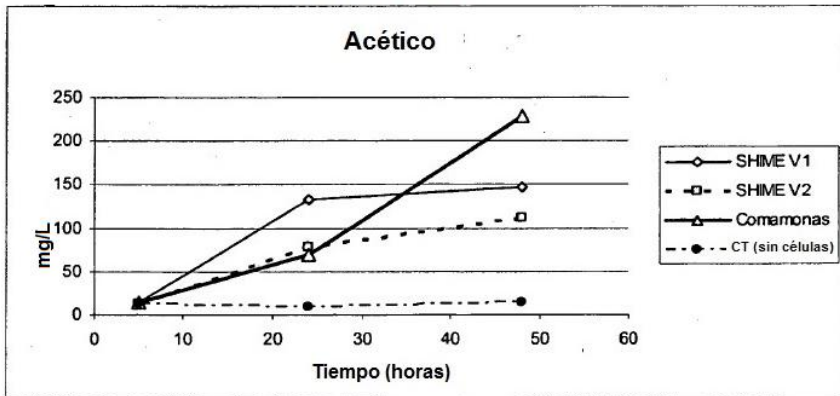


FIGURA 2B

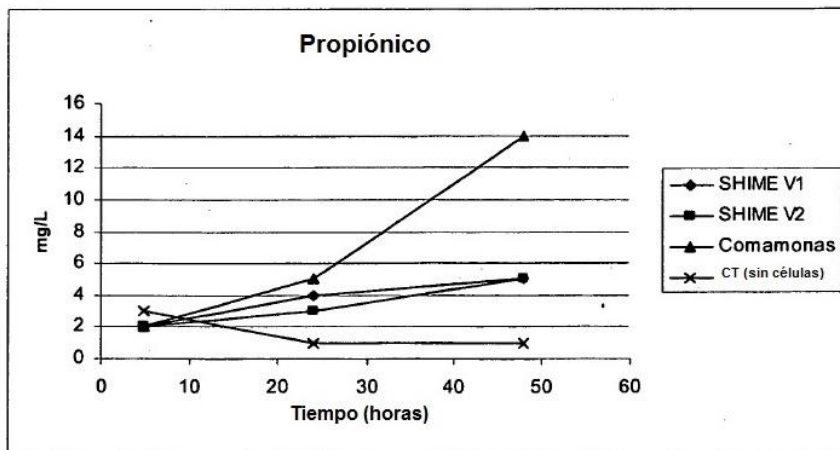


FIGURA 2C

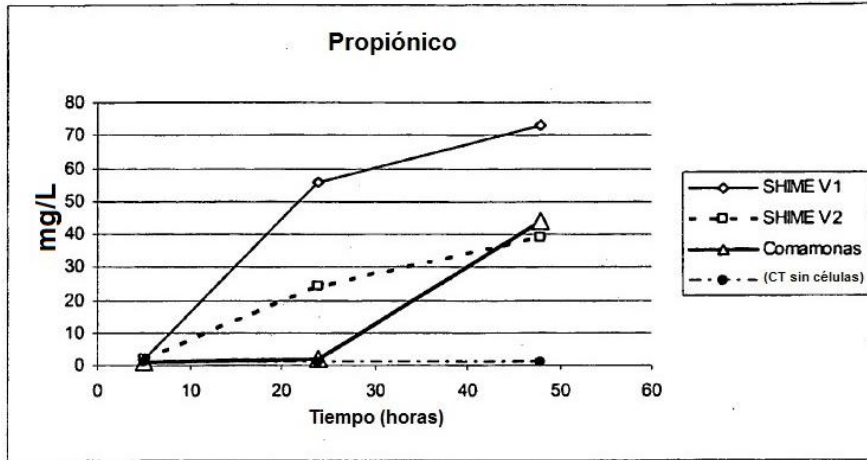


FIGURA 3

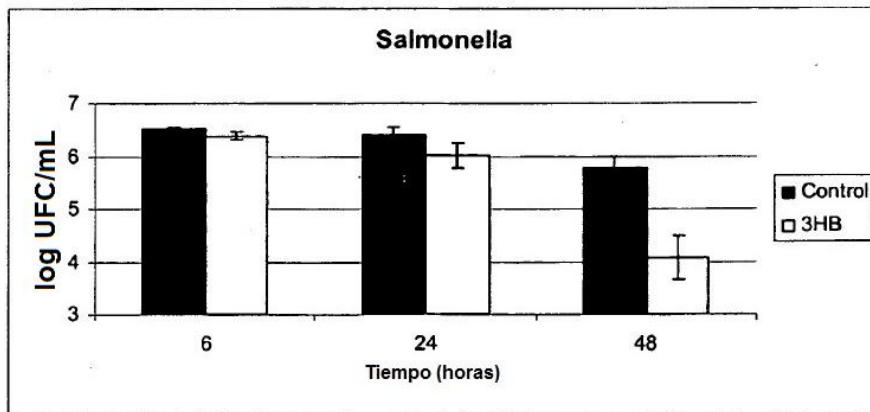
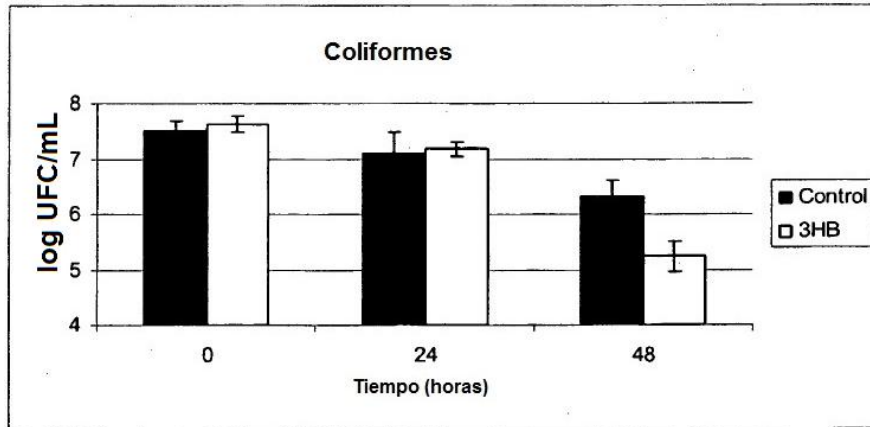


FIGURA 4

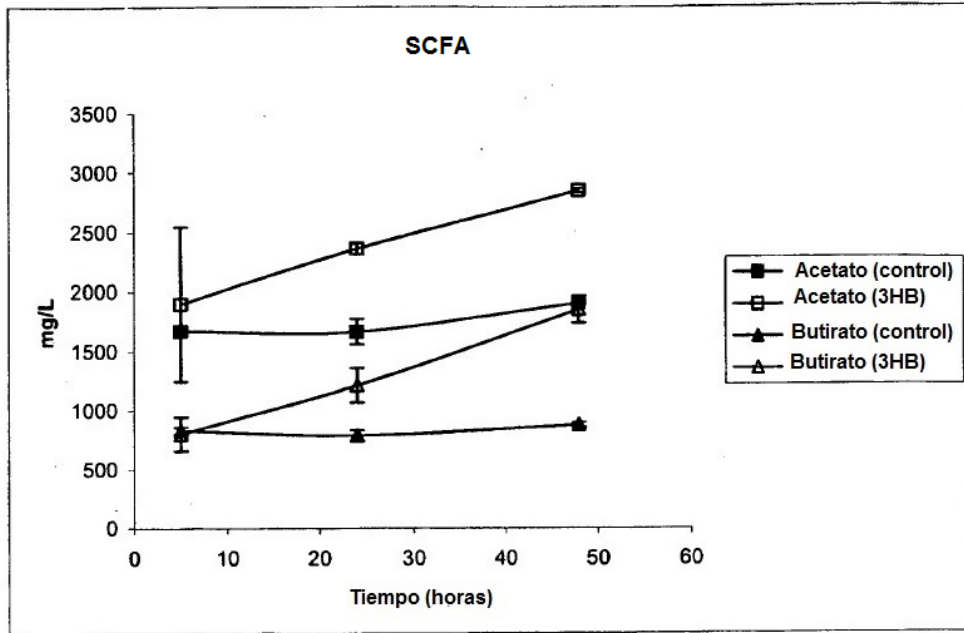


FIGURA 5

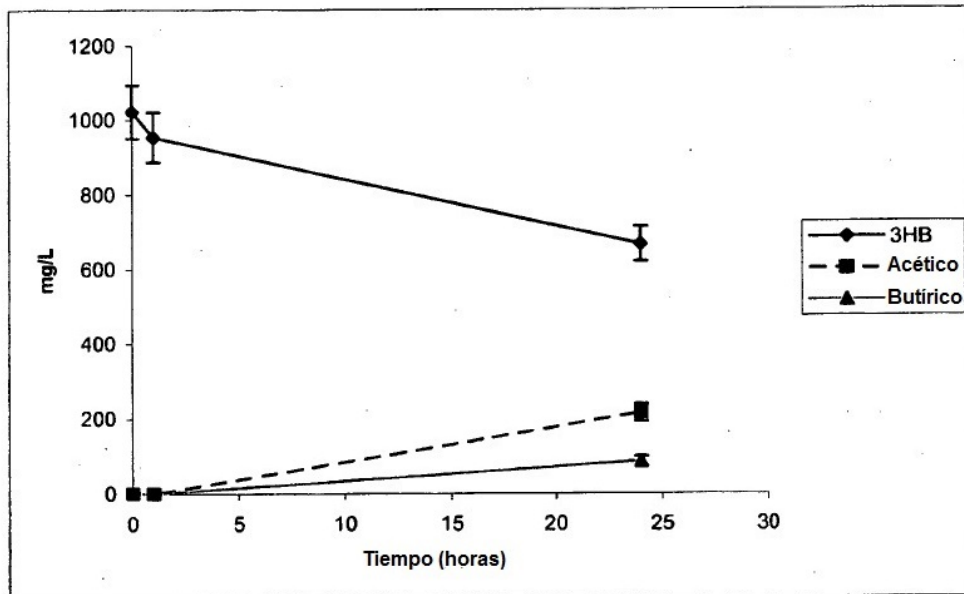


FIGURA 6

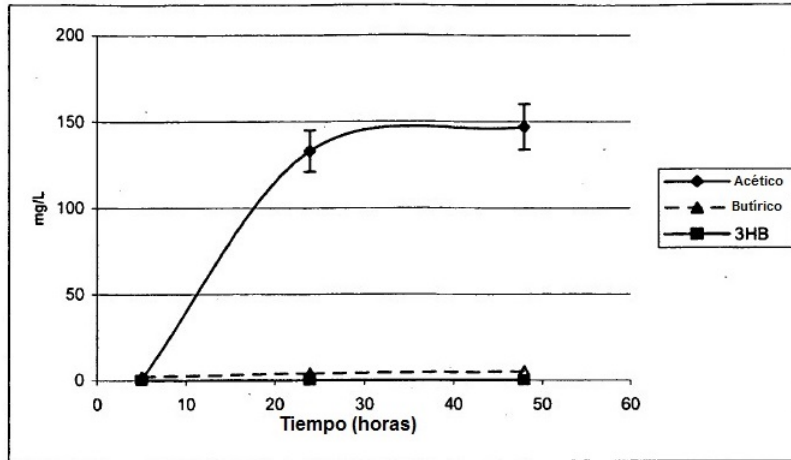


FIGURA 7

