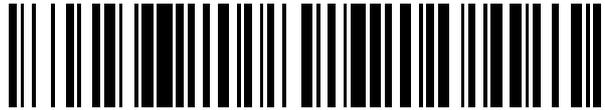


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 242**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2011 E 11719735 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2566952**

54 Título: **Cepa de Bacillus amyloliquefaciens**

30 Prioridad:

04.05.2010 US 331203 P

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

09.05.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIOLOGICALS, INC. (100.0%)
5400 Corporate Circle
Salem, VA 24153, US**

72 Inventor/es:

**KANG, YAOWEI;
SEMONES, SHAWN;
SMITH, JESSICA y
FRODYMA, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 569 242 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

Cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. 119 de la solicitud provisional de EE.UU. n.º: 61/331.203 presentada el 4 de mayo de 2010, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en este documento por referencia.

10 Referencia cruzada a microorganismos depositados

[0002] La presente divulgación se refiere a microorganismos depositados. El contenido de los microorganismos depositados se incorpora en su totalidad en este documento por referencia.

15 Campo de la invención

[0003] La presente divulgación se refiere a la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350. La cepa se caracteriza como bacterias de *Bacillus* que tienen una actividad de amilasa, surfactante y antifúngica excelente. Además, la cepa de la presente divulgación produce múltiples enzimas útiles y tiene actividad de lipasa, resistencia al fago y alta tolerancia a pH, sal y temperatura. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación y las enzimas que produce tienen numerosas aplicaciones en las áreas de la producción agrícola, la industria de los detergentes, la industria del bioetanol y la industria de la purificación.

Antecedentes de la invención

25 [0004] *Bacillus amyloliquefaciens* o *B. amyloliquefaciens* es una bacteria aeróbica bien conocida que se encuentra frecuentemente en muestras de suelo que son responsables de la mayor parte de la producción mundial de alfa-amilasa y proteasa. *B. amyloliquefaciens* es una bacteria gram-positiva móvil en forma de barra que frecuentemente forma cadenas. La temperatura óptima para su crecimiento es de 30 a 40°C, sin crecimiento por debajo de 15°C o por encima de 50°C. El organismo fue previamente descrito y distinguido de *B. subtilis* en Priest, *et al.*, *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev., International Journal of Systematic Bacteriology, 37, 69-71 (1987) (aquí incorporada por referencia en su integridad). El organismo también se ha caracterizado como un organismo de bajo contenido en G+C.

35 [0005] Se ha sugerido que una cepa de *B. amyloliquefaciens*, BNM122, podría ser una alternativa ecológica prometedora para los tratamientos agrícolas químicos y usarse para desarrollar una gestión agrícola sostenible para reemplazar o reducir el uso y/o abuso agroquímico. Para ejemplo, un estudio informó del uso de *B. amyloliquefaciens* como un agente de biocontrol microbiano (MBCA) caracterizado como una alternativa respetuosa del medioambiente para reducir o reemplazar el control químico de las enfermedades de las plantas. Véase, por ejemplo, Correa *et al.*, *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities, Applied Soil Ecology 41, 185-194 (2009) (aquí incorporada por referencia en su integridad). Aquí, una cepa de *B. amyloliquefaciens* se demostró que coloniza semillas y raíces cuando se aplica como un recubrimiento en las semillas para, entre otras cosas, controlar patógenos fúngicos transmitidos por el suelo.

45 [0006] Una cepa de *B. amyloliquefaciens*, MIR-41, también se ha descrito como una alfa-amilasa hiperproductora. Esta cepa se ha usado en combinación con otros microbios para producir etanol a partir de sustratos de almidón. Véase, por ejemplo, Abate, *et al.*, Production of amyolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*, Biotechnology Letters 21, 249-252 (1999) (aquí incorporada por referencia).

50 [0007] El estado de la técnica de interés incluye la patente de EE.UU. n.º 6.960.342 que se refiere a una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* que muestra amplia actividad antifúngica. Esta divulgación también se refiere al uso de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* o una composición antifúngica compuesta por la cepa nueva para control de una amplia gama de patógenos de planta fúngica.

55 [0008] La patente de EE.UU. n.º 6.589.524 se refiere a una composición de control biológico y al método que incluye las cepas específicas de *Bacillus*, que son seleccionadas del grupo de *Bacillus cereus* NRRL B-30517 y NRRL B-30519, *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-30518 y *Bacillus subtilis* NRRL B-30520. Aquí, las cepas específicas, en combinación, proporcionan un efecto contra los hongos patógenos. Los hongos patógenos incluyen especies de *Phytophthora* variadas tales como *P. capsici*.

60 [0009] La WO/2005/059112 se refiere a un *Bacillus amyloliquefaciens* KTGB0202 y un método para controlar patógenos vegetales utilizando el mismo. Esta cepa tiene un efecto de control contra el moho pulverulento de planta de cultivo y un amplio espectro de actividad antifúngica contra los hongos patógenos de plantas e inhibe la infección por virus de mosaico de tabaco, al igual que un caldo de cultivo bacteriano respetuoso con el medioambiente para controlar el moho pulverulento que contiene el mismo.

[0010] El estado de la técnica de interés también incluye las solicitudes de patente de EE.UU. n°. 12/511.499, 12/503.272 y 12/492.816 (todo lo cual se incorpora aquí por referencia en su integridad) en referencia a cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50154, NRRL B-50151 y NRRL B-50141, respectivamente, y composiciones y usos de estas cepas.

[0011] La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* SB3200 se incluye en productos vendidos por Novozymes para aplicaciones de limpieza y control de olores donde las enzimas ayudan a eliminar suelos orgánicos que hacen que suelos inorgánicas se aferren y provoquen malos olores y para aplicaciones de desagüe/atascos de grasa donde la cepa ayuda a degradar la grasa y los compuestos orgánicos que causan acumulaciones en los desagües que causan atascos.

[0012] Hay una necesidad continua de identificar cepas que sean excelentes productoras y/o secretoras de enzimas adecuadas para un uso industrial. Además hay una necesidad continua de identificar nuevas cepas que produzcan/segregen enzimas útiles múltiples y/o tengan aplicaciones antifúngicas. Es deseable identificar una única cepa que pueda producir excelente amilasa, surfactante y actividad de amilasa. La identificación de cepas nuevas es necesaria para resolver necesidades industriales continuas para mejorar aplicaciones industriales en el área de la producción agrícola, la industria de los detergentes, la industria del bioetanol y la industria de la panificación.

Resumen de la invención

[0013] Una cepa nueva de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 se ha identificado y aislado. La cepa se caracteriza como una cepa de bacterias de *Bacillus* que produce enzimas que tienen amilasa excelente, surfactante y actividad antifúngica. Además, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación tiene actividad lipásica, resistencia al fago, y es tolerante a pH extremo, sal y temperatura extrema. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación y las enzimas que produce son útiles en varias aplicaciones en las áreas de producción de la agricultura, la industria de los detergentes, la industria del bioetanol y la industria de la panificación como se muestra más adelante.

[0014] Más específicamente, la presente divulgación se refiere a un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 que produce más actividad de amilasa que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50154. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 es una cepa resistente a los bacteriófagos (resistente a los fagos) de *Bacillus amyloliquefaciens*. Para propagar la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 a un número suficientemente grande que permita una amplia aplicación de esta cepa, se requiere fermentación repetida a gran escala. Se conoce que la introducción natural del bacteriófago nativo puede ocurrir en sistemas de fermentación a gran escala estándar en eventos de crecimiento repetido o lotes. Tal infección puede llevar rápidamente a una pérdida completa del cultivo en horas o días, anulando la capacidad de proporcionar la cepa para aplicaciones prácticas. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 es resistente a tal fago, y por lo tanto mantiene crecimiento y produce los beneficios descritos aquí.

[0015] La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 es capaz de producir amilasa, que cataliza la degradación de los principales componentes químicos de residuos de desagüe, tales como almidones.

[0016] Esta presente divulgación también se refiere a una composición líquida que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 en una solución acuosa, por ejemplo, agua destilada, agua del grifo, una solución salina u otra solución acuosa.

[0017] La presente divulgación se dirige también a una formulación que mejora el desarrollo de la raíz vegetal y el bioaumento del medio de crecimiento de la planta.

[0018] La presente divulgación se dirige también a una formulación desatascadora que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350

[0019] La presente divulgación también se refiere a métodos para matar hongos por contacto de los hongos con la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0020] La presente divulgación también se refiere a una formulación líquida que mata los hongos que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0021] La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de semillas vegetales que comprende poner en contacto las semillas con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0022] La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento del medio de crecimiento de la planta que comprende poner en contacto el medio de crecimiento con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0023] La presente divulgación también se refiere a un método para matar hongos que comprende poner en contacto los hongos con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

5 [0024] La presente divulgación también se refiere a un método de degradación de almidón que comprende poner en contacto almidón con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

10 [0025] La presente divulgación también se refiere a un método para alterar ingredientes de panificación que comprende poner en contacto ingredientes de panificación con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0026] La presente divulgación también se refiere a un método para degradar lípidos que comprende poner en contacto lípidos con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

15 [0027] La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de aguas residuales que comprende el paso de añadir a las aguas residuales la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0028] La presente divulgación también se refiere al método de limpieza de una superficie que comprende el paso de poner en contacto la superficie con la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

20 [0029] La presente divulgación también se refiere a una composición que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350. Composiciones adecuadas comprenden uno o más microorganismos. En formas de realización, las composiciones adecuadas comprenden uno o más surfactantes y/o una o más enzimas. Ejemplos no limitativos de enzimas adecuadas incluyen una o más alfa-amilasas, celulasas, lipasas, mananasas, pectato liasas, peroxidases/oxidases y proteasas o mezclas derivadas. En formas de realización, las composiciones comprenden además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en dispersantes, estabilizadores, agentes anti-microbianos, fragancias, tintes y biocidas. En las formas de realización de la composición, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 está presente en una concentración de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{10} por ml.

30 [0030] Como se utiliza en este caso, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad capaz de proporcionar un efecto beneficioso o prevenir, aliviar o eliminar una condición indeseable. Ejemplos no limitativos de efectos beneficiosos incluyen calidad de semilla vegetal mejorada, calidad de medio de crecimiento de planta mejorada, efecto biocida en la población fúngica, efecto bioestático en la población fúngica, degradación de almidón, alteración del ingrediente de panificación, degradación lipídica, calidad de aguas residuales mejorada, limpieza de superficie mejorada y/o mal olor disminuido y combinaciones de los mismos.

35 [0031] Como se utiliza en este caso, la palabra "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere al uso de la cepa o composiciones de la presente divulgación bien profilácticamente para prevenir brotes de una o más condiciones indeseables, bien terapéuticamente para mejorar una o más condiciones indeseables existentes. Regímenes de tratamiento conformes a la presente divulgación mejoran la calidad de la semilla vegetal, mejoran la calidad del medio de crecimiento de la planta, reducen y/o eliminan hongos indeseables y mejoran la limpieza de una superficie.

40 [0032] Estos y otros aspectos de esta divulgación serán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada.

45 Breve descripción de los dibujos

[0033]

50 La figura 1 es un gráfico que muestra la actividad específica de amilasa en el tiempo.
 La figura 2 es un gráfico que muestra la actividad específica de amilasa en el tiempo.
 La figura 3 es un gráfico que muestra la actividad específica de proteasa en el tiempo.
 La figura 4 es un gráfico que muestra la actividad específica de lipasa en el tiempo.
 55 La figura 5 es un gráfico que compara la producción de biosurfactante de dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.
 La figura 6 es un gráfico que compara la producción de biosurfactante entre dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.
 La figura 7 es un gráfico que compara la tensión superficial en el factor de dilución entre dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

60 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

[0034] La presente divulgación se refiere a la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350. La cepa se caracteriza como bacterias de *Bacillus* que tienen amilasa excelente, surfactante y/o actividad antifúngica. Además, la cepa de la presente divulgación produce múltiples enzimas útiles y tiene actividad lipásica, resistencia al fago y alta tolerancia a la sal (por ejemplo hasta 7,5% de cloruro sódico) y a la temperatura (por ejemplo hasta 50°C). La

cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación y las enzimas que produce tienen un número de aplicaciones en las áreas de la producción agrícola, la industria de los detergentes, la industria del bioetanol y la industria de la panificación.

5 [0035] En formas de realización, la presente divulgación se refiere a un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350.

[0036] En formas de realización, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 de la presente divulgación es adecuado para su uso en una variedad de composiciones y métodos. Ejemplos no limitativos de composiciones
10 adecuadas de la presente divulgación incluyen cualquier composición que incluya la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350; soluciones acuosas que contengan la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350, composiciones que incluyan la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y uno o más microorganismos; composiciones que incluyan la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y surfactante; composiciones que incluyan la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y una o más enzimas. Enzimas no
15 limitadoras adecuadas para su uso conforme a la presente divulgación incluyen alfa-amilasas, celulasas, lipasas, mananetas, pectato liasas, peroxidases/oxidases y proteasas o mezclas derivadas. Otros ejemplos no limitativos de composiciones incluyen la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y uno o más dispersantes, estabilizadores, agentes anti-microbianos, fragancias, tintes y biocidas.

20 [0037] En formas de realización, las composiciones conforme a la presente divulgación están en forma líquida incluyendo un solvente de agua.

[0038] Está previsto que composiciones de la presente divulgación tengan la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 presente en una concentración de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{10} por ml.

25 [0039] Otros ejemplos no limitativos de composiciones adecuadas conforme a la presente divulgación incluyen formulaciones de desatascador, formulaciones de desinfectante o composiciones de neutralizador de olores.

[0040] En formas de realización, la presente divulgación se refiere a una formulación de desatascador que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 en un medio acuoso. Ejemplos no limitativos de formulaciones de desatascador adecuadas pueden comprender además surfactante(s) y/o conservante(s). Formas de realización de desatascadores de la presente divulgación tienen numerosas ventajas sobre los desatascadores actualmente disponibles; tal como actividad a pH más cercano al neutro, y capacidad de solubilización para jabones, sebos, aceites y grasas. Las formas de realización además proporcionan actividad biológica específica para
30 carbohidratos, y establece una biopelícula en el desagüe y en las superficies abajo para ayudar continuamente al proceso biodegradativo natural.

[0041] En formas de realización, la formulación de desatascador incluye una suspensión estable de microorganismos viables, surfactante(s), conservantes y fragancias opcionales en un medio acuoso con un pH preferido de aproximadamente 5 a 6.

[0042] Una gama de concentración operable para los microorganismos es de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^9 UFC/mL, y en formas de realización una concentración de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL, tal como aproximadamente 1×10^7 UFC/mL de la formulación.

[0043] A diferencia de los detergentes típicos, que principalmente solo limpian superficies, el surfactante de las formas de realización de formulación de la presente divulgación puede solubilizar grasa y hacerla biodisponible. El surfactante puede ser cualquier surfactante fácilmente biodegradable, o una mezcla de surfactantes con baja toxicidad para los microorganismos contenidos en el sistema. El(los) surfactante(s) debería(n) tener una alta capacidad de solubilización de la grasa. Surfactantes iónicos o mezcla de surfactantes no iónicos/iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo/lipófilo cerca de 10 son particularmente preferidos para la solubilización de grasa necesaria. Ejemplos no limitativos de surfactantes adecuados para su uso con la presente divulgación incluyen n-alkil benceno sulfonatos y alkil sulfonatos. Ejemplos no limitativos de agentes surfactantes no iónicos incluyen alcoxilatos de alcohol alifático, alcohol etoxilatos, copolímeros de óxido de polialquileño, alkil fenol alcoxilatos, ésteres de ácido carboxílico, amidas carboxílicas y otros. En formas de realización, el surfactante está presente en una concentración de aproximadamente 3 a 10 por ciento en peso de la composición total o formulación.

[0044] En las formas de realización de la formulación de desatascador, el pH de la solución debería mantenerse lo más cerca posible del neutro para asegurar actividad bacteriana adecuada, y para minimizar el riesgo para la salud, pero estar en una gama compatible para la actividad de surfactante y propicio para la supervivencia de las bacterias. Una gama de pH operable puede estar entre aproximadamente 3 a 10.

[0045] En las formas de realización de la formulación de desatascador, un conservante tal como parabeno, metil parabeno o 1-2-bencisotiazolin-3-ona se añade para inhibir o prevenir el crecimiento de contaminantes microbianos indeseables en el producto. La necesidad de un conservante es mayor cuando el pH está cerca del neutro, y menor cuando el pH está en los extremos de la gama operable. La concentración del conservante se determina según las

recomendaciones del vendedor. Una gama de concentración típica para el conservante usado en el ejemplo es de aproximadamente 0,075 a 0,75 por ciento en peso de la composición total o formulación.

5 [0046] Un conservante opcional adicional se puede añadir específicamente para preservar la forma de espora de los microorganismos. En formas de realización, el metil antranilato en concentraciones de aproximadamente 25 a 50 ppm (p/v) en peso es un satisfactorio aditivo.

10 [0047] En las formas de realización de la formulación de desatascador, opcionalmente un agente quelante se añade para mejorar estabilización de la formulación.

[0048] En las formas de realización de la formulación de desatascador, una fragancia puede opcionalmente añadirse para ocultar el olor de los componentes del producto y para hacerlo atractivo en el mercado. La fragancia debe ser compatible con los demás componentes de la formulación.

15 [0049] En formas de realización, la presente divulgación también se refiere a formulaciones de desinfectante que comprenden la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350. Las formulaciones comprenden una suspensión de una composición de desinfección, esporas bacterianas y surfactantes todos contenidos en una solución acuosa. Estas formulaciones tienen las ventajas de ser un buen agente de limpieza de superficies y un buen desinfectante junto con el efecto a largo plazo de bacterias beneficiosas que controlan patógenos y degradan residuos tanto en la superficie como en el sistema de aguas residuales que recibe el agua de enjuague de la superficie.

20 [0050] Agentes o composición de desinfección y desinfectantes pertenecen a la misma categoría de ingrediente antimicrobiano (activo). Los ingredientes antimicrobianos (activos) son compuestos que matan los microorganismos o previenen o inhiben su crecimiento y reproducción y que contribuyen al efecto reivindicado del producto en el que se incluyen. Más específicamente, un desinfectante es un agente que reduce el número de contaminantes microbianos o patógenos para niveles seguros según se considera por las exigencias de la salud pública.

25 [0051] En las formas de realización de desinfectantes, el componente surfactante funciona para limpiar la superficie eliminando la tierra, suciedad, orina seca y jabón y ayuda en la desinfección de la superficie. La composición de desinfección desinfecta la superficie (mata los patógenos) y preserva la formulación de contaminación por microorganismos no deseados. Las esporas bacterianas y células vegetativas funcionan para sembrar el sistema de recogida de residuos, controlar el olor y proporcionar una población microbiana dominante saludable que inhiba el crecimiento de patógenos a través de competición de sustrato, producción de antibióticos, etc.

30 [0052] En una forma de realización de desinfectante de la presente divulgación, la composición comprende 1,2-bencisotiazolin-3-ona (Proxel), tetrasodio etilendiaminotetraacetato (EDTA) e isopropil alcohol (IPA) en una gama seleccionada de concentraciones, combinados con otros componentes de la fórmula, pueden eficazmente inactivar organismos indicadores. Esta composición de desinfección preferiblemente está en pH neutro y no contiene materiales relacionados con el cloro, que se usan comúnmente como desinfectantes. Consecuentemente, esta composición de desinfección es más respetuosa con el medioambiente y menos o nada corrosiva.

35 [0053] En formas de realización, cuando una formulación de desinfección se aplica a un accesorio de baño, lavabo, taza del inodoro, etc., se puede pulverizar o eyectar desde un contenedor directamente sobre una superficie o cepillo. La formulación se deja luego sobre la superficie o se restriega contra la superficie con un cepillo durante no menos de 10 minutos. El producto se aclara o enjuaga con agua y se elimina del accesorio.

40 [0054] En formas de realización, las formulaciones de desinfectante de la presente divulgación contienen agentes de desinfección, esporas bacterianas y surfactantes. También se añaden fragancias y tintes para controlar el olor y el color de las formulaciones, respectivamente. Dependiendo del uso destinado, la formulación puede opcionalmente contener un abrasivo. Mientras que los componentes clave permanecen igual, se pueden utilizar agentes espesantes diferentes en la formulación con y sin un abrasivo.

45 [0055] Aunque muchos agentes de desinfección se pueden usar para inactivar patógenos en las superficies, no todos ellos se pueden usar en formas de realización de la presente divulgación. Esto se debe a que los agentes de desinfección usados en esta presente divulgación no son solo necesarios para inactivar patógenos eficazmente, sino que deben no tener efectos negativos en la estabilidad y la actividad de las esporas bacterianas contenidas en la formulación. Además, los agentes de desinfección es necesario que sean relativamente respetuosos con el medioambiente, y no deberían causar sensibilización cutánea, y debería no corroer los materiales de construcción de los accesorios sobre los que se usan.

50 [0056] En formas de realización, la composición de desinfección de la presente divulgación incluye Proxel, EDTA e IPA en gamas seleccionadas de concentraciones. La concentración máxima de Proxel que no es posible que cause sensibilización cutánea es aproximadamente 2,900 mg/L. Los rangos de concentración adecuados de Proxel, Versene (Versene contiene 39% de EDTA) e IPA para producir una reducción de 4 log en la cuenta de un organismo indicador en 10 minutos son 0,087 a 0,29% (vol.), 0,36 a 1,19% (vol.) y 3,5 a 7% (vol.), respectivamente. Un

compuesto adicional, metil antranilato, también se puede usar en las formulaciones de la invención. El propósito de utilizar metil antranilato es ayudar en la conservación de las formulaciones.

5 [0057] En formas de realización, agentes de desinfección, tales como compuestos de amonio cuaternario (QACs), organoazufre que contiene nitro y compuestos de azufre-nitrógeno, también se pueden usar en las composiciones de desinfección de la presente divulgación.

10 [0058] En las formas de realización de desinfectante, una gama de concentración operable para los microorganismos es de 1×10^5 a 1×10^9 UFC/mL, tal como 10^7 UFC/mL (CFU, unidad formadora de colonia) de la formulación.

15 [0059] En formas de realización, se incluyen surfactantes en las formulaciones de desinfectante de la presente divulgación. Los surfactantes pueden mojar y emulsionar la suciedad, incluyendo suciedad, orina seca, jabón, etc., presente en una superficie sucia. Además, los surfactantes ayudan en la sanitización de la superficie. A diferencia de los surfactantes usados normalmente para la limpieza de superficies, los surfactantes usados en la presente divulgación tienen baja toxicidad para los microorganismos contenidos en la formulación. En formas de realización, un único surfactante o una mezcla de diferentes surfactantes se puede usar.

20 [0060] Ejemplos no limitativos de surfactantes adecuados para usar en las formas de realización de desinfectante incluyen agentes surfactantes no iónicos ya que proporcionan la humidificación deseada y acciones de emulsión y no inhiben significativamente la estabilidad y la actividad de la espora. Surfactantes no iónicos son surfactantes que no tienen ninguna carga eléctrica cuando se disuelven o dispersan en un medio acuoso. Ejemplos no limitativos de agentes tensioactivos no iónicos incluyen alcoxilatos de alcohol alifático, alcohol etoxilatos, copolímeros de óxido de polialquileño, alcoxilatos de alquil fenol, ésteres de ácido carboxílico, amidas carboxílicas y otros.

25 [0061] Surfactantes aniónicos o mezclas de surfactantes no iónicos y aniónicos también se pueden usar en las formulaciones de la divulgación. Surfactantes aniónicos son surfactantes que tienen una fracción hidrofílica en un estado aniónico o cargado negativamente en la solución acuosa. Ejemplos no limitativos de surfactantes aniónicos adecuados para su uso aquí incluyen ácidos sulfónicos, ésteres de ácidos sulfúricos, ácidos carboxílicos y sales derivadas.

30 [0062] En formas de realización, composiciones de la presente divulgación incluyen abrasivos que son partículas sólidas insolubles en agua. El propósito de utilizar abrasivos es proporcionar lavado y limpieza profundos. Dependiendo de la aplicación, los abrasivos se pueden usar opcionalmente en la formulación de la divulgación. Ejemplos no limitativos de abrasivos adecuados incluyen carbonato cálcico, carbonato de magnesio, sílice, etc. En formas de realización, los abrasivos puede estar presentes en un tamaño de malla de 80 a 325 de malla (ASTM E 11-70 (1995)).

35 [0063] Dado que la densidad relativa de las esporas bacterianas es normalmente superior a la del agua, hay que usar un agente espesante en esta divulgación para suspender las esporas. Ejemplos no limitativos de agentes espesantes acuosos adecuados incluyen: ácido poliacrílico, poliestireno, alcohol polivinílico, polipropileno, etc. En formas de realización, un agente espesante para suspender esporas bacterianas es ácido poliacrílico (por ejemplo, Acrysol TT615 de Rohm and Haas Co.). Si un abrasivo se usa en la formulación, agentes espesantes además de ácido poliacrílico es posible que sean necesarios para mantener la suspensión del abrasivo.

40 [0064] En formas de realización, una fragancia y un tinte se puede añadir opcionalmente para ocultar el olor y para controlar el color de los componentes del producto, respectivamente, y para hacerlo atractivo para el mercado. La fragancia y el tinte deben ser compatibles con los demás componentes de la formulación.

45 [0065] En formas de realización, la presente divulgación se dirige también a una composición que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 en una solución acuosa. En formas de realización, la solución acuosa está diseñada para proporcionar y control de olor a corto y largo plazo y es respetuosa con el medioambiente y económica.

50 [0066] En formas de realización, una gama de concentración operable para la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 es de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{10} UFC/mL, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 UFC/mL. En formas de realización, una gama de concentración operable para la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 es una cantidad de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL, o en formas de realización aproximadamente 1×10^7 UFC/mL de la formulación.

55 [0067] En formas de realización, composiciones desodorantes de la presente divulgación pueden comprender un neutralizador de olor, que es un agente que puede rápidamente interactuar, por reacciones químicas, con compuestos olorosos para producir compuestos inodoros. Estos agentes debería no depender del mecanismo de enmascaramiento de un perfume para controlar los olores. Además, estos agentes deben ser seguros y rentables. Los neutralizantes debe ser compatibles con los componentes microbianos.

[0068] En una forma de realización de la presente divulgación, el neutralizador es carbonato de propileno, que tiene la fórmula molecular $C_4H_6O_3$. El carbonato de propileno adecuado para su uso conforme a la presente divulgación está disponible de vendedores comerciales tales como Huntsman Chemical Corporation.

5 [0069] En combinación con otros componentes de la composición, el carbonato de propileno puede eficazmente reducir olores, incluyendo olores de amina y amoníaco tales como trimetilamina, dimetilamina y amoníaco, que son los compuestos olorosos objetivo principales. Además, el carbonato de propileno no inactiva los componentes microbianos aún después de un periodo largo de contacto.

10 [0070] Otros compuestos de neutralización de olores, tales como el citrato sódico, bicarbonato sódico y carbonato de sodio, también se pueden usar en formas de realización de la presente divulgación.

[0071] En formas de realización, el agente o compuesto neutralizador del olor está presente en una cantidad de 1-15% en peso, tal como 2-10 % en peso de la composición total.

15 [0072] En composiciones de la presente divulgación, otros componentes microbianos son adecuados para su uso aquí. Microorganismos viables, o mezclas derivadas, que sean capaces de crecer y degradar residuos doméstico comunes, industriales, de mascotas y de animales, capaces de sobrevivir a las formulaciones, y compatibles con las formulaciones, y que no produzcan mal olor mientras se utilizan, se pueden usar en formas de realización de la presente divulgación.

20 [0073] Ejemplos no limitativos de otros microorganismos que se pueden usar en las composiciones de la presente divulgación incluyen cepas de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Pseudomonas* y *Streptococcus*, que se conocen por producir enzimas que son capaces de degradar materia orgánica que pueden causar olores en alfombras u otros materiales fibrosos.

[0074] Otros ingredientes se pueden utilizar en las composiciones de la presente divulgación, incluyendo surfactantes, fragancias y tintes.

30 [0075] En las formas de realización de la composición, los surfactantes pueden humedecer y emulsionar materiales de residuos insolubles presentes en el sistema tratado y la inclusión de surfactantes en la composición de la divulgación añadirá a ésta una capacidad de limpieza. Además, se pueden utilizar surfactantes para descomponer los residuos insolubles, aumentando por lo tanto la disponibilidad de éstos para degradación microbiana. Surfactantes adecuados para la divulgación incluyen los tipos no iónico y aniónico. En formas de realización, el surfactante está presente en una cantidad de 0-8% en peso, tal como 0-6% en peso de la composición.

[0076] En formas de realización, la fragancia y el tinte se pueden añadir opcionalmente para ocultar el olor y para controlar el color de la composición de la divulgación, respectivamente, y para aumentar el atractivo en el mercado.

40 [0077] La fragancia y el tinte deben ser compatible con otros ingredientes de la composición.

[0078] Se ha descubierto la cepa de la presente divulgación tiene actividad de surfactante muy fuerte. Además, la cepa de la presente divulgación es adecuada para su uso en controlar los hongos patógenos. Un ejemplo no limitativo de hongos patógenos es los hongos que producen espora de cieno conocida por causar la amortiguación de la enfermedad. En formas de realización, la espora de cieno es sensible a los surfactantes incluyendo los surfactantes producidos por la cepa de la presente divulgación. Poner en contacto la espora de cieno con la cepa de la presente divulgación y/o el surfactante tiene un efecto biocida y/o bioestático en los hongos conocidos por hacer espora de cieno. En formas de realización, la cepa de la presente divulgación tiene actividad antifúngica excelente contra *Pythium spp.* En formas de realización, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y composiciones que contienen esta cepa se ponen en contacto con semillas y/o un medio de crecimiento que tiene hongos indeseables y que necesita tratamiento. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 tiene un efecto biocida en los hongos y alivia la condición fúngica indeseable. Por consiguiente, las semillas y/o medio de crecimiento vegetal se altera y es más adecuado para el crecimiento de plantas en el mismo. En formas de realización, métodos conforme a la presente divulgación son adecuados para matar un género de oomicetos parasitarios conocidos como *Pythium*.

55 [0079] En formas de realización de la presente divulgación, los métodos y composiciones son adecuados para su uso en el área del detergente. Se ha descubierto sorprendentemente que la cepa de la presente divulgación incluye actividad muy alta de amilasa, surfactante y antifúngica. Por ejemplo, la cepa de la presente divulgación produce cantidades excelentes de amilasa, surfactante, mientras que tiene excelente actividad antifúngica contra *Pythium spp.* En formas de realización, cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y composiciones que contienen esta cepa se ponen en contacto con un sustrato sucio que necesita tratamiento. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 descompone almidón y el almidón mancha allí y alivia la condición de suciedad indeseable. Por consiguiente, el sustrato, tal como un tejido o superficie se altera y está más limpio en apariencia.

65

[0080] En formas de realización, la cepa y composiciones que incluyen la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 de la presente divulgación son adecuadas para su uso en una variedad de aplicaciones del método. Ejemplos no limitativos de métodos adecuados incluyen tratamiento de semillas de planta poniendo en contacto semillas con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; tratamiento del medio de crecimiento de la planta poniendo en contacto el medio de crecimiento con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; matar hongos poniendo en contacto hongos con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; degradación de almidón poniendo en contacto almidón con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; alterar ingredientes de panificación poniendo en contacto ingredientes de panificación con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; degradar lípidos poniendo en contacto lípidos con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; tratamiento de aguas residuales que comprenden la etapa de adición a las aguas residuales de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación; y limpieza de una superficie poniendo en contacto la superficie con la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la presente divulgación. Ejemplos no limitativos de superficies adecuadas para limpiar conforme a la presente divulgación incluyen una superficie dura, preferiblemente hecha de uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste en metal, plásticos, caucho, tablero, vidrio, madera, papel, hormigón, roca, mármol, yeso y materiales cerámicos, tal como porcelana; o una superficie blanda, preferiblemente hecha de uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste en fibras, por ejemplo, madejas, tejidos, fibras vegetales; lana de roca, pelo; piel; materiales queratinosos; y órganos internos, por ejemplo, pulmones; o una superficie porosa.

[0081] En formas de realización, el tratamiento incluye la aplicación de una cantidad eficaz de una o más composiciones de cepa. Ejemplos no limitativos incluyen formulaciones de desatascador, formulaciones de desinfectante y composiciones de neutralizador de olor. Tales tratamientos puede prevenir, aliviar o eliminar una condición indeseable.

[0082] Ejemplos no limitativos de efectos beneficiosos incluyen mejora de la calidad de la semilla de planta, mejora de la calidad del medio de crecimiento de la planta, efecto biocida en la población fúngica, efecto bioestático en la población fúngica, degradación de almidón, alteración de ingrediente de panificación, degradación lipídica, mejora de la calidad de las aguas residuales, mejora de la limpieza de superficies y/o disminución del mal olor y combinaciones de los mismos.

Depósito de material biológico

[0083] Una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* fue depositada según las condiciones del tratado de Budapest el 12 de abril de 2010 con la Agricultural Research Service Culture Collection, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, E.E.U.U., bajo el número de registro NRRL B-50350. El depósito debe ser mantenido en condición viable en la depositaria durante toda la duración de la patente expedida y debe estar disponible para cualquier persona o entidad para su uso no comercial sin restricción, pero conforme a las provisiones de la ley que regula el depósito.

[0084] Los siguientes ejemplos se dan como ilustrativos de la divulgación pero sin intención de limitar la misma. Para que esos expertos en la técnica pueden practicar mejor las composiciones y métodos descritos aquí, los siguientes ejemplos se dan como una ilustración de la preparación de las presentes composiciones y métodos. Debe observarse que la divulgación no está limitada a los detalles específicos contenidos en los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

[0085] La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 ("Cepa SB3778") fue aislada de un área de laboratorio de investigación. Se realizaron estudios que incluyeron: un estudio de identificación bacteriana; estudio de huella digital de ADN; estudio de actividad de biosurfactante; estudio de actividad antifúngica; estudio de tolerancia a la tensión; estudio de actividad de proteínasa; y clonación de gen para amilasa.

Aislamiento e identificación de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350

[0086] Un ADN de 16s en toda su longitud de base 1600 se obtuvo del aislado de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y la secuencia fue analizada. El análisis identificó el aislado bacteriano como *Bacillus amyloliquefaciens*.

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 tiene morfología única en placa de SM:

[0087] La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 fue comparada con las cepas conocidas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Específicamente, el crecimiento y la morfología fueron comparados. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

amyloliquefaciens NRRL B-50350 fue morfológicamente diferente de las demás cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* en medio SM. Todas las demás cepas de *B. amyloliquefaciens* produjeron exopolisacáridos en placa de SM agar y la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 no.

5 La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 tiene un genotipo único

[0088] La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 fue comparada con cepas conocidas de *Bacillus amyloliquefaciens* por medio de análisis de toma de huella genética de ADN. Los resultados demostraron que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 tenían 70% de similitud con una cepa conocida de *Bacillus amyloliquefaciens*.

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 produjo más actividad de amilasa que la cepa bien conocida de *Bacillus amyloliquefaciens* para producción de amilasa interna:

15 [0089] La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 fue evaluada para actividad de amilasa contra la cepa conocida de *Bacillus amyloliquefaciens* conocida por ser productora de amilasa, es decir, DD3, que tiene el número de registro de depósito NRRL B-50154. La actividad de amilasa fue determinada con análisis Konelab KNU-B usando BAN. En este procedimiento, alfa-amilasas (1,4- α -D-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) catalizan la degradación hidrolítica de los carbohidratos poliméricos tales como amilosa, amilopectina y glucógeno escindiendo

20 enlaces 1,4-alfa-glucosídicos. En polisacáridos y oligosacáridos, diferentes enlaces glicosídicos son hidrolizados simultáneamente. Maltotriosa, la unidad más pequeña de tal, se convierte en maltosa y glucosa, sin embargo muy lentamente. El método cinético descrito aquí se basa en la escisión bien probada de 4,6-etilideno-(G7)-1,4-nitrofenil-(G1)- α ,D-maltoheptaósido por alfa-amilasa e hidrólisis posterior de todos los productos de degradación en p-nitrofenol con la ayuda de alfa-glucosidasa. Este produce 100% de liberación del cromóforo.

25 [0090] Este proceso ha sido automatizado en el Konelab Arena 30 con los siguientes pasos: 1) 200 microlitros de reactivo R1 se pipeta en la cubeta, 2) 16 microlitros de la muestra se añade a la cubeta, 3) la mezcla se incuba durante 300 segundos para obtener temperatura de 37 grados C, 4) 20 microlitros de reactivo R2 se pipeta en la cubeta y la mezcla se incuba durante 180 segundos, y 5) la absorción se mide cada 18 segundos a 405 nm durante

30 un total de 7 mediciones para cada muestra.

[0091] Oligosacáridos definidos fueron divididos bajo la acción catalítica de alfa-amilasas. Los derivados de PNP resultantes se dividen directamente en PNP por la acción de alfa-glucosidasa y la intensidad de color del p-nitrofenol formado es directamente proporcional a la actividad de alfa-amilasa y se mide espectrofotométricamente.

35

$$5 \text{ Etilideno-G}_7\text{PNP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ etilideno-G}_5 + 2 \text{ G}_2\text{PNP} + 2 \text{ etilideno-G}_4 + 2 \text{ G}_3\text{PNP} + \text{etilideno-G}_3 + \text{G}_4\text{PNP} \quad (1)$$

40 $2 \text{ G}_2\text{PNP} + 2 \text{ G}_3\text{PNP} + \text{G}_4\text{PNP} + 14\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5 \text{ PNP} + 14\text{G} \quad (2)$

[0092] La reacción (1) fue mediada por la amilasa adicionada del estándar o la muestra. La reacción (2) fue mediada por la glucosidasa proporcionada en el equipo. Los resultados demostraron que la actividad de amilasa de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 fue al menos 5 veces mayor que la de la cepa conocida es decir, DD3 (cepa NRRL B-50154).

[0093] Análisis enzimático: para cada cepa, una única colonia fue inoculada en 10mL de medio PCB y se dejó durante toda la noche. Aproximadamente 1×10^4 células de cada cepa fueron inoculadas en 100mL de medio de almidón. Lecturas de O.D. se tomaron en cada momento especificado en los gráficos más adelante. Para cada cepa en cada momento, 2mL de material de sobrenadante libre de células fue combinado con 1mL 50% de glicerol y almacenado a -20°C . La actividad enzimática para todas las muestras fue determinada por análisis Konelab KNU-B usando BAN como se ha descrito previamente. Una repetición de este procedimiento fue realizada para confirmar el resultado.

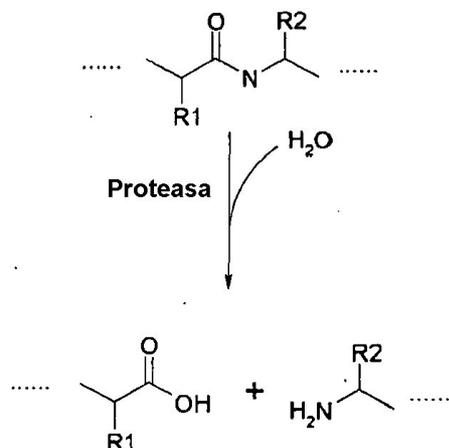
[0094] Haciendo referencia ahora a la figura 1, el estudio mostró un rendimiento de un aumento de aproximadamente unas cinco veces en la producción de amilasa en amy1 (cepa NRRL B-50350) cuando se comparó con DD3 (cepa NRRL B-50154).

[0095] Una segunda prueba dio como resultado un aumento de unas cuatro veces en la producción de amilasa cuando amy1 (cepa NRRL B-50350) fue comparada con DD3 (cepa NRRL B-50154). Estos resultados se muestran en la figura 2. En ambos estudios, la cepa NRRL B-50350 consistentemente superó a una cepa estándar en la producción de amilasa con una producción de amilasa máxima para la cepa NRRL B-50350 de aproximadamente 800 NU.

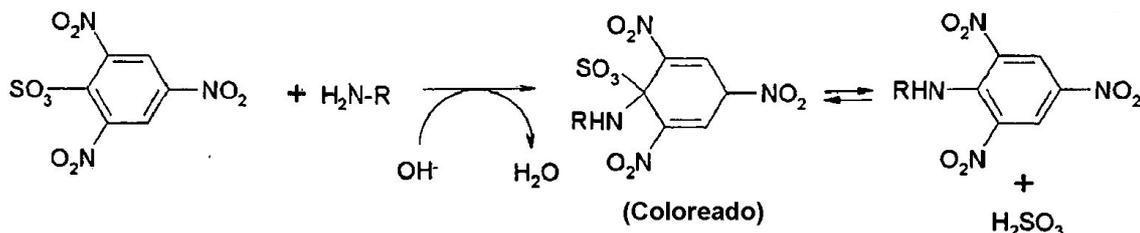
65 Unidades definidas

[0096] BAN es una alfa-amilasa disponible de Novozymes. El estándar analítico fue suministrado a 360 KNU(B)/g=360 NU(B)/mg. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 tiene actividad de proteasa y lipasa.

- 5 [0097] El ensayo de proteasa fue configurado según el protocolo descrito para el ensayo de amilasa anterior. Análisis de Konelab fue realizado de la siguiente manera:



- 10 [0098] Proteasas hidrolizan DMC (N,N-dimetilcaseína). Cuando el enlace de péptido es hidrolizado, un ácido carboxílico y amina primaria se forman como dos extremidades nuevas del oligopéptido. La amina primaria luego reacciona bajo condiciones alcalinas con ácido sulfónico de trinitrobenzeno (TNBS) para formar un complejo coloreado:



- 15 [0099] El complejo coloreado se detecta a 405 nm cinéticamente en el Konelab Arena 30 utilizando el siguiente procedimiento: 1) 180 microlitros de solución DMC se pipeta en la cubeta, 2) la mezcla se incuba durante 480 segundos para obtener temperatura de 50 °C, 3) 36 microlitros de TNBS se pipeta en la cubeta y se mezcla, 4) la mezcla se incuba durante 60 segundos para recuperar una temperatura de 50 °C, 5) 18 microlitros de muestra se pipeta en la cubeta y se mezcla, 6) la mezcla se incuba durante 120 segundos y la absorción a 405 nm es medida cada 18 segundos por un total de 7 mediciones. La reacción entre las aminas primarias y el TNBS se asume que es más rápido que la escisión de DMC, de modo que la reacción en presencia de sustrato de exceso se puede asumir que es una función de la concentración enzimática solo.

- 25 [0100] En referencia a la figura 3, se proporciona la comparación de actividad específica de proteasa. *Bacillus amyloliquefaciens* amy1 (cepa NRRL B-50350) produce alrededor de la misma cantidad de proteasa que DD3 (cepa NRRL B-50154).

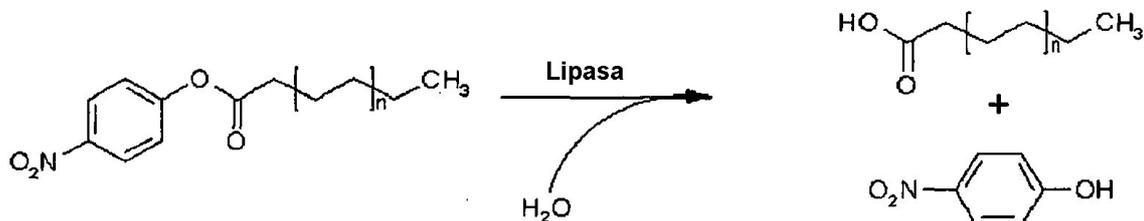
- 30 [0101] El ensayo de lipasa se configuró según el protocolo descrito para el ensayo de amilasa anterior. Análisis de Konelab fue realizado de la siguiente manera:

35 Lipasas son clases especiales de enzimas de esterasa. Lipasas están comúnmente asociadas a la descomposición de triglicéridos en glicerol y 3 ácidos grasos. A veces, las lipasas serán específicas para triglicéridos que contienen ácidos grasos de una longitud de cadena particular, o en otros casos serán específicas para la química posicional del ácido graso en la fracción de glicerol. Las lipasas tienden a funcionar en la interfaz de agua-aceite. En la reacción descrita aquí, un derivado de p-nitrofenol de un ácido graso se usa como sustrato para una lipasa. Hay diferentes longitudes de cadena de ácido graso para elegir de las que están disponibles para este ensayo de laboratorio. Estos incluyen:

- 40 pNP-butirato: C₄
 pNP-valerato: C₅
 pNP-palmitato: C₁₆

pNP-valerato es el sustrato más frecuentemente usado para este ensayo. El sustrato es incoloro, mientras el producto de escisión de p-nitrofenol tiene una absorción fuerte a 405 nm. Por lo tanto, la actividad enzimática se puede seguir controlando el aumento en A_{405} en el tiempo. El esquema de reacción se muestra a continuación:

5



10

[0102] El complejo coloreado se detecta a 405 nm cinéticamente en el Konelab Arena 30 utilizando el siguiente procedimiento: 1) 175 microlitros de solución de pNP-valerato se pipeta en la cubeta, 2) la mezcla se incuba durante 480 segundos para obtener temperatura de 37 °C, 3) 50 microlitros de muestra se pipeta en la cubeta y se mezcla, 4) la mezcla se incuba durante 250 segundos para recuperar una temperatura de 37 °C, 5) la mezcla se incuba durante 600 segundos y la absorción a 405 nm es medida cada 54 segundos por un total de 12 mediciones.

15

[0103] En referencia a la figura 4, *Bacillus amyloliquefaciens* amy 1 (cepa NRRL B-50350) produce aproximadamente la misma cantidad de lipasa que DD3 (cepa NRRL B-50154).

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 tiene actividad antifúngica:

20

[0104] Capacidades antifúngicas de la cepa NRRL B-50350 fueron comparadas a las de DD3 (cepa NRRL B-50154). Por cepa, DD3 (cepa NRRL B-50154) *Pythium* inhibido pero más fuertemente inhibido *R. solani* y *S. sclerotiorum*. La cepa NRRL B-50350 inhibió los tres hongos, más fuertemente en *Pythium*. En la comparación, DD3 (cepa NRRL B-50154) fue más eficaz que la cepa NRRL B-50350 en inhibición de *R. solani* y *S. sclerotiorum*, sin embargo, la cepa NRRL B-50350 inhibió *Pythium* mucho más fuertemente que DD3 (cepa NRRL B-50154). Los datos son particularmente interesantes porque es difícil encontrar buenos inhibidores de *Pythium*. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación:

25

Tabla 1: diámetro de zonas de inhibición (mm) (datos de SSGN)

	Pythium	R. solani	S. sclerotiorum
Control (sin inhibición)	90,0mm	90,0mm	90mm
Tipo salvaje dd3 (cepa NRRL 1 B-50154)	5,0 x 5,0	20 x 12	25 x 10,0
2	5,0 x 3,0	19 x 13	25 x 8,0
3	5,0 x 4,0	20 x 13	25 x 10,0
Cepa NRRL B-50350 1	15 x 15,0	10 x 10,0	10 x 10,0
2	15 x 13,0	8 x 10,0	10 x 11,0
3	10 x 10,0	10 x 9,0	10 x 10,0

30

Ejemplo 2: tolerancia a la temperatura

35

[0105] Método: la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y una cepa doméstica (usada como un control para comparación) fueron inoculadas en PCB y se dejaron crecer durante toda la noche en cada una de las temperaturas siguientes: 35°C, 40°C, 45°C y 50°C. La tolerancia fue medida por la presencia o la ausencia de crecimiento.

[0106] Resultados: el crecimiento fue visible hasta 50°C para cada cepa. Por consiguiente, la cepa de la presente divulgación es tolerante al calor.

40

Ejemplo 3: tolerancia a la salinidad

45

[0107] Método: la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 y una cepa doméstica (usada como un control para comparación) fueron inoculadas en medios de bactotripton (10g/L) extracto de levadura (5g/L) con las siguientes concentraciones de sal: 2%, 5%, 7,5%, 10% y 12,5%. La tolerancia fue medida por la presencia o la ausencia de crecimiento.

[0108] Resultados: el crecimiento fue visible hasta el 7,5% para la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 mientras que el crecimiento visualizado del control hasta 12,5%.

Ejemplo 4: actividad de biosurfactante

5 [0109] Método: la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 ("amy1" y precedentemente denominada "Cepa X") y otra cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50017 ("SB3195" y precedentemente denominada "Cepa Y") con actividad de biosurfactante conocida fueron inoculadas en 100mL de medios de biosurfactante de modo que cada matraz tuviera una O.D. de 0,001. La tensión superficial y la O.D. fueron medidas a 8, 24, 56 y 72
10 horas. A las 56 horas, varias diluciones fueron realizadas para determinar la fuerza de biosurfactante para amy1 y SB3195.

[0110] Resultados: aunque amy1 y SB3195 fueron inoculadas en el mismo índice, SB3195 mostró crecimiento más rápido que amy1 (figura 5). A las 56 horas, el crecimiento de SB3195 fue 3 veces superior al de amy1. Sin embargo, la producción de biosurfactante para amy1 comenzó a las 8 horas mientras que la producción de biosurfactante de SB3195 se mostró a las 24 horas (figura 6). La buena actividad de biosurfactante fue determinada por una tensión superficial inferior a 50mN/m. El biosurfactante producido por amy1 pudo ser diluido 100 veces antes de perder la actividad de biosurfactante mientras que SB3195 perdió la actividad de biosurfactante en la dilución de 25 veces (figura 7). Mientras amy1 mostró 1/3 del crecimiento de SB3195, amy1 produjo un biosurfactante 4 veces más fuerte en cuanto a dilución que SB3195.
15
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cultivo biológicamente puro de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 que produce más actividad de amilasa que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50154.
2. Método para matar hongos que comprende poner en contacto los hongos con una cantidad eficaz de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* según la reivindicación 1.
- 10 3. Composición que comprende la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* según la reivindicación 1.
4. Composición conforme a la reivindicación 3 que comprende además uno o más de otros microorganismos.
5. Composición según la reivindicación 3, que comprende además un surfactante.
- 15 6. Composición según la reivindicación 5, que comprende además una o más enzimas.
7. Composición según la reivindicación 6, donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en alfa-amilasas, celulasas, lipasas, mananasas, pectato liasas, peroxidasa/oxidasas y proteasas o mezclas derivadas.
- 20 8. Composición según la reivindicación 3, que comprende además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en dispersantes, estabilizadores, agentes antimicrobianos, fragancias, tintes y biocidas.
- 25 9. Composición según la reivindicación 3, donde la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50350 está presente en una concentración de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{10} por ml.

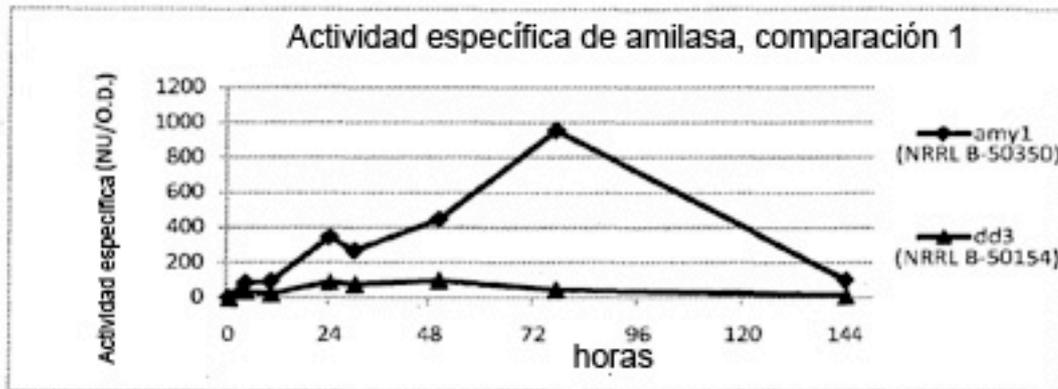


FIG. 1

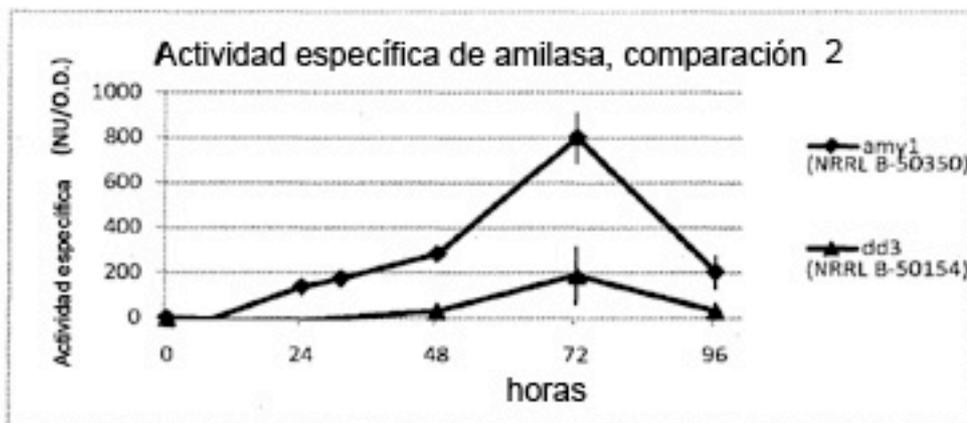


FIG. 2

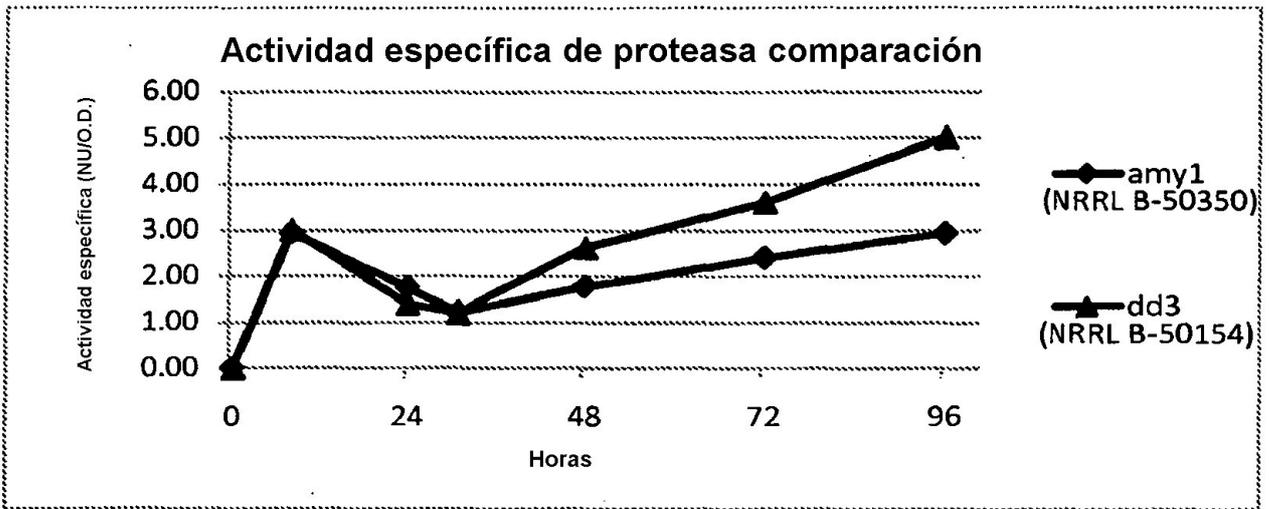


FIG. 3

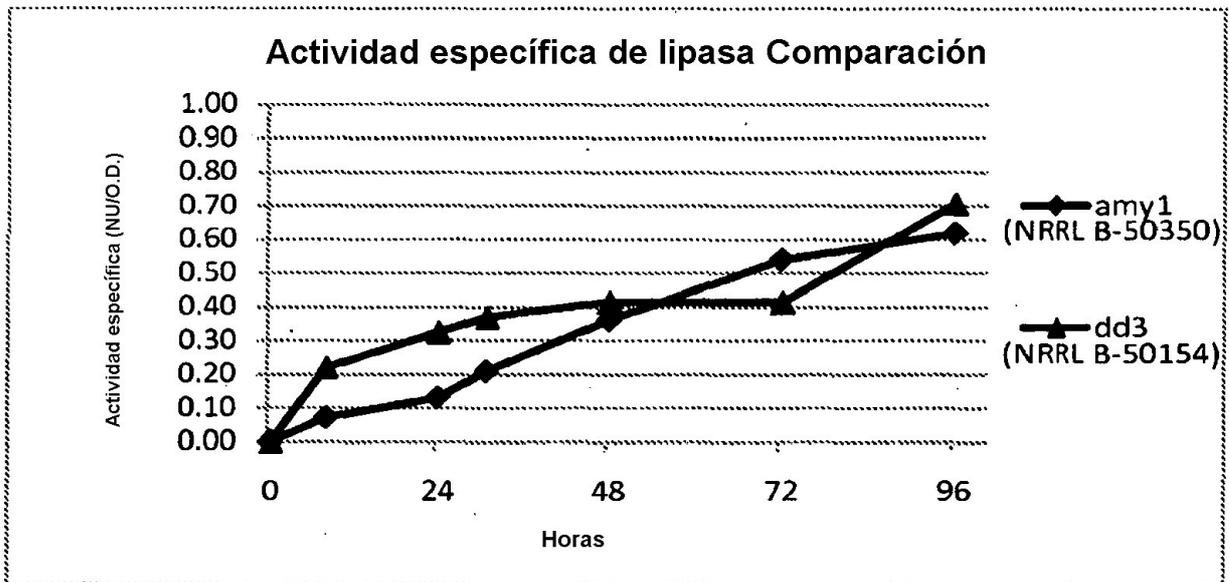


FIG. 4

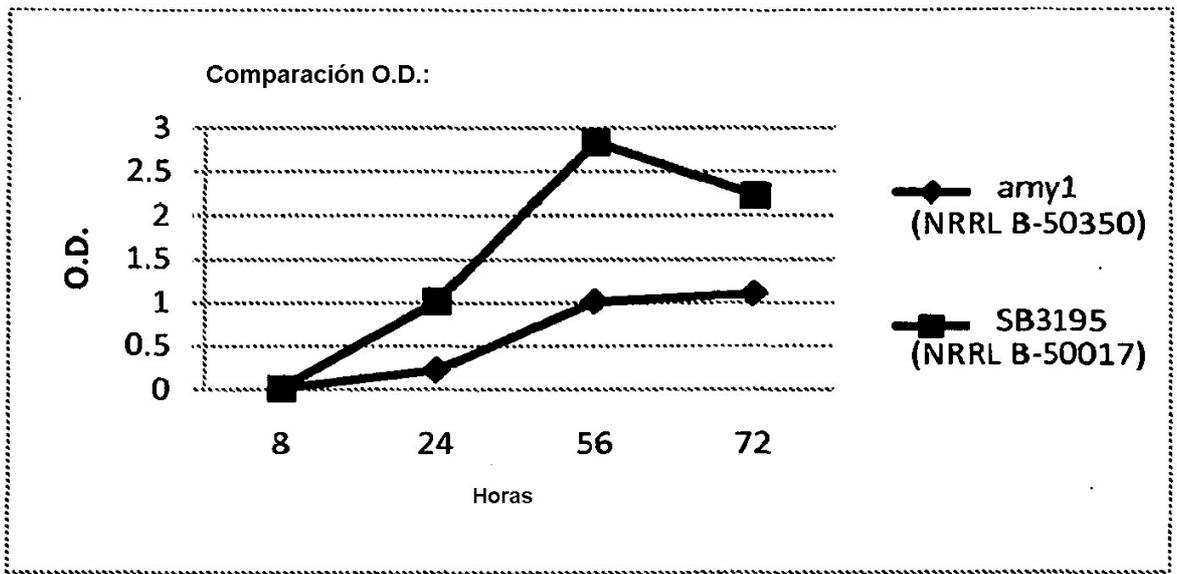


FIG. 5

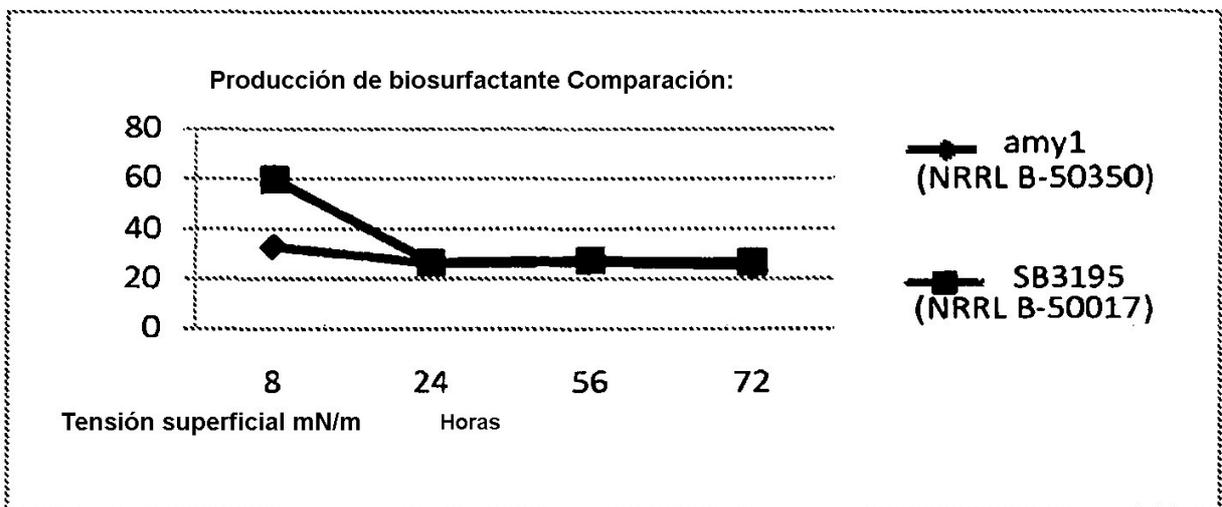


FIG. 6

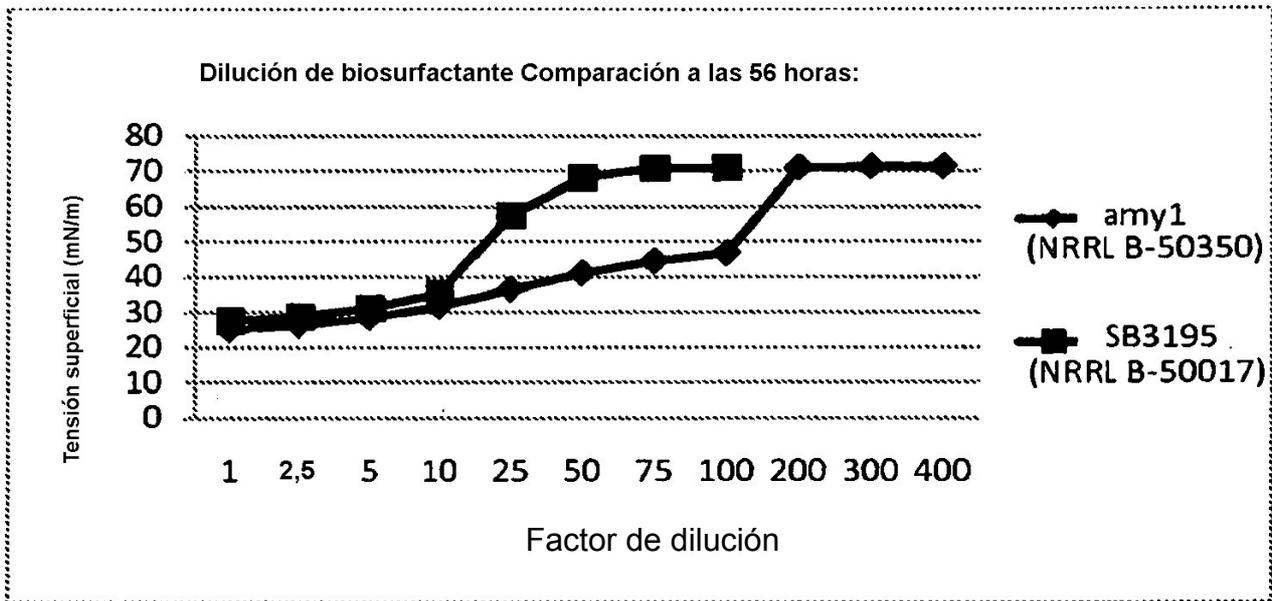


FIG. 7