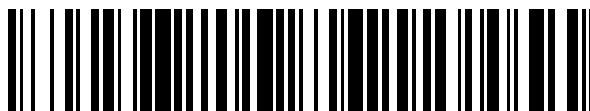


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 591 356**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/125** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2011 PCT/US2011/051575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO12037237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2011 E 11760939 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2616558**

54 Título: **Aislado de bacillus subtilis del maíz**

30 Prioridad:

**15.09.2010 US 383169 P**

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

**28.11.2016**

73 Titular/es:

**INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGIA AVANZADA,  
S.A. DE C.V. (100.0%)  
Ave Ruiz Cortines S/N Frente a Colonia la  
Purísima Entre Gral. Bonifacio Salinas y  
Carretera Miguel Aleman  
Guadalupe, N.L. México C.P. 67110, MX**

72 Inventor/es:

**RUBIO, MANUEL J.;  
RUBIO, FELIPE A.;  
CONTRERAS, ROBERTO y  
RAMIREZ, J. FERNANDO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 591 356 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

Aislado de *Bacillus subtilis* del maíz

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a cultivos puros aislados biológicamente de una nueva espora que forma especies de *Bacillus*, y más en particular, a un aislado de *Bacillus subtilis* Maseca-1.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante más de cuatro décadas se han llevado a cabo investigaciones sobre péptidos antimicrobianos. Este campo ha atraído una gran dosis de atención, con la búsqueda entre especies microbianas prácticamente de todos los rincones del planeta, para encontrar microbios como fuente potencial de agentes terapéuticos que puedan cribarse para actividades antimicrobianas, antifúngicas, antivíricas, inmunomoduladoras, inmunosupresoras, antiinflamatorias y antitumorales. Estos pequeños péptidos o lantibióticos (<4 kDa) se caracterizan por su alto contenido de restos de aminoácidos ligados a tioéter y restos deshidratados insaturados.

Los lantibióticos son muy activos contra bacterias grampositivas patógenas (por ejemplo, *B. cereus*) y hongos (por ejemplo, *A. flavus*) que son responsables directamente de algunas enfermedades transmitidas por alimentos. Esta clase de péptidos puede usarse como bioconservante para proteger productos alimentarios perecederos de contaminación por patógenos, prevenir el deterioro, inhibir patógenos y prevenir infecciones en seres humanos y animales.

Varias especies microbianas han mostrado también capacidad para producir una variedad de metabolitos de interés y utilidad secundarios. Entre ellos están las moléculas peptídicas pequeñas que representan una subclase muy grande y diversa de productos naturales bioactivos que tienen características estructurales únicas que intervienen en la morfología, la fisiología y la supervivencia del microbio. Son, por ejemplo, lipopéptidos anfífilos que son agentes de reducción de la tensión superficial agresivos, como la surfactina y la micosubtilina antifúngica. En estos compuestos, el liposustituyente desempeña un papel fundamental en la desorganización de la membrana celular, mientras que el componente anfílico muestra propiedades hemolíticas disruptivas. Estas propiedades hacen de ellos compuestos antivíricos y antibacterianos muy potentes.

El consumo de determinados microorganismos vivos ha mostrado en algunas circunstancias un impacto beneficioso en el ser humano y los animales. Se ha evaluado un grupo diverso de microbios en relación con dicha actividad "probiótica", incluyendo muchas especies de los géneros *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*. Son los más abundantes en productos alimentarios que contienen probióticos. Menos comúnmente, se han sugerido las especies de *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Escherichia* no patógena y *Sporolactobacillus* de formación de esporas, *Brevibacillus* y *Bacillus* no patógenos para alimentos probióticos.

La microflora comensal del intestino es un ecosistema complejo con interacciones entre células hospedadoras, nutrientes y microflora. Un cuerpo humano adulto contiene una biomasa bacteriana viva de más de  $10^{14}$  y más de 400 especies diferentes. Las bacterias probióticas ayudan a mantener controladas las bacterias patógenas. Además, las bacterias "simbióticas" de alimentos fermentados industriales y tradicionales pueden contribuir al desarrollo de una microflora gastrointestinal sana (por ejemplo, un enriquecimiento importante en el filo bacteriano *Bacteroidetes* y agotamiento en el filo bacteriano *Firmicutes* en la microbiota del aparato digestivo humano).

La "hipótesis de la higiene" propuesta en 1989 por David Strachan establecía una correlación entre la menor exposición ambiental a los microbios, como se observa en los países desarrollados, y las tasas más elevadas de alergias. Los países desarrollados occidentales controlaron con éxito las enfermedades infecciosas durante la segunda mitad del siglo XX al mejorar la higiene y con el uso de antibióticos y vacunas. Al mismo tiempo, se produjo un aumento en nuevas enfermedades como alergias, trastornos autoinmunitarios y enfermedad inflamatoria intestinal (EII) tanto en adultos como en niños. Se sabe que la microflora gastrointestinal desempeña un papel importante en la patogenia de la EII. La obesidad se asocia también con un desequilibrio en la microbiota normal del aparato digestivo.

### RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a cultivos puros aislados biológicamente de una nueva espora que forma especies

de *Bacillus*, y más en particular, a *Bacillus subtilis* Maseca-1, número de acceso ATCC PTA-8831.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La FIG. 1 ilustra una imagen de microscopía óptica de las células vegetativas de *Bacillus subtilis* Maseca-1.

Las FIG. 2A y 2B ilustran análisis de huella de ADN genómico de las cepas de *Bacillus subtilis* Maseca 1-4. Los patrones de huella genética corresponden a (GTG)<sub>5</sub>-PCR en la FIG. 2A y a ERIC-PCR en la FIG. 2B.

10 La FIG. 3 es un gráfico que ilustra un árbol filogenético de *Bacillus spp.* y otras especies estrechamente relacionadas con las cepas Maseca 1-4 basado en un análisis de probabilidad máxima de secuencias de nucleótidos de ADNr 16S.

Las FIG. 4A, 4B, 4C y 4D son cromatogramas de LC-MS máximos de base de muestra de *Bacillus subtilis* Maseca-1 sobrenadante (A-C) y un patrón de nisina (D).

La FIG. 5A es un cromatograma de LC-MS máximo de base de muestra de *Bacillus subtilis* Maseca-1 sobrenadante que muestra un pico en m/z 1.701,8; la FIG. 5B es un análisis de espectros de masas de ese pico.

20 Las FIG. 6A y 6B son cromatogramas de cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) de muestras de *Bacillus subtilis* Maseca-1 para fructosa del polímero de fructosilo o levano (6A) y glucosa del polímero de glucosilo o dextrano (6B).

La FIG. 7 es cromatograma de análisis HPLC de ácidos grasos de cadena corta de una muestra de *Bacillus subtilis* Maseca-1.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un cultivo biológicamente puro aislado de una nueva espora que forma especies de *Bacillus*, y más en particular, a *Bacillus subtilis* Maseca-1 aislado del pericarpio de maíz entero nixtamalizado.

La siguiente descripción, tomada conjuntamente con los dibujos y/o tablas de referencia, se presenta para permitir que un experto en la materia prepare y use la invención. Para los expertos en la materia serán muy evidentes diversas modificaciones, y los principios generales definidos en la presente memoria descriptiva pueden aplicarse a una amplia diversidad de aspectos. Así, la presente invención no pretende estar limitada a los aspectos presentados, sino que se adecua al ámbito más extenso coherente con los principios y las nuevas características divulgados en la presente memoria descriptiva. Además, debe observarse que salvo que se indique explícitamente lo contrario, las figuras incluidas en la presente memoria descriptiva se ilustran cualitativamente y sin ninguna escala específica, y en general pretenden presentar el concepto de la presente invención.

#### Definiciones

Las siguientes definiciones pretenden proporcionar al lector una comprensión general del significado de los términos, pero no pretenden transmitir el alcance completo de cada término. Al contrario, las definiciones pretenden servir de complemento a la memoria descriptiva y explicar los términos con más claridad.

ADNr 16S. El término "ADNr 16S" se refiere a los códigos para una pequeña subunidad de ARN ribosómico. El ADNr 16S es una macromolécula informacional ampliamente usada para estudios sistemáticos bacterianos en los niveles de familia, género, especie y subespecie. El ADNr 16S contiene varias secuencias conservadas que pueden usarse para inferir relaciones naturales entre especies con relaciones lejanas y varias regiones variables que pueden usarse para separar las estrechamente relacionadas.

Huella de ADN. El término "huella de ADN" se refiere a una técnica empleada para identificar un organismo sobre la base de su perfil de ADN. Normalmente, se realizan técnicas moleculares basadas en PCR. La PCR de elementos repetitivos usa cebadores complementarios para secuencias de ADN repetitivas, altamente conservadas y de ocurrencia natural. Estas secuencias no codificantes están presentes en múltiples copias en los genomas de la mayor parte de las bacterias gramnegativas y varias bacterias grampositivas. Algunos ejemplos de estos elementos repetitivos son las secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC) y la secuencia de politrinucleótido (GTG)<sub>5</sub>.

Grampositivo. El término “grampositivo” se refiere a bacterias que se tiñen de azul oscuro o de violeta mediante tinción de Gram (cristal violeta), a diferencia de las bacterias gramnegativas que no retienen el colorante de cristal violeta y en su lugar asimilan el contra-colorante (safranina o fucsina) con lo que viran a rojo o a rosa. Los organismos grampositivos son capaces de retener el colorante de cristal violeta debido a su mayor cantidad de peptidoglucano en la pared celular interior y normalmente carece de la pared secundaria o externa y la capa de lipopolisacáridos presente en bacterias gramnegativas.

Probiótico. El término “probiótico” se refiere a bacterias que forman al menos una parte de la flora temporal o endógena y muestran así un efecto profiláctico y/o terapéutico beneficioso en el organismo hospedador. Los expertos en la materia saben en general que los probióticos son seguros. Aunque sin desear verse limitado por ningún mecanismo en particular, el efecto profiláctico y/o terapéutico de una espora que forma la bacteria de la presente invención procede de la exclusión competitiva de sitios de unión a patógenos, la inhibición competitiva del crecimiento de patógenos debido a la mayor colonización, el parasitismo de microorganismos no deseables, la producción de ácido orgánico y carboxílico y/o la producción de otros productos extracelulares que tienen actividad antimicrobiana, o combinaciones de los mismos. Normalmente, los probióticos se usan para prevenir la aparición de una enfermedad de colon o sistémica, a diferencia de la mayor parte de los fármacos que se usan para curar una enfermedad. Estas afecciones de colon o intestinales incluyen colitis asociada a antibióticos, enfermedades inflamatorias intestinales (EII) tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, cáncer colorrectal, enterocolitis necrosante y ileocecititis. Los trastornos sistémicos incluyen septicemia con origen en el aparato digestivo, pancreatitis y fallo multiorgánico.

Prebiótico. El término “prebiótico” se refiere a ingredientes no digeribles de los alimentos que estimulan el crecimiento y/o la actividad de bacterias en el sistema digestivo que son beneficiosas para la salud del organismo. Normalmente, los prebióticos son hidratos de carbono (como polisacáridos, oligosacáridos, ácidos de azúcares y alcoholes sin almidón) pero la definición incluye también no hidratos de carbono (como la lignina y las glucoproteínas). La definición de prebiótico no resalta un grupo bacteriano específico. En general, un prebiótico puede aumentar el número y/o la actividad de grupos de bacterias que tienen varios efectos beneficiosos en el hospedador, especialmente en términos de mejora de la digestión (lo que incluye el favorecimiento de la absorción de minerales) y la efectividad y la estimulación intrínseca del sistema inmunitario.

Simbiótico. El término “simbiótico” se refiere a suplementos nutricionales que combinan los microorganismos probióticos vivos y sustratos prebióticos específicos en una forma de sinergia. Esto puede estimular selectivamente el crecimiento y/o activar el metabolismo de una o más bacterias que promueven la salud y mejorar así el bienestar del hospedador.

Alimento funcional. El término “alimento funcional” es un alimento que tiene una propiedad que promueve la salud o previene la enfermedad más allá de la función básica de suministrar nutrientes. Los alimentos funcionales incluyen alimentos reforzados con aditivos que promueven la salud, como productos “enriquecidos con vitaminas”, y alimentos con ingredientes de prebióticos y/o cultivos de probióticos vivos.

#### Introducción

La presente memoria descriptiva describe cepas de *Bacillus subtilis* aisladas del pericarpio de maíz entero nixtamalizado. Las cepas de *Bacillus* aisladas y descritas en la presente memoria descriptiva se caracterizaron basándose en parte en un enfoque taxonómico polifásico que examinaba sus afiliaciones fenotípicas y genotípicas.

La cepa de *Bacillus subtilis* Maseca-1 se ha depositado en un depositario internacional, en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente para las personas determinadas por el Comisario de Patentes y Marcas con derecho a ello de conformidad con el artículo 37 del C.F.R. apartado 1.14 y el artículo 35 del U.S.C. apartado 122. La cepa de *Bacillus* Maseca-1 divulgada en la presente descripción ha sido depositada en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110 EE.UU., como PTA-8831. El depósito fue recibido por la ATCC el 12 de diciembre de 2007 y le fue asignado un número de acceso por la International Depository Authority de PTA-8831. El depósito se ha realizado y recibido por la International Depository Authority de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest, y todas las restricciones sobre el acceso público al depósito serán eliminadas irrevocablemente con la concesión de una patente a partir de la presente solicitud. Los depósitos estarán disponibles cuando se necesite en virtud de las leyes de patente de otros países en los que se registren las equivalencias de la solicitud objeto, o sus documentos relacionados. No obstante, debe entenderse que la disponibilidad de los depósitos no constituye una

licencia para aplicar la invención objeto en derogación de los derechos de patente otorgados por la acción gubernamental.

Además, los depósitos del cultivo objeto se almacenarán y estarán disponibles para el público de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, es decir, se almacenarán con todos los cuidados necesarios para mantenerlos viables y no contaminados durante un periodo de al menos cinco años desde la petición más reciente para el suministro de una muestra de un depósito, y en cualquier caso, durante un periodo de al menos treinta (30) años desde la fecha de depósito o durante el tiempo de permanencia en vigor de cualquier patente que pudiera derivarse de la divulgación de los cultivos. El depositante reconoce la obligación de reponer el o los depósitos si el depositario no pudiera suministrar una muestra cuando fuera solicitado debido al estado del o de los depósitos.

#### Procedimientos

Los procedimientos para la recogida, aislamiento y caracterización descritos en la presente memoria descriptiva tienen sólo fines ilustrativos. Debe entenderse que las especies *B. subtilis* pueden ser recogidas y aisladas de cualquier superficie en la que estén presentes las bacterias y que pueden usarse otras técnicas para caracterizar las especies. Las técnicas siguientes son ejemplos no limitativos para completar el procedimiento o técnica descrito.

#### 20 Preparación y aislamiento de muestras

Las cepas de *Bacillus subtilis* Maseca se aislaron a partir de pericarpio de maíz entero nixtamalizado que había sido cultivado en Amarillo, Texas, y en Chihuahua, México. Inicialmente se aislaron cuatro cepas y se designaron como Maseca-1, Maseca-2, Maseca-3 y Maseca-4.

El procedimiento de nixtamalización (cocción con cal) tiene lugar, por ejemplo, cuando se cuece el maíz a 80°C-90°C en una solución de cal (> 0,2% de hidróxido de calcio) durante 20-40 minutos, se deja en remojo y se lava a temperaturas ambiente, se muele y después se seca para preparar harina de maíz entero nixtamalizado o harina de masa (por ejemplo, harina de marca comercial MASECA®). El remojo se usa para describir el proceso de revenido o hidratación (por ejemplo, humedad del 30-40%) que tiene lugar cuando se deja enfriar el maíz cocido en álcali industrial (nixtamal) para que se enfríe en condiciones ambiente (por ejemplo, 60-150 minutos a 35°C-40°C) y el objetivo no es la separación de almidón del maíz como en la operación industrial de molienda húmeda. Por otra parte, la producción de almidón implica el procesamiento ácido (por ejemplo, dióxido de azufre) y la fermentación láctica (por ejemplo, *Lactobacillus spp.* endógeno) durante el remojo o humidificación de granos de maíz entero a contracorriente (por ejemplo, 24-48 horas, 45°C-50°C y 50-65% de humedad). El resultado principal es una dispersión de la proteína/zeína del endosperma y la liberación de almidón durante la posterior molienda y fraccionamiento en húmedo de los granos y el pericarpio con la menor pérdida posible de endospermo antes de su secado final.

En el pericarpio de maíz entero nixtamalizado industrial se identificó una cepa bacteriana endógena y de endofito y se sembró en placa en nutriente agar a 30°C-35°C (pH 6,5-7,5) durante 18-24 horas. Las colonias representativas de las placas de agar fueron sometidas a tinción de Gram y se examinaron microscópicamente para determinar la morfología y la motilidad de la cepa. También se trataron las colonias por el método de estría en agar nutriente en pico de flauta, se incubaron a 35°C durante 24 h y se almacenaron a 5°C. Se seleccionaron los aislados, se purificaron y se almacenaron en una de glicerol a entre -25°C y -80°C

Se realizaron pruebas bioquímicas para identificar en lo posible las cepas aisladas. Se usaron los medios API® 50 CHB/E y API® M (motilidad) (BIOMERIEUX®) para identificar las cepas bacterianas aisladas idénticas en aproximadamente el 98% con *Bacillus subtilis* con movilidad en enjambre positiva.

#### Microscopia

La FIG. 1 ilustra una imagen de microscopia óptica de las células vegetativas de *Bacillus subtilis* Maseca-1. La cepa Maseca-1 es una espora grampositiva, en forma de bastón, aerobia y facultativa que forma bacterias.

La bacteria aislada es un organismo móvil en forma de largo bastón (3 a 5 µm por 0,5 a 1 µm). Las colonias representativas teñidas con solución de verde malaquita al 5% mostraron una endospora elipsoidal que se teñía de verde mientras el resto de la célula se teñía de rojo claro. La endospora puede formarse con estrés nutricional (por ejemplo, crecimiento estacionario). La bacteria es capaz de formar enjambres superficiales a través de la producción

de flagelos y tiene la capacidad de excretar biopelículas y sustancias exopoliméricas.

#### Crecimiento

- 5 Las cepas de *Bacillus subtilis* Maseca pueden cultivarse en un medio líquido o sólido que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, materia inorgánica y similares empleados comúnmente en medios para cultivar microorganismos. Puede usarse cualquier fuente de carbono, siempre y cuando pueda ser metabolizada por *Bacillus subtilis* como, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, licor de maceración del maíz, licor de maceración alcalino y melazas. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen peptona, hidrolizado de caseína, extracto de
- 10 carne, licor de maceración del maíz, licor de maceración alcalino y sulfato de amonio. En caso necesario, el medio puede contener además ácido fosfórico, sales de potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso y similares, vitaminas, aminoácidos, tensioactivos y similares. Se prefiere realizar el cultivo de forma aerobia para inhibir el crecimiento de organismos anaerobios como clostridias de formación de endosporas. Con respecto a la condición de cultivo, puede usarse un medio líquido contenido en un vaso fermentador con aeración/agitación (por ejemplo,
- 15 fermentación sólido-líquido, LSF), un medio sólido de tipo placa (por ejemplo, fermentación en sustrato sólido, SSF) o un fermentador de producción de koji automatizado. El cultivo se realiza a una temperatura de aproximadamente 25°C a 42°C, preferentemente de aproximadamente 32°C a 40°C, durante 12 horas a aproximadamente 3 días en un pH de cultivo de 5 a 9, preferentemente a un pH de 6 a 8.
- 20 La identificación de las cepas Maseca purificadas se realizó mediante PCR basada en secuencias repetitivas para tipificación de huella de ADN genómico y por secuenciación de ácido desoxirribonucleico ribosómico (ADNr).

#### Huella de ADN

- 25 Se aisló ADN genómico de las cepas Maseca 1-4. Se realizaron amplificaciones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el ADN usando cebadores para (GTG)<sub>5</sub>-PCR y ERIC-PCR. Se separaron por tamaños los productos de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa, y se tiñeron los geles con bromuro de etidio y se capturaron digitalmente con luz UV. Se compararon y analizaron las imágenes de los geles.
- 30 La FIG. 2 ilustra un análisis de huella de ADN genómico de las cepas de *Bacillus subtilis* Maseca. En la FIG. 2-A se muestran los patrones de huella genética de (GTG)<sub>5</sub>-PCR; en la FIG. 2-B se muestran los patrones de huella genética de ERIC-PCR. Las calles 1-4 corresponden a Maseca 1-4, respectivamente. M es un marcador de peso molecular de ADN.
- 35 Maseca 1 y Maseca 4 tienen el mismo patrón de huella de ADN genómico por los procedimientos (GTG)<sub>5</sub>-PCR y ERIC-PCR y se identificaron como el mismo organismo.

#### Secuenciación de ADNr 16S

- 40 Se usó ADN genómico de cultivos líquidos como una plantilla para la amplificación por PCR. Se secuenciaron amplicones purificados y se verificó la identidad de un producto de PCR dado mediante análisis de secuencias. Las relaciones filogenéticas de organismos cubiertos en la presente descripción se determinaron por comparación de las secuencias de ADNr 16S individuales con secuencias existentes en bases de datos públicas, como la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se construyeron árboles evolutivos basados en la
- 45 distancia y en análisis de probabilidad máxima con árboles filogenéticos (dendogramas) usando los métodos del vecino más cercano (Neighbor-Joining, NJ) y media aritmética del método de agrupamiento de pares no ponderada (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean, UPGMA). Se usaron procedimientos de inicio para proporcionar estimaciones de confianza para topología de árboles en el método NJ.
- 50 Los análisis resultantes indicaron que las cepas Maseca 1-4 guardaban la mayor relación con los miembros del grupo de especies *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (una variante de la cepa 168, la cepa ATCC9799, la cepa DSM10A o ATCC6051). En la FIG. 3 se muestra un árbol filogenético de probabilidad máxima representativo en secuencias de ADNr 16S secuencias de varias bacterias en forma de bastones y de formación de esporas. Se muestra el número de cepa y los números de acceso de la base de datos GenBank (por ejemplo, AL009126). Los números son
- 55 valores porcentuales de identidad de secuencia o de inicio (por ejemplo, 85 ± 0,01) para esa rama del árbol.

De este modo, la presente invención se refiere a cultivos puros aislados biológicamente de bacterias aislados a partir del pericarpio de maíz entero nixtamalizado. En particular, las bacterias son *Bacillus subtilis* y más particular, *Bacillus subtilis* Maseca-1, depositado como número de acceso ATCC PTA-8831.

Como especie, *Bacillus subtilis* es un organismo grampositivo, no patógeno y de formación de esporas presente normalmente en la rizosfera del suelo, en y alrededor de las raíces de las plantas (por ejemplo, maíz y trigo) y en el aparato gastrointestinal de los animales y los seres humanos. El organismo es aerobio y facultativo, cultivado normalmente en caldo de nutrientes (por ejemplo, medio NB) a entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 40°C. En el organismo puede inducirse esporulación cuando se cultiva en medio de esporulación (por ejemplo, medio de Luria-Bertani o DSM), que induce la formación de esporas por agotamiento de los nutrientes. La endospora protectora y resistente permite que el organismo tolere condiciones ambientales extremas. *B. subtilis* es no patógeno y en general se considera seguro (por ejemplo, clasificación GRAS por la U.S. Food and Drug Administration) o como presunción cualificada de seguridad (es decir, estado QPS de la Comisión Europea-SCAN, 2003).

#### Caracterización del sobrenadante de cultivo

15 Se llevó a cabo una caracterización de las biomoléculas presentes en el sobrenadante del cultivo gastado de Maseca-1. Se efectuó un análisis metabólico péptidos lantibióticos, EPS-exopolisacáridos (por ejemplo, levano y dextrano), ácidos orgánicos y proteasas.

Para producir las muestras, se incubaron los cultivos de Maseca-1 en caldo de nutrientes (NB) o en medio de Luria-Bertani (LB) a 35°C, pH 6,8 con vigorosa agitación orbital (200 rpm) durante 24-48 horas. Se centrifugó el medio cultivado (4.000 rpm durante 20 min) para eliminar las células y a continuación se fraccionó el sobrenadante libre celular usando el filtro de membrana Amicon® Centricon® (MILLIPORE™).

En la Muestra 1 y la Muestra 2, se fraccionó el sobrenadante con un filtro de membrana que tenía un corte de peso molecular de 3.000 Daltons. Se produjeron dos fracciones, una fracción retenida superior (FAPM) que no pudo pasar a través de la membrana, correspondiente a un material de más de 3.000 Daltons, y una fracción de filtrado inferior (FBPM) correspondiente a un material de bajo peso molecular inferior a 3.000 Daltons. Las fracciones FAPM y FBPM se almacenaron congeladas a -80°C

En la Muestra 3, el sobrenadante se filtró dos veces, primero usando un filtro de membrana PB BioMax Amicon® Centricon® (MILLIPORE™) con un corte de peso molecular de 8.000 Daltons. A continuación se filtró la fracción de filtrado inferior correspondiente al material de menos de 8.000 Daltons usando un filtro de membrana con un corte de peso molecular de 3.000 Daltons. Se produjeron dos fracciones, la fracción retenida superior (FAPM) correspondiente al material de 3.000-8.000 Daltons, y el filtrado inferior (FBPM) correspondiente a un material de menos de 3.000 Daltons. A continuación se procesó el material FAPM para extraer péptidos lantibióticos a través de extracción de disolvente orgánico.

#### Extracción de disolvente orgánico

Se extrajeron 25 ml de fracción de FAPM de la Muestra 3 con 12,5 ml de cloroformo durante aproximadamente 20 minutos. Se produjo así una mezcla láctea marrón. Se ultracentrifugó esta solución a 10,400 g durante 20 minutos a 12°C Se obtuvieron múltiples capas, con la capa superior correspondiente a la porción orgánica (cloroformo), la capa acuosa inferior y una capa media de precipitado que flotaba entre las fases acuosa y orgánica, correspondiente a la mezcla de péptidos lantibióticos. Se retiró este precipitado y se secó durante toda la noche. La cantidad total de sedimento húmedo obtenida de 25 ml de filtrado fue de 975 mg. Después del secado, se suspendió el sedimento en 2,5 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 7,0. Se retiró una parte alícuota de esta fracción en crudo extraída orgánica (OECF). Se suspendieron los 2,1 ml restantes en 50 ml de agua nanopura de calidad de biología molecular y se almacenó congelada a -80°C.

#### 50 Análisis para péptidos lantibióticos

Se analizaron las muestras del sobrenadante de cultivo gastado (es decir, Muestras 1, 2 y 3) por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) en relación con la presencia de péptidos lantibióticos (por ejemplo, nisina A, nisina B, subtilina, mutacina, epidermina). El análisis LC-MS se realizó en un sistema Finnigan LTQ Orbitrap™ (Thermo Electron Corp.). La detección de MS se llevó a cabo usando ionización de electropulverización (ESI) en el modo positivo usando un episodio de exploración Full MS de m/z 200-2.000. Las separaciones se realizaron en el modo de fase invertida en una columna ProSphere™ C4 300 Å 150 × 3,2 mm, 5 µm (Grace Alltech). Todas las separaciones se realizaron usando un agua en fase móvil de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%. Se ensayaron diferentes gradientes..

Las condiciones de HPLC y los gradientes seleccionados fueron los siguientes:

Disolvente A:: agua MilliQ + ácido fórmico al 0,1%

5 Disolvente B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%

Velocidad de flujo: 400 µl/min (división antes de MS)

Temperatura de columna: 30°C

Volumen de inyección: 10 µl

Gradiente: lineal

10

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
2	95	5
50	10	90
55	10	90
55,5	95	5
60	95	5

En las FIG. 4A, 4B y 4C se muestran los cromatogramas de LC-MS pico de base resultantes de las tres muestras (Muestras 1, 2 y 3), junto con un patrón de nisina en la FIG. 4D (Sigma N5764, Sigma-Aldrich®). Las tres muestras mostraron relativamente patrones de picos similares, es decir, picos de alta densidad con intensidad elevada en un tiempo de retención corto y picos inferiores abundantes para tiempos de retención elevados. Como puede verse a partir de las figuras, se detectaron varios picos pero ninguno de ellos podría asignarse a la nisina.

Debido a la falta de compuestos de referencia apropiados para micosubtilina, subtilina, mutacina y epidermina, en los cromatogramas LC-MS se buscaron valores típicos de relación masa-carga (m/z) (véase Tabla I). No pudieron encontrarse correspondencias exactas con los lantibióticos o bacteriosinas caracterizados anteriormente; sin embargo, se observó un pico en las tres muestras que mostró características de lantibiótico (véase, FIG. 5A, pico en RT 38,96 y BP 1.701,8). El tiempo de retención y la masa determinados para este pico están en el intervalo esperado para los lantibióticos. Además, el análisis de espectros de masa de ese pico mostró iones de hidrógeno con carga múltiple típicos de los péptidos, donde los más abundantes son los iones de doble y triple carga (véase FIG. 5B). El pico no pudo asignarse a un lantibiótico específico basándose en la información disponible en la bibliografía. Se sabe que los lantibióticos muestran cierta variación con respecto a la masa molecular dependiendo del lantibiótico específico y de las condiciones experimentales debido a oxidación, metilación u otras modificaciones.

20

25

Tabla I. Posibles valores m/z en modo ESI positivo para los péptidos lantibióticos

		1 +	2 +	3 +	4 +	5 +	6 +
Epidermina	H	2.166,6	1.083,8	722,9	542,4	434,1	361,9
PM = 2.165,6	Na	2.188,6	1.105,8	744,9	564,4	456,1	383,9
	H y Na		1.094,8	737,5	558,9	451,7	380,3
				730,2	553,4	447,3	376,6
					547,9	442,9	372,9
						438,5	369,1
							365,4
Nisina A	H	3.355,0	1.678,0	1.119,0	839,5	671,8	560,0
PM = 3.354	Na	3.377,0	1.700,0	1.141,0	861,5	693,8	582,0
	H y Na		1.689,0	1.133,7	856,0	689,4	578,3
				1.126,3	850,5	685,0	574,7
					845,0	680,6	571,0
						676,2	567,2
							563,5
Nisina Q	H	3.328,0	1.564,5	1.110,0	832,8	666,4	555,5
PM = 3.327	Na	3.350,0	1.686,5	1.132,0	854,8	688,4	577,5
	H y Na		1.675,5	1.124,7	849,3	684,0	537,8
				1.117,3	843,8	679,6	570,2
					838,3	675,2	566,5
						670,8	562,7



## ES 2 591 356 T3

							559,0
Nisina Z	H	3.332,0	1.666,5	1.111,3	833,8	667,2	556,2
PM = 3.331	Na	3.354,0	1.688,5	1.133,3	855,8	689,2	578,2
	H y Na		1.677,5	1.126,0	850,3	684,8	574,5
				1.118,7	844,8	680,4	570,8
					839,3	676,0	567,2
						671,6	563,3
							559,7
Mutacina I	H	2.365,0	1.183,0	789,0	592,0	473,8	395,0
PM = 2.364	Na	2.387,0	1.205,0	611,0	614,0	495,8	417,0
	H y Na		1.194,0	803,7	608,5	491,4	413,3
				796,3	603,0	487,0	409,7
					597,5	482,6	406,0
						478,2	402,2
							398,5
Mutacina 1140	H	2.264,0	1.132,6	755,3	566,8	453,6	378,2
PM = 2.263	Na	2.286,0	1.164,6	777,3	688,8	475,6	400,2
	H y Na		1.143,5	770,0	583,3	471,2	396,5
				762,7	577,8	466,8	392,8
					572,3	462,4	389,2
						458,0	385,3
							381,7
Mutacina B-Ny255	H	2.271,0	1.136,0	757,7	568,5	455,0	379,3
PM = 2.270	Na	2.293,0	1.158,0	779,7	590,5	477,0	401,3
	H y Na		1.147,0	772,3	585,0	472,6	397,7
				765,0	579,5	468,2	394,0
					574,0	463,8	390,3
						459,4	388,5
							382,8
Subtilina	H	3.322,0	1.661,5	1.108,0	831,3	665,2	554,5
PM = 3.321	Na	3.344,0	1.683,5	1.130,0	853,3	687,2	576,5
	H y Na		1.672,5	1.122,7	847,8	682,8	572,6
				1.115,3	842,3	878,4	569,2
					836,8	674,0	565,5
						669,6	561,7
							558,0

### Análisis de exopolisacárido (EPS)

Para preparar las muestras para análisis de exopolisacárido, se extrajeron las fracciones de sobrenadante con 5 etanol y se precipitó el EPS. Se combinaron las fracciones de FAPM y FBPM y se añadió etanol frío en hielo (volumen de muestra 1,5 veces) a la muestra. Se mezclaron suavemente las muestras durante 5 minutos. En cuanto terminó el proceso de mezclado, la formación de precipitado de EPS blanco empezó a agregarse en la capa superior y precipitó gradualmente y se depositó en el fondo del recipiente. Se puso la solución durante toda la noche a -20°C y se dejó que continuara el precipitado. A continuación, se retiró con cuidado la fase transparente de etanol de la 10 parte superior y se recogió el EPS precipitado por centrifugación adicional (9.000 rpm durante 15 min).

Para la determinación de fructosa, se incubó el sedimento que contenía el EPS con ácido trifluoroacético 2 M durante 2 horas. En estas condiciones, los monómeros de fructosa se liberan completamente desde el EPS. Para la 15 determinación de glucosa, se incubó el sedimento que contenía EPS con ácido sulfúrico 2 M durante 1 hora a 100°C. En estas condiciones, los monómeros de glucosa se liberan completamente del EPS. Posteriormente, se diluyeron las muestras y se analizaron usando cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Como controles de calidad para la hidrólisis se incluyeron inulina tratada con ácido trifluoroacético, almidón de patata tratado con ácido sulfúrico y EPS de LB180 tratado con ácido sulfúrico.

20

Se analizó el EPS preparado a partir de las Muestras 1, 2 y 3 y en la FIG. 6A y 6B se muestran respectivamente los

cromatografías HPAEC-PAD para la fructosa y la glucosa. Como puede verse a partir de los cromatogramas, el tiempo de retención del monómero puede diferir debido al pH de la muestra hidrolizada.

Los resultados se muestran también en la Tabla II. La relación fructosa/glucosa se basa en las áreas de los picos de los cromatogramas.

Tabla II.

Número de muestra	Relación fructosa/glucosa
1	5
2	20
3	10

#### Análisis de actividad de la enzima proteasa

10

Se midió la actividad proteolítica extracelular de acuerdo con un procedimiento modificado descrito por Holm, K. A. (determinación colorimétrica automatizada de actividad de proteínasa ácida en muestras de fermentación usando un reactivo de ácido trinitrobenzenosulfónico. (1980) *Analyst*, 105:18-24).

- 15 El procedimiento se automatizó totalmente usando un autoanalizador Cobas Mira Plus. Se determinó la actividad proteolítica de los sobrenadantes de cultivo incubando muestras con 0,5% (p/v) de base N,N-dimetilada en tampón MES 0,25 M (pH 6) durante 17,5 min a 37°C. Como patrón, se incubaron muestras sin caseína N,N-dimetilada. Se interrumpió la reacción mediante la adición de una solución que contenía 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> I<sup>-1</sup> en tampón de borato 0,1 M a pH 9,3. Simultáneamente, se añadió ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBSA). El TNBSA reacciona con los grupos de aminoácidos libres para producir un color amarillo, que se midió a 405 nm después de 3 min. Se usó glicina como patrón. Se definió una unidad de actividad de proteasa como la cantidad de enzima que en 1 min en las condiciones estándar dadas produce una absorción a 405 nm igual a glicina 1 µM.

En la Tabla III se ofrecen los resultados de la actividad de proteasa para las tres muestras.

25

Tabla III

Muestra	Muestra pH	Actividad de proteasa - mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> (pH 6)
1	5,81	0
2	6,78	0,003
3	6,31	0,01

- Tal como se muestra en la Tabla III, se midió una actividad de proteasa nula o muy baja. Las muestras contenían un valor de fondo elevado de amoníaco libre o ligado primario. En consecuencia, las muestras de proteasa se diluyeron 3-4 veces para reducir el valor de fondo a un nivel aceptable. El resultado final de la actividad de proteasa fue el mismo para las muestras diluidas; por tanto, la dilución no tuvo ningún efecto en la actividad de proteasa.

30

#### Análisis de la presencia de ácidos grasos de cadena corta

- 35 Los compuestos se detectaron por HPLC junto con detección UV (ultravioleta) y RI (índice de refracción) usando una columna de ácido orgánico (Aminex<sup>®</sup>, BIO-RAD) con un flujo isocrático de agua ácida que contenía H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Waters Alliance 2695 acoplado a un detector Waters 996 PDA y 2412 RI. Los ácidos grasos de cadena corta específicos se cuantificaron usando curvas de calibración externas.

- 40 La FIG. 7 ilustra un cromatograma de ejemplo de análisis HPLC de ácidos grasos de cadena corta de la Muestra 1. Usando curvas de calibración externa, se determinó la concentración de los ácidos grasos de cadena corta específicos.

En la Tabla IV se ofrece la concentración de ácidos grasos de cadena corta determinada por HPLC.

45

**Tabla IV. Concentración de ácidos grasos de cadena corta**

Muestra	Ácido succínico (mg/ml)	Ácido láctico (mg/ml)	Ácido acético (mg/ml)	Ácido propiónico (mg/ml)	Ácido butírico (mg/ml)
1	<0,56 <sup>2</sup>	1,3	0,93	<1,3 <sup>4</sup>	<LdD <sup>5</sup>
2	<LdD <sup>1</sup>	0,05	0,08	<LdD <sup>3</sup>	<LdD <sup>5</sup>
3	<0,56 <sup>2</sup>	0,62	0,73	<1,3 <sup>4</sup>	<LdD <sup>5</sup>

<sup>1</sup> El límite de detección (LdD) para ácido succínico fue 0,02 mg/ml; <sup>2</sup> debido a perturbaciones el LdD para estas muestras es 0,56 mg/ml; <sup>3</sup> el LdD para el ácido propiónico fue 0,05 mg/ml; <sup>4</sup> debido a perturbaciones el LdD para estas muestras es 1,3 mg/ml; <sup>5</sup> el LdD para el ácido butírico fue 0,03 mg/ml.

Los resultados para ácidos grasos de cadena corta muestran concentraciones similares para las Muestras 1 y 3, aunque en la Muestra 2 se encontraron concentraciones menores.

#### 10 Inhibición del crecimiento de microorganismos

Se analizó la capacidad de *Bacillus subtilis* Maseca-1 de inhibir el crecimiento del patógeno grampositivo *Micrococcus luteus*.

- 15 Se añadió un cultivo de 0,3 ml de *M. luteus* (ATCC 9341) a 500 ml de agar LB fundido, se vertió en placas de Petri y se dejó que solidificara. Se cargaron discos de papel (6,0 mm de diámetro) con 5 µl de muestra y se secó. A continuación se colocaron los discos en la superficie de agar y se incubaron las placas durante toda la noche a 37°C. Se midió la inhibición del crecimiento como el diámetro de la zona transparente alrededor de cada disco de papel. Las medidas se toman de placas en duplicado (4 discos/placa). Se sometieron a ensayo las fracciones OECF 20 obtenidas de la Muestra 3.

**Tabla V. Inhibición del crecimiento de antibióticos peptídicos de *Bacillus subtilis* Maseca-1<sup>1,2</sup>**

Zona de inhibición de <i>M. luteus</i> (mm) OECF 1	Zona de inhibición de <i>M. luteus</i> (mm) OECF 2
18,5	19
19,5	18,5
18	20
17,5	19,5

<sup>1</sup> Los datos son las medias de dos ensayos repetidos.

<sup>2</sup> Distancias de inhibición del crecimiento medidas como el diámetro (mm) de la zona transparente alrededor del disco.

También se analizó la capacidad de *Bacillus subtilis* Maseca-1 de inhibir el crecimiento de patógenos *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* y *Aspergillus flavus* tal como se describe anteriormente.

#### 30 **Tabla VI. Inhibición del crecimiento de antibióticos peptídicos de *Bacillus subtilis* Maseca-1 en los patógenos 1, 2**

Tanda	ML	BC	AF	Control
1	16,1	34,75	10,5	6,5
2	16,5	34,50	10,5	6,5
3	21,0	35,10	10,5	6,5
4	22,0	36,00	10,5	6,5

ML = *Micrococcus luteus* ATCC 9341; BC = *Bacillus cereus* NRLL; AF = *Aspergillus flavus* NRLL

<sup>1</sup> Los datos son medias de dos ensayos repetidos.

<sup>2</sup> Distancias de inhibición del crecimiento medidas como el diámetro (mm) de la zona transparente alrededor del disco.

35

El aislado de Maseca-1 mostró capacidad para secretar péptidos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos.

De acuerdo con varias realizaciones de la invención, se proporcionan cultivos biológicamente puros de *Bacillus subtilis*. La cepa Maseca-1 de *Bacillus subtilis* se ha depositado con el número de acceso ATCC PTA-8831.

40

Los cultivos de *Bacillus subtilis* Maseca-1 son capaces de producir proteínas y/o antibióticos peptídicos secretados

que tienen actividad antimicrobiana (por ejemplo, lantibióticos). Estos péptidos y proteínas secretados de estructura lineal o globular son útiles en composiciones de acuerdo con la presente invención. Los cultivos celulares de Maseca-1 pueden recolectarse y los sobrenadantes recogerse, por ejemplo, por filtración (sobrenadante filtrado), precipitación diferencial o centrifugación (sobrenadante libre celular) y el sobrenadante resultante puede contener 5 actividades antimicrobianas útiles en una composición antimicrobiana.

La cepa Maseca-1 puede secretar una o más proteínas o péptidos que inhiben el crecimiento de microorganismos, incluidas bacterias grampositivas y gramnegativas, mohos y levaduras. Por ejemplo, la proteína o péptido secretado puede inhibir el crecimiento de los patógenos grampositivos *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus* y de *Aspergillus* 10 *flavus*.

El *Bacillus subtilis* Maseca-1 puede ser activo contra bacterias gramnegativas y grampositivas, así como mohos y levaduras, que forman comúnmente parte de la flora que estropea los alimentos. Muchas bacterias gramnegativas como *Salmonella*, *Shigella*, algunos tipos serológicos de *Escherichia*, y similares son patógenos transportados por 15 los alimentos. Las bacterias grampositivas, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y similares pueden causar intoxicación alimentaria.

De acuerdo con varias realizaciones, la presente invención también se refiere a un procedimiento para inhibir microorganismos no deseables en un material que contiene o está expuesto a los microorganismos. El 20 procedimiento incluye la exposición del material a un inhibidor de los microorganismos no deseados obtenido de *Bacillus subtilis* Maseca-1 de manera que los microorganismos no deseados en el material se inhiben. El material que va a protegerse puede ser, por ejemplo, un material en contacto con un alimento. El alimento puede ser para cualquier animal, en particular los mamíferos.

El *Bacillus subtilis* Maseca-1 puede ser un organismo vivo o no vivo. Si es vivo, Maseca-1 puede estar congelado o liofilizado o secado por otros medios para su conservación. La inhibición del crecimiento de microorganismos puede ser producida por un componente de Maseca-1 y así Maseca-1 puede ser un organismo no vivo. Puede ser 25 sonificado o desorganizado por otros medios para la recuperación de la fracción de la pared celular y la conservación antes de su uso. Todas estas variaciones son conocidas para los expertos en la materia.

Uno de los problemas principales en la distribución y la comercialización de tortillas es la aparición de puntos y manchas de decoloración por moho en las tortillas empaquetadas. De acuerdo con varias realizaciones, Maseca-1 puede añadirse a las masas de maíz y trigo y usarse para controlar el crecimiento de moho y bacterias, por ejemplo, 30 en tortillas y panes sin levadura. Pueden usarse preparaciones similares para diversos panes, panes sin levadura, alimentos horneados y similares, donde la masa es el material de partida. Maseca-1 puede usarse para inhibir mohos y bacterias, extendiendo la duración de almacenamiento y conservando la masa durante la manipulación o el transporte al lugar de horneado. Maseca-1 puede usarse también para suprimir mohos y bacterias y extender la duración de almacenamiento de los productos lácteos como la leche, la nata, las cremas lácteas y el queso.

*Bacillus subtilis* Maseca-1 puede aplicarse a los materiales de envasado para suprimir la microflora de los alimentos. Maseca-1 puede usarse así para tratar películas, envoltorios y otros materiales de envasado con el fin de controlar el 40 crecimiento de mohos y bacterias en diversos productos alimentarios como panes, quesos, salchichas, verduras, frutas y similares.

*Bacillus subtilis* Maseca-1 puede producir biopolímeros naturales como fructano ramificado y de alto peso molecular formado por unidades de fructosa unidas por enlaces de  $\beta$ -(2,6)fructofuranósido y uniones  $\beta$ -(2,1)inulina.

*Bacillus subtilis* Maseca-1 puede producir la enzima levano sacarasa, por ejemplo,  $\beta$ -(2,6)fructano-D:glucosa-1-fructosiltransferasa (E.C.2.4.1.10). 50

Dado que las esporas de *Bacillus* son resistentes al calor y a la presión y pueden almacenarse como un polvo seco, son especialmente útiles en la formulación y la fabricación de productos tales como diversos productos horneados (por ejemplo, tortillas y panes sin levadura y similares). *Bacillus subtilis* Maseca-1 es muy adecuado para la presente invención, ya que tiene la capacidad de formar esporas que son relativamente resistentes al calor y a otras 55 condiciones, lo que las hace ideales para mejorar el almacenamiento (es decir, la duración de almacenamiento) de los productos alimentarios. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* Maseca-1 puede sobrevivir al almacenamiento durante dos años o más.

De acuerdo con varias realizaciones, un procedimiento de prevención o tratamiento de una infección gastrointestinal

- bacteriana en un ser humano o un animal comprende las etapas de administración oral a un sujeto humano o animal de una formulación de alimento o bebida que contiene una colonia viable que forma unidades de *Bacillus subtilis* Maseca-1, y permite que las bacterias crezcan en el aparato gastrointestinal del sujeto. En una realización, la colonia viable que forma unidades son esporas de Maseca-1. Maseca-1 puede reducir los trastornos causados por agentes infecciosos, tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sp.* que incluye *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. tributrycum*, y *C. sporogenes*, *B. cereus* patógeno, *Gardnerella vaginalis*, *Propionibacterium acnes*, *Aeromonas hydrophilia*, *Aspergillus sp.* que incluye *A. flavus* y *A. niger*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Campylobacter*.
- 10 Los efectos probióticos de *Bacillus subtilis* Maseca-1 pueden producirse porque el microorganismo coloniza la mucosa de la pared del aparato digestivo y compite con los patógenos potenciales. El probiótico *Bacillus subtilis* Maseca-1 puede producir también: i) ácidos orgánicos y carboxílicos tales como ácidos grasos de cadena corta que muestran actividad antimicrobiana hacia muchos microorganismos, y reducen el pH y el potencial redox en el
- 15 aparato digestivo, creando condiciones subóptimas para los patógenos, ii) metabolitos tales como proteínas (es decir, enzimas) y exopolisacáridos (es decir, levanos y glucanos) que son antagonistas de algunos patógenos a través de la inhibición de su capacidad para captar nutrientes y iones o su adhesión a las células de la mucosa intestinal, y iii) bacteriocinas y productos similares a las bacteriocinas (es decir, lantibióticos) que ejercen sus efectos por desorganización de sistemas de producción energía, síntesis de macromoléculas y permeabilidad de membrana.
- 20 Un experto en la materia reconocerá que el probiótico *Bacillus subtilis* Maseca-1 puede encontrarse en forma de esporas, o estar acompañado por esporas microbianas. En general, las esporas bacterianas son formas dominantes de paredes gruesas que son capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables. Estos auxiliares de la dieta o microbianos de alimentación directa pueden completar su ciclo de vida dentro del aparato gastrointestinal, desde el
- 25 estado de espora a célula vegetativa y nueva esporulación.
- De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a una composición simbiótica que incluye *Bacillus subtilis* Maseca-1 viable. La composición simbiótica puede usarse, por ejemplo, en combinación con oligosacáridos bifidogénicos y lactobacilogénicos que son especialmente útiles preferentemente para promover el crecimiento de
- 30 *Bacillus subtilis* Maseca-1. Estos oligosacáridos incluyen fructooligosacáridos (FOS) de levano ramificado e inulina lineal, galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), ácidos de azúcares (ácido glucurónico y galacturónico), alcoholes de azúcares (lactitol y xilitol) y otros polímeros de cadena larga (lignina y glucoproteínas) que no son digeridos con facilidad por las bacterias patógenas. El crecimiento preferente es promovido debido a los requisitos de nutrientes de *Bacillus subtilis* Maseca-1 en comparación con las bacterias patógenas. Bacterias
- 35 perjudiciales tales como *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella* y *E. coli* no pueden metabolizar FOS, GOS, XOS u otros oligosacáridos bifidogénicos y lactobacilogénicos y, por tanto, el uso de estos oligosacáridos en combinación con *Bacillus subtilis* Maseca-1 permite el crecimiento de estas bacterias probióticas y beneficiosas y la sustitución de microorganismos patógenos o no deseables.

**REIVINDICACIONES**

1. Un cultivo aislado biológicamente puro de *Bacillus subtilis* Maseca-1 depositado con el número de acceso ATCC PTA-8831.  
5
2. El *Bacillus subtilis* Maseca-1 de acuerdo con la reivindicación 1, donde Maseca-1 está en forma de células vegetativas, esporas o una combinación de las mismas.
3. El *Bacillus subtilis* Maseca-1 aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde Maseca-1 está vivo y liofilizado.  
10
4. Un procedimiento para inhibir microorganismos no deseados en un material que contiene o está expuesto a los microorganismos, que comprende la exposición del material a una cantidad efectiva de un inhibidor de los microorganismos no deseados, siendo el inhibidor un cultivo aislado biológicamente puro de *Bacillus subtilis* Maseca-1 de acuerdo con la reivindicación 1.  
15
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el material es un producto alimentario.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde el material es un producto alimentario horneado.  
20
7. El *Bacillus subtilis* Maseca-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una infección gastrointestinal bacteriana en un ser humano o un animal, que comprende:  
25 administrar oralmente a un sujeto necesitado de la misma una composición que comprende células viables de dicho *Bacillus subtilis* Maseca-1; y permitir que el *Bacillus subtilis* Maseca-1 crezca en el aparato gastrointestinal del sujeto, reduciendo así la infección gastrointestinal bacteriana.
- 30 8. Una composición simbiótica que comprende el *Bacillus subtilis* Maseca-1 aislado de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con al menos un oligosacárido bifigodénico o lactobacilogénico que no es digerido fácilmente por bacterias patógenas y que promueve el crecimiento de Maseca-1.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, donde el al menos un oligosacárido bifigodénico o lactobacilogénico se selecciona de entre el grupo que consiste en :  
35 fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, ácidos de azúcares, alcoholes de azúcares y polímeros de cadena larga.
- 40 10. Un procedimiento de control del crecimiento de mohos y bacterias en un producto alimentario que comprende la adición del *Bacillus subtilis* Maseca-1 aislado de acuerdo con la reivindicación 1 a dicho producto alimentario, estando dicho producto alimentario seleccionado de entre el grupo que consiste en masa de maíz, masa de trigo, tortillas, pan sin levadura, leche, nata, cremas lácteas y queso.

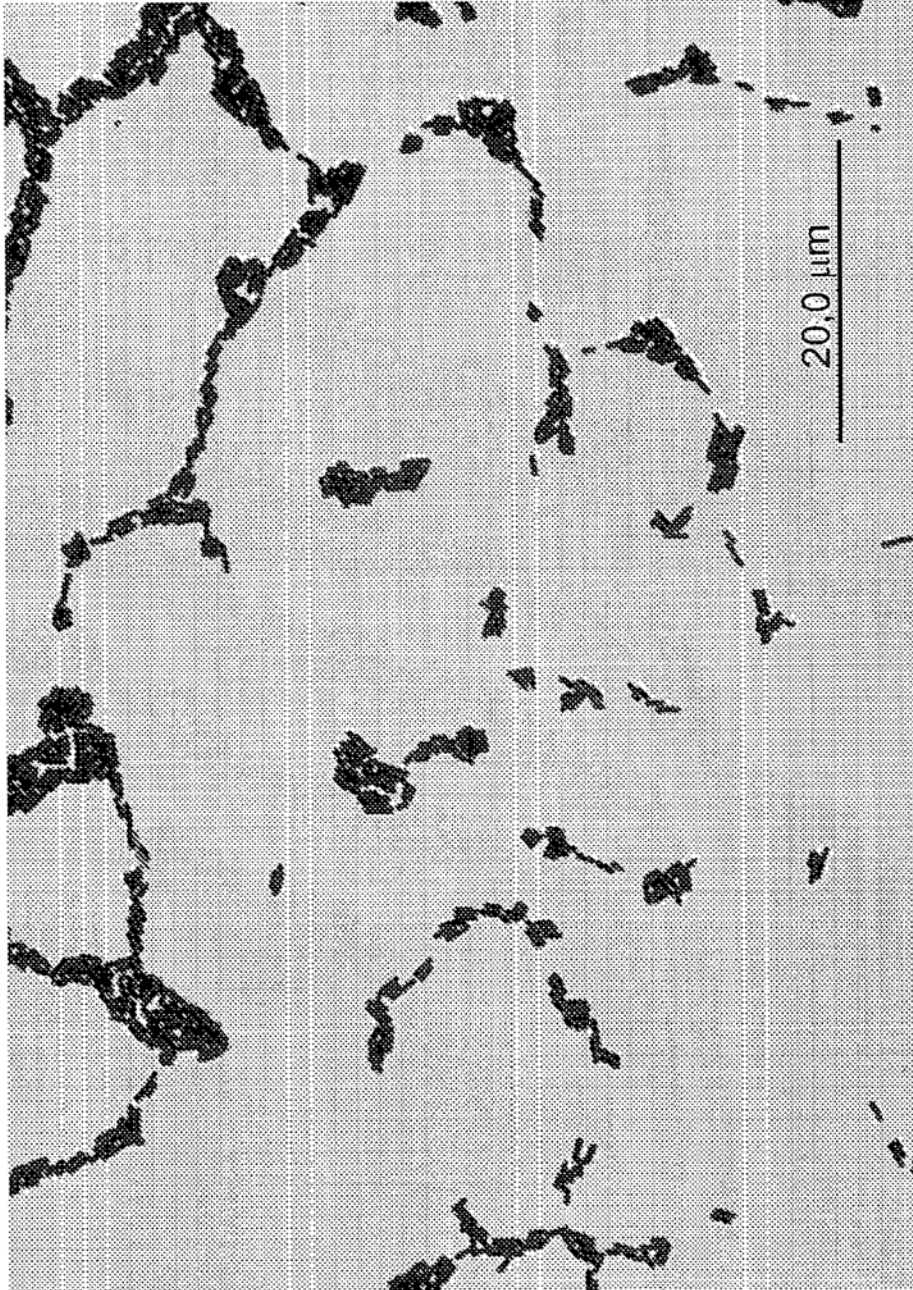


FIG. 1

## Huella de ADN genómico

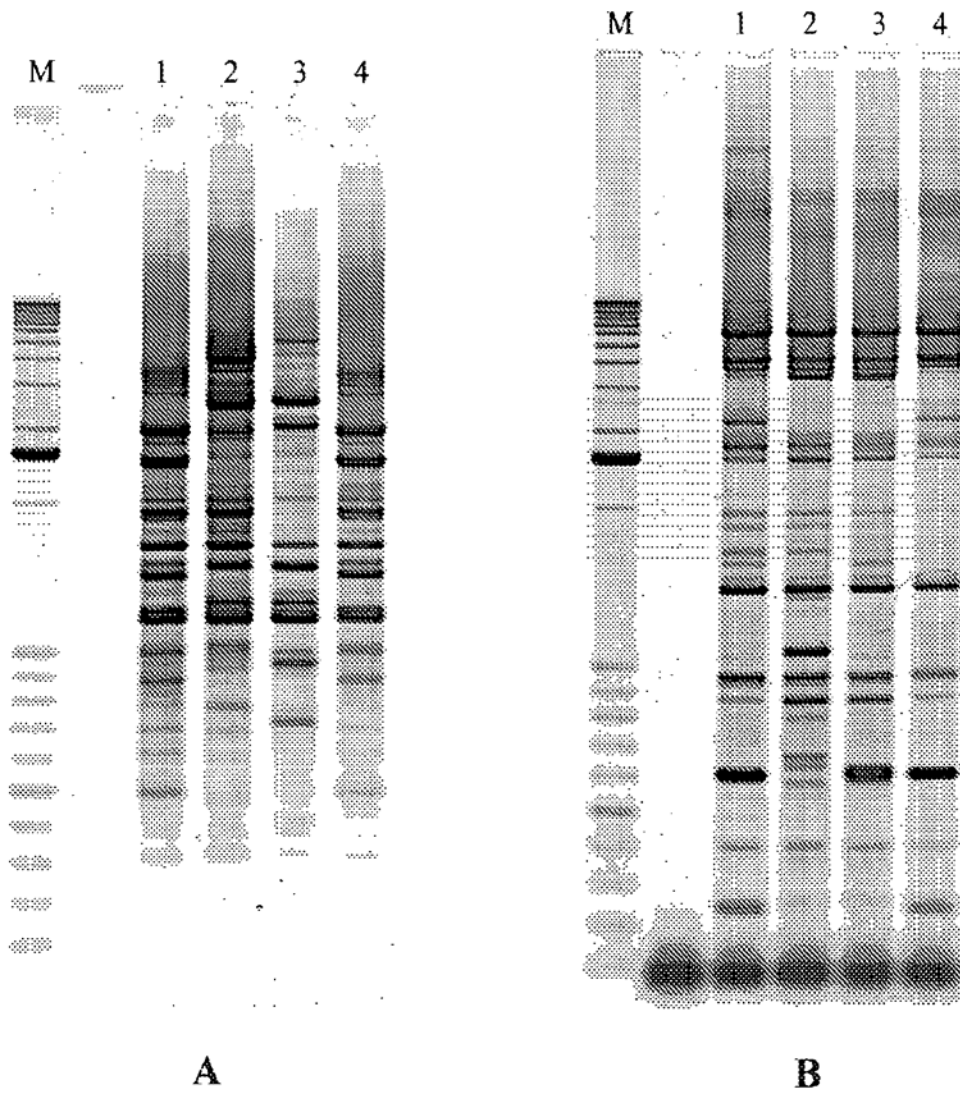
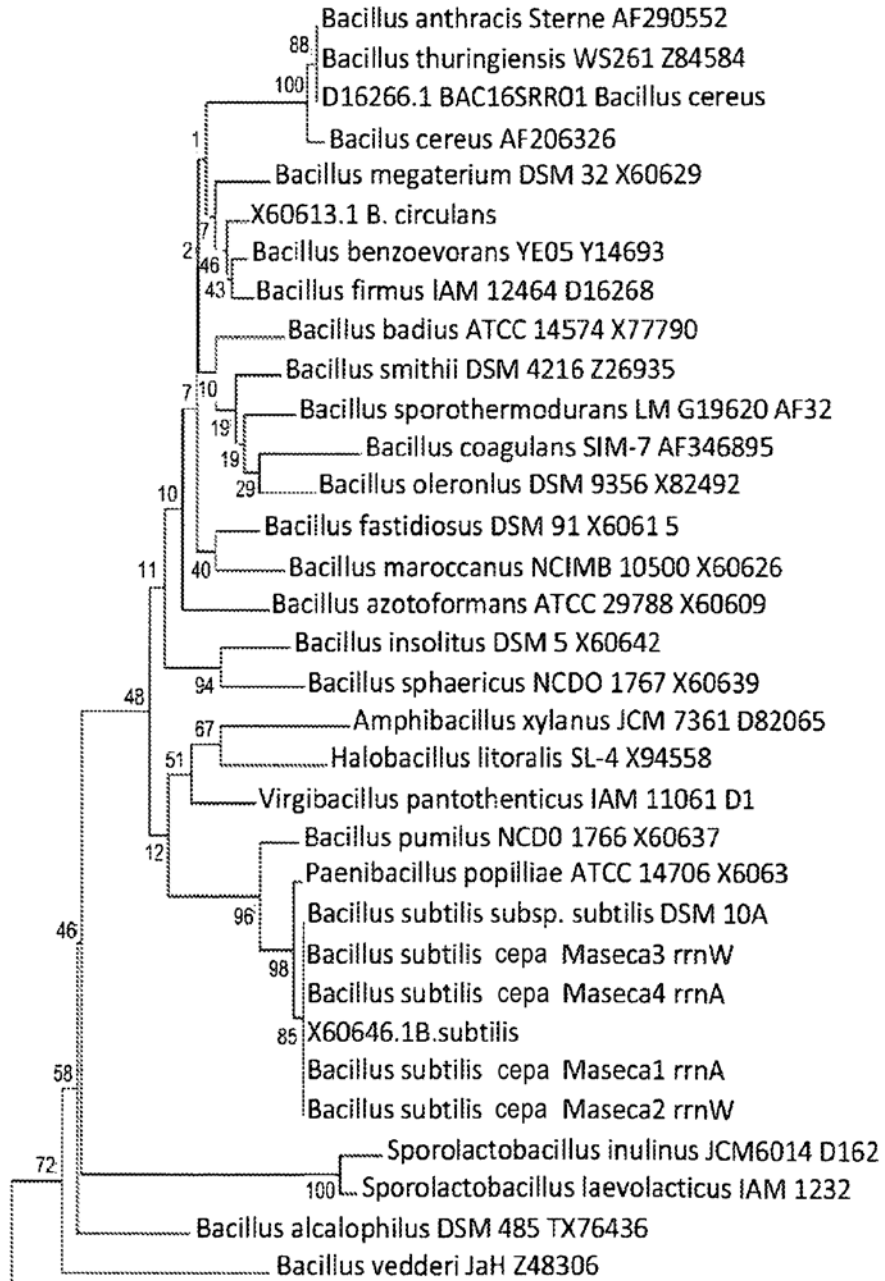


FIG. 2



FIG. 3A



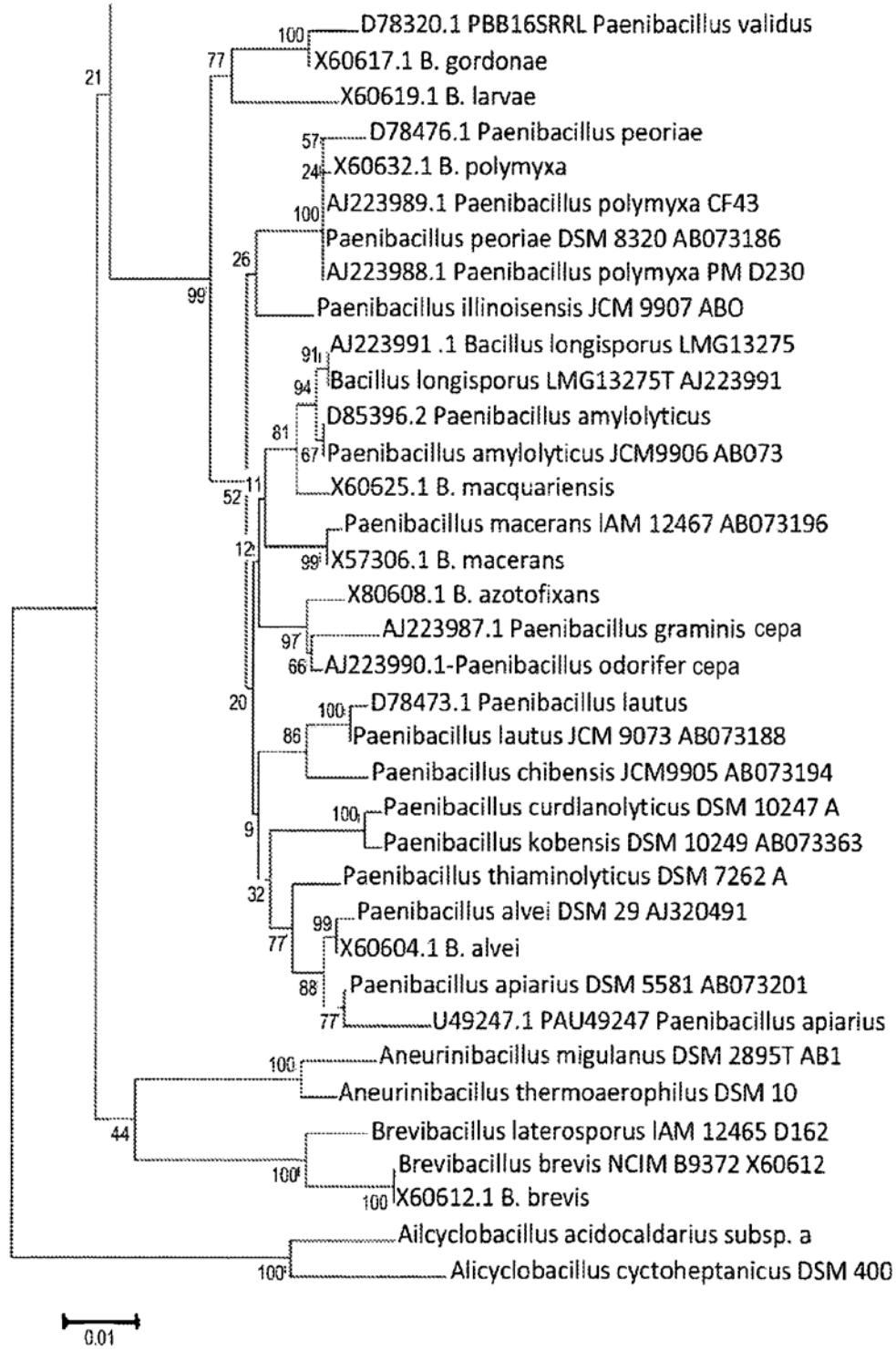


FIG. 3B

FIG. 4A

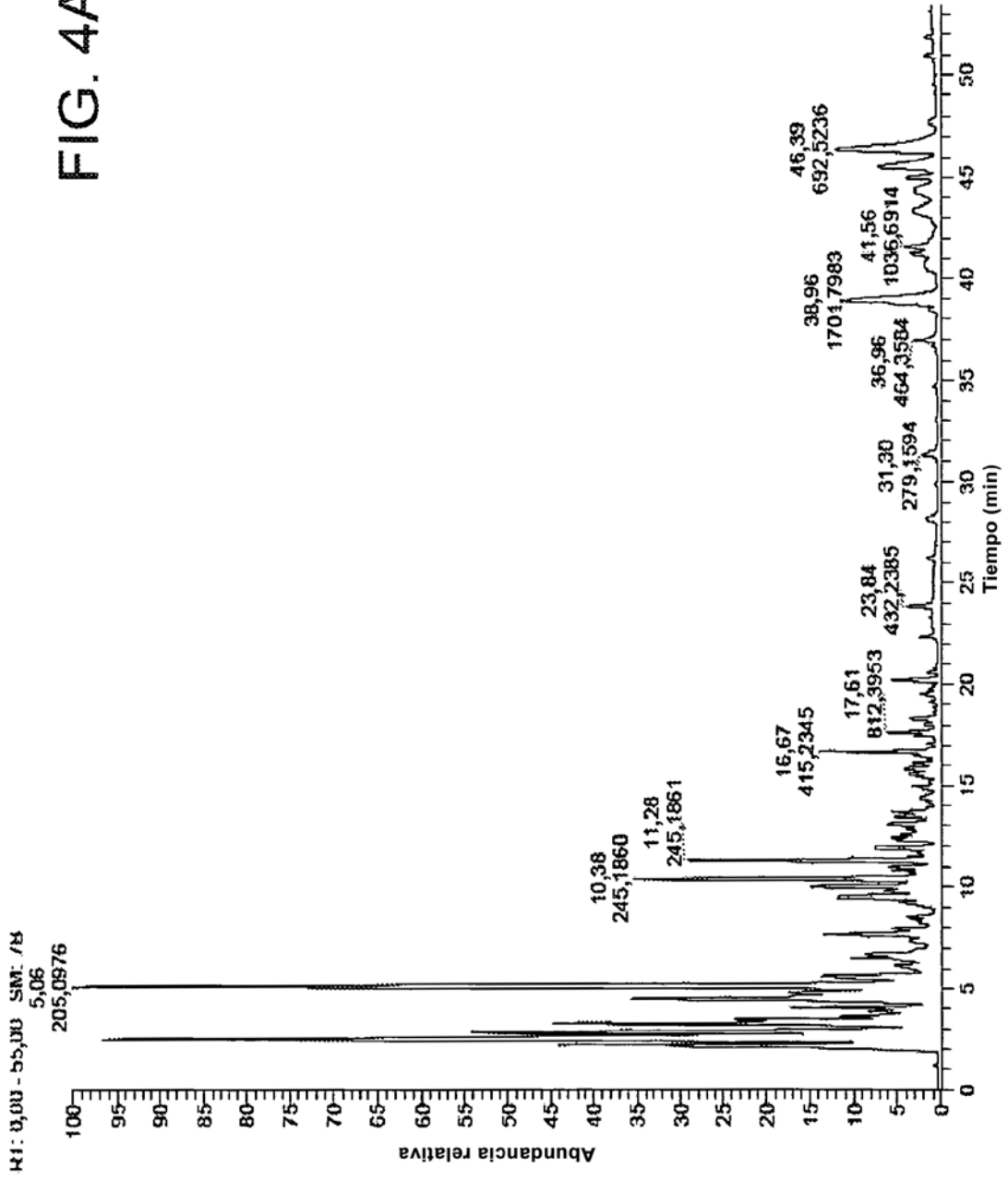


FIG. 4B

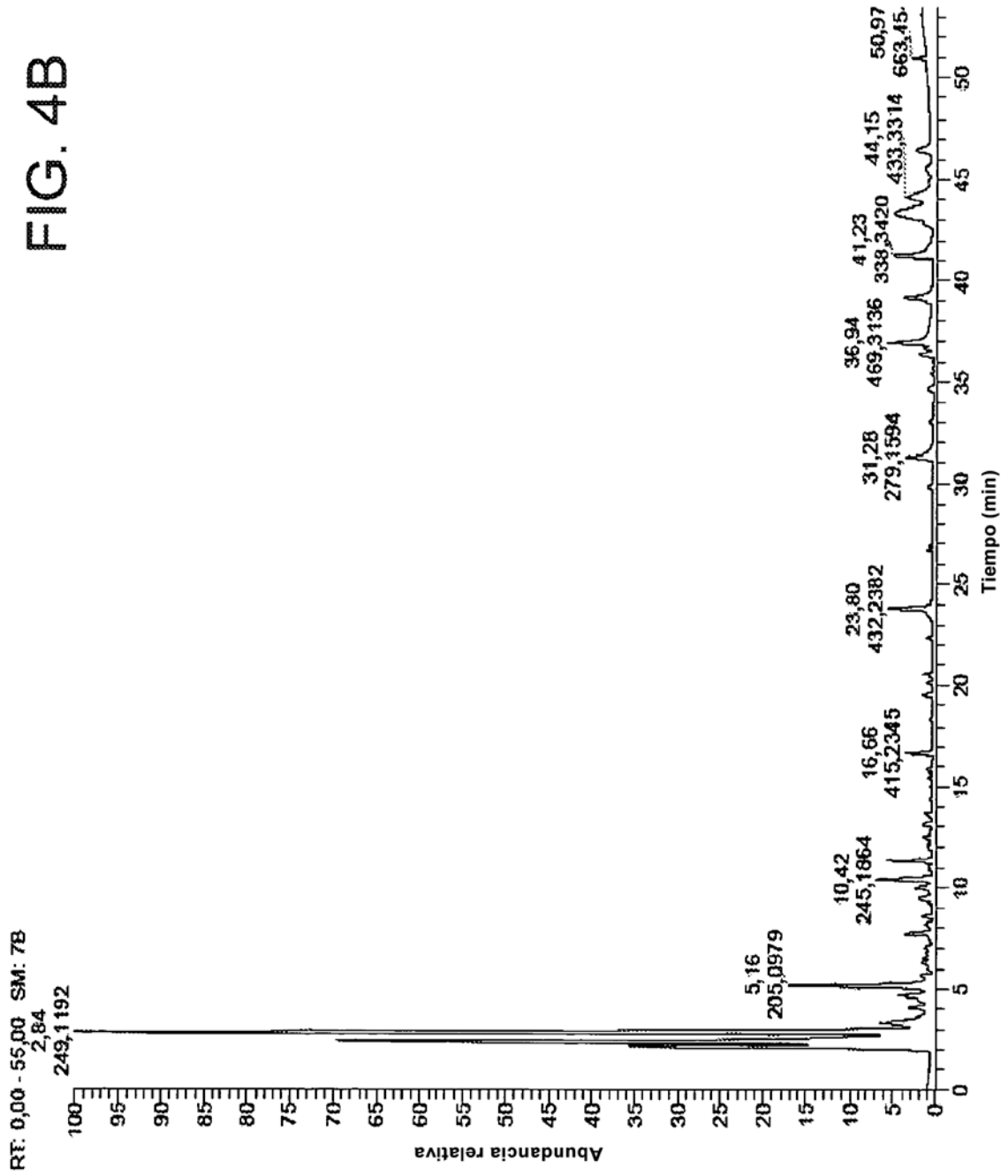
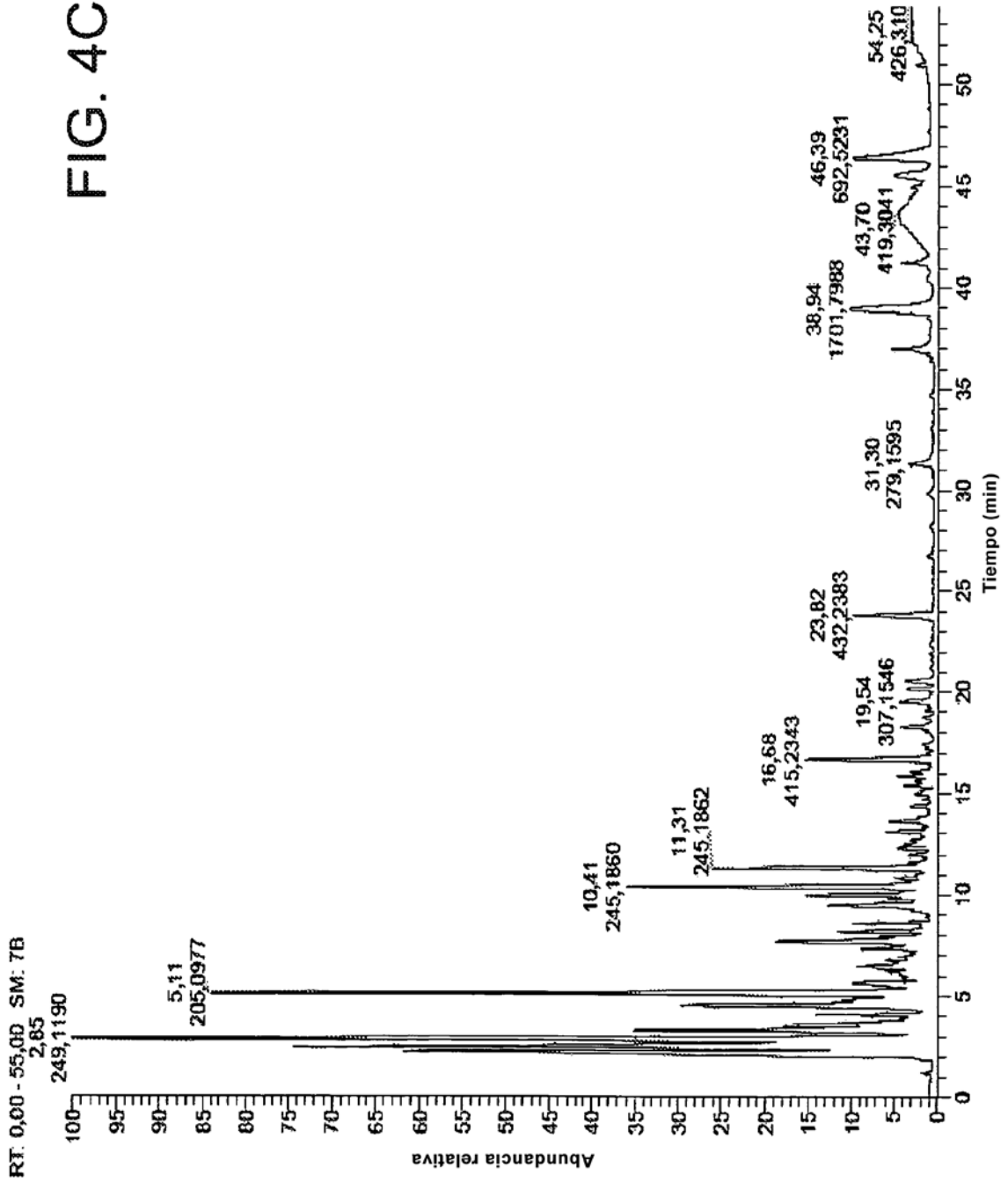


FIG. 4C



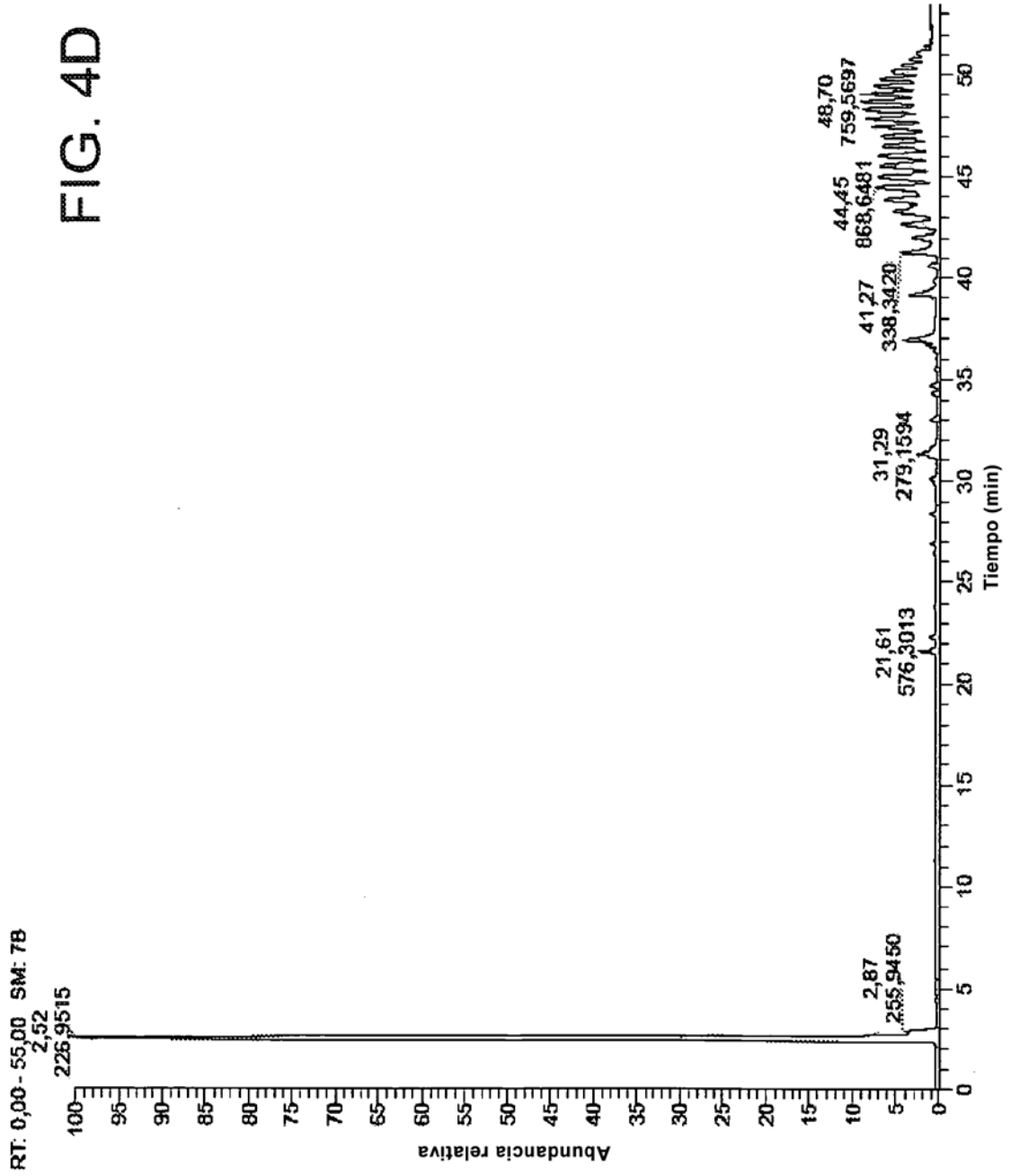


FIG. 4D

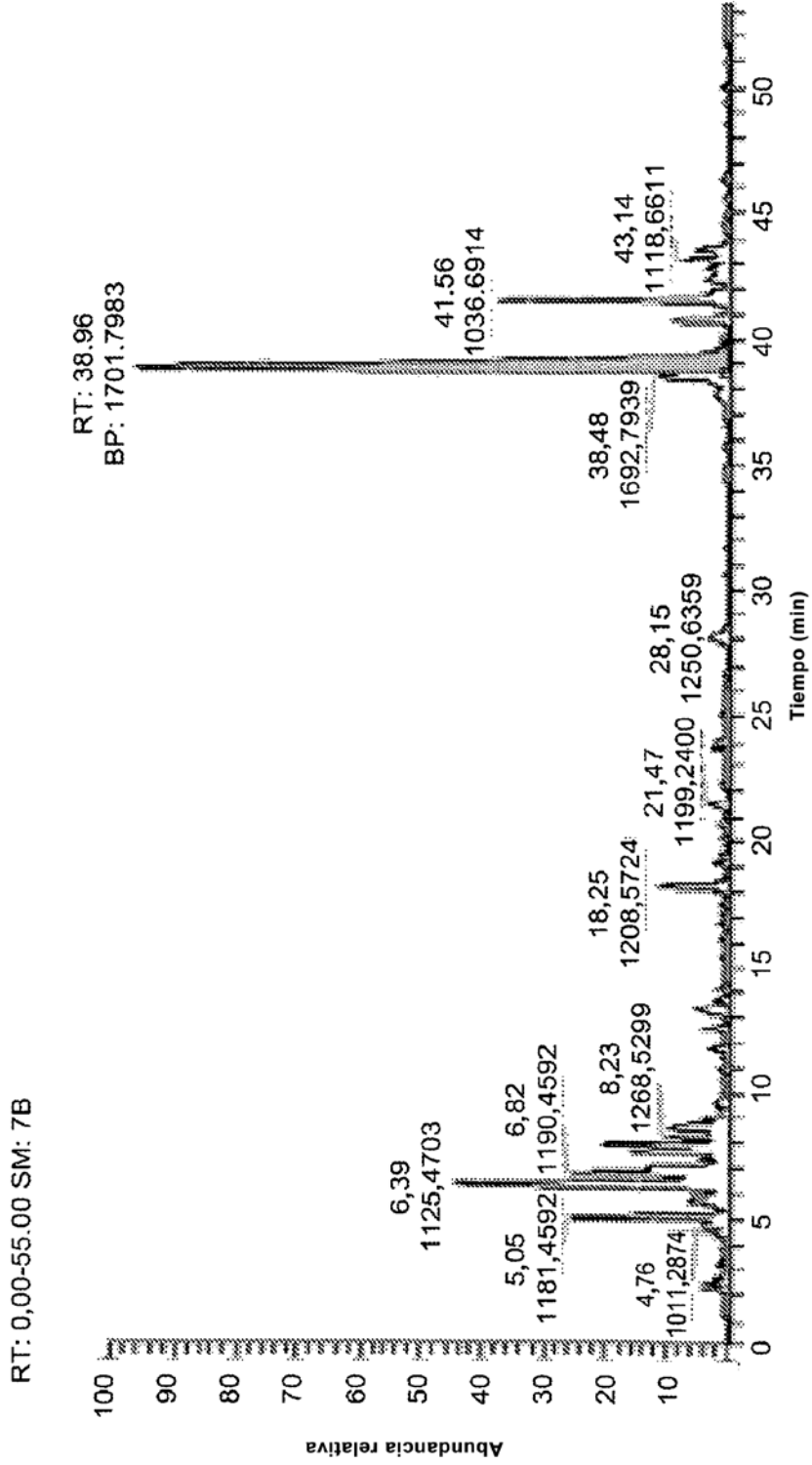


FIG. 5A

Isaen orbi esipos 06 #3040 RT: 38.93 AV: 1 NL: 1,93E6  
F: FTMS + cESI Full ms [200,00-2000,00]

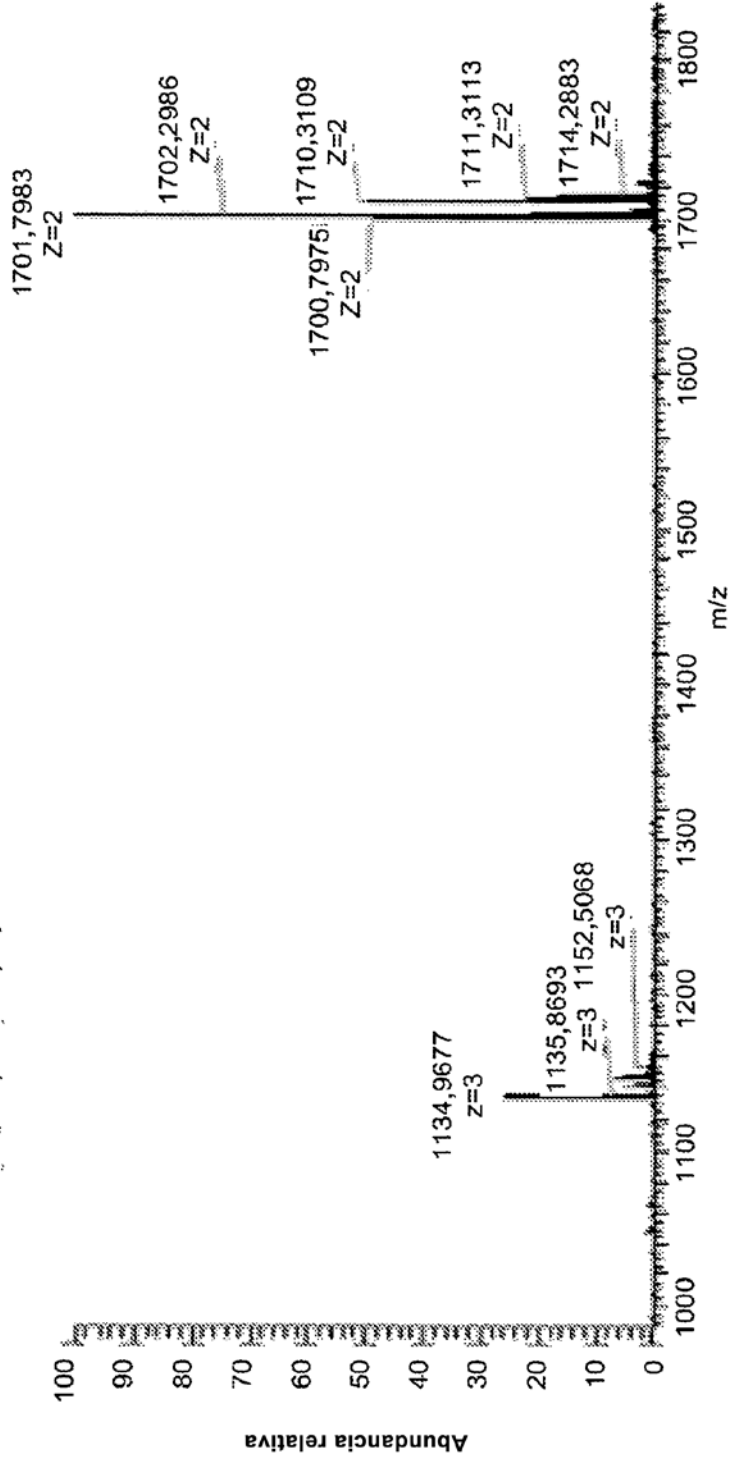


FIG. 5B



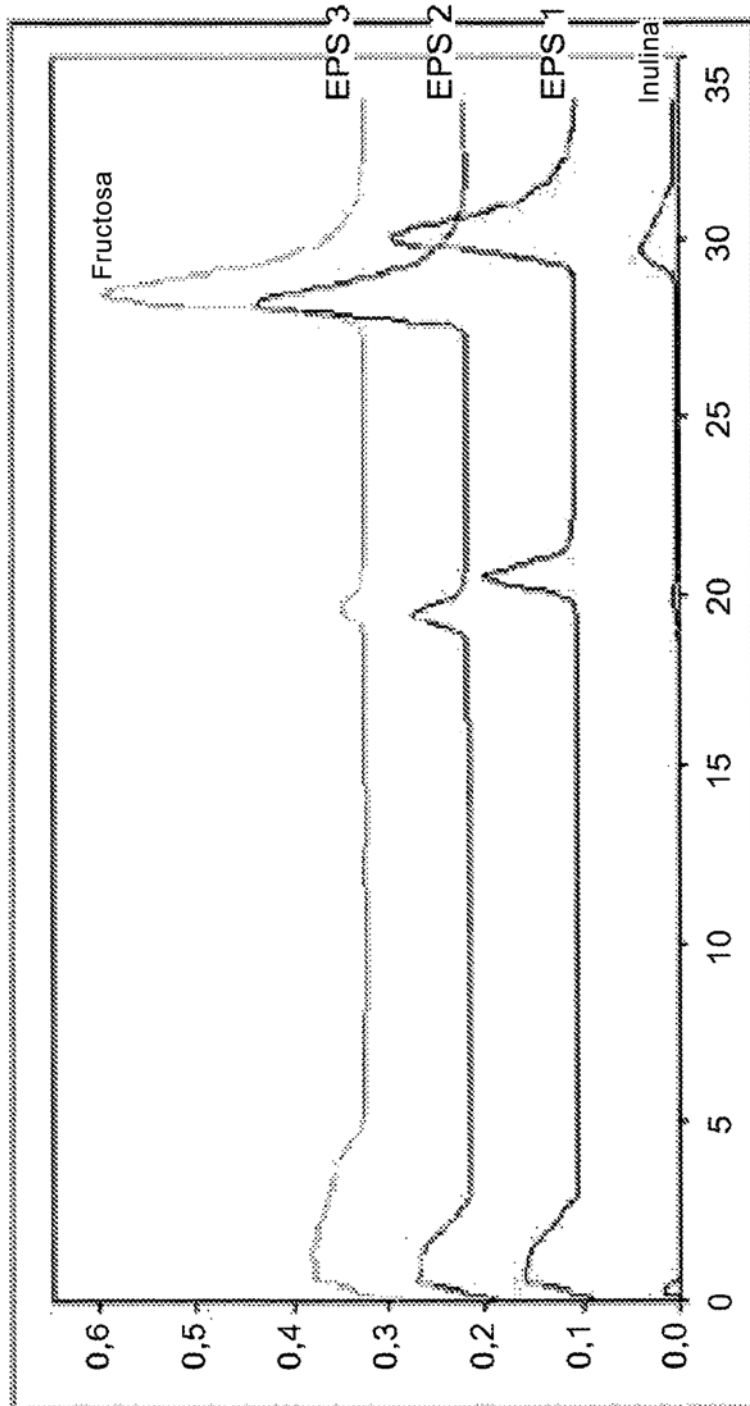


FIG. 6A

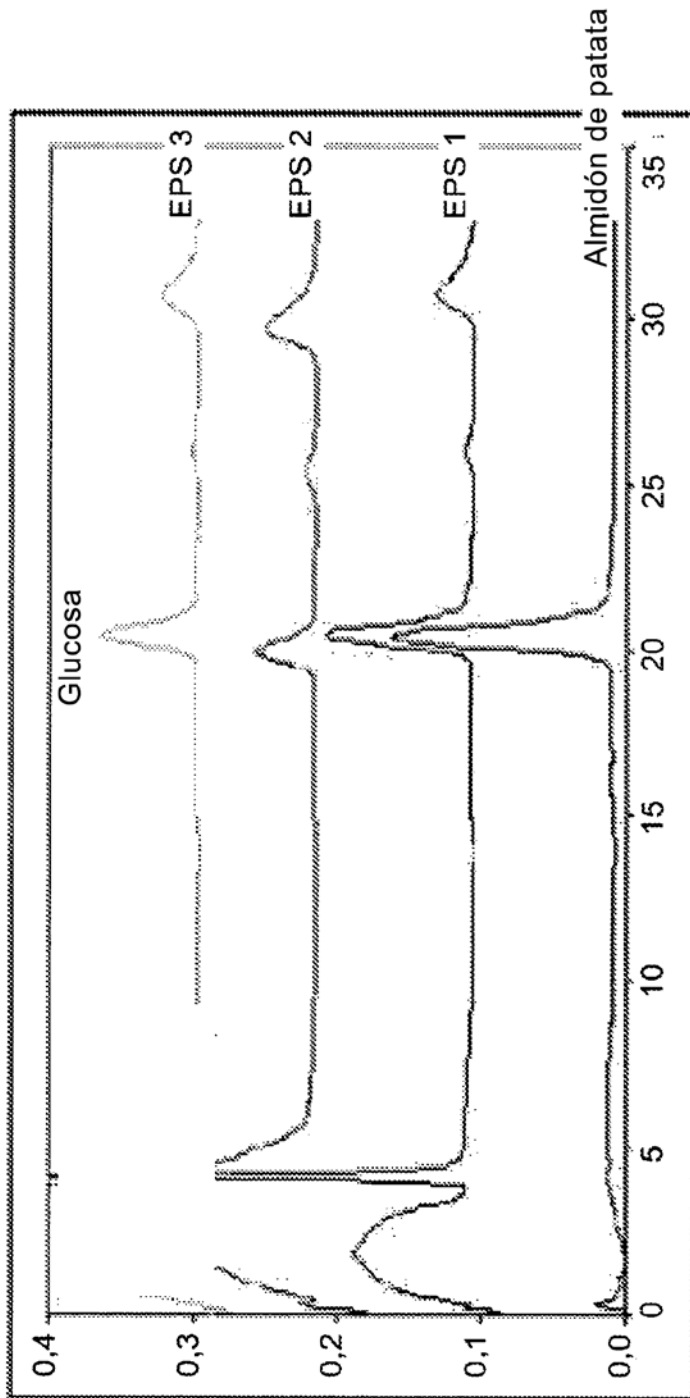


FIG. 6B

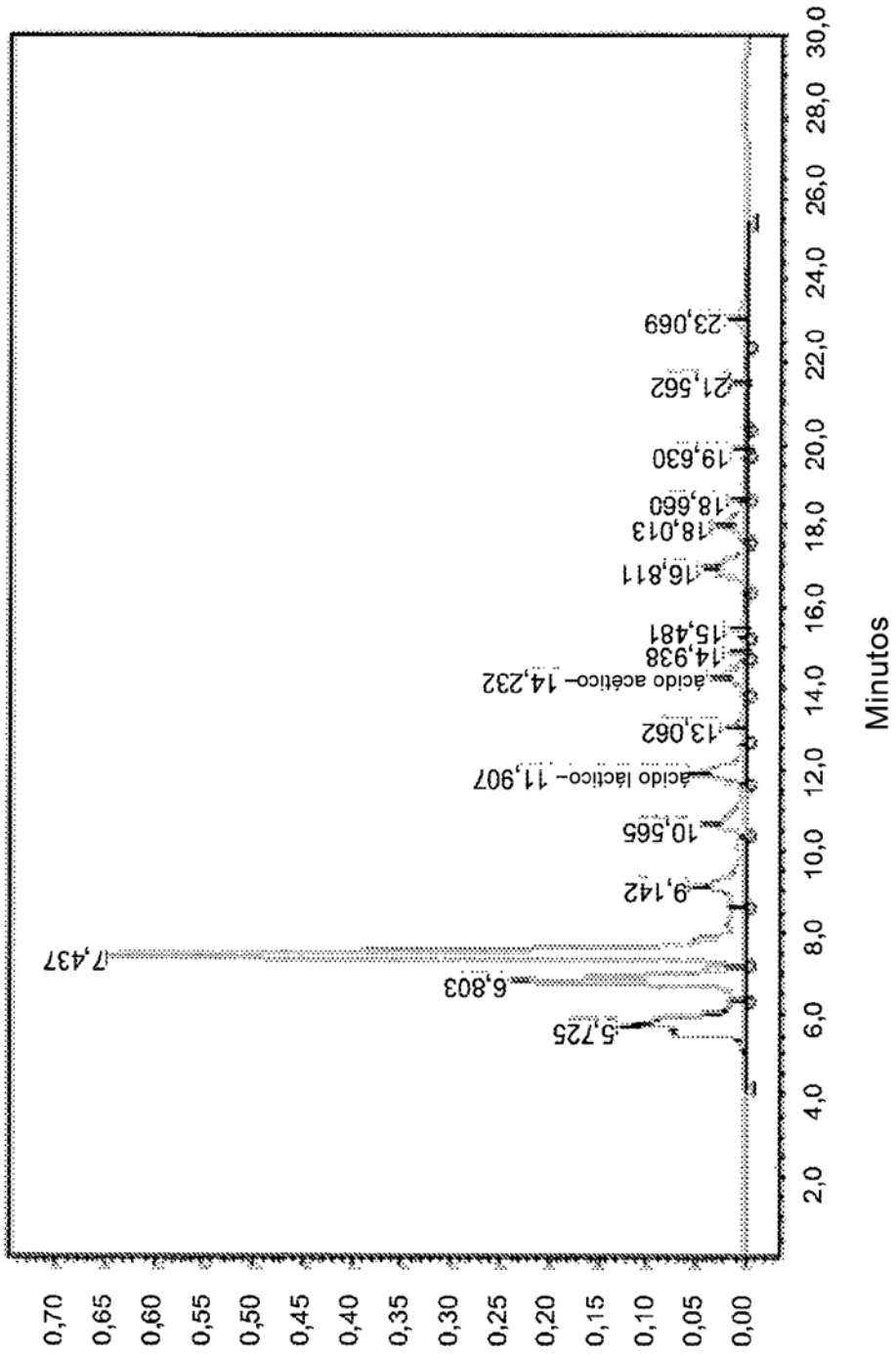


FIG. 7