

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 805**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/01</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/00</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/125</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2009 PCT/EP2009/067317**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010 WO2010070005**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009 E 09795409 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2379705**

54 Título: **Composición de bacillus resistente a la bilis**

30 Prioridad:

**19.12.2008 EP 08389501**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 613 805 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición de bacillus resistente a la bilis

5 [0001] La presente invención se refiere a una composición de *Bacillus subtilis* caracterizada por una germinación y crecimiento rápidos en las sales de bilis (ambiente intestinal simulado) y por la producción de una enzima o un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina.  
 10 La composición de *Bacillus subtilis* se puede utilizar como suplemento en el pienso para animales donde este tiene un efecto probiótico (promoción de salud y crecimiento) y aumenta la digestión y disponibilidad de nutrientes de piensos para animales.

Estado de la técnica

15 [0002] Las bacterias probióticas tal como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se usan en la industria de pienso para animales como suplemento a la dieta.  
 Su uso se refiere a la capacidad de bacillus para reemplazar o reducir el uso de antibióticos, que se usan como promotores de crecimiento en la industria de pienso para animales.

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

25 [0004] Además, el modo sugerido de las acciones (por ejemplo, modulación inmunitaria, modificador de flora intestinal) bacillus probiótico son capaces de producir muchos componentes beneficiosos, tales como enzimas, que se excretan en el tracto gastro intestinal (GIT) cuando se usa como suplemento de pienso para animales.  
 Las enzimas tal como fitasa se excretan y mejoran la digestión y mejor absorción de pienso para animales (digestibilidad más alta).

30 La dieta (pienso) está compuesta en su mayoría de origen vegetal, tal como granos, maíz, soja, aceite de soja y aminoácidos.  
 En general, estos efectos contribuyen a la producción de productos asequibles para animales.

[0005] Los bacilos probióticos son también capaces de producir otros componentes beneficiosos tales como aminoácidos ácidos esenciales.

35 [0006] Las esporas de *Bacillus* pueden pasar la barrera gástrica ácida y germinar y crecer en el (GIT) gastrointestinal de los animales.  
 Esto tiene grandes ventajas, ya que cuando se ingieren estos pueden excretar tipos numerosos de componentes beneficiosos, por ejemplo, bacteriocinas y también excretan aminoácidos esenciales útiles.

40 Además, las esporas de bacillus son termoestables durante un proceso de granulación de pienso y son así un sistema de entrega excelente para obtener ambas bacteriocinas y por ejemplo aminoácidos esenciales en el GIT.

[0007] En el proceso de supervivencia y de proliferación de bacillus en el GIT, el papel de la bilis es importante.  
 La bilis se produce en el hígado y se almacena en la vesícula biliar.

45 La bilis contiene agua, lecitina, bilirrubina y biliverdina y sales de bilis.

[0008] Se sabe de la literatura que la bilis tiene algunas influencias negativas en la supervivencia y germinación, y crecimiento de células de espora de bacillus a células vegetativas en el GIT de animales.  
 Por lo tanto, se está realizando una investigación para encontrar cepas de *Bacillus* resistentes a la bilis probiótica.

50 [0009] El artículo (Antonie Van Leeuwenhoek. 2006 Aug; 90(2): 139-46. Epub 2006 Jul 4) describe el aislamiento de un número de muestras *Bacillus*/célula directamente desde el intestino de pollos.  
 Las células de bacillus aisladas se evaluaron para una actividad probiótica.

55 Los seis bacilos con máxima actividad probiótica fueron evaluados para resistencia de sal de bilis y se ha observado que un bacillus probiótico altamente específico tiene un nivel relativamente alto de resistencia a sal de bilis.

[0010] En este artículo no hay foco especial en cualquier periodo temporal para la prueba de resistencia a la bilis.  
 En la parte experimental, las células de espora de bacillus son sencillamente evaluadas para resistencia después de 5 días de presencia en la sal de bilis (ver párrafo "prueba simulada de tolerancia al líquido del intestino delgado" en la página 141).

[0011] US2003/0124104A describe que las endoesporas de bacillus convencionales probióticas son sensibles a la concentración baja de sales de bilis, es decir, la germinación de espora y/o rehidratación se inhibe por la presencia de concentraciones incluso bajas de sales de bilis.

65 Esto es contrario a otras bacterias tales como patógenos entéricos, tal como *E. coli* o *S. aureus* (ver sección [0014] A [0015]).

En vista de esto, se sugiere filtrar/seleccionar para esporas de bacillus que son resistentes a la actividad inhibidora de sales de bilis, y como resultado, germinar en células vegetativas, que luego colonizan el colon (ver [0019]).

5 [0012] Los ejemplos prácticos están todos presentes y datos experimentales no reales de célula de Bacillus específica realmente seleccionada se proporcionan en la descripción.

[0013] Además, las condiciones de selección de sal de bilis están relativamente descritas de forma genérica. En particular, no hay indicaciones de cualquier periodo temporal para las selecciones de resistencia a la bilis. Dicho en otras palabras, basándose en la única instrucción amplia/genérica de este documento, uno puede  
10 seleccionar células de Bacillus que solo pueden crecer (germinar) lentamente, es decir, son capaces de germinar de esporas a células vegetativas después de por ejemplo 20 horas en presencia de la cantidad pertinente de sal de bilis.

[0014] En este documento, no hay descripción o sugerencia para seleccionar células de bacillus que puedan crecer  
15 (germinar) rápidamente, es decir, capaces de germinar y crecer de esporas a células vegetativas, de forma que se alcanza un punto de crecimiento definido dentro de un determinado intervalo temporal en la presencia de una cantidad pertinente de sal de bilis.

[0015] En resumen, las referencias del estado de la técnica acerca de la selección/filtrado de células de bacillus  
20 resistentes a la bilis no focalizan en el crecimiento/germinación rápidos de células de espora a células de bacillus vegetativas.

[0016] La solicitud internacional PCT con número de solicitud PCT/EP2008/057296 fue solicitada el 11/06/2008. El solicitante es Chr. Hansen A/S y no se publicó en la fecha de prioridad de esta presente solicitud.

[0017] La solicitud de prioridad de PCT/EP2008/057296, EP07111939.0 fue publicada en 07-01-2009 como  
25 EP2011858A1 y PCT/EP2008/057296 fue publicada en 15-01-2009 como WO2009/007192, después de la fecha de prioridad de esta presente solicitud (19-12-2008) pero antes de la fecha de depósito de esta presente solicitud (16-12-2009)

[0018] PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 describen esporas de bacillus nuevas caracterizadas por el hecho de  
30 tener una velocidad de germinación mejorada/rápida y un crecimiento de espora a célula vegetativa en presencia de un medio de sal de bilis.

[0019] Las esporas de bacillus como se describen en este caso tienen la misma velocidad de germinación y  
35 crecimiento mejorada/rápida de espora a célula vegetativa como se describe en PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1.

[0020] PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 solo describen células vegetativas de bacillus que producen fitasa en  
40 una cantidad aumentada en comparación con la célula de Bacillus de referencia DSM 19467.

[0021] Como se puede observar abajo, en el primer aspecto y reivindicación 1 aquí se niegan tales células de bacillus fitasa de alta producción de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1.

[0022] Cuando abajo se refiere al estado de la técnica, debe entenderse como estado de la técnica disponible al  
45 público (por ejemplo artículos/patentes publicadas) en la fecha de depósito de esta presente solicitud.

#### Resumen de la invención

[0023] El problema por resolver de la presente invención es proporcionar una composición de *Bacillus subtilis* que  
50 pueda excretar altas cantidades de compuestos beneficiosos en el tracto gastro intestinal (GIT) de un animal.

[0024] La solución se basa en que los presentes inventores han desarrollado un método de selección para la  
identificación de composiciones de *Bacillus subtilis* mejoradas.

[0024] Un paso importante del método de selección descrito aquí es específicamente filtrar/seleccionar células de espora  
55 de *Bacillus subtilis* con velocidad de germinación y crecimiento mejorada/rápida de esporas a células vegetativas en presencia de sales de bilis.

[0025] Como se ha descrito anteriormente, el estado de la técnica ha descrito métodos para la selección de células  
60 de bacillus capaces del crecimiento en presencia de sales de bilis, pero los métodos de filtrado/selección del estado de la técnica no focalizan en la velocidad de germinación y crecimiento en presencia de sal de bilis.

Por consiguiente, ambas células de bacillus resistentes a la bilis seleccionadas del estado de la técnica no germinan y crecen suficientemente rápido para cumplir con los criterios de velocidad de germinación y crecimiento como se describe en este caso.

[0025] Por ejemplo, las células de bacillus aisladas directamente desde el intestino de por ejemplo pollos (como por  
65 ejemplo descrito en el artículo mencionado anteriormente Antonie van Leeuwenhoek) en el ambiente intestinal no

están seleccionados (bajo presión natural) para germinar y crecer rápidamente en el intestino.

[0026] Como se muestra en ejemplos prácticos aquí, esto también es real para la composición de Bacillus GalliPro® disponible comercialmente, que germina sencillamente y crece más demasiado lentamente y no alcanza el punto de crecimiento definido en las primeras 20 horas en la presencia de niveles fisiológicos de sales de bilis para cumplir los criterios de velocidad de germinación y crecimiento, como se describe en este caso. GalliPro® es una composición de *Bacillus subtilis* que es exitosa comercialmente.

[0027] La cepa descrita aquí depositada como DSM 19467 fue seleccionada usando GalliPro® como una cepa de inicio y un método de presión selectiva y un aislamiento posterior para germinación y crecimiento rápidos de esporas a células vegetativas en presencia de sal de bilis, como se describe en este caso.

[0028] Ver por ejemplo tabla 1 para detalles adicionales (GalliPro® pueden aquí también ser denominadas DSM 17231). En la figura 1 aquí, este se ilustra esquemáticamente.

[0029] En resumen, se cree que ningún estado de la técnica describe una composición de *Bacillus subtilis* aislada, que comprende de 10<sup>5</sup> a 10<sup>12</sup> CFU/g de células de bacillus, donde las células de la composición de bacillus cumplen con la germinación y crecimiento rápidos en presencia del criterio de sal de bilis, como se describe en este caso.

[0030] Sin estar limitado a la teoría, los presentes inventores han identificado que la germinación y crecimiento rápidos es un aspecto muy importante de la invención como esporas de bacillus, que son resistentes a la bilis pero no germinan y crecen suficientemente rápido, serán excretadas antes de cualquier característica positiva, tal como producción de aminoácido esencial, puede hacerse en cantidades significativas por las células de bacillus vegetativas.

[0031] Las esporas de Bacillus que germinan demasiado lentamente pasarán sencillamente al tracto gastro intestinal (GIT) antes de que la bacteria pueda producir cualquier cantidad significativa de, por ejemplo, aminoácidos esenciales.

[0032] Después de un número detallado de pruebas y análisis, los inventores por lo tanto eligen trabajar con un rango temporal de hasta 20 horas y seleccionan las esporas de germinación y crecimiento más rápido dentro de este período de tiempo en presencia de altas concentraciones fisiológicas de sales de bilis. Sin estar limitado a la teoría y basándose en el trabajo experimental detallado descrito aquí, los presentes inventores han identificado que resulta importante tener una germinación y crecimiento rápidos en las primeras 18 y 19 horas en presencia de 4 y 6 mM de sal de bilis, respectivamente.

[0033] Los presentes inventores luego identificaron que una vez que las células de *Bacillus subtilis*, con germinación y crecimiento rápidos en el medio de sal de bilis se hayan seleccionado, estas células son altamente útiles como células de inicio para mutagénesis para obtener células nuevas con producción de aminoácido mejorada.

[0034] Como se ilustra esquemáticamente en la figura 1 y ejemplo 4, la bilis de crecimiento rápido resistente a la cepa seleccionada, DSM 19467 se usó como cepa de inicio para mutación tradicional y las cepas que producen altas cantidades de aminoácidos fueron seleccionadas. Como se puede observar en el ejemplo 4, algunas de las cepas seleccionadas producen al menos 5 veces más de leucina de aminoácido que DSM 19467 y GalliPro®.

[0035] Como se ha mencionado anteriormente, en nuestras aplicaciones anteriores PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1, DSM 19467 se usaron para hacer nuevas cepas de alta producción de fitasa, ver por ejemplo, el ejemplo 4 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1.

[0036] Por consiguiente, uno puede ver DSM 19467 como un tipo muy útil por ejemplo de "intermediar" para hacer nuevas células de bacillus con propiedades mejoradas tal como, por ejemplo, fitasa más alta o producción de aminoácido o cualquier otro compuesto pertinente de interés.

[0037] Además, es evidente para la persona experta que una vez que los inventores aquí hayan descrito el ensayo de prueba para probar la germinación y crecimiento rápidos del ejemplo 1 más la cepa identificada DSM 19467 será trabajo de rutina para la persona experta seleccionar otras células de *Bacillus subtilis* que cumplan con el criterio del primer aspecto de este documento, es decir, otras células de *Bacillus subtilis* alternativas con características similares a DSM 19467.

[0038] Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición de *Bacillus subtilis*, que comprende de 10<sup>5</sup> a 10<sup>12</sup> CFU/g de células de spora de *Bacillus subtilis*, donde la composición de *Bacillus subtilis* se caracteriza por el hecho de que:

(i): las esporas de *Bacillus subtilis* tienen una germinación y crecimiento rápidos de spora a célula vegetativa en

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

(I): donde el medio de sal de bilis es el medio no selectivo de Caldo de Infusión de Ternera (VIB) del ejemplo 1 aquí suplementado con una mezcla de sal de bilis que comprende sales de bilis conjugadas taurodesoxicolato y glicodeoxicolato y la sal de bilis desconjugada deoxicolato en las proporciones 60 % de taurodesoxicolato, 30 % de glicodeoxicolato y 10 % de deoxicolato; y

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

(a): rellenar un pocillo en una placa de microtitulación con 0,150 ml de medio de sal de bilis que tiene 108 esporas *Bacillus subtilis* por ml de medio (es decir, este es tiempo cero); e

(b): incubar la placa a 37 °C bajo condiciones atmosféricas y medir los valores OD<sub>630</sub>, utilizando un espectrofotómetro y con agitación antes cada lectura, para obtener una curva de crecimiento representativa a lo largo del tiempo;

y

(ii) las células vegetativas de *Bacillus subtilis* producen una enzima o un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina;

y con la condición de que las células vegetativas de *Bacillus subtilis* no son células, como se describe en la reivindicación 1, de PCT/EP2008/057296 y la solicitud de prioridad de las mismas, EP07111939.0, publicada como EP2011858A1, donde las células vegetativas de bacillus del aspecto (ii) según la reivindicación 1 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858 A1

producen fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más que la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467, donde la cantidad de fitasa producida se mide por el ensayo de fitasa del ejemplo 2 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 después de 4 horas de crecimiento a 37 °C en el medio de Caldo de Infusión de Corazón (HIB) no selectivo del ejemplo 2 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 y

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

(a): hacer un cultivo de células vegetativas de bacillus durante toda la noche en un medio de cultivo enriquecido;

y

(b): transferir un 1 % de inóculo del cultivo durante toda la noche al medio HIB (es decir, este es tiempo cero) e incubar a 37 °C hasta medir la actividad de fitasa.

[0039] Como se ha mencionado anteriormente, las células de *Bacillus subtilis* con esporas que cumplen con el criterio (i) del primer aspecto pueden usarse en principio por ejemplo como una cepa de inicio para filtrar células vegetativas de *Bacillus subtilis* que pueden por ejemplo tener una producción más alta/mejorada de cualquier compuesto de interés, tal como por ejemplo una enzima de interés.

[0040] Como se ha mencionado anteriormente, la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 se selecciona para una germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis usando GalliPro® como cepa de inicio. La DSM 19467 no se selecciona para la producción mejorada de un compuesto de interés (por ejemplo un aminoácido).

Sin estar limitado a la teoría, se cree que la producción pertinente aquí de la gran mayoría de compuestos pertinentes de interés comercial (por ejemplo fitasa o un aminoácido) de DSM 19467 corresponde a la producción de GalliPro® del mismo compuesto.

[0041] En relación con el punto (i) el punto de crecimiento de célula vegetativa para GalliPro® es al menos 20 horas tras la incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis y para la nueva cepa DSM 19467, como se describe en este caso, es después 14 y 15 horas en 4 y 6 mM de sales de bilis, respectivamente (ver figura 2 y ejemplo práctico 3 de este documento).

[0042] Aquí es pertinente darse cuenta de que los presentes inventores también evaluaron el producto disponible comercialmente CALSPORIN® (Calpis Co., Ltd., Japón) para determinar el punto de crecimiento de célula vegetativa bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

En cuanto a GalliPro®, el producto comercial CALSPORIN® es una composición de *Bacillus subtilis* usada como un aditivo de pienso probiótico.

El punto de crecimiento de célula vegetativa bajo las condiciones del punto (i) de primer aspecto para CALSPORIN® fue más de 20 horas a 4 y 6 mM de sales de bilis, respectivamente.

Esto es considerablemente más de 18 y 19 horas requeridas bajo el punto (i) y esto ilustra que productos disponibles comercialmente hasta ahora no han sido seleccionados para una germinación y crecimiento rápidos.

Como se ha mencionado anteriormente, las células de bacillus "naturales" no han estado bajo ninguna presión selectiva para obtener una germinación y crecimiento rápidos.

Sin estar limitado a la teoría, se cree por lo tanto que las células de bacillus "naturales" no cumplen con las condiciones del punto (i) del primer aspecto.

[0043] La resistencia a la bilis [del punto (i)] y ensayo de aminoácidos esenciales [del punto (ii)] se basan en elementos estándar disponibles comercialmente (tales como, por ejemplo medios estándar, sales de bilis; mediciones OD estándar y pruebas estándar).

5 [0044] La célula de *Bacillus* de referencia se deposita como DSM 19467 y, por lo tanto, está disponible públicamente.

[0045] La célula de *Bacillus subtilis* GalliPro® se deposita como DSM 17231 (nombrado "GalliPro®") y, por lo tanto, está disponible públicamente.

10 [0046] Por consiguiente, basándose en la descripción de ensayo detallada aquí (ver por ejemplo ejemplo 1 de este documento para el ensayo de resistencia a la bilis y ejemplo 2 de aquí para el ensayo de aminoácido) la persona experta es capaz de repetir rutinariamente estos ensayos para determinar objetivamente si una célula de *Bacillus subtilis* específica de interés cumple con la resistencia a la bilis [del punto (i)] y los niveles de aminoácido [del punto (ii)] del primer aspecto de la invención.

15 [0047] La composición de *Bacillus subtilis* nueva, como se describe en este caso, se puede utilizar como un suplemento probiótico para alimentos de animales.  
La dosis y administración puede realizarse según la técnica, como ha ocurrido por ejemplo en cuanto a las composiciones de bacillus GalliPro® del estado de la técnica.

[0048] Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar un animal que comprende administrar la composición de *Bacillus subtilis* del primer aspecto y formas de realización relacionadas aquí descritas con un animal conjuntamente con otros ingredientes de pienso para animales.

25 [0049] Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para la selección y aislamiento de una célula de *Bacillus subtilis* que comprende los pasos siguientes:

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

30 (b): realización de una célula de *Bacillus subtilis* vegetativa de la célula de espora aislada del paso (a) y mutación de la célula seleccionada y aislada para obtener una agrupación de células vegetativas de *Bacillus subtilis* individuales;

35 (c): selección y aislamiento de la agrupación de células vegetativas de *Bacillus subtilis* individuales del paso (b) una célula vegetativa de *Bacillus subtilis* que es capaz de la producción de una enzima o un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina; y

40 (d): análisis de la célula de *Bacillus subtilis* vegetativa del paso (c) para confirmar que esta ha mantenido la germinación y crecimiento rápidos del paso (a) y aislamiento de la célula de *Bacillus subtilis* seleccionada.

[0050] Es evidente para la persona experta que una vez que los inventores aquí hayan descrito los ensayos de prueba pertinentes (en particular, el ensayo para probar la germinación y crecimiento rápidos del ejemplo 1) más la cepa de referencia DSM 19467 será trabajo de rutina para la persona experta seleccionar otras células de *Bacillus subtilis* que cumplan con el criterio del primer aspecto de este documento.

[0051] Como se ha discutido aquí, usando el método de filtrado/selección como se describe en este caso, los inventores han seleccionado y han aislado un número de células de *Bacillus subtilis* mejorada.

50 [0052] La forma de realización de la presente invención está descrita abajo, solo por medio de ejemplos.

#### Definiciones

55 [0053] Todas las definiciones de términos pertinentes aquí están en concordancia con lo que entendería la persona experta en relación al contexto técnico aquí pertinente.

[0054] El término "célula bacillus" o "célula de *Bacillus subtilis*" se refiere aquí a ambos una célula de espora de bacillus o de *Bacillus subtilis* y una célula vegetativa bacillus o de *Bacillus subtilis*.

60 [0055] El término "espora bacillus" o "espora *Bacillus subtilis*" en relación a la célula de espora de bacillus o *Bacillus subtilis* se refiere aquí a una espora que según la técnica se puede caracterizar por una estructura aletargada, resistente, no reproductiva producida por la bacterias de bacillus.

La función primaria de esporas es generalmente asegurar la supervivencia de una bacteria en los periodos de estrés ambiental.

65 Estas son por lo tanto resistentes a la radiación ultravioleta y gamma, desecación, lisozima, temperatura, inanición y desinfectantes químicos.

Las esporas se encuentran comúnmente en tierra y agua, donde estas pueden sobrevivir por periodos largos de tiempo.

El revestimiento de spora es impermeable a muchas moléculas tóxicas y también puede contener enzimas que se implican en la germinación.

5 El núcleo tiene estructuras celulares normales, tal como ADN y ribosomas, pero es inactivo metabólicamente.

Cuando una bacteria detecta que las condiciones medioambientales se vuelven desfavorables, esta puede iniciar el proceso de esporulación, que lleva cerca de ocho horas.

10 [0056] El término "célula vegetativa bacillus" o "célula vegetativa *Bacillus subtilis*" se refiere a células bacillus vegetativas funcionales o células de *Bacillus subtilis*, que se pueden dividir para producir células más vegetativas.

[0057] El término "germinación y crecimiento" se refiere a que las esporas de bacillus germinan y crecen a células vegetativas de bacillus.

15 Como sabe la persona experta, la reactivación de la spora se produce cuando las condiciones son favorables e implican la germinación y crecimiento.

La germinación implica el inicio de la actividad metabólica de la spora latente y así la entrada de la hibernación.

Es comúnmente caracterizado por la rotura o absorción del revestimiento de spora, inflamación de la spora, un aumento de la actividad metabólica y pérdida de resistencia para estrés ambiental.

20 El crecimiento le sigue a la germinación e implica al núcleo de la spora en la fabricación de nuevos componentes químicos y se retira el revestimiento de spora vieja para desarrollarse en una célula bacteriana vegetativa funcional, que se pueden dividir para producir más células.

Las curvas de crecimiento (OD contra tiempo) de células de bacillus muestran fases de crecimiento diferentes.

25 Como las esporas se transfieren a un medio rico en nutrientes, la germinación se inicia seguida de una reducción temporal en OD (fase I), que se debe a la liberación de ácido dipicolínico y consecuentemente la hidratación del revestimiento de spora.

En la segunda fase (fase II = fase de crecimiento) hay un periodo con un cambio relativamente pequeño en OD, hasta que las esporas se desarrollan en unas células bacterianas vegetativas funcionales, que se pueden dividir para producir más células y proporcionar así un aumento continuo en el valor OD.

30 El punto cuando uno comienza a obtener el aumento continuo en los valores OD que alcanzan un OD de 0,4 aquí se denomina "punto de crecimiento celular vegetativo".

[0058] El término "densidad óptica" se define como una medida de absorbancia óptica que utiliza un espectrofotómetro.

35 La densidad óptica (OD) es la absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada  $\perp$  por distancia de unidad.

Si OD se mide por ejemplo a una longitud de onda de 630 nm se puede referir como OD<sub>630</sub>.

Dibujos

40 [0059]

La Figura 1: en esta figura, se ilustran los pasos para obtener a las cepas mejoradas nuevas aquí.

Los ejemplos prácticos aquí se comenzaron de DSM 17231 (GalliPro®), que fueron mutados clásicamente y filtrados/seleccionados para una germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis para obtener la nueva cepa seleccionada DSM 19467.

45 DSM 19467 fue usado como cepa de inicio para mutación tradicional y cepas que producen altas cantidades de aminoácidos fueron seleccionadas.

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

50

Descripción detallada de la invención

Un compuesto pertinente de interés:

55 [0060] Como se ha mencionado anteriormente, el término "un compuesto relevante de interés" del punto (ii) debería entenderse en términos generales.

Como se ha mencionado anteriormente, células de bacillus con esporas que cumplen con el criterio (i) del primer aspecto (tal como por ejemplo DSM 19467) en principio, por ejemplo, se pueden utilizar como una cepa de inicio para filtrar células vegetativas de bacillus que pueden por ejemplo tener una producción más alta/mejorada de cualquier compuesto de interés, tal como por ejemplo una enzima de interés.

60

[0061] Ejemplos adecuados de un compuesto de interés pueden ser enzimas tales como por ejemplo mananasa.

Un compuesto de interés podría ser también un aminoácido tal como leucina.

65 [0062] En una forma de realización preferida del punto (ii) del primer aspecto, las células vegetativas de *Bacillus subtilis* producen el compuesto de interés en una cantidad que es superior a la célula de *Bacillus* de referencia DSM

19467, donde la célula vegetativa y célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467 han crecido bajo condiciones idénticas.

5 [0063] En el ejemplo 4 aquí, uno puede ver un ejemplo de esta forma de realización, en el ejemplo 4 aquí se describen células vegetativas con una producción de un mínimo de 5 veces más alta de leucina de aminoácido en comparación con DSM 19467.

10 [0064] Además, como se ha discutido arriba, en el ejemplo 4 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 se describe de forma similar para fitasa, es decir, células vegetativas con una producción más alta de fitasa en comparación con DSM 19467.

Composición de *Bacillus*:

15 [0065] El término "composición de bacillus" o composición de *Bacillus subtilis* debe entenderse según la técnica. Aquí se entiende como una composición de *Bacillus* o de *Bacillus subtilis* que comprende un número de células de espora bacillus o de *Bacillus subtilis* con una característica de interés.

20 [0066] La composición de bacillus o de *Bacillus subtilis* comprende *B. subtilis*. En la esencia de la composición debe sencillamente comprender la cantidad de células de espora de *Bacillus subtilis* dada en el primer aspecto aquí, donde las células de *Bacillus subtilis* cumplen el criterio dado en el primer aspecto.

25 [0067] Como sabe la persona experta, las composiciones de célula de espora de bacillus pertinentes comercialmente en este documento se han hecho generalmente por fermentación. Las células de espora obtenidas están generalmente concentradas, secas, mezcladas con un portador y empaquetadas en un contenedor adecuado.

[0068] Las células de *Bacillus subtilis* pertinentes, por ejemplo,  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de la composición pueden estar presentes en una forma comercialmente relevante conocida por la persona experta.

30 [0069] Por consiguiente, en una forma de realización  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus subtilis* de la composición están presentes como células secas (por ejemplo, secadas por atomización) o como células de espora congeladas.

35 [0070] En una forma de realización preferida, la composición de *Bacillus subtilis* comprende de  $10^6$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus subtilis*, más preferiblemente, de  $10^7$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus subtilis*.

El término "CFU/g" se refiere al peso en gramos de la composición como tal, incluyendo aditivos pertinentes adecuados presentes en la composición.

40 No incluye el peso de un contenedor adecuado usado para el empaquetado de la composición de *Bacillus subtilis*.

[0071] Una forma de realización, se refiere a que la composición de *Bacillus subtilis* se empaqueta en un contenedor adecuado.

45 [0072] Como sabe la persona experta, una composición bacteriana pertinente comercialmente generalmente también comprende otros aditivos pertinentes, tales como por ejemplo un portador/ingrediente del grupo de suero de leche, permeato de suero de leche, carbonato/piedra caliza de calcio y anti agentes de apelmazamiento tales como silicatos de aluminio y kieselgur (diatomeas tierra).

50 [0073] Además de las células de bacillus pertinentes aquí, la composición también puede comprender otros microorganismos pertinentes de interés tales como por ejemplo bacterias de ácido láctico de interés.

Célula de *Bacillus*

55 [0074] La célula de *Bacillus* es una célula *B. subtilis*.

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

60 [0075] Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo de resistencia a la bilis del punto (i) del primer aspecto se basa en elementos estándar disponibles comercialmente (tales como por ejemplo medios estándar, sales de bilis; mediciones OD estándar).

65 [0076] Por consiguiente, basándose en la descripción del ensayo detallado aquí (ver por ejemplo, el ejemplo 1 de aquí), la persona experta es capaz de repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si una célula de espora de *Bacillus subtilis* específica de interés cumple con el criterio de la germinación y crecimiento rápidos de espora a célula vegetativa como se describe en el punto (i).



[0077] En el punto (i) se explica que el punto de crecimiento de célula vegetativa es el punto en una curva de crecimiento que parte con  $10^8$  esporas/ml que corresponden con OD de alrededor de 0,2-0,3 hasta que el tiempo donde el valor OD haya aumentado (debido al crecimiento de las células vegetativas) en un cierto sentido continuo y haya alcanzado OD 0,4.

5 Esto es conforme a como una persona experta entendería tal punto de crecimiento de célula vegetativa y basándose en una curva de crecimiento, la persona experta puede determinar esto rutinariamente, dentro de una variabilidad limitada de alrededor de  $\pm 30$  minutos, como se ha explicado aquí.

[0078] El ejemplo práctico 1 aquí proporciona una descripción detallada de un ensayo de resistencia a la bilis adecuada para seleccionar la germinación y crecimiento rápidos en presencia de sal de bilis.  
10 Las condiciones detalladas aquí en este ejemplo 1 son un ensayo preferido para determinar si una célula de espora de *Bacillus subtilis* de interés cumple con el criterio del punto (i) del primer aspecto.

[0079] El término "sal de bilis" se refiere a la sal de ácidos biliares.  
15 Ácidos biliares son ácidos esteroides descubiertos predominantemente en la bilis de mamíferos. Estos se producen en el hígado por la oxidación de colesterol y se almacenan en la vesícula biliar y se segregan en el intestino en forma de sales. Estos hacen de surfactantes, lípidos emulsionantes y asistencia con su absorción y digestión.  
20 Las sales de bilis usadas en el ejemplo 1 se prepararon imitando las concentraciones fisiológicas y composiciones de sales de bilis porcina. Como sabe la persona experta, las composiciones de sales de bilis porcina pueden aquí estar consideradas como condiciones relativamente "fuertes" en comparación con composiciones de sal de bilis aviar.

[0080] El término "medio de sal de bilis" se refiere al medio que comprende ingredientes de crecimiento de bacillus pertinentes tales como nutrientes pertinentes y sal de bilis.  
25

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

[0081] Como se ha dicho anteriormente, en relación con el punto (i) del primer aspecto, las células de espora de *Bacillus subtilis*, como se describe en este caso, tienen una germinación y crecimiento de espora a célula vegetativa que es tan rápido que estas alcanzan un punto de crecimiento de célula vegetativa de 0,4 OD dentro de menos de 18 y 19 horas a 4 y 6 mM de sales de bilis, respectivamente.  
30 Como se ha dicho anteriormente, la nueva cepa DSM 19467 alcanza el punto de crecimiento de célula vegetativa después de 14 y 15 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis, respectivamente.  
35

[0082] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa después de 17 y 18 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto, más preferiblemente, las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa después de 15 y 16 horas de incubación en 4 y 6 mM de sal de bilis bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.  
40

[0083] Como se ha explicado arriba y se ha mostrado esquemáticamente en la figura 1, la cepa aquí descrita DSM 19467 fue seleccionada usando el GalliPro® disponible comercialmente como una cepa de inicio para mutagénesis y selección para crecimiento rápido en presencia de sal de bilis como se describe en este caso.  
45

[0084] GalliPro® es una composición que comprende células de *Bacillus subtilis* y el *Bacillus subtilis* se deposita como DSM 17231.  
Por consiguiente, GalliPro® puede verse aquí como una cepa de referencia.

[0085] Como se ha dicho anteriormente, el punto de partida de crecimiento de célula vegetativa para GalliPro® es después de 20 horas de incubación en 4 y 6 mM de sales de bilis bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.  
Por consiguiente, en una forma de realización, las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa, al menos 3 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto, más preferiblemente, las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa de al menos 4 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto y, de la forma más preferible, las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan el punto de partida de crecimiento de célula vegetativa al menos 5 horas antes que las de células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) del primer aspecto.  
50  
55  
60

Aminoácidos esenciales

[0086] Como sabe la persona experta, un aminoácido puede ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y  
65

arginina.

[0087] En una forma de realización preferida, el aminoácido es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina y lisina.

[0088] En la forma de realización más preferida, el aminoácido es al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: valina, isoleucina y leucina.

[0089] Un amino muy pertinente aquí es leucina.

[0090] Como sabe la persona experta, las células vegetativas de bacillus pueden producir una cantidad más alta de más de un aminoácido, tal como por ejemplo una cantidad más alta de dos o tres o más aminoácidos diferentes.

Ensayo de aminoácido

[0091] Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo de aminoácido del punto (ii) del primer aspecto se basa en elementos estándar disponibles comercialmente (tales como por ejemplo medios estándar, prueba estándar).

[0092] Por consiguiente, basándose en la descripción del ensayo detallado aquí (ver por ejemplo, el ejemplo 2 aquí), la persona experta es capaz de repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si una célula vegetativa específica de *Bacillus subtilis* de interés cumple con la cantidad de aminoácidos producidos como se describe en el punto (ii).

[0093] Ejemplo práctico 2 aquí proporciona una descripción detallada de un ensayo de aminoácidos.

Las condiciones detalladas de este ejemplo 2 son aquí un ensayo de aminoácido preferido para determinar si una célula vegetativa de bacillus de interés cumple con el criterio del punto (ii) del primer aspecto.

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

[0094] En relación con el punto (ii) del primer aspecto, las células vegetativas de *Bacillus subtilis* preferiblemente producen al menos un aminoácido esencial en una cantidad de al menos 2 veces más de la célula de Bacillus de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

[0095] En una forma de realización más preferida, en relación con el punto (ii) del primer aspecto, las células vegetativas de *Bacillus subtilis* preferiblemente producen al menos un aminoácido esencial en una cantidad de al menos 4 veces más de la célula de Bacillus de referencia DSM 19467 bajo las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

Método para alimentar/administrar esporas de bacillus a un animal

[0096] Como se ha dicho anteriormente, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para alimentar un animal que comprende administrar la composición de *Bacillus subtilis* del primer aspecto y formas de realización aquí descritas relacionadas con un animal conjuntamente con otros ingredientes de pienso para animales.

[0097] El animal puede ser cualquier animal de interés.

Preferiblemente, el animal es un animal seleccionado del grupo que consiste en aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, pescado y animales domésticos.

[0098] Cuando se administra el GalliPro® según la técnica, normalmente se hace en una dosis de alrededor de  $10^4$ - $10^8$  CFU/g de pienso, comúnmente  $10^5$ - $10^6$  CFU/g de pienso o en dosis equivalentes a la ingesta normal de pienso/kg de peso del animal vivo.

[0099] Alternativamente, las esporas de bacillus se pueden administrar al animal en una de las siguientes vías:

- (1): poner en el agua potable para animales;
- (2): pulverizar sobre animales; o
- (3): aplicar vía pasta, gel o bolo.

Método para la selección y aislamiento de una célula de bacillus nueva

[0100] Como se ha dicho anteriormente, el tercer aspecto se refiere a un método para la selección y aislamiento de una célula de *Bacillus subtilis* nueva.

[0101] En el método del tercer aspecto, se selecciona para una célula de *Bacillus subtilis* capaz de satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

[0102] Como sabe la persona experta, la resistencia a la bilis descrita aquí detallada específica y los parámetros de

ensayo de cantidad de aminoácido (ver por ejemplo, el ejemplo 1 aquí para el ensayo de resistencia a la bilis y ejemplo 2 aquí para el ensayo de aminoácidos) se pueden cambiar para hacer un método de filtración alternativo que aún así consigue los objetivos principales como se describe en este caso, es decir, una célula de *Bacillus subtilis* que es capaz de satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

5 [0103] En una forma de realización preferida, el ensayo de resistencia a la bilis del ejemplo 1 se usa en el paso (a) del método de selección del tercer aspecto y el ensayo de aminoácido esencial del ejemplo 2 se usa en el paso (c) del método de selección del tercer aspecto.

10 [0104] En el paso (d) del método de selección del tercer aspecto, se aísla una célula de *Bacillus subtilis* vegetativa. Esta célula de *Bacillus subtilis* vegetativa se puede utilizar para hacer esporas de bacillus.

[0105] Por consiguiente, el método de selección del tercer aspecto se puede seguir por un paso extra (e), donde la célula vegetativa de *Bacillus subtilis* aislada del paso (d) se fermenta para hacer de  $10^5$  a  $10^{12}$  células vegetativas de *Bacillus subtilis* y estas  $10^5$  a  $10^{12}$  células vegetativas de *Bacillus subtilis* se usan para hacer  $10^5$  a  $10^{12}$  células de espora de *Bacillus subtilis*, que se aíslan para dar una composición de *Bacillus subtilis*, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus subtilis*.

15 El resultado final de la etapa (e) es una composición de *Bacillus subtilis* nueva, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus subtilis* y donde las células de *Bacillus subtilis* son capaces de satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

[0106] Por consiguiente, una composición de *Bacillus subtilis*, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espora de *Bacillus subtilis* capaces de satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto puede ser obtenida por el método de selección del tercer aspecto.

25 [0107] En el paso (b) del método de selección del tercer aspecto se hacen mutaciones de célula de *Bacillus subtilis* anteriormente seleccionadas resistentes a la bilis para seleccionar cepas que producen altas cantidades de aminoácidos en el paso (c).

30 Como entiende la persona experta, esta puede por ejemplo por mutación tradicional (por ejemplo, por tratamientos químicos o UV) de intercambio específico de genes hacer un denominado organismo genéticamente modificado (GMO).

Cepas depositadas

35 [0108] Una muestra de la cepa de *Bacillus subtilis* ha sido depositada en la colección alemana DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) bajo el número de registro DSM 19467 con una fecha de depósito de 27 de junio de 2007.

40 El depósito se ha realizado bajo las condiciones del tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines de procedimiento de patente.

## Ejemplos

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

45 Medio:

[0109] El medio fue un medio de Caldo de Infusión de Ternera (VIB) disponible comercialmente no selectivo estándar (Difco, 234420).

50 En la fecha de depósito de la presente solicitud, el catálogo de producto ("Difco™/BBL™ Manual) del proveedor BD Diagnostic Systems (ww.bd.com) indica en relación al Caldo de Infusión de Ternera:

"Infusión de magro de ternera y peptona proporciona nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos al medio de infusión de ternera. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico de las formulaciones"; y

55 El medio se preparó según la producción de instrucciones por la suspensión de 25 g del polvo de Caldo de Infusión de Ternera en 1 L de agua purificada (2,5 % de solución) y se calienta con una agitación frecuente y ebullición durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.

Una solución del 2,5 % de Caldo de Infusión de Ternera comprendido por litro:

Carne de magro de ternera, infusión: 10 g

Proteosa Peptona: 10 g

Cloruro sódico 5 g

60 [0110] El medio fue distribuido en botellas esterilizadas y sometidas a autoclave durante 15 min a 121 °C.

Soluciones/medio de sal de bilis:

65 [0111] La mezclas de sales de bilis fueron preparadas imitando la composición fisiológica y concentración de sales de bilis en la bilis de cerdo y las sales de bilis fueron disueltas en el medio de Caldo de Infusión de Ternera como se

preparan arriba para dar una concentración final de sal de bilis de 8 mM.

Las sales de bilis conjugadas fueron taurodesoxicolato (Sigma T-0875, EEUU) y glicodeoxicolato (Sigma G-9910, EEUU) y el deoxicolato de sal de bilis desconjugada (Sigma D-5670 EEUU) y la solución final 8 mM de salina de bilis mezclada contenía 60 % del taurodesoxicolato, 30 % del glicodeoxicolato y 10 % de deoxicolato.

5 Antes de esterilizarlas durante 15 minutos a 121 °C, las soluciones se ajustaron a pH 7,4 utilizando hidróxido sódico. Los medios preparados de sal de bilis de 8 mM fueron diluidos para obtener concentraciones de sal de bilis de 0, 1, 2, 4, 6 y 8 mM.

10 [0112] Las sales de bilis fueron añadidas al medio de Caldo de Infusión de Ternera en una forma concentrada.

[0113] Por consiguiente, la cantidad final de infusión de magro de ternera, proteosa peptona y cloruro sódico fueron esencialmente con respecto al 2,5 % de medio de Caldo de Infusión de Ternera antes de que las sales de bilis fueran adicionadas.

15 Suspensiones de esporas

[0114] Para distinguir entre células vegetativas y esporas y para asegurar productos de spora puros para inoculación, las cuentas de spora del producto de bacillus fueron determinadas utilizando +/- tratamiento térmico a 80 °C durante 10 min. Después del tratamiento térmico y enfriamiento posterior de la cámara temperatura, las diluciones seriadas con un factor de dilución de 10 se dirigieron al agua de peptona de solución salina.

20 Se inocularon duplicados de placas de agar-sangre triptosa (Difco 0232-01) con 0,1 ml de las diluciones de decimal apropiadas.

Las placas fueron incubadas a 37 °C hasta el día siguiente.

25 Basadas en determinaciones de cuenta de spora precedentes de los productos, se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada esterilizada para alcanzar una concentración de spora calculada final de  $10^8$  UFC/ml.

Las cuentas de células vegetativas y esporas en los inóculos finales fueron determinadas utilizando el método anteriormente descrito.

La concentración final de  $10^8$  UFC/mL correspondía a un inicio  $OD_{630}$  a 0,2-0,3.

30 Medición de crecimiento: mediciones de densidad óptica

[0115] Se utilizaron las placas del pocillo de microtitulación con la parte plana de abajo esterilizada 96 (Greiner Bio-one GmbH, Alemania).

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

[0116] Para evitar la condensación en el interior de la cubierta de la placa, las tapas fueron expuestas a una solución diluida de Tritón X-100.

40 [0117] La germinación y crecimiento cinético de cepas de Bacillus fueron medidas utilizando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 630 nm ( $OD_{630}$ ) (Bio-tek Instruments, Inc. VE).

Las lecturas se realizaron con intervalos de 10 minutos y se analizaron utilizando el software KC4™ (Bio-tek Instruments, Inc. USA).

45 Después de 20 h, los datos fueron exportados a hojas de cálculo de Excel® para otro análisis, importados en versión SAS 9.0 y analizados estadísticamente.

### Ejemplo 2: ensayo de aminoácido

50 [0118] El método para medir y cuantificar los aminoácidos producidos por las células de bacillus usadas en este estudio es un método GC-MS estándar para muestras acuosas, usando cloroformato de metilo como agente de derivatización.

Crecimiento de células de Bacillus

55 [0119] Las células de bacilos se inoculan y crecen en uno o más medios de crecimiento de sales mínimo a 37 °C, 150 r.p.m. y crecen durante 2 días y cantidad de aminoácido luego se mide en el sobrenadante como se describe abajo.

60 [0120] Las células de bacillus se propagan en un medio de sales mínimas, según Chapman (1972) con la composición siguiente:

$(NH_4)_2SO_4$  (Merck 1.01217.1000) 1 g/l  
 $K_2HPO_4$  (Merck 1.05101.1000) 7 g/l  
 $KH_2PO_4$  (Merck 1.04873.1000) 3 g/l  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck 1.05886.1000) 0,1 g/l

65

## ES 2 613 805 T3

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

[0121] La incubación está hecha en tubos con 10 ml de medio durante 2 días a 37 °C y 150 r.p.m.

5 Ensayo de aminoácido

[0122] El ensayo de aminoácido se realiza en sobrenadantes celulares, ya que los aminoácidos se segregan a los medios.

10 Las muestras se filtran estériles y se mantienen a -20 °C hasta el análisis.

[0123] Reactivos:

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

Reactivo 2: metanol/piridina 32/8 (v/v) (*Catalizador*)

15 Reactivo 3: Cloroformato de metilo p.a. (MCF) (*agente de derivatización*)

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

[0124] Preparación de la muestra:

• Pipeta 150 µl (25 µl + 125 µl MQW) muestra en frasco de inyección de 2 ml.

• Añadir 150 µl IS

• Añadir 200 µl 1-Metanol/piridina 32/8 % (v/v). Mezclar bien.

• Añadir 25 µl MCF (metilo cloroformato).

• Mezclar bien hasta que se produzca el desarrollo del gas.

• Añadir 500 µl 1 % MCF/CHCl<sub>3</sub> (v/v), tapar y mezclar enérgicamente.

25 La fase de separación se produce en minutos.

Si la fase de separación es demasiado lenta, centrifugar el frasco (500 rpm/10 min).

[0125] Si la norvalina se usa como antimetabolito, en su lugar debería usarse un estándar externo u otro estándar interno adecuado y el 150 µl IS sustituido con el MQW o muestra.

[0126] Las muestras se realizan en GC-MS con una columna y protocolo de aminoácido estándar.

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

35 [0127] La célula de *Bacillus* de inicio fue la célula de *Bacillus subtilis* GalliPro®.

[0128] GalliPro® fue mutagenizada para obtener una agrupación de células nuevas de *Bacillus* individuales.

Las esporas se hicieron y se seleccionaron por una germinación y crecimiento rápidos de espora a célula vegetativa en presencia de un medio de sal de bilis que comprende 4 y 6 mM de sal de bilis como se describe en ejemplo 1 de arriba.

[0129] Célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467 fue seleccionada.

[0130] La tabla 1 de abajo muestra los datos de germinación y crecimiento.

45 [0131] Tiempo (horas) de 10<sup>8</sup> UFC/mL correspondientes a OD 0,2-0,3 hasta OD 0,4 se alcanza (medio de 3 réplicas).

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

50 [0132] Algunos de los datos de este ejemplo se realizaron por la prueba de sobreexpresión de fitasa DSM 19489. De no ser por el resultado técnico de este ejemplo, esto es aquí relativamente irrelevante, ya que DSM 19467 tiene una germinación y crecimiento aproximadamente como DSM 19489. Ver PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 para detalles adicionales.

55 Conclusión

[0133] DSM 19467 es una cepa resistente a la bilis y que claramente germina y crece más rápido que GalliPro®.

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

[0134] La célula de Bacillus de inicio fue la célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467 seleccionada en el ejemplo 3.

5 [0135] La DSM 19467, bien tipo salvaje o mutantes producidos por, por ejemplo, mutagénesis de UV creció en sales mínimas de medio agar, descritas en el ejemplo 2B de arriba y le fue añadido un 1,5 % de agar, que contiene análogos de aminoácido en cantidades inhibitorias adecuadas.

10 Dependiendo del aminoácido que se va a sobreexpresar, varios análogos de aminoácido podrían ser usados, por ejemplo, norvalina o 4-aza-DL-leucina para la sobreproducción de leucina (Bardos, 1974, Topics in Current Chemistry 52,63-98).

Colonias resistentes al análogo de aminoácidos fueron escogidas, crecidas en medio de sales mínimo y ensayadas para la producción de aminoácido.

Las células vegetativas fueron seleccionadas para producir una cantidad alta de aminoácidos usando el método GC-MS descrito en ejemplo 2B de arriba.

15 Se seleccionó una célula de *Bacillus subtilis* de alta producción de aminoácidos.

Resultados de mediciones de aminoácidos

20 [0136] Se seleccionó un número de cepas que producían leucina de aminoácido esencial en una cantidad que era significativamente superior a la célula de Bacillus de referencia DSM 19467.

[0137] Un número de cepas seleccionadas produjeron al menos 5 veces más leucina que DSM 19467.

Conclusiones:

25 [0138] Este ejemplo muestra que uno puede - basándose en las instrucciones de aquí - seleccionar e identificar una cepa rutinariamente, que produce al menos un aminoácido esencial (aquí ejemplificado por leucina) en una cantidad que fue significativamente superior a la célula de Bacillus de referencia DSM 19467.

30 [0139] DSM 19467 es originaria de GalliPro® y no se selecciona para la alta producción de aminoácidos esenciales. Por consiguiente, se cree que GalliPro® produce aproximadamente la misma cantidad de aminoácidos esenciales como DSM 19467.

**Ejemplo 5:** "control" de resistencia a la bilis de células de bacillus de alta producción de aminoácidos esenciales.

35 [0140] Las células de bacillus de alta producción de aminoácidos esenciales seleccionados en el ejemplo 4 se controlaron de nuevo por su capacidad de germinación y crecimiento rápidos de espora a células vegetativas como se describe en el ejemplo 1.

40 [0141] Los resultados son que estas - como estaba previsto - mantuvieron aproximadamente la misma buena germinación y crecimiento rápidos como la célula de inicio DSM 19467 usada para obtener estos.

Referencias

- 45 [0142]  
1. Antonie van Leeuwenhoek. 2006 Aug; 90(2): 139-46.  
Epub 2006 Jul 4  
2. US2003/0124104A  
3. US6255098  
50 4. PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1

## REIVINDICACIONES

1. Composición de *Bacillus subtilis*, que comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de espора de *Bacillus subtilis*, donde la composición de *Bacillus subtilis* **se caracteriza por el hecho de que:**
- 5 (i): las esporas de *Bacillus subtilis* tienen una germinación y crecimiento rápidos de espора a célula vegetativa en presencia de un medio de sal de bilis que comprende 4 mM de sales de bilis y en presencia de un medio de sal de bilis que comprende 6 mM de sales de bilis, definido por el hecho de que las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan un punto de crecimiento de célula vegetativa de 0,4 OD<sub>630</sub> dentro de menos de 18 y 19 horas, respectivamente, donde el punto de crecimiento de célula vegetativa es el punto en la curva de crecimiento
- 10 donde el valor OD comienza a aumentar (debido a crecimiento de las células vegetativas) en un cierto sentido continuo y alcanza un OD<sub>630</sub> de 0,4;
- (I): donde el medio de sal de bilis es el medio de Caldo de Infusión de Ternero no selectivo (VIB) del ejemplo 1 aquí suplementado con una mezcla de sal de bilis que comprende el taurodesoxicolato de sales de bilis conjugadas y glicodeoxicolato y el deoxicolato de sal de bilis desconjugada en las proporciones 60 % del
- 15 taurodesoxicolato, 30 % del glicodeoxicolato y 10 % de deoxicolato; y
- (II): donde el análisis de ensayo OD se realiza por los pasos siguientes:
- (a): rellenar un pocillo en una placa de microtitulación con 0,150 ml medio de sal de bilis con  $10^8$  esporas de *Bacillus subtilis* por ml medio (es decir, este es tiempo cero); y
- 20 (b): incubar la placa a 37 °C bajo condiciones atmosféricas y medir los valores OD<sub>630</sub>, utilizando un espectrofotómetro y con agitación antes cada lectura, para obtener una curva de crecimiento representativa a lo largo del tiempo;
- y
- (ii) las células vegetativas de *Bacillus subtilis* producen una enzima o un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina,
- 25 histidina y arginina;
- y con la condición de que las células vegetativas de *Bacillus subtilis* no son células, como se describe en la reivindicación 1 de PCT/EP2008/057296 y la solicitud de prioridad de esta, EP07111 939.0, publicada como EP2011858A1, donde las células vegetativas de bacillus del punto (ii) según la reivindicación 1 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858 A1
- 30 producen fitasa en una cantidad de al menos 1,25 veces más de la célula de *Bacillus* de referencia DSM 19467, donde la cantidad de fitasa producida se mide por el ensayo de fitasa del ejemplo 2 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1 después de 4 horas de crecimiento a 37 °C en el medio de Caldo de Infusión de Corazón (HIB) no selectivo del ejemplo 2 de PCT/EP2008/057296 y EP2011858A1, y
- donde el análisis de ensayo de fitasa se realiza por los pasos siguientes:
- 35 (a): hacer un cultivo de células vegetativas de bacillus durante toda la noche en un medio de cultivo enriquecido;
- y
- (b): transferir un 1 % de inóculo del cultivo a un medio HIB (es decir, este es tiempo cero) durante toda la noche e incubar a 37 °C hasta la medición de actividad de fitasa.
- 40 2. Composición de *Bacillus subtilis*, según la reivindicación 1, donde las células de espора de *Bacillus subtilis* de la composición están presentes como células de espора secas (por ejemplo, secado por atomización).
3. Composición de *Bacillus subtilis*, según la reivindicación 1 o 2, donde las esporas de *Bacillus subtilis* alcanzan el punto de crecimiento de célula vegetativa al menos 3 horas antes que las células de esporas de *Bacillus subtilis* de referencia depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") bajo las condiciones del punto (i) según la reivindicación 1.
- 45 4. Composición de *Bacillus subtilis*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las células vegetativas de *Bacillus subtilis* del punto (ii) según la reivindicación 1 producen enzimas o aminoácidos en una cantidad que es superior a la célula de *Bacillus subtilis* de referencia DSM 19467, donde la célula vegetativa y la célula de *Bacillus subtilis* de referencia DSM 19467 crecen bajo condiciones idénticas.
- 50 5. Composición de *Bacillus subtilis*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la enzima del punto (ii) según la reivindicación 1 es mananasa.
- 55 6. Composición de *Bacillus subtilis*, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde las células vegetativas de *Bacillus subtilis* del punto (ii) según la reivindicación 1 producen al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina en una cantidad que es superior a la célula de *Bacillus subtilis* de referencia DSM 19467, donde la cantidad de aminoácido producida se mide por el ensayo de aminoácidos basado en el método estándar GC-MS del ejemplo
- 60 2 de aquí después de dos días de crecimiento a 37 °C en el conocido medio de crecimiento de sales mínimas estándar del ejemplo 2 de aquí.
7. Método para alimentar a un animal que comprende la administración de la composición de *Bacillus subtilis*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, a un animal conjuntamente con otros ingredientes de pienso para animales.
- 65 8. Método para alimentar un animal, según la reivindicación 7, donde el animal es un animal seleccionado del grupo

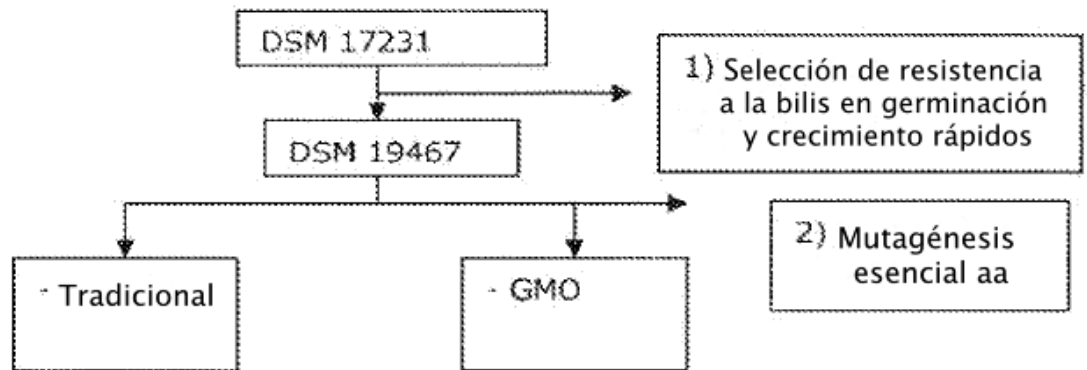
que consiste en aves, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, peces y animales domésticos.

9. Método para la selección y aislamiento de una célula de *Bacillus subtilis* que comprende los pasos siguientes:

- 5 (a): selección y aislamiento de una agrupación de células de espora de *Bacillus subtilis* individuales una célula de espora de *Bacillus subtilis* que es capaz de germinar y crecer tan rápidamente que esta alcanza un punto de crecimiento de célula vegetativa dentro de menos de 18 y 19 horas bajo las condiciones de punto (i) según la reivindicación 1;
- 10 (b): realización de una célula de *Bacillus subtilis* vegetativa de la célula de espora aislada del paso (a) y mutación de la célula seleccionada y aislada para obtener una agrupación de células vegetativas de *Bacillus subtilis* individuales;
- 15 (c): selección y aislamiento de un agrupamiento de células vegetativas de *Bacillus subtilis* individuales del paso (b) una célula vegetativa de *Bacillus subtilis* que es capaz de la producción de una enzima que no es fitasa o un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina de interés; y (d): análisis de la célula vegetativa de *Bacillus subtilis* de alta producción del paso (c) para confirmar que esta ha mantenido una germinación y crecimiento rápidos del paso (a) y aislamiento de la célula de *Bacillus subtilis* seleccionada.



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



## Figura 2A y 2B

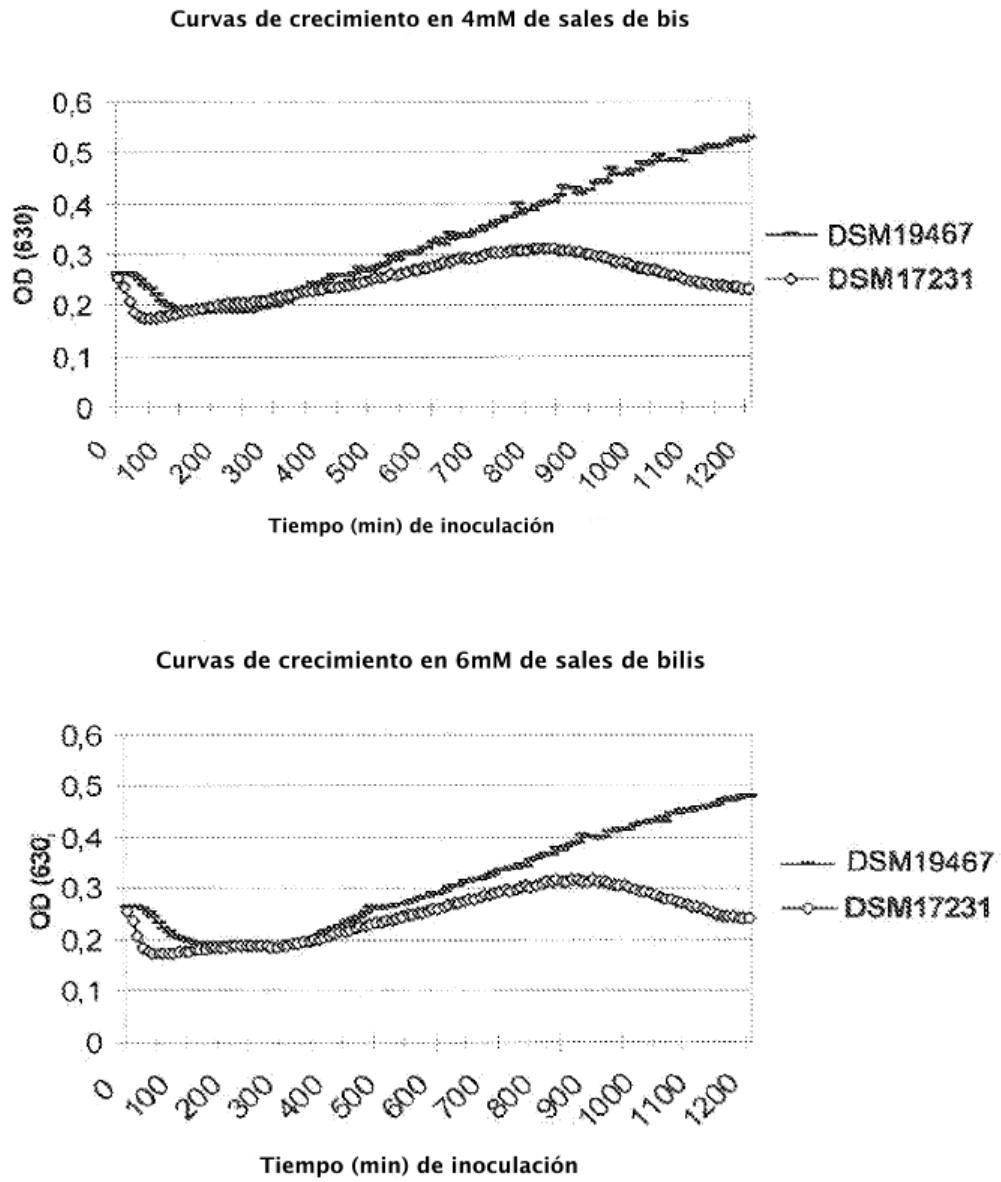


Figura 2A (4mM) y 2B (6mM). Tiempo (min) de  $10^8$  esporas/ml hasta OD 0.4<sub>630</sub> se alcanza