

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 438**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2014 PCT/US2014/015076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14124120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2014 E 14749483 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2954041**

54 Título: **Mezclas de compuestos germinativos de esporas secas**

30 Prioridad:

06.02.2013 US 201361849973 P

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

11.02.2019

73 Titular/es:

**ENVERA LIC, LLC (100.0%)
220 Garfield Avenue
West Chester, PA 19380, US**

72 Inventor/es:

HASHMAN, TOMMIE, EUGENE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 699 438 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

Mezclas de compuestos germinativos de esporas secas

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. Ser. No. 61/849,973 presentada el 6 de febrero de 2013, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

Campo de la invención

10 En un aspecto, la presente invención se dirige a una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, y procedimientos para preparar la mezcla. En otro aspecto, esta invención está dirigida a una composición que comprende dicha mezcla. La invención también se refiere en general a procedimientos para aumentar la germinación, el crecimiento, el metabolismo y/o la actividad enzimática de las esporas bacterianas, que comprende preparar una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido.

Antecedentes de la invención

15 El uso de bacterias formadoras de esporas, incluidas ciertas cepas de *Bacillus* como probióticos para humanos y animales, se ha vuelto frecuente en los últimos años. Como se señala en Knap et al. (WO 2010/070005) especies como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se utilizan como suplementos en la alimentación animal para promover el crecimiento al aumentar la digestión y la disponibilidad de nutrientes de la alimentación animal. *Bacillus coagulans* es el ingrediente activo de los productos probióticos comerciales para consumo humano, que ayudan a la digestión de proteínas, lactosa y fructosa.

20 Como se señala en Maathuis et al. (2010, Beneficial Microbes, 1(1): 31-36) tales bacterias deben estar presentes en el intestino delgado en su forma germinada o vegetativa para funcionar como probióticos. Si bien estos microbios son resistentes tanto al ácido estomacal como a las sales biliares en su forma de esporas, son susceptibles a tales ambientes en sus estados vegetativos. Por lo tanto, si se emplean en su estado vegetativo, las cepas de *Bacillus* deben estar contenidas dentro de un portador "entérico" resistente a los ácidos farmacéuticamente aceptable. Ver el párrafo 7 de Farmer (Solicitud de Patente de EE.UU. 2003/0124104).

25 Desafortunadamente, es difícil formular especies de *Bacillus* en su forma vegetativa de modo que posean una vida útil adecuada. Como se señala en la literatura de productos GanedenBC, los probióticos vegetativos tradicionales no sobreviven al calor y la presión en el proceso de fabricación, mueren rápidamente en el estante y son sensibles a los ácidos estomacales y las enzimas biliares en el intestino. En contraste, las formulaciones de tales especies en su forma de esporas son mucho más adecuadas para el uso comercial y práctico. Así, como lo señalan Cartman et al. (2008, Applied and Environmental Microbiology, Aug., p. 5254-5258) "las esporas bacterianas son particularmente adecuadas para su uso como productos microbianos vivos, ya que son metabólicamente latentes y altamente resistentes al estrés ambiental. Estas propiedades intrínsecas son altamente deseables desde una perspectiva comercial y significan que los productos basados en esporas tienen una larga vida útil y conservan su viabilidad durante la distribución y el almacenamiento".

35 El uso de ciertos compuestos, particularmente ciertos L-aminoácidos, para estimular la germinación de las esporas de *Bacillus* se ha descrito en la literatura. Así, por ejemplo, Foerster et al. (1966, Journal of Bacteriology 91(3): 1168-1177 describe que la adición de L-alanina a las suspensiones de esporas en soluciones acuosas causará la germinación de varias especies de *Bacillus*. Además, Maathuis et al. citado anteriormente, sugiere que las esporas de *Bacillus coagulans* en GanedenBC podrían activarse para germinar al comienzo del intestino delgado al ingerirlas junto con una dieta que contenga L-alanina, o al incluir L-alanina con tales esporas en una formulación en polvo. Sin embargo, los enfoques sugeridos por Maathuis presentan varios desafíos importantes para establecer un cultivo bacteriano probióticamente eficaz:

45 1) Si bien las esporas de *Bacillus coagulans* empleadas en GanedenBC son en gran medida resistentes al bajo pH en el estómago, la exposición a tales ácidos podría conducir a un retraso en la germinación cuando dichas esporas entran en un pH más neutral. Por ejemplo, Blocher et al. (1985, Applied and Environmental Microbiology 50(2): 274-279) demostró que se inhibió la germinación de las esporas de *B. cereus* a pH 4.5, incluso en presencia de los compuestos germinativos L-alanina o L-cisteína. Las esporas expuestas secuencialmente a un tampón de pH 4.5 seguido de un tampón de pH 7,0 pudieron germinar tras la exposición a tales L-aminoácidos, pero mostraron un retraso en el compromiso de germinar. Cualquier retraso sustancial en la germinación es altamente indeseable, dado el período relativamente corto de tiempo que las esporas pueden estar presentes en el intestino delgado antes de ser excretadas. Esto es particularmente cierto en animales más pequeños, como los polluelos, que tienen tiempos de tránsito de aproximadamente 1.5 horas cuando tienen 1 día de vida y menos de 2 horas cuando tienen 7 días (vea *B. C. Watson* y otros (2006, Poultry Science 85: 493-497) y camarón, que tienen un tiempo de tránsito de menos de 90 minutos (véase Beseres et al., 2005, Journal of Shellfish Research 24(1): 301-308). Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de acelerar y aumentar la germinación de las esporas bacterianas en condiciones de exposición a pH bajo, como las que se encuentran en el estómago.

2) Las dietas altas en L-alanina también pueden ser altas en D-alanina. Según lo observado por Atluri et al. (2006, Journal of Bacteriology 188 (1): 28-36), y Blocher et al. (citado anteriormente), la D-alanina es un poderoso inhibidor de la germinación de *Bacillus*. Además, puede haber grandes cantidades de otros inhibidores de la germinación (por ejemplo, otros D-aminoácidos, ácidos orgánicos e inorgánicos, ácidos grasos y sales biliares) presentes en el intestino delgado que podrían competir con la L-alanina si se mezclan en forma de polvo con esporas de *Bacillus*. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento para mejorar la germinación de esporas en presencia de inhibidores de la germinación que puedan competir con los compuestos germinativos.

Por consiguiente, un objeto de esta invención es proporcionar una formulación de esporas bacterianas que sea capaz de proporcionar tales beneficios.

Sumario de la invención

Se ha encontrado sorprendentemente que la germinación, el crecimiento, el metabolismo y la actividad enzimática de las esporas bacterianas se incrementan a través de la formación de una mezcla íntima de la espora bacteriana y un L-aminoácido. Inesperadamente, la mezcla íntima también aumenta la germinación y el crecimiento de las esporas bacterianas en la presencia de inhibidores de la germinación.

En un aspecto, la presente invención se dirige a una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en el que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición que comprende una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en la que la espora bacteriana y el compuesto germinativo se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo, el procedimiento que comprende:

a) preparar una solución que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido; y

b) secar la solución para obtener una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en el que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un ambiente propicio para la germinación

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la germinación, el crecimiento, el metabolismo y/o la actividad enzimática de las esporas bacterianas, que comprende:

a) preparar una solución que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido; y

b) secar la solución para obtener una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en el que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación de las esporas bacterianas; y

c) exponer la mezcla íntima a un ambiente propicio para la germinación de las esporas bacterianas, en el que la germinación, el crecimiento, el metabolismo y/o la actividad enzimática de las esporas bacterianas en la mezcla íntima aumenta en relación con una formulación de esporas bacterianas correspondiente que carece de un compuesto germinativo.

Descripción detallada de la invención

Las mezclas de esta invención comprenden una espora bacteriana y un L-aminoácido como compuesto germinativo. Las especies bacterianas empleadas pueden ser cualquier especie que forme esporas, y es típicamente una que muestra una actividad probiótica deseable en seres humanos o animales. Sin embargo, también pueden emplearse especies bacterianas que tienen otras aplicaciones industriales, incluidas aquellas útiles en agricultura, remediación ambiental, producción de compost o metano, productos de limpieza y similares. Dichas especies incluyen miembros formadores de esporas de filum Firmicutes y miembros formadores de esporas del filum Actinobacteria como se menciona en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Segunda Edición (2009), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los miembros del filum Firmicutes incluyen especies aerobias formadoras de esporas (generalmente definidas previamente como especies de *Bacillus*) y especies anaerobias formadoras de esporas (definidas generalmente de manera general como especies de *Clostridium*). Especies ilustrativas del filum Firmicutes incluyen *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B.*

weihenstephanensis, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei* y *Pasteuria nishizawa*, así como las variantes modificadas genéticamente de dichas especies. Las especies preferidas incluyen *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *C. butyricum*. Los miembros del filum *Actinobacteria* incluyen especies de *Streptomyces*, así como variantes genéticamente modificadas de tales especies. Las especies preferidas incluyen *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus*, y *Streptomyces aureofaciens*.

Los compuestos germinativos son L-aminoácidos que incluyen L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina, L-fenilalanina y análogos de los mismos. Dichos análogos pueden ser creados por un experto en la técnica haciendo sustituciones en o dentro de grupos de una química básica. Así, por ejemplo, los análogos de L-alanina incluyen: L-Leu-L-Ala, L-Ala-L-Leu, L-Pro-L-Ala, L-Ala-L-Pro, a-L-Glu-L-Ala, L-Ala-L-Glu, L-His-L-Ala, L-Ala-L-His, L-Ala-L-Ala, Gly-L-Ala, L-Ala-Gly, sal de N42-metilsulfonil) etiloxicarbonilo L-alanina dicitclohexilamonio (N-MSOC-L-Ala), Nt-butoxicarbonil-L-alanina (N-t-BOC-L-Ala), N-acetil-L-alanina (N-Ac-L-Ala), N-2,4-dinitrofenil-L-alanina (N-DNP-L-Ala), Ncarbобензоxi-L-alanina (N-CBZ-L-Ala), sal de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonil-L-alanina ciclohexilamina (N-dansil-L-Ala), N-benzoil-L-alanina (N-Bz-L-Ala), clorhidrato de éster metílico de L-alanina, clorhidrato de éster etílico de L-alanina, clorhidrato de éster t-butílico de L-alanina, clorhidrato de éster bencilico de L-alanina, L-alaninamida, clorhidrato de L-alanina p-nitroanilida y L-alaninol. En una realización, el compuesto germinativo es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina. Preferiblemente, dicho compuesto germinativo es L-alanina.

Las combinaciones de esporas bacterianas/compuestos germinativos particularmente preferidas incluyen

L-alanina + *Bacillus subtilis*, L-alanina + *Bacillus licheniformis*, L-alanina + *Bacillus pumilus*, L-alanina + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-alanina + *Bacillus coagulans*, L-alanina + *Bacillus cereus*, L-alanina + *Bacillus clausii*, L-alanina + *Clostridium butyricum*, L-valina + *Bacillus subtilis*, L-valina + *Bacillus licheniformis*, L-valina + *Bacillus pumilus*, L-valina + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-valina + *Bacillus coagulans*, L-valina + *Bacillus cereus*, L-valina + *Bacillus clausii*, L-valina + *Clostridium butyricum*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus licheniformis*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus pumilus*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus coagulans*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus cereus*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus clausii*, L-alanina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Clostridium butyricum*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus subtilis*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus licheniformis*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus pumilus*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus coagulans*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus cereus*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Bacillus clausii*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones de potasio (GFK) + *Clostridium butyricum*, L-alanina + inosina + *Bacillus subtilis*, L-alanina + inosina + *Bacillus licheniformis*, L-alanina + inosina + *Bacillus pumilus*, L-alanina + inosina + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-alanina + inosina + *Bacillus coagulans*, L-alanina + inosina + *Bacillus cereus*, L-alanina + inosina + *Bacillus clausii*, L-alanina + inosina + *Clostridium butyricum*, L-prolina + glucosa + *Bacillus megaterium*, L-prolina + *Bacillus megaterium*, y L-lactato + *Clostridium butyricum*.

En ciertas realizaciones, las mezclas preferidas de la presente invención incluyen aquellas en las que la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.

El compuesto germinativo está presente en una cantidad suficiente para hacer que germinen las esporas bacterianas empleadas. Aunque esto puede determinarse fácilmente para cualquier mezcla particular de espora bacteriana/compuesto germinativo por experimentación rutinaria, tales compuestos germinativos se formulan típicamente, antes del secado, a concentraciones de 0,0001 mg/ml a 170 mg/ml. En algunas realizaciones, los compuestos germinativos se formulan, antes del secado, en concentraciones de 0,0003 mg/ml a 170 mg/ml, 0,0003 mg/ml a 30 mg/ml, 0,001 mg/ml a 100 mg/ml o 0,001 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización preferida, el compuesto germinativo se formula, antes del secado, a concentraciones de 0,001 mg/ml a 1 mg/ml.

Como se emplea en este documento, el término "mezcla íntima" se refiere a una mezcla en la que las esporas y los compuestos germinativos se mantienen en una posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación.

Dicha mezcla íntima se puede lograr empleando procesos como el secado por pulverización, el secado por liofilización, el secado al aire o el secado con tambor. En una realización preferida, la mezcla íntima se produce por secado por pulverización o por liofilización. Al formar tales mezclas íntimas, es importante que la espora y el

compuesto germinativo no se mezclen en condiciones que permitan que el compuesto germinativo haga que la espora germine, ya que esto podría causar una germinación prematura con un efecto adverso sobre la vida de almacenamiento de la mezcla. Esto puede evitarse empleando corrientes separadas en un secador por pulverización, ya sea utilizando dos boquillas o una sola boquilla que permita la pulverización simultánea de dos corrientes separadas; o por liofilización bajo condiciones (por ejemplo, temperaturas) que no son propicias para la germinación. La germinación prematura también se puede evitar introduciendo la masa de esporas en una solución que contenga el compuesto germinativo inmediatamente antes del secado.

En una realización preferida, el L-aminoácido es adsorbido o absorbido por la espora bacteriana en la mezcla íntima. En una realización adicional, la espora bacteriana y el L-aminoácido se dispersan finamente en toda la mezcla íntima. En una realización adicional más, las esporas bacterianas y el L-aminoácido se dispersan microscópicamente por toda la mezcla íntima, de modo que las partículas individuales que consisten esencialmente en esporas bacterianas y partículas individuales que consisten esencialmente en compuestos germinativos no son visibles a simple vista.

En una realización, la mezcla íntima se prepara combinando las esporas bacterianas y el L-aminoácido en una solución antes del secado. Preferiblemente, la espora bacteriana y el compuesto germinativo se combinan en una solución inmediatamente antes del secado.

Si bien no se desea mantener ninguna teoría, se cree que la formación de una mezcla íntima coloca el compuesto germinativo en una posición próxima donde puede unirse más preferiblemente a los sitios iniciadores de germinación de la espora cuando la mezcla alcanza un ambiente apropiado para germinación. Dicha posición próxima permite que el compuesto germinativo supere a los compuestos que interfieren en la germinación (como los D-aminoácidos) que pueden estar presentes, con el resultado de que se germinarán mayor porcentaje de esporas. Debido al crecimiento logarítmico de las bacterias una vez que entran en la etapa vegetativa; un porcentaje tan elevado puede dar como resultado rápidamente un aumento de varios registros en la formación de cultivos.

La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una mezcla íntima que comprende (a) una espora bacteriana y (b) un L-aminoácido, en la que la espora y el L-aminoácido se mantienen en una forma inactiva de modo que el L-aminoácido no induzca la germinación de la espora hasta que dicha composición se someta a un entorno de activación.

Como se emplea en este documento, el término "entorno de activación" se refiere a un entorno que permite que el compuesto germinativo y la espora interactúen, de manera que la espora es inducida a entrar en un estado vegetativo. Dicho entorno de activación puede involucrar una combinación de factores tales como temperatura, humedad, pH o salinidad.

La formación de una mezcla íntima de un compuesto germinativo y una espora bacteriana puede mejorar la utilidad de las esporas bacterianas al aumentar uno o más rasgos de interés de las esporas bacterianas, que incluyen, pero no se limitan a la germinación, el crecimiento, el metabolismo, la actividad enzimática y la tolerancia a tensiones ambientales tales como bajo pH, alta concentración de sal y exposición a metales tóxicos. En algunas realizaciones, la mezcla íntima aumenta el rasgo de interés en al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 % en relación con correspondiente formulación de esporas bacterianas que carece de un compuesto germinativo.

Con el fin de mejorar aún más la germinación, se prefiere que la espora se choque antes de la formación de la mezcla íntima. Las esporas pueden ser impactadas en una variedad de procedimientos estándar, por ejemplo, choque osmótico, choque térmico, choque por presión, privación de nutrientes y/o exposición a ciertos ácidos. El choque térmico implica calentar las esporas durante un período de tiempo suficiente a una temperatura suficiente para inducir la producción de proteínas de choque térmico. Atluri et al., Citado anteriormente, describe uno de estos tratamientos de choque térmico para *Bacillus subtilis*.

Las composiciones de esta invención comprenden una mezcla íntima que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido. Dichas composiciones pueden comprender además componentes adicionales, incluidos cogermiñantes, nutrientes y adyuvantes de formulación (por ejemplo, tensioactivos y/o recubrimientos entéricos) dependiendo de su uso previsto.

Los cogermiñantes que pueden emplearse incluyen nucleósidos de purina tales como inosina o adenosina, sales, azúcares (tales como glucosa y fructosa), y similares; todos los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica.

También se pueden incluir nutrientes, incluyendo dextrosa, almidones y micronutrientes que ayudarán en la multiplicación de colonias bacterianas una vez que las esporas hayan germinado.

Cuando la composición está pensada para su uso como probiótico, el uso de un recubrimiento entérico se emplea preferiblemente para evitar el retraso en la germinación de las esporas asociada con la exposición de las esporas a ambientes de pH bajo. Dicho recubrimiento entérico está diseñado para resistir la solución en el estómago y disolverse en el fluido intestinal neutro o alcalino. Dicho recubrimiento puede ser sensible al pH, por ejemplo, no se

disuelve en un ambiente ácido como se encuentra en el estómago, pero se disuelve en un ambiente neutro como se encuentra en el intestino delgado. Alternativamente, el recubrimiento entérico puede disolverse cuando se expone a un evento metabólico específico, como un encuentro con una enzima digestiva que se encuentra en el intestino delgado. Por ejemplo, el recubrimiento es digerido por una enzima pancreática como la tripsina, la quimotripsina o una lipasa pancreática. La digestión o disolución del recubrimiento permite que la espora de *Bacillus*/compuestos germinativos entren en un ambiente propicio para la germinación de las esporas.

Los materiales de recubrimiento entérico que pueden emplearse son conocidos en la técnica e incluyen alginatos, ácido málico-1,2-diol-propano; derivados de celulosa, por ejemplo, ftalato de acetato de celulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP); ftalato de acetato de celulosa, ftalato de poli vinil acetato, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y polímeros aniónicos de ácido metacrílico y metacrilato de metilo; y una emulsión acuosa de copolímero de ácido metilacrílico etilacrilato o acetato de succinato de hidroxipropil metil celulosa (HPMAS).

Cuando se emplean en usos agrícolas o industriales, tales composiciones pueden comprender además ayudas de formulación estándar tales como tensioactivos, emulsionantes, otros ingredientes activos, etc., siempre y cuando tales otros componentes no interfieran con la germinación o afecten adversamente la viabilidad de las esporas germinadas. Por ejemplo, se sabe que los compuestos fenólicos que de otra manera no son particularmente esporocidas inhiben la germinación en concentraciones tan bajas como 0,2 % (fenol), 0,08 % (cresol) y 0,02 % (clorocresol) (peso/vol). Otros compuestos que pueden inhibir la germinación también son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, A. D. Russell, *Bacterial Spores and Chemical Sporicidal Agents*, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 1990, p. 99-119.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, el procedimiento comprende:

a) preparar una solución que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido; y

b) secar la solución para obtener una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo, en el que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un ambiente propicio para la germinación.

En una realización preferida, el secado en el procedimiento mencionado anteriormente es secado por pulverización, secado por liofilización, secado por aire o secado por tambor. En otra realización preferida, la espora en el procedimiento mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. Pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y *Streptomyces spp.*

En una realización preferida adicional, la espora en el procedimiento mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo en el procedimiento mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.

El compuesto germinativo en el procedimiento mencionado anteriormente puede formularse, antes del secado, a concentraciones de 0,0001 mg/ml a 170 mg/ml. En algunas realizaciones del procedimiento mencionado anteriormente, los compuestos germinativos se formulan, antes del secado, a concentraciones de 0,0003 mg/ml a 170 mg/ml, 0,0003 mg/ml a 30 mg/ml, 0,001 mg/ml a 100 mg/ml, o 0,001 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización preferida del procedimiento mencionado anteriormente, el compuesto germinativo se formula, antes del secado, a concentraciones de 0,001 mg/ml a 1 mg/ml. En una realización preferida del procedimiento mencionado anteriormente, la espora se ha impactado.

La invención también proporciona una mezcla íntima seca producida por los procedimientos mencionados anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la germinación, el crecimiento, el metabolismo y/o la actividad enzimática de las esporas bacterianas, que comprende:

a) preparar una solución que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido; y

b) secar la solución para obtener una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en el que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación de las esporas bacterianas; y

c) exponer la mezcla íntima a un ambiente propicio para la germinación de las esporas bacterianas, en el que la germinación, el crecimiento, el metabolismo y/o la actividad enzimática de las esporas bacterianas en la mezcla íntima aumenta en relación con una formulación de esporas bacterianas correspondiente que carece de L-aminoácido.

5 En algunas realizaciones del procedimiento mencionado anteriormente, la mezcla íntima aumenta el rasgo de interés en al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 % relativos a una formulación de esporas bacterianas correspondiente que carece de un L-aminoácido. En una realización preferida del procedimiento mencionado anteriormente, el porcentaje de germinación, crecimiento, metabolismo y/o actividad enzimática de las esporas bacterianas en la mezcla íntima se incrementa en al menos un 10 % con respecto a la formulación de esporas bacterianas correspondiente que carece de un L-aminoácido. En una realización preferida adicional del procedimiento mencionado anteriormente, el secado es secado por pulverización, secado por liofilización, secado al aire o secado en tambor.

15 En ciertas realizaciones, la espora en el procedimiento mencionado anteriormente se selecciona del grupo que consiste en *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y *Streptomyces spp.* En una realización preferida, la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.

20 En una realización preferida, el compuesto germinativo en el procedimiento mencionado anteriormente se formula, antes del secado, a concentraciones de 0,0001 mg/ml a 170 mg/ml. En algunas realizaciones del procedimiento mencionado anteriormente, los compuestos germinativos se formulan, antes del secado, a concentraciones de 0,0003 mg/ml a 170 mg/ml, 0,0003 mg/ml a 30 mg/ml, 0,001 mg/ml a 100 mg/ml, o 0,001 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización preferida del procedimiento mencionado anteriormente, el compuesto germinativo se formula, antes del secado, a concentraciones de 0,001 mg/ml a 1 mg/ml. En una realización preferida adicional del procedimiento mencionado anteriormente, la espora se ha impactado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar más la invención, pero no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

35 En los siguientes ejemplos, los términos "GOSD" y "GO+" se refieren a las composiciones en las que un optimizador germinativo (L-alanina a menos que se especifique lo contrario) se secó por pulverización con la especie *Bacillus* particular indicada. Las esporas de las especies de *Bacillus* se secaron por pulverización, introduciéndose L-alanina en la masa de la espora inmediatamente antes del secado por pulverización en forma de una solución que contenía 0,044 gramos de alanina por mililitro de agua destilada.

40 El término "GO-" se refiere a composiciones en las que la especie *Bacillus* se secó por aspersión de manera similar sin que estuviera presente un compuesto germinativo.

45 Además, se empleó el siguiente procedimiento para determinar la germinación de las esporas en los siguientes ejemplos, a menos que se indique lo contrario. Cuando las esporas se colocan en soluciones nutritivas y comienzan a germinar, liberan ácido dipicolínico e iones, lo que produce un oscurecimiento. Este indicador de germinación resulta en una disminución de la extinción óptica de la luz visible por una suspensión de esporas. Por lo tanto, la velocidad de germinación se determinó contando la proporción de esporas oscuras/brillantes de fase, y monitorizando la disminución en la densidad óptica a 600 nm (O.D. 600) de suspensiones de esporas en germinación bajo un espectrofotómetro visible en u.v. Esto luego se convierte en porcentaje de germinación.

Ejemplo 1: Aumento de la germinación de *B. subtilis* ENV 923 en una mezcla íntima con L-alanina

50 Con el fin de comparar la velocidad de germinación de las esporas de mezclas íntimas de esta invención con la de las esporas mezcladas convencionalmente con un germinante, se realizaron los siguientes tratamientos:

55 A. Formación de una mezcla íntima: Las esporas de *B. subtilis* ENV 923 se secaron por pulverización y se introdujo L-alanina en la masa de la espora inmediatamente antes del secado por pulverización en forma de una solución que contenía 0,044 gramos de alanina por mililitro de agua destilada. La mezcla íntima producida se germinó por introducción subsiguiente en una solución que consiste en tampón de fosfato 0,01 M en agua destilada con pH resultante 7 y se calibró a una O.D. de partida 600 de 0,6.

B. Mezcla convencional de esporas con un germinante: Las esporas de *B. subtilis* ENV 923 se secaron por pulverización y posteriormente se introdujeron en una solución que consistía en tampón de fosfato 0,01 M en agua destilada con un pH resultante de 7. Las esporas se agregaron a la solución tampón para calibrar a una O.D. de partida 600 de 0.6. Se añadió alanina a la solución a una concentración de 0,0001 gramos de alanina por mililitro de solución.

C. Germinación de esporas solas: Las esporas de *B. subtilis* ENV 923 se secaron por pulverización y posteriormente se introdujeron en una solución que consistía en tampón de fosfato 0,01 M en agua destilada con un pH resultante de 7 y se calibraron a una O.D de partida 600 de 0,6.

Se realizaron dos repeticiones de cada uno de dichos tratamientos. La Tabla 1 a continuación muestra los resultados promedio de dichos tratamientos que afectan la germinación de *B. subtilis* ENV 923, medido por una caída porcentual en la densidad óptica. Una caída en la densidad óptica indica progresión de la germinación. La densidad óptica (OD) se midió a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro de rango visible Jenway Modelo 6320D. La L-alanina utilizada fue del 99 % de pureza y se obtuvo de Alfa Aeser; Heysham, Lancashire, Reino Unido.

Tabla 1 Reducción porcentual de la línea de base OD (600 nm) a lo largo del tiempo.

Tiempo de muestra (minutos)	0	5	10	15	20
Mezcla íntima	0 %	2,7 %	17,7 %	34,3 %	41,2 %
Mezcla convencional	0 %	0,5 %	18,8 %	31,9 %	33,7 %
Esporas Solas	0 %	1,3 %	3,2 %	4,1 %	7,5 %

Los resultados anteriores muestran que las esporas en las mezclas íntimas de esta invención germinan más rápidamente que las esporas que no se mezclan íntimamente con el mismo germinante. Las esporas mezcladas con germinantes mostraron una germinación mucho mayor que las esporas solas.

Ejemplo 2: Aumento de la germinación de la cepa de *Bacillus subtilis* ENV 923 tratada con GOSD

Las esporas de *Bacillus subtilis* se trataron con GOSD a través de esporas de secado por aspersión en presencia de una solución de L-alanina y los niveles de germinación se determinaron mediante lecturas de densidad óptica (OD).

Tampón de fosfato de potasio 0,01 M, pH 7

El tampón de fosfato de potasio 0,01 M se preparó utilizando soluciones de K_2HPO_4 1M (87,09 g disuelto en 0,5L de agua destilada) y KH_2PO_4 1M (68,045 g disuelto en 0,5l de agua destilada). Combinando 61,5 ml de K_2HPO_4 1M con 38,5 ml de KH_2PO_4 1M y diluyendo a 1000 ml con agua destilada, se preparó tampón de fosfato de potasio 0,1M a pH 7,0. Diluyendo adicionalmente el tampón de fosfato de potasio 0,1M con agua destilada en la proporción 1:10, se obtuvo el tampón de fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0. El tampón se esterilizó en autoclave a 121 °C durante sesenta (60) minutos.

Las suspensiones de esporas de *Bacillus subtilis* se prepararon a la concentración de $1,7 \times 10^8$ ufc/ml en tampón de fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0, se incubaron en el baño de agua precalentada a 37 °C y se evaluó el porcentaje de germinación en intervalos de 5 minutos durante un periodo de 45 minutos.

Tabla 2

% de Germinación de <i>Bacillus subtilis</i> ENV923 a 37°C con y sin tratamiento GOSD										
Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
<i>B. subtilis</i> GOSD	0	13 %	45 %	63 %	64 %	75 %	76 %	80 %	81 %	83 %
<i>B. subtilis</i> Control	0	7 %	9 %	10 %	11 %	14 %	14 %	16 %	18 %	19 %

Conclusión: el tratamiento con GOSD mejoró significativamente el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación de las esporas de *Bacillus subtilis*.

Ejemplo 3: Aumento de la germinación de la cepa de *Bacillus licheniformis* ENV100 tratada con GOSD

5 Las esporas de *Bacillus licheniformis* se trataron con GOSD a través de esporas de secado por pulverización en presencia de 0,044 gramos de L-alanina por ml de agua destilada como se describe en el Ejemplo 1. Los niveles de germinación se determinaron mediante lecturas de densidad óptica (OD) como se describió anteriormente utilizando un tampón de fosfato potásico 0,01 M, pH 7,0 para la preparación de la suspensión de esporas.

10 Las suspensiones de esporas de *Bacillus licheniformis* se prepararon a la concentración $1,29 \times 10^8$ ufc/ml en tampón de fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0, se incubaron en un baño de agua precalentado a 37 °C y se evaluaron para determinar el porcentaje de germinación en intervalos de cinco (5) minutos durante un período de cuarenta y cinco (45) minutos.

Tabla 3

% de germinación de suspensiones de esporas de <i>Bacillus licheniformis</i> tratadas y no tratadas										
Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
<i>B. licheniformis</i> , control	0	1 %	5 %	3 %	10 %	11 %	10 %	10 %	10 %	10 %
<i>B. licheniformis</i> , GOSD	0	4 %	5 %	39 %	60 %	81 %	85 %	88 %	91 %	91 %

15 Conclusión: el tratamiento con GOSD mejoró significativamente el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación de las esporas de *Bacillus licheniformis*.

Ejemplo 4: Aumento de la germinación en diversos niveles de pH para la cepa de *Bacillus subtilis* ENV923 tratada con GOSD

20 Las esporas de la cepa ENV923 GO+ y GO- de *Bacillus subtilis* se prepararon como se describió anteriormente y se resuspendieron en tampón de fosfato de potasio 0,01 M a diversos niveles de pH. Las mediciones de OD₆₀₀ se realizaron como se describe anteriormente.

Tampones de fosfato de potasio 0.01M a pH 3.0-7.0

Tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0 se preparó como se describe en el Ejemplo 1.

25 • Para preparar 0,01M de tampones de fosfato de potasio con un rango de pH de 3,0 a 6,0 como base se usó un tampón de fosfato de potasio 0,1M, con un pH de 6,0 mezclando 13,2 ml de K₂HPO₄ 1M y 86,8 ml de soluciones de KH₂PO₄ 1M (descritas en el Ejemplo 1) y llevar el volumen a 1 L con agua destilada.

• Para obtener tampones de fosfato de potasio 0,01 M con pH 5,0 a pH 3,0, tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0 se diluyó con agua destilada, el pH de los tampones se redujo a pH 5,0, pH 4,0 y pH 3,0 utilizando H₂PO₄ 1M y se llevó a volumen final con agua destilada manteniendo una relación de tampón 0,1 M a agua destilada 1:10.

30 Los tampones preparados se almacenaron a 4 °C y, antes de cada experimento, el pH de los tampones se volvió a ajustar utilizando NaOH 1 M o H₂PO₄ 1 M.

Tabla 4 Resultados de la germinación con GOSD (GO+) y sin GOSD (GO-) a diversos niveles de pH, la tabla muestra el porcentaje de germinación medido a intervalos de 5 minutos.

Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
GO + pH 7	0	8 %	48 %	69 %	80 %	84 %	88 %	90 %	91 %	92 %
GO-pH 7	0	3 %	3 %	8 %	10 %	11 %	13 %	14 %	16 %	16 %
GO + pH 6	0	4 %	40 %	58 %	69 %	75 %	77 %	78 %	81 %	82 %

(continuación)

Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
GO - pH 6	0	1 %	4 %	5 %	9 %	8 %	11 %	13 %	12 %	12 %
GO + pH 5	0	7 %	24 %	34 %	39 %	41 %	43 %	45 %	46 %	46 %
GO - pH 5	0	4 %	4 %	5 %	5 %	6 %	6 %	7 %	7 %	7 %
GO + pH 4	0	5 %	23 %	28 %	30 %	31 %	33 %	32 %	33 %	34 %
GO - pH 4	0	3 %	4 %	5 %	4 %	4 %	5 %	3 %	4 %	4 %
GO + pH 3.5	0	5 %	11 %	16 %	18 %	18 %	18 %	18 %	20 %	20 %
GO - pH 3.5	0	2 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	2 %	0 %	1 %
GO + pH 3	0	11 %	16 %	19 %	19 %	22 %	21 %	22 %	21 %	22 %
GO - pH 3	0	4 %	4 %	4 %	5 %	2 %	3 %	4 %	2 %	4 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus subtilis* germinen más rápido y superen los efectos de los niveles más bajos de pH.

- 5 **Ejemplo 5:** Aumento de la germinación de la cepa de *Bacillus subtilis* ENV923 tratada con GOSD. Respuesta de la germinación de esporas como afectada por los diversos niveles de temperatura. La tabla muestra el porcentaje de germinación medido a intervalos de 10 minutos

10 Las cepas de *Bacillus subtilis* ENV 923 GOSD y control se prepararon como se describió anteriormente. La germinación de las esporas se probó a través de mediciones de densidad óptica (OD) como se describe anteriormente. Se prepararon suspensiones de esporas para mediciones de OD₆₀₀ y se enfriaron a 4 °C en tampón de fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0 (tampón de fosfato, preparación de pH 7,0) a la concentración de 1,7 x 10⁸ ufc/ml. Para cada suspensión de esporas se prepararon 3 tubos de cultivo llenos hasta un volumen de 3 ml. Tras la agitación y la medición inicial de OD₆₀₀, los tubos se incubaron en baños de agua precalentados a 25 °C, 30 °C y 37 °C durante 120 min. A intervalos de 10 minutos, los tubos se agitaron y se tomaron las mediciones de OD₆₀₀.

15 **Tabla 5** Porcentaje de germinación de *Bacillus subtilis* con GO- y GO+ a 37°C, 30°C y 25°C.

Minutos	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
GO+, 37°C	0	36 %	58 %	63 %	68 %	70 %	70 %	71 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %
GO+, 30°C	0	12 %	32 %	45 %	52 %	55 %	58 %	59 %	58 %	60 %	60 %	60 %	60 %
GO+, 25°C	0	1 %	9 %	16 %	23 %	28 %	32 %	33 %	35 %	37 %	36 %	35 %	35 %
GO-, 37°C	0	1 %	4 %	6 %	7 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %
GO-, 30°C	0	0 %	2 %	3 %	4 %	6 %	6 %	7 %	7 %	8 %	9 %	8 %	7 %
GO-, 25°C	0	0 %	2 %	3 %	4 %	5 %	7 %	8 %	8 %	9 %	10 %	10 %	10 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD (GO+) permite que las esporas de *Bacillus subtilis* germinen más rápido y superen los efectos de los regímenes de temperaturas más bajas.

Ejemplo 6: Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones molares de NaCl

Medio:

5 El medio era un caldo de soja tríplico diluido (mTSB) (BD, 211822). El medio se preparó suspendiendo 50 mg de polvo de caldo de soja Tríplico en 1 l de agua con calor y agitación hasta que se disolvió completamente. Luego se dividió en alícuotas en botellas y se sometió a autoclave durante 30 minutos a 121°C. Según el contenido de polvo informado por el fabricante, el medio mTSB contenido por litro:

Digestión pancreática de caseína: 28,3 mg

Digestión pápica de soja: 5,0 mg

10 Dextrosa: 4,2 mg

Cloruro de sodio: 8,3 mg

Fosfato Dipotásico: 4,2 mg

15 Se añadió cloruro de sodio (Amresco X190) para inducir estrés osmótico cuando fue apropiado, de modo que las concentraciones finales fueron de 0,5 M o 1,5 M (29,22 g/l y 87,66 g/l respectivamente) antes de que el medio se calentara y se sometiera a autoclave.

Suspensiones de esporas:

20 Los polvos de esporas de la cepa ENV 100 de *Bacillus licheniformis* tratados o no tratados con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de una jarra de licuadora estéril. Las esporas se suspendieron mezclando durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieran visualmente de manera completa. Esto se realizó de tal manera que la concentración final en la jarra de la licuadora fue de 1×10^{10} ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250 μ l a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para dar una concentración final de 5×10^8 ufc/ml. Estas concentraciones están determinadas por las optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para lograr un OD600 inicial de aproximadamente 0,6.

25 Ensayo de germinación OD:

30 Los tubos que contenían las esporas suspendidas se agitaron inmediatamente, se midieron a OD600 para el punto cero de tiempo y se incubaron en un baño de agua a 37 °C. A intervalos de tiempo respectivos, se registró el tiempo, se extrajeron los tubos, se agitaron, se midieron a OD600 y se devolvieron al baño de agua. El porcentaje de disminución en OD600 se determinó restando el valor medido del punto de tiempo cero, dividido por el punto de tiempo cero y multiplicado por 100 %. Anteriormente se documentó que la germinación completa correspondía a un porcentaje de disminución de OD600 del 60 %. Por lo tanto, el porcentaje de germinación se determinó multiplicando el porcentaje de OD600 por 1,67.

Tabla 6 % germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* durante una hora con GOSD (GO+) y sin (GO-) en la presencia de soluciones 0,5 molar y 1,5 molar de NaCl.

Tiempo	GO+ 0M	GO-0M	GO+ 0,5M	GO- 0,5M	GO+ 1,5M	Go-1,5M
0:00	0	0	0	0	0	0
0:11	7 %	0 %	29 %	1 %	15 %	2 %
0:16	23 %	0 %	49 %	0 %	30 %	0 %
0:22	44 %	3 %	61 %	0 %	44 %	0 %
0:27	53 %	0 %	67 %	0 %	48 %	0 %
0:32	59 %	0 %	70 %	1 %	53 %	0 %

35

(continuación)

Tiempo	GO+ 0M	GO-0M	GO+ 0,5M	GO- 0,5M	GO+ 1,5M	Go-1,5M
0:38	64 %	0 %	74 %	1 %	56 %	0 %
0:43	68 %	0 %	75 %	0 %	58 %	0 %
0:49	71 %	0 %	77 %	0 %	61 %	0 %
0;55	72 %	0 %	77 %	2 %	63 %	0 %
1:01	75 %	0 %	78 %	2 %	66 %	0 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus licheniformis* germinen más rápido y superen los efectos del estrés osmótico de diversos niveles de sal (NaCl).

- 5 **Ejemplo 7:** Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones de cobre en partes por millón.

Medio:

10 El medio mTSB se preparó como anteriormente, pero se complementó con NaCl hasta una concentración final de 50 mM para crear un medio osmóticamente equilibrado. Se preparó una solución madre de nitrato de cobre (II) hemi(pentahidrato) (Alfa Aesar 12523) de 1×10^5 ppm suspendiendo 2 g en 20 ml de agua y filtrando a $0,22 \mu\text{m}$. Esto se agregó a las alícuotas de mTSB para alcanzar concentraciones finales de 0,50, 100 y 200 ppm.

Suspensiones de esporas:

15 Los polvos de esporas de la cepa de *Bacillus licheniformis* ENV 100 tratados o no tratados con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de una jarra de licuadora estéril. Las esporas se suspendieron al mezclar durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieran visualmente de manera completa. Esto se realizó de tal manera que la concentración final en la jarra de la licuadora fue 2×10^9 ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250 μl a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para dar una concentración final de 1×10^8 ufc/ml. Estas concentraciones están determinadas por las optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para
20 lograr un OD600 inicial de aproximadamente 0,6.

Ensayo de germinación OD: Realizado y calculado como se indica en el Ejemplo 6.

Tabla 7 Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* durante una hora con GOSD (GO+) y sin (GO-) en la presencia de soluciones de iones de cobre de 0, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm.

Tiempo	GO+0 ppm	GO-0 ppm	GO+50 ppm	GO-50 ppm	GO+100 ppm	GO-100 ppm	GO+200 ppm	GO-200 ppm
0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00
0:05	3,1 %	0,6 %	7,7 %	1,5 %	7,8 %	1,4 %	5,0 %	2,8 %
0:11	19,8 %	1,1 %	14,3 %	2,0 %	12,5 %	1,9 %	9,0 %	4,6 %
0:16	34,1 %	2,2 %	25,2 %	2,0 %	16,7 %	3,3 %	11,5 %	4,6 %
0:21	40,9 %	4,4 %	30,7 %	1,5 %	19,3 %	5,1 %	14,0 %	4,6 %
0:26	47,7 %	4,4 %	34,0 %	2,0 %	18,2 %	5,1 %	15,0 %	6,5 %
0:31	50,2 %	4,4 %	38,4 %	1,5 %	21,9 %	5,6 %	15,0 %	5,6 %

(continuación)

Tiempo	GO+0 ppm	GO-0 ppm	GO+50 ppm	GO-50 ppm	GO+100 ppm	GO-100 ppm	GO+200 ppm	GO-200 ppm
0:36	50,8 %	4,4 %	38,9 %	0,5 %	20,8 %	6,1 %	17,0 %	6,0 %
0:41	52,0 %	3,3 %	40,6 %	1,5 %	21,4 %	6,5 %	18,0 %	5,6 %
0:47	55,8 %	3,9 %	45,0 %	3,0 %	26,0 %	7,5 %	20,0 %	6,0 %
0:53	57,0 %	2,8 %	44,4 %	2,5 %	25,5 %	8,4 %	19,5 %	6,0 %
0:58	57,6 %	3,9 %	45,5 %	3,0 %	25,0 %	8,4 %	20,5 %	6,9 %
1:04	60,1 %	4,4 %	45,0 %	1,0 %	24,5 %	8,4 %	21,0 %	4,6 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus licheniformis* germinen más rápido y superen los efectos del estrés de varios niveles de iones de cobre.

- 5 **Ejemplo 8:** Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes partes por millón de soluciones de aluminio

Medio:

10 El medio mTSB se preparó como anteriormente, pero se complementó con NaCl hasta una concentración final de 50 mM para crear un medio osmóticamente equilibrado. Se preparó una solución madre de 1000 ppm de Al^{3+} suspendiendo 0,62 g de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 14 H_2O$ (Alfa Aesar 12362) en 50 ml de agua y filtración de 0,22 μm . Esto se agregó a las alícuotas de mTSB para alcanzar concentraciones finales de 0, 0,25, 0,50 y 1,0 ppm. El pH del medio se redujo luego a pH 4,5 mediante la adición de HCl para permitir la separación completa del ion Al^{3+} .

Suspensiones de esporas:

15 Los polvos de esporas de la cepa de *Bacillus licheniformis* ENV 100 tratados o no tratados con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de una jarra de licuadora estéril. Las esporas se suspendieron mezclando durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieran visualmente. Esto se realizó de tal manera que la concentración final en la jarra de la batidora fue de 1×10^{10} ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250 μl a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para dar una concentración final de 5×10^8 ufc/ml. Estas concentraciones están determinadas por las optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para lograr un OD600 inicial de aproximadamente 0,6.

Ensayo de germinación OD: Realizado y calculado como en el Ejemplo 6.

Tabla 8 Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* en una hora con GOSD (GO+) y sin (GO-) en presencia de 0, 0,25 ppm, 0,50 ppm y 1,0 ppm soluciones de iones de aluminio.

Tiempo	GO+0 ppm	GO-0 ppm	GO+0,25 ppm	GO-0,25 ppm	GO+0,50 ppm	GO-0,50 ppm	GO+1,00 ppm	GO-1,00 ppm
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0
0:07	21 %	2 %	9 %	1 %	26 %	2 %	30 %	3 %
0:14	48 %	3 %	47 %	4 %	50 %	4 %	52 %	3 %
0:22	62 %	3 %	60 %	5 %	63 %	4 %	63 %	4 %
0:30	67 %	2 %	66 %	4 %	67 %	4 %	67 %	3 %

25

(continuación)

Tiempo	GO+0 ppm	GO-0 ppm	GO+0,25 ppm	GO-0,25 ppm	GO+0,50 ppm	GO-0,50 ppm	GO+1,00 ppm	GO-1,00 ppm
0:37	70 %	3 %	68 %	5 %	70 %	4 %	70 %	3 %
0:44	71 %	3 %	69 %	4 %	71 %	4 %	71 %	3 %
0:52	72 %	3 %	70 %	4 %	72 %	5 %	71 %	3 %
0:59	72 %	3 %	70 %	5 %	74 %	6 %	73 %	4 %
1:07	72 %	3 %	72 %	5 %	74 %	5 %	72 %	4 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite esporas de *Bacillus licheniformis* para germinar más rápido y superar los efectos del estrés de varios niveles de iones de aluminio.

- 5 **Ejemplo 9:** Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones milimolares de sales biliares

Medio:

10 El medio mTSB se preparó como anteriormente, pero se complementó con NaCl hasta una concentración final de 50 mM para crear un medio osmóticamente equilibrado. Se preparó una solución madre de sales biliares 80 mM mediante la suspensión de 2,5 g de taurodeoxicolato de sodio (Sigma T0875), 1,1 g de glicodeoxicolato de sodio (Sigma G9910) y 0,346 g de deoxicolato de sodio (Sigma D5670) en 100 ml de agua y filtración de 0,22 µm. Esto se agregó a las alícuotas de mTSB para alcanzar concentraciones finales de 0, 4, 6 y 8 mM.

Suspensiones de esporas:

15 Los polvos de esporas de la cepa ENV 100 de *Bacillus licheniformis* tratados o no tratados con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de una jarra de licuadora estéril. Las esporas se suspendieron mezclando durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieran visualmente de manera completa. Esto se realizó de tal manera que la concentración final en la jarra de la licuadora fue de 1×10^{10} ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250 µl a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para dar una concentración final de 20 5×10^8 ufc/ml. Estas concentraciones están determinadas por las optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para lograr un OD600 inicial de aproximadamente 0,6.

Ensayo de germinación OD:

Realizado y calculado como arriba.

- 25 **Tabla 9** Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* en una hora con GOSD (GO+) y sin (GO-) en presencia de soluciones de sales biliares 0, 4 mM, 6 mM y 8 mM.

Tiempo	GO+ 0mM	GO-0mM	GO+ 4mM	GO-4mM	GO+ 6mM	GO-6mM	GO+ 8mM	GO-8mM
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0
0:05	13 %	4 %	17 %	1 %	22 %	1 %	29 %	7 %
0:10	44 %	5 %	44 %	1 %	50 %	2 %	56 %	10 %
0:15	61 %	5 %	61 %	1 %	62 %	1 %	67 %	9 %
0:20	70 %	5 %	69 %	2 %	70 %	3 %	73 %	11 %
0:26	76 %	5 %	73 %	2 %	75 %	2 %	77 %	11 %

(continuación)

Tiempo	GO+ 0mM	GO-0mM	GO+ 4mM	GO-4mM	GO+ 6mM	GO-6mM	GO+ 8mM	GO-8mM
0:31	78 %	5 %	77 %	3 %	78 %	3 %	81 %	11 %
0:36	81 %	5 %	80 %	2 %	80 %	3 %	83 %	11 %
0:41	83 %	6 %	82 %	3 %	82 %	2 %	84 %	11 %
0:46	85 %	7 %	83 %	2 %	84 %	2 %	86 %	11 %
0:51	86 %	6 %	85 %	2 %	86 %	3 %	87 %	11 %
0:56	86 %	6 %	85 %	2 %	87 %	3 %	88 %	11 %
1:01	87 %	6 %	87 %	2 %	88 %	3 %	90 %	11 %
1:06	88 %	7 %	89 %	3 %	89 %	3 %	90 %	11 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus licheniformis* germinen más rápido y superen los efectos del estrés de varios niveles de sales biliares que se pueden encontrar en un tracto gastrointestinal.

Ejemplo 10: Crecimiento promedio de tres réplicas de *Bacillus licheniformis* con o sin GOSD en medio de fosfato de potasio definido y 2 % de glucosa

Las esporas de la cepa de *Bacillus licheniformis* ENV 431 GO+ se trataron con GOSD (procedimiento descrito anteriormente). Como control se utilizaron esporas de GO- del mismo cultivo que se secó por pulverización sin usar GOSD. La prueba de crecimiento se realizó en medio de sales mínimas suplementado con 2 % de glucosa.

Medio

El medio se preparó disolviendo (NH₄)₂SO₄ (1,26 g/l), MgCl₂ (0,81 g/l), CaCl₂ (0,15 g/l), NaCl (0,05 g/l) en agua destilada y agregando 1 ml/l 1000X Trace Mineral Mix (MnSO₄ (0,85 g/50 ml), ZnSO₄ (0,15 g/50 ml), FeSO₄·7H₂O (0,15 g/50 ml), hidrocloreuro de tiamina (0,05 g/50 ml). La solución preparada se vertió en matraces (90 ml/matraz) y se sometió a autoclave a 121 °C durante 40 min. Antes de la inoculación, el medio se complementó con 4 ml de solución esterilizada con filtro de fosfato de potasio 25x (K₂HPO₄ (3,44 g/50 ml), KH₂PO₄ (2,81 g/50 ml)) y 2 ml de 50x (100 g/200 ml) glucosa a 2 % de concentración final.

Crecimiento de las células de *Bacillus licheniformis*

La cantidad de esporas utilizadas para la inoculación se determinó utilizando los conteos de polvo de esporas GO- y GO+. Se prepararon suspensiones de esporas de la cepa ENV 431 de *Bacillus licheniformis* concentradas (1000X) mediante la mezcla de esporas en los recipientes de mezcla estériles con agua estéril y se agregaron a los matraces con medio a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla como 0 h. Los recuentos de cultivo inicial se obtuvieron realizando diluciones y recuentos en placa de suspensiones de esporas mezcladas. Se prepararon 3 matraces para cada muestra de esporas.

Los matraces se incubaron a 30 °C, 150 rpm y se cultivaron durante 48 h. Las muestras se tomaron y se realizó el recuento de placas a las 24 h y 48 h.

Tabla 10 Crecimiento promedio de tres réplicas de *Bacillus licheniformis* con GOSD (GO+) o sin GOSD (GO-) en medio de fosfato de potasio mínimo y 2 % de glucosa. Los datos mostrados están en ufc/ml.

	0 horas	24 horas	48 horas
B, licheniformis GO-	1,88x10 ³	2,20x10 ⁴	9,4x10 ⁴
B, licheniformis GO+	1,46x10 ³	7,95x10 ⁴	3,65x10 ⁵

Conclusión: GOSD el tratamiento mejoró significativamente la germinación y la tasa de crecimiento de *Bacillus licheniformis*.

Ejemplo 11: Crecimiento de *Bacillus licheniformis* en un período de dos días; Comparación de tratamientos con o sin GOSD en presencia de diferentes concentraciones de NaCl

5 Medio:

mTSB se preparó como se indicó anteriormente, pero con cloruro de sodio (Amresco X190) agregado para inducir estrés osmótico cuando sea apropiado, de modo que las concentraciones finales fueran 0, 0,5, 1,0 o 1,5 M (0, 29,22, 58,44 u 87,66 g/l respectivamente). El medio se calentó, se dividió en alícuotas en matraces y se sometió a autoclave.

10 Se preparó una placa de conteo de agar (PCA) (BD 247910) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 23,5 g de polvo suspendido en 1 L de agua, llevar a ebullición con agitación frecuente, alícuotas en frascos de vidrio y autoclave. Los recipientes de medios se enfriaron en un baño de agua a 45 °C hasta que se necesitaron. El fabricante del polvo reporta los siguientes contenidos para PCA por litro:

Digestión de caseína pancreática: 5,0 g

15 Extracto de levadura: 2,5 g

Dextrosa: 1,0 g

Agar: 15,0 g

Suspensiones de esporas:

20 Los polvos de esporas de la cepa ENV100 de *Bacillus licheniformis* tratados o no tratados con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de una jarra de licuadora estéril. Las esporas se suspendieron mezclando durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieran visualmente, seguidas de diluciones en serie en agua estéril. Esto se realizó de tal manera que la concentración final en los matraces de cultivo fue de 1×10^2 ufc/ml.

25 Cuantificación:

Los matraces se incubaron a 37 °C, agitando a 150 rpm durante 28 horas ("1 día") o 50 horas ("2 días"). Las partes alícuotas de cada matraz se diluyeron en serie en placas de Petri con PCA enfriado a <45 °C vertidas en la parte superior, se agitaron y se dejaron solidificar. Las placas se invirtieron y se incubaron durante aproximadamente 24 horas a 37 °C. Se contaron las colonias y se calcularon las concentraciones basándose en las diluciones.

30 Aproximadamente 10 µl de muestras de cada matraz también se sembraron en placas de PCA para probar la pureza.

Tabla 11 Crecimiento de *Bacillus licheniformis* tratado con GOSD (GO+) cuando se enfrenta a estrés osmótico de la solución salina.

Día	GO+ o -	Molar	ufc/ml
1	GO+	0	1,05E+06
1	GO-	0	7,33E+03
1	GO+	0,5	3,60E+06
1	GO-	0,5	5,00E+06

(continuación)

Día	GO+ o -	Molar	ufc/ml
1	GO+	1,0	3,00E+05
1	GO-	1,0	2,31E+05
1	GO+	1,5	1,22E+04
1	GO-	1,5	1,50E+02
2	GO+	0	8,17E+06
2	GO-	0	4,90E+05
2	GO+	0,5	7,03E+06
2	GO-	0,5	8,43E+06
2	GO+	1,0	2,07E+06
2	GO-	1,0	3,50E+06
2	GO+	1,5	4,33E+05
2	GO-	1,5	1,53E+02

Conclusión: El tratamiento con GOSD mejoró significativamente la germinación y el crecimiento de *Bacillus licheniformis* bajo estrés salino osmótico.

5 Ejemplo 12: Actividad de proteasa de la cepa de *Bacillus subtilis* ENV 923

Las esporas de la cepa ENV 923 de *Bacillus subtilis* tratadas con GOSD (GO+) como se describió anteriormente, y no tratadas (GO-) se usaron para la prueba de actividad de la proteasa.

Medio

10 Se usó medio de sal químicamente definido (CDSM) para la propagación celular en una prueba de proteasa. El medio se preparó disolviendo los componentes de la solución básica (g/l): (NH₄)SO₄, 1,26 g; ácido L-glutámico, 1,18 g; MgCl₂, 0,81; CaCl₂, 0,155 y 85 % de ácido L-láctico (0,530 ml/l) en agua destilada y agregando 1 ml/l de 1000X Trace Mineral Mix (g/50 ml). Los matraces con solución de base (48 ml/matraz) se sometieron a autoclave durante 40 min. Antes de la inoculación, 2 ml de solución de tampón 25X esterilizada con filtro preparada por separado con glucosa (g/50 ml): MOPS, 11,6; KH₂PO₄, 0,6; glucosa, se agregaron 4,5.

15 Crecimiento de células de *Bacillus subtilis* ENV923

20 La cantidad de esporas utilizadas para la inoculación se determinó utilizando los conteos de polvo de esporas GO- y GO+. Las suspensiones concentradas de esporas de la cepa ENV923 de *Bacillus subtilis* (1000X) se prepararon mezclando esporas en los frascos de licuadora estériles utilizando tampón de fosfato potásico 0,01 M estéril, pH 7,0 y se agregaron a los matraces a una concentración de aproximadamente 1×10⁴ ufc/ml. Los recuentos de cultivo inicial se confirmaron realizando diluciones y recuentos en placa de suspensiones de esporas mezcladas. Se prepararon 3 matraces para cada muestra de esporas. Los matraces se incubaron a 30 °C, 150 rpm, y se tomaron muestras a las 48 h.

Ensayo de actividad de proteasa

25 El ensayo de la actividad de la proteasa se llevó a cabo en sobrenadantes celulares utilizando caseína como sustrato y el reactivo de fenol de Folin y Ciocalteu que reacciona con la tirosina y facilita el desarrollo del color azul. La unidad de actividad proteasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µg de tirosina en un minuto. La cantidad de tirosina en los tubos de ensayo se determinó midiendo OD₆₅₀ en un espectrofotómetro Jenway 7305 y calculando la tirosina liberada utilizando una curva estándar.

Reactivos

Reactivo 1: tampón de fosfato potásico 0,05 M, pH 7,0

El tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0 (preparado como se describe en el Ejemplo 1) se diluyó a la relación 1:1 con agua destilada para obtener un tampón de fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0

Reactivo 2: Solución de caseína al 0,65 %

- 5 0,65 g de caseína se disolvieron en 80 ml de tampón de fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0, se calentaron para llevar la caseína a solución, y el volumen final se llevó a 100 ml con tampón de fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0.

Reactivo 3: 15 % de ácido tricloroacético (TCA)

15 g de TCA se disolvieron en agua destilada y el volumen final se llevó a 100 ml. Reactivo 4: 20 % Na₂CO₃ 20 g de Na₂CO₃ disuelto en agua destilada y volumen final llevado a 100 ml.

10 Ensayo de proteasa

- 10 ml de cultivo se centrifugaron y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,2 µm en tubos estériles.
 - 3 ml de sobrenadante filtrado se mezclaron con 3 ml de solución de caseína al 0,65 % y se pusieron en un baño de agua a 37 °C durante 1 h.
 - La reacción se detuvo añadiendo 6 ml de TCA al 15 % y las muestras se centrifugaron durante 5 min.
- 15 • 0,5 ml de cada muestra se mezcló con 1 ml de Na₂CO₃ al 20 %, seguido de 0,5 ml de la adición del reactivo de fenol de Folin & Ciocalleu e incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color azul.
- Se añadieron 3 ml de agua destilada a cada muestra y, después de mezclar, se midió el OD₆₅₀.
- 20 • Para calcular la actividad de la proteasa, se preparó la curva estándar para la tirosina obteniendo series de dilución de la tirosina disuelta en agua destilada, tratándolas en las mismas condiciones que las muestras de cultivo y midiendo OD₆₅₀.

Tabla 12 Producción de proteasa de *Bacillus subtilis* tratado con GOSD (GO+) versus control (GO-)

<i>Bacillus subtilis</i>			Unidades de actividad de proteasa
54 h		GO+	71.5
		GO-	40

- 25 Conclusión: El tratamiento de las esporas de *Bacillus subtilis* con GOSD permite una mayor producción de enzimas como la proteasa.

Ejemplo 13: Germinación de *Streptomyces viridochromogenes* en presencia de compuestos germinativos

- 30 Las esporas de *Streptomyces viridochromogenes* se recogieron de las placas vertiendo 10 ml de tampón TX (tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,3 con Tween 80 al 0,001 %) y eliminando las esporas con un algodón estéril. Las suspensiones de esporas de las placas se vertieron en tubos estériles de 50 ml. Cuando se obtuvieron suspensiones de esporas de todas las muestras, se realizó un choque térmico colocando los tubos con las suspensiones de esporas en un bloque de calor, permitiendo que la temperatura alcanzara los 55°C, y manteniendo la temperatura a 55°C durante 10 min. Después del choque térmico, las suspensiones de esporas se enfriaron en agua helada durante 5 minutos y se centrifugaron durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las esporas en 25 ml de tampón fosfato de potasio 0,02 M, pH 7,0 a 4 °C y se centrifugaron durante 15 min. Después de eliminar el sobrenadante, las esporas se resuspendieron en 20 ml de tampón de fosfato potásico 0,02 M, pH 7,0 y se mezclaron vigorosamente para obtener la suspensión de esporas que se utilizó en el experimento.

- 35 Las muestras se prepararon mezclando 1,5 ml de mezcla germinante 2X con 1,5 ml de suspensión de esporas. Todas las mezclas de germinantes se prepararon en agua destilada como soluciones de 2x50 ml. El cloruro de calcio se preparó como una solución de 100X (0,4 g/10 ml) y se agregaron 20 µl a 10 ml de mezclas de germinantes 2X. Las concentraciones finales de los compuestos germinativos fueron las siguientes: 0,89 mg/ml de L-alanina; 1,17 mg/ml de L-valina, 13,2 mg/ml de L-asparagina; 2,25 mg/ml de glucosa; y 2,25 mg/ml de fructosa. Después de medir la OD₆₀₀ inicial, las muestras se transfirieron a un baño de agua a 30°C y la OD₆₀₀ se midió a intervalos de 15 minutos durante 90 minutos para determinar las tasas de germinación.

Tabla 13 Reducción del % en la densidad óptica ENV 151 (*Streptomyces viridochromogenes*)

Ion/Tratamiento de germinante	0	15	30	45	60	75	90
0,01M KPO4	0	1,0 %	2,0 %	5,4 %	6,2 %	4,9 %	5,4 %
0,01M KPO4, CaCl ₂	0	7,3 %	3,4 %	6,1 %	6,1 %	8,0 %	9,3 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , L-Ala	0	1,8 %	5,2 %	12,2 %	11,9 %	14,2 %	17,6 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , L-Val	0	2,0 %	4,9 %	11,2 %	7,8 %	14,4 %	18,0 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , L-Asn	0	2,0 %	6,1 %	8,8 %	11,7 %	8,0 %	9,0 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , L-Ala, L-Asn	0	7,7 %	12,1 %	14,4 %	19,8 %	20,4 %	18,6 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , L-Ala, L-Asn, glucosa	0	8,2 %	11,7 %	14,5 %	20,1 %	19,4 %	20,7 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , glucosa	0	7,0 %	8,8 %	7,0 %	10,5 %	12,6 %	13,2 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , glucosa, fructosa	0	5,9 %	8,3 %	12,0 %	12,7 %	14,6 %	14,6 %
0,01M KPO4, CaCl ₂ , L-Ala, L-Asn, glucosa, fructosa	0	11,7 %	14,0 %	17,7 %	20,4 %	22,2 %	22,4 %

Conclusión: El tratamiento de las esporas de *Streptomyces viridochromogenes* con compuestos germinativos mejoró la germinación.

5 **Ejemplo 14:** Comparación de las tasas de germinación entre mezclas íntimas y la mezcla convencional de esporas bacterianas y compuestos germinativos

Para comparar la tasa de germinación de las esporas de mezclas íntimas con la de las esporas mezcladas convencionalmente con un germinante, se realizan los siguientes tratamientos:

10 A. Formación de una mezcla íntima: Esporas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus*, y *Streptomyces aureofaciens* se secan con L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina o L-fenilalanina introduciéndose en la masa de esporas inmediatamente antes del secado como una solución que contiene 0,044 gramos del aminoácido por mililitro de agua destilada. La mezcla íntima producida se germinó por introducción subsiguiente en una solución que consiste en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con un pH resultante de 7.

15 B. Mezcla convencional de esporas con un germinante: Esporas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus*, y *Streptomyces aureofaciens* se hidratan y se secan. Dichas esporas se germinan mediante la introducción en una solución que consiste en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH resultante 7 y 0,0001 gramos de L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina o L-fenilalanina por mililitro de solución.

20 C. Germinación de esporas solas: Esporas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*,

Streptomyces galbus, *Streptomyces microflavus*, y *Streptomyces aureofaciens* se hidratan y se secan. Las esporas se introducen posteriormente en una solución que consiste en tampón de fosfato 0,01 M en agua destilada con el pH resultante 7.

- 5 La germinación de las esporas resultantes de cada tratamiento se mide por el porcentaje de caída en la densidad óptica o contando el número de esporas germinadas bajo un microscopio. Se encuentra que las composiciones íntimamente mezcladas germinan más rápidamente que su correspondiente equivalente convencionalmente mezclado.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en la que la espora bacteriana y el L-aminoácido se secan juntos de manera que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en una posición próxima hasta que alcancen un ambiente propicio a la germinación.
- 5 2. La mezcla de la reivindicación 1, en la que la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*,
10 *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. Ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y *Streptomyces spp.*
- 15 3. La mezcla de la reivindicación 1, en la que el L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina, L-fenilalanina y sus análogos.
4. La mezcla de la reivindicación 1, en la que dicha mezcla se produce mediante secado por pulverización, liofilización, secado al aire o secado con tambor.
5. La mezcla de la reivindicación 1, en la que la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el L-aminoácido se selecciona del grupo que
20 consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.
6. La mezcla de la reivindicación 1, en la que el L-aminoácido se formula, antes del secado, a concentraciones de 0,0003 mg/ml a 170 mg/ml.
7. Una composición que comprende la mezcla íntima seca de la reivindicación 1.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicha mezcla se produce mediante secado por pulverización, liofilización, secado al aire o secado con tambor.
25
9. La composición de la reivindicación 7, en la que dicha composición comprende además un recubrimiento entérico.
10. La composición de la reivindicación 7, en la que la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.
- 30 11. Un procedimiento de preparación de una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, comprendiendo el procedimiento:
 - a) preparar una solución que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido; y
 - b) secar la solución para obtener una mezcla íntima seca que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido,
- 35 en el que la espora bacteriana y el L-aminoácido se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un ambiente propicio para la germinación.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el secado es secado por pulverización, liofilización, secado al aire o secado en tambor.
- 40 13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boronophilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. simplex*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis*, *B. weihenstephanensis*, *C. thermocellum*, *C. Ljungdahlii*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawa*, y *Streptomyces spp.*
- 45
14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la espora se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el L-aminoácido se selecciona del grupo que
50 consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.
15. Una mezcla íntima seca producida por el procedimiento de la reivindicación 11.