

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 871**

51 Int. Cl.:

C12R 1/06 (2006.01)
C07K 14/305 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A23K 20/147 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2015 PCT/FR2015/051611**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193618**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2015 E 15738726 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3157946**

54 Título: **Nuevas cepas de *Arthrobacter gandavensis***

30 Prioridad:

17.06.2014 FR 1455536

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

16.05.2019

73 Titular/es:

ADISSEO FRANCE S.A.S. (100.0%)
Immeuble Antony Parc II 10, place du Général de
Gaulle
92160 Antony, FR

72 Inventor/es:

PUJOL, ANGE;
FONS, MICHEL;
MIRANDE, CAROLINE;
DEVILLARD, ESTELLE y
RHAYAT, LAMYA

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 712 871 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

Nuevas cepas de *Arthrobacter gandavensis*.

5 La presente invención tiene por objeto nuevas cepas bacterianas que tienen un interés como probiótico en la alimentación animal y más particularmente para la alimentación de los pollos.

10 Algunas cepas bacterianas tienen la capacidad de liberar unas sustancias que tienen un efecto bacteriostático o bactericida sobre sus competidores. Estas sustancias antimicrobianas pueden ser de naturaleza orgánica, por ejemplo ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno (Ross *et al.*, Int. J. Food Microbiol. 79, 3-16, 2002), o de naturaleza peptídica. Se distinguen, además, los péptidos antimicrobianos sintetizados por vía enzimática que pertenecen a la clase de los antibióticos (Mootz *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 543-551, 1997; Keating *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 598-606, 1999), y los péptidos producidos por la vía ribosómica que forman la clase de las bacteriocinas (Jacob *et al.*, Ann. Inst. Pasteur (Paris) 84, 222-224, 1953).

15 Las bacteriocinas suscitan un interés que aumenta en el mundo de la investigación y de la industria; podrían proporcionar unas soluciones alternativas a la utilización de antibióticos, en particular en la crianza de animales (Luchansky, Antonie Van Leeuwenhoek 76, 335, 1999; O'Sullivan *et al.*, Biochimie 84, 593-604, 2002).

20 Se han desarrollado desde hace algunos años numerosos sistemas de expresión heterólogos de estas bacteriocinas. En particular, Morisset *et al.* (Morisset *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 70, 4672-4680, 2004) han producido unas variantes de la mesentricina Y105, bacteriocina de clase IIa producida por *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* Y105, en *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* DSM20484. Asimismo, Flynn *et al.* (Microbiol., 148, 973-984, 2002) han realizado la expresión del gen de ABP-118, bacteriocina de clase IIb producida en origen por *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* UCC118, en los hospedantes *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus cereus*.

30 Además, se han llevado a cabo varios ensayos para expresar los genes de las bacteriocinas en la bacteria *Escherichia coli* (McCormick *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4757-4766, 1998; Garneau *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 69, 1352-1358, 2003; Biet *et al.*, Microbiol., 144, 2845-2854, 1998; Miller *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 14-20, 1998; Richard *et al.*, J. Bacteriol., 186, 4276-4284, 2004; Kloche *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 67:532-538, 2005), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Schoeman *et al.*, Yeast, 15, 647-656, 1999; Van Reenen *et al.*, Int. J. Food Microbiol., 81, 29-40, 2003) y en unas bacterias lácticas (Rodríguez *et al.*, Int. J. Food Microbiol., 80, 101-116, 2003).

35 Numerosos trabajos se han llevado a cabo por lo tanto con vistas a la identificación de nuevas bacteriocinas y de nuevas cepas bacterianas para producir unas bacteriocinas.

40 El ecosistema digestivo está constituido por una flora intestinal abundante y muy compleja que agrupa bacterias, levaduras, y *Archaea*. Esta flora intestinal es esencialmente anaerobia y se encuentran principalmente unas bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* y *Fusobacterium* (Suau *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 65, 4799-4807, 1999). La flora intestinal tiene un impacto importante sobre la salud del hospedante. Está implicada en particular en la toxificación y la detoxificación de compuestos metabólicos procedentes de la alimentación (Hughes y Rowland, Microbial Ecology Health Disease 2, 179-185, 2000). Es capaz asimismo de modular la expresión de funciones enterocitarias (Bry *et al.*, Science 273,1380-1383, 1996; Hooper *et al.*, Science 291, 881-884, 2001). Por último, tiene un papel primordial en la protección del hospedante contra la invasión por bacterias exógenas potencialmente patógenas (Ducluzeau *et al.*, Microbial Ecology and Intestinal Infections, 1988; Fons *et al.*, Microbial Ecology in Health and Disease 2, 240-246, 2000).

50 Entre los patógenos intestinales conocidos, se encuentra *Clostridium perfringens*, bacteria Gram positiva, anaerobia estricta, capaz de formar esporas y muy extendida en el medioambiente. Este patógeno puede provenir de la alimentación, pero puede estar presente también a baja concentración en el intestino y ponerse a proliferar y segregar unas toxinas bajo el efecto de un estrés. Las cepas de *Clostridium perfringens* están clasificadas en 5 toxinotipos en función de las toxinas que producen (Petit *et al.*, Trends Microbiol. 7, 104-110, 1999). Las cepas de *C. perfringens* de tipo A son responsables de enfermedades gastro-intestinales en el ser humano. En 1997, se censaron más de 245000 casos de infecciones por *C. perfringens* en los Estados Unidos. Esto condujo a la hospitalización de 41 personas de las cuales 7 no sobrevivieron (Mead *et al.*, Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625, 1999). Las cepas de *C. perfringens* de tipo A y C pueden ser respectivamente el origen de enteritis necrótica en las aves de corral y los cerdos. En las aves de corral, la enteritis necrótica es una patología aguda, de evolución rápida cuya mortalidad puede alcanzar 1 a 2% por día. Además de su incidencia sobre el bienestar de los animales, esta patología puede por lo tanto tener una influencia económica no despreciable. Hasta 1999, esta enfermedad estaba bien controlada por el uso de antibióticos como factores de crecimiento. Pero, en 1999, la Unión europea prohibió parcialmente su uso, y después completamente en 2006 en la alimentación animal por miedo a seleccionar las bacterias resistentes y por lo tanto ver disminuir la eficacia de los antibióticos en el ser humano. Desde esta prohibición, la enteritis necrótica provocada por *Clostridium*

perfringens en el ave de corral y el cerdo, ya no está controlada en Europa. El número de casos declarados en la Réseau National d'Observations Épidémiologiques en Aviculture (RNOEA) (AFSSA Ploufragan) ha aumentado considerablemente en 1999 y 2000 (Valancony, Bulletin des GTV 12, 9-12, 2001).

5 Dabard *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 67, 4111-4118, 2001) han demostrado que la cepa *Ruminococcus gnavus* E1, aislada a partir de la flora dominante del ser humano, es capaz de producir una sustancia antimicrobiana, denominada ruminococcina A o RumA, que se acumula en el sobrenadante de cultivo. Se trata de una bacteriocina que pertenece a la familia de los lantibióticos, activa contra diferentes cepas de *Clostridium* sp. patógenas. *Ruminococcus gnavus* es una bacteria anaerobia estricta que pertenece a la familia de las *Lachnospiraceae*, en el orden de los *Clostridiales*.

10 La solicitud de patente WO 2008/152252 tiene como objeto una cepa bacteriana de *Ruminococcus gnavus* (depositada en la CNCM bajo el número I-3705, así como los péptidos RumC1, RumC2 y RumC3 que presentan una actividad antibacteriana contra *Clostridium perfringens*, así como los genes que codifican para estos péptidos.

15 En la actualidad, la búsqueda de soluciones alternativas para controlar y tratar las enfermedades asociadas a la proliferación de *Clostridium perfringens* es por lo tanto de primera importancia.

20 La presente invención ha permitido identificar de manera completamente sorprendente nuevas cepas de *Arthrobacter gandavensis* que sintetizan unos péptidos que tienen una actividad antibacteriana (como bacteriocina) contra *Clostridium perfringens*.

25 Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto una cepa de *Arthrobacter gandavensis*, que tiene una actividad contra *Clostridium perfringens* seleccionada de entre *Arthrobacter gandavensis* AP1 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28444, *Arthrobacter gandavensis* AP2 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28445, *Arthrobacter gandavensis* AP3 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28446, o *Arthrobacter gandavensis* AP4 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28447.

35 En el marco de la presente invención, la actividad contra *Clostridium perfringens* se puede definir como la capacidad para inhibir el crecimiento o el desarrollo de bacterias diana o la capacidad para matar unas bacterias diana. Las técnicas de medición de la actividad antimicrobiana son conocidas por el experto en la materia. La actividad contra *Clostridium perfringens* se puede definir mediante un ensayo de actividad tal como se describe en el punto 4.3 del ejemplo 4 siguiente o en la solicitud de patente WO 2008/152252 (y más particularmente en la página 23 y 24: «2. Ensayo de actividad antimicrobiana a partir de una muestra líquida» o página 24: «3. Ensayo de actividad antimicrobiana a partir de colonias que se desarrollan en medio gelosado»: La actividad antimicrobiana está, en este caso, puesta en evidencia en la presente invención por un ensayo de inhibición de la cepa *Clostridium perfringens* CpA puesta en cultivo sobre medio gelosado. La muestra que contiene uno de los péptidos de la invención se deposita en unos pocillos formados en el medio gelosado. La actividad antimicrobiana se pone en evidencia cuando se forma un halo de inhibición alrededor del pocillo.

45 La presente divulgación tiene asimismo por objeto un compuesto que tiene una actividad contra *C. perfringens* aislado a partir de una cepa bacteriana seleccionada de entre *Arthrobacter gandavensis* AP1 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28444, *Arthrobacter gandavensis* AP2 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28445, *Arthrobacter gandavensis* AP3 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28446, o *Arthrobacter gandavensis* AP4 depositada el 19 febrero de 2014 en la DSMZ bajo el número DSM 28447.

50 En un modo de realización particular, el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 1 a SEC ID nº 16.

55 La presente divulgación se refiere asimismo a unos fragmentos biológicamente activos de estos péptidos que tienen una actividad antimicrobiana. El término "fragmento biológicamente activo" de un péptido designa un péptido que comprende una parte, pero no la totalidad, del péptido del cual se deriva y que ha conservado la actividad antimicrobiana del polipéptido del cual se deriva.

60 Los procedimientos de preparación de los péptidos de secuencias SEC ID nº 1 a SEC ID nº 16 son conocidos por el experto en la materia.

65 Las secuencias de estos péptidos presentan fuertes identidades con los péptidos RumC de la cepa *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM bajo el número I-3705. Los procedimientos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre polipéptidos son conocidos por el experto en la materia. La alineación de las secuencias está realizada por ejemplo por medio de Vector NTi 9.1.0, programa de

alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>) o utilizando la herramienta CLUSTAW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

5 Los péptidos tales como los descritos anteriormente son segregados (o liberados) por las bacterias en el entorno extracelular. Es posible que uno cualquiera de los péptidos de secuencias SEC ID nº 1 a SEC ID nº 16 comprenda un péptido señal de un número determinado de aminoácidos. En este caso, la invención se refiere asimismo al péptido maduro obtenido después de la escisión del péptido señal.

10 En otro modo de realización, el péptido señal potencial del péptido SEC ID nº 1 a SEC ID nº 16 puede ser sustituido por un péptido señal heterólogo para realizar la expresión y la secreción de este péptido por un organismo hospedante heterólogo.

15 Los péptidos tales como los descritos anteriormente pueden estar aislados o purificados de su entorno natural. En particular, pueden estar aislados a partir de floras intestinales cecales e ileales de animales y en particular de cerdos que alojan la cepa *Arthrobacter gandavensis*. Los péptidos pueden ser preparados mediante diferentes procedimientos. Estos procedimientos son, en particular, la purificación a partir de fuentes naturales tales como unas bacterias que expresan naturalmente estos péptidos, la producción de péptidos recombinantes por unas células hospedantes apropiadas y su purificación ulterior, la producción por síntesis química o, finalmente, una combinación de estos diferentes enfoques. Así, los péptidos de secuencias SEC ID nº 1 a 16 descritos en la presente memoria pueden ser aislados a partir de una de las cepas de *Arthrobacter gandavensis* AP1 depositada en la DSMZ bajo el número DSM 28444, *Arthrobacter gandavensis* AP2 depositada en la DSMZ bajo el número DSM 28445, *Arthrobacter gandavensis* AP3 depositada en la DSMZ bajo el número DSM 28446, o *Arthrobacter gandavensis* AP4 depositada en la DSMZ bajo el número DSM 28447.

25 En otro modo de realización, los péptidos tales como los descritos anteriormente están aislados a partir de organismos hospedantes recombinantes que expresan un compuesto o un fragmento de un compuesto que presenta una actividad antimicrobiana.

30 Se divulgan asimismo unas proteínas de fusión, unas proteínas recombinantes o unas proteínas quiméricas que comprenden los péptidos tales como los descritos anteriormente.

Según un modo de realización, el péptido está adaptado para una utilización en nutrición o en farmacia, por ejemplo una utilización en nutrición animal.

35 Se entiende por "péptido adaptado para la utilización en la nutrición o la farmacia", un péptido cuyas características son tales que convienen para la nutrición o la farmacia. Las características esenciales para una utilización en nutrición o en farmacia son en particular el pH al que el péptido puede resistir, la resistencia a las enzimas gástricas y la conservación de su actividad a temperaturas fisiológicas. En efecto, una parte del sistema digestivo de los animales y del ser humano es ácida y por lo tanto es esencial que el péptido sea resistente a este pH. Otra característica esencial para una utilización en nutrición es la temperatura a la que la sustancia antimicrobiana es activa. En efecto, la puesta en forma de sustancia antimicrobiana en un medicamento, en aditivo nutricional o un alimento para animales, por ejemplo, implica unos tratamientos y una temperatura superior a la temperatura ambiente. La actividad de los antimicrobianos utilizados debe ser por lo tanto estable en las condiciones de los procedimientos, en particular las condiciones de temperaturas. Los antimicrobianos utilizados también deben ser activos a temperaturas fisiológicas (37-41°C).

40 Según un modo de realización, el péptido, o una mezcla de péptidos según la invención, presenta una actividad antimicrobiana a pH neutro y conserva su actividad antimicrobiana a un pH ácido, por ejemplo inferior a 7, preferentemente inferior a 4,4 y en particular a pH 2.

50 Según un modo de realización, el péptido, o una mezcla de péptidos según la invención, presenta una actividad antimicrobiana a 37°C y conserva esta actividad a temperaturas inferiores y superiores a la temperatura ambiente, por ejemplo superior a 50°C.

55 Se divulga asimismo un polinucleótido que codifica para un péptido que tiene una actividad contra *Clostridium perfringens* seleccionado de entre los polinucleótidos cuya secuencia está definida por SEC ID nº 17 a SEC ID nº 32, los polinucleótidos que se hibridan al polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 17 a SEC ID nº 32, o los polinucleótidos que codifican para un péptido tales como los definidos anteriormente.

60 Según la presente divulgación, se entiende por "polinucleótido" una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementario que puede ser de tipo ADN o ARN, o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN complementario o genómico. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular ADN bicatenario. El término "polinucleótido" designa asimismo los polinucleótidos modificados.

65 Los polinucleótidos tales como los descritos anteriormente pueden estar aislados o purificados de su entorno natural. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden ser preparados por síntesis química o por

unas técnicas clásicas de biología molecular tales como las descritas por Sambrook, Fritsch y Maniatis, en su obra titulada "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- 5 Se divulgan también unos polinucleótidos capaces de hibridarse de manera selectiva con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 17 a SEC ID nº 32.

En el marco de la presente divulgación, una hibridación selectiva se efectúa en unas condiciones de media astringencia y preferentemente en unas condiciones de fuerte astringencia. Por "secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva", se entienden las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces más intenso que el de la interacción de otras secuencias de ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son conocidas por el experto en la materia. En general, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior en por lo menos 5°C a la T_m de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30°C para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60°C para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 500 µg/ml esperma de salmón desnaturalizado ADN. Los lavados se realizan por ejemplo sucesivamente a baja astringencia en un tampón 2X SSC, 0,1% SDS, a mediana astringencia en un tampón 0,5X SSC, 0,1% SDS y a fuerte astringencia en un tampón 0,1X SSC, 0,1% SDS. La hibridación se puede efectuar por supuesto según otros procedimientos habituales conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook, Fritsch y Maniatis, en su obra titulada "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Preferentemente, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva a un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En el presente caso, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 17 a SEC ID nº 32, codifican para una actividad anti-microbiana.

- 30 La divulgación se refiere de manera general a los polinucleótidos que codifican para los péptidos tales como los descritos anteriormente. Debido a la degenerescencia del código genético, diferentes polinucleótidos pueden codificar para un mismo polipéptido.

35 La presente divulgación se refiere asimismo a un casete de expresión, caracterizado por que comprende, en el sentido de la transcripción, un promotor funcional en un organismo hospedante, un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y una secuencia terminadora funcional en dicho organismo hospedante.

La presente divulgación se refiere también a un vector que comprende un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y/o un casete de expresión tal como se ha definido anteriormente.

40 La presente divulgación se refiere asimismo a unos vectores de clonación o de expresión para la transformación de un organismo hospedante que comprende por lo menos un polinucleótido o un casete de expresión tales como se han descrito anteriormente. Este vector puede corresponder en particular a un plásmido, a un cósmido, a un bacteriófago o a un virus en el que está insertado un polinucleótido o un casete de expresión según la invención. Las técnicas de construcción de estos vectores y de inserción de un polinucleótido de la invención en estos vectores son conocidas por el experto en la materia. De manera general, se puede utilizar cualquier vector capaz de mantenerse, de autorreplicarse o de propagarse en una célula hospedante con el fin de inducir en particular la expresión de un polinucleótido o de un péptido. El experto en la materia elegirá los vectores apropiados en función del organismo hospedante a transformar, y en función de la técnica de transformación utilizada.

50 Los vectores de la presente divulgación se utilizan en particular para transformar un organismo hospedante con vistas a la replicación del vector y/o de la expresión de un péptido tal como se ha descrito anteriormente en el organismo hospedante. La divulgación se refiere asimismo a un procedimiento para preparar un péptido tal como se ha descrito anteriormente, que comprende las etapas siguientes:

- se transforma un organismo hospedante con un vector de expresión que comprende un casete de expresión tales como los descritos anteriormente y/o con un polinucleótido tal como se ha descrito anteriormente,
- se aíslan los péptidos producidos por el organismo hospedante.

65 La presente divulgación se refiere también a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente, a un casete de expresión tal como se ha definido anteriormente y/o a un vector tal como se ha definido anteriormente.

La presente divulgación tiene también por objeto un procedimiento de transformación de un organismo hospedante por integración en dicho organismo hospedante de por lo menos un polinucleótido, de por lo menos un casete de expresión o de por lo menos un vector tales como se han descrito anteriormente.

- 5 El polinucleótido puede estar integrado en el genoma del organismo hospedante o replicarse de manera estable en el organismo hospedante. Los procedimientos de transformación de los organismos hospedantes son conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía.

10 Por "organismo hospedante" se entiende, en particular, cualquier organismo mono o pluricelular, inferior o superior, seleccionado en particular de entre las bacterias, las levaduras y los hongos. En particular, por "organismo hospedante" se entiende un organismo no humano. De manera ventajosa, las levaduras se seleccionan de entre, por ejemplo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Schwanniomyces occidentalis*. Los hongos se seleccionan, por ejemplo, de entre los *Aspergillus*, los *Trichoderma* y los *Penicilliums*, preferentemente de entre *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*,
 15 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii* y *Trichoderma koningii*. En un modo de realización de la invención, el organismo hospedante es una cepa de *Penicillium funiculosum* en la que se expresa o se sobreexpresa un péptido según la invención. En otro modo de realización, el organismo hospedante es una cepa de *Debaryomyces castellii* en la que se expresa o se sobreexpresa un péptido según la invención. En otro modo de realización, el organismo hospedante es una cepa de enterobacteria o corinebacteria y más particularmente
 20 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, en la que se expresa o se sobreexpresa un péptido tal como el descrito anteriormente.

25 Las técnicas de construcción de vectores, de transformación de organismos hospedantes y de expresión de proteínas heterólogas en estos organismos están ampliamente descritas en la bibliografía, en particular por Sambrook, Fritsch y Maniatis, en la obra titulada "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 o por Ausubel *et al.*, en la obra titulada "Current Protocols in Molecular Biology", edición: Greene Publishing Associates, Inc., y John Wiley and Sons, NY, 1992.

30 La divulgación se refiere también a un procedimiento de preparación de un péptido que presenta una actividad antimicrobiana tal como se ha descrito anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- puesta en cultivo de una cepa de *Arthrobacter gandavensis* según la invención o de un organismo hospedante transformado tal como se ha descrito anteriormente en unas condiciones de inducción de la expresión del péptido, y
 35
- recuperación del sobrenadante de cultivo (o mosto de fermentación) que comprende el péptido.

40 La separación del péptido a partir del sobrenadante de cultivo puede ser realizada por la carga, el tamaño y/o el carácter hidrófobo. El experto en la materia conoce las diferentes técnicas que permiten la separación en función de la carga, del tamaño y/o del carácter hidrófobo de los diferentes constituyentes de un medio.

45 Este sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación puede ser concentrado o liofilizado a continuación para la formulación de un aditivo alimenticio o de un alimento para animales. El procedimiento puede comprender unas etapas suplementarias de purificación de la sustancia antimicrobiana a partir del sobrenadante de cultivo.

50 Si el organismo hospedante no segrega la sustancia antimicrobiana en el medio de cultivo, puede ser necesaria una etapa suplementaria de rotura de las células y de purificación del extracto celular.

La presente invención se refiere también a una composición que comprende un mosto de fermentación de una cepa según la invención.

Según un modo de realización de la presente invención, la composición se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

55 Estas composiciones comprenden diferentes ingredientes. En forma líquida, pueden comprender, por ejemplo, otro agente antimicrobiano, por ejemplo ácido sórbico o una sal de ácido sórbico, ácido benzoico o una sal de ácido benzoico, ácido fumárico o una sal de ácido fumárico. Las composiciones tales como las descritas anteriormente pueden comprender además sorbitol. El sorbitol es un agente de estabilización y de formulación. Las composiciones tales como las descritas anteriormente también pueden comprender unos agentes
 60 anticongelantes, por ejemplo el etilenglicol, el glicerol, el propilenglicol y el propano-1,2-diol.

Las composiciones tales como las descritas anteriormente comprenden por lo menos un péptido tal como se ha descrito anteriormente, pero también pueden comprender otras sustancias como vitaminas, otros principios activos, aminoácidos o sales minerales.

65 Las composiciones en forma de polvo comprenden un soporte. Este soporte se puede seleccionar de entre la

harina de trigo, el almidón, la maltodextrina, el yeso, y las rasas de maíz.

5 Las composiciones según la invención presentan una actividad antimicrobiana. Proporcionan unas soluciones alternativas a la utilización de antibióticos. Pueden ser utilizadas, por ejemplo, en la crianza de los animales o como medicamento para el ser humano.

La presente invención se refiere asimismo a un aditivo nutricional que comprende una cepa según la invención o un mosto de fermentación de una cepa según la invención.

10 Según un modo de realización de la presente invención, el aditivo se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

La presente invención se refiere también a un alimento para animales, caracterizado por que comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional tal como se ha definido anteriormente.

15 Estos alimentos se presentan habitualmente en forma de harinas o de granulados en los que se incorporan las composiciones que presentan una actividad antimicrobiana.

20 En el marco de la presente invención, se entiende por "alimento" todo lo que puede servir para la alimentación de los animales. Por "base nutricional" se entiende todo lo que constituye lo esencial a la ración alimentaria del animal, constituida a título de ejemplo por una mezcla de cereales, de proteínas y de materias grasas de origen animal y/o vegetal. Habitualmente, estas bases nutricionales comprenden, por ejemplo, maíz, trigo, y soja. Estas bases nutricionales están adaptadas a las necesidades de las diferentes especies animales a las que están destinadas. Puede tratarse, por ejemplo, de aves de corral (gallinas ponedoras, pollos, pavos y patos) o de
25 de cerdos (cerdos de crecimiento y de cebo, lechones, cerdas).

La invención tiene por objeto la utilización de por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la invención y/o por lo menos de una cepa según la invención para la preparación de un aditivo nutricional, de un
30 alimento o de un medicamento.

El péptido tal como se ha definido anteriormente, el mosto de fermentación de una cepa o de un organismo hospedante tal como se ha definido anteriormente, la cepa o el organismo hospedante tal como se ha descrito anteriormente pueden ser utilizados como medicamento.

35 El péptido tal como se ha definido anteriormente, el mosto de fermentación de una cepa o de un organismo hospedante tal como se ha definido anteriormente, la cepa o el organismo hospedante tal como se ha descrito anteriormente pueden ser utilizados para prevenir o tratar las enfermedades gastro-intestinales en el ser humano.

40 De manera particular, el péptido tal como se ha descrito anteriormente, el mosto de fermentación de una cepa o de un organismo hospedante tal como se ha descrito anteriormente, la cepa o el organismo hospedante tal como se ha descrito anteriormente pueden ser utilizados para la prevención y/o el tratamiento de disbacteriosis intestinales, en particular la enteritis necrótica en los animales monogástricos, y más particularmente las aves de corral y los cerdos.

45 La presente invención tiene también por objeto la utilización de por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la invención y/o de por lo menos un aditivo nutricional según la invención o de un alimento según la invención para mejorar las prestaciones de crecimiento de los animales, en particular del pollo.

50 La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la invención y/o por lo menos de una cepa según la invención y/o de un aditivo nutricional según la invención y/o de un alimento según la invención para mejorar las prestaciones zootécnicas de los animales de crianza.

55 En el marco de la presente invención, la mejora de las prestaciones zootécnicas de los animales de crianza comprende, de manera no exhaustiva, el aumento de la ganancia de peso de los animales, la disminución del índice de consumo, la disminución de la mortalidad y morbilidad, la homogeneidad de los animales, la mejora rendimiento carcasa/rendimiento carne, la mejora de la digestibilidad de los nutrientes, la mejora del estatuto inmunitario del animal, la reducción de los efectos negativos de una infección por patógeno (*Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*) o también la mejora de la utilización
60 de los nutrientes y por lo tanto la reducción de la excreción de rechazos.

Descripción de las figuras

65 Figura 1: Detección del gen *rumC1* por PCR

Figura 2: Perfil cromosómico por electroforesis en campo pulsado de las cepas AP1, AP2, AP3 y AP4.

Figura 3: Porcentaje de supervivencia en el alimento de las cepas AP1, AP2, AP3 y AP4

5 Figura 4: Dosificación de las interleucinas IL8 por ELISA en el sobrenadante de cultivo de las células Caco-2 después del contacto con las bacterias en presencia o en ausencia de IL1

Figura 5: Los ensayos de actividad con los sobrenadantes de cultivo bacteriano contra la cepa *Clostridium perfringens*

10 Figura 6: Una actividad anti-*C. perfringens* después de que se haya realizado una primera etapa de pre-purificación: purificación de los sobrenadantes sobre columna Sep-Pak con una elución al 40% de acetonitrilo (ACN, véase el documento WO 2008/152252)

15 La presente invención se ilustrará mediante los ejemplos siguientes

Ejemplo 1: Aislamiento de cepas bacterianas rumC+

20 La investigación de cepas cultivables que albergan los genes *rumC*-like se llevó a cabo a partir de floras intestinales cecales e ileales de cerdos.

En un primer tiempo las bacterias son puestas en cultivo en los medios siguientes:

- M17: que favorece los lactococos
- 25 - LB: que permite el crecimiento de los *Bacillus* sp. y enterococos
- BEA: medio que contra-selecciona el grupo *Bacteroides*

Los clones son seleccionados a continuación por su capacidad para inhibir el crecimiento de *Clostridium perfringens*. La presencia de los genes *rumC* se pone entonces en evidencia mediante PCR (Figura 1).

30 *Tabla 1: Lista de los cebadores utilizados para amplificar los diferentes fragmentos de ADN diana*

Par de cebadores	Temperatura de hibridación (T _{opt})	Tamaño del fragmento amplificado	Gen(es) diana
FC1 (SEC ID nº 33) - RC1 (SEC ID nº 34)	55°C	700 pb	<i>rumC1</i>
FC2C3 (SEC ID nº 35) - RC2C3 (SEC ID nº 36)	60°C	800 pb	<i>rumC2-rumC3</i>
FC4C5 (SEC ID nº 37) - RC4C5 (SEC ID nº 38)	55°C	400 pb	<i>rumC4-rumC5</i>

35 Se han retenido cuatro cepas: AP1, AP2 AP3 y AP4.

Ejemplo 2: Identificación de las cepas retenidas

2.1 ADNr 16S

40 Se ha amplificado un fragmento (aproximadamente 1550 pb) del gen que codifica el ARNr 16S (que corresponde a las posiciones 8-1541 en el sistema de numeración de *Escherichia coli*) mediante PCR utilizando unos cebadores conservados (16F8: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' (SEC ID nº 39) y 16R1541: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (SEC ID nº 40) y después secuenciado.

45 Las secuencias obtenidas han sido sometidas a una comparación en los bancos de datos con la ayuda de un programa de búsqueda de homología de secuencia de tipo "BLAST"

- Cepa AP1 (SEC ID nº) => 99,45% de identidad con *Arthrobacter gandavensis* R 5812
- Cepa AP2 (SEC ID nº) => 99,37% de identidad con *Arthrobacter gandavensis* R 5812
- 50 Cepa AP3 (SEC ID nº) => 99,44% de identidad con *Arthrobacter gandavensis* R 5812
- Cepa AP4 (SEC ID nº) => 99,31% de identidad con *Arthrobacter gandavensis* R 5812

2.2. Identificación PFGE

55 Las cepas AP1, AP2 AP3 y AP4 que pertenecen al género *Arthrobacter* deben poder ser diferenciadas en el plano genético. La técnica de referencia para identificar a nivel intra-específico unas cepas bacterianas consiste en establecer su perfil cromosómico por electroforesis en campo pulsado (Figura 2) (Informe de análisis N°: LR251012 - Biocéane).

60 Las cepas AP3 y AP4 parecen idénticas. Sin embargo, la secuenciación de los genes *rumC*, así como sus secuencias peptídicas reducidas, parece indicar por su parte que AP3 y AP4 son dos cepas distintas (véase el

Ejemplo 4, punto 1 4.2).

Ejemplo 3: Caracterización de las cepas

5 3.1 Resistencia al pH y a las sales biliares

Las cepas son sometidas a dos tratamientos para determinar su resistencia a la acidez y a las sales biliares.

- Acidez: tampón NaCl 0.85%, pH2, que contiene pepsina (1 mg/ml)
- Sales biliares: tampón isotónico (K_2HPO_4 1.24%, H_2PO_4 0.76%, citrato trisódico 0.1%, $[NH_4]_2SO_4$ 0.6%, pH 6.7) que contiene 0.2% de sales biliares (50% colato de sodio, 50% desoxicolato de sodio)

Tabla 2: Porcentaje de supervivencia de las diferentes cepas

	AP1	AP2	AP3	AP4
Acidez	0%	15%	12%	90%
SB	0%	10%	8%	ND

SB: Sales biliares; ND: No determinado

La cepa AP4 resiste mejor a las condiciones que imitan el medio gástrico. De manera general, todas las cepas son más sensibles a las sales biliares, pero la supervivencia es no obstante suficiente, salvo para la cepa AP1.

20 3.2 Parámetros de fermentación

El análisis de sus parámetros de fermentación se ha realizado sobre un sobrenadante de cultivo obtenido después del crecimiento en BHI-YH en semi-anaerobiosis (analyse © In vivo Labs).

25 Tabla 3: Dosificación de los parámetros de fermentación

	AP1	AP2	AP3	AP4	BHI-YH
Acide láctico %	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04
Azote amoniacal g/l	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Acide fumárico %	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Acide acético g/l	0,16	0,14	0,13	0,15	0,15
Acide propiónico g/l	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Acide isobutírico g/l	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Acide butírico g/l	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Acide isovalérico g/l	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Acide valérico g/l	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

30 Como se esperaba, es difícil evaluar los parámetros de fermentación para las cepas de *Arthrobacter*. Las condiciones de cultivo no permiten poner en evidencia la producción de un cualquier metabolito procedente de la fermentación. Se ha buscado también la presencia de ácido propiónico, de ácido isobutírico, de ácido butírico, de ácido isovalérico y de ácido valérico. Sin embargo, ninguna de las cuatro cepas parece ser productora en nuestras condiciones de cultivo.

35 3.3 Ensayo de supervivencia a la temperatura

Las cepas son sensibles a las temperaturas elevadas. En efecto, ninguna sobrevive más allá de 70°C.

Según estos resultados, es difícilmente considerable prever una adición de estas cepas cuando tiene lugar la granulación.

40 3.4 Ensayo de supervivencia en agua y en los alimentos

45 La cepa *Arthrobacter* sp. AP4 sobrevive muy bien en agua (Tabla 4 siguiente). Parecería incluso que sea capaz de desarrollarse en estas condiciones. En efecto, después de 7 días en agua, la población bacteriana se habría duplicado.

Tabla 4: Porcentaje de supervivencia en agua

	D1	D2	D3	D4	D7
AP4	134%	144%	130%	166%	206%

En el alimento, la población permanece relativamente estable incluso después de 21 días (Figura 3). Según estos resultados, se puede considerar la adición de las cepas tanto en el agua de bebida como en el alimento.

3.5 Potencial antiinflamatorio

5 La modulación del perfil inflamatorio se estima por dosificación de las interleucinas IL8 por ELISA en el sobrenadante de cultivo de las células Caco-2 (línea celular intestinal) después del contacto con las bacterias en presencia o en ausencia de IL1 (molécula de inducción de la inflamación).

10 Estos resultados se obtuvieron sobre los sobrenadantes de células cultivadas en pocillos. Las bacterias no presentan ninguna actividad proinflamatoria (secreción de IL8 baja en ausencia de IL1) ni de actividad antiinflamatoria (cantidad de IL8 en presencia de IL1 idéntica al control).

15 El experimento se ha repetido con la cepa AP4 pero con unas células Caco-2 cultivadas sobre filtro. En este caso, esta cepa presenta una actividad proinflamatoria.

3.6 Perfiles enzimáticos

20 El sistema API ZYM es un procedimiento semi-cuantitativo de búsqueda de actividades enzimáticas. Los ensayos enzimáticos son inoculados con una suspensión bacteriana densa.

Tabla 5: Resultados de las lecturas de las galerías Api Zym

	AP1		AP2		AP3		AP4	
	I	II	I	II	I	II	I	II
1. Control sin sustrato	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Fosfatasa alcalina	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Esterasa (C4)	5	5	5	4	5	4	5	5
4. Esterasa lipasa (C8)	1	3	4	4	3	4	3	5
5. Lipasa (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-
6. Leucina arilamidasa	5	5	5	5	5	5	5	5
7. Valina arilamidasa	3	1	4	1	4	1	4	1
8. Cistina arilamidasa	3	-	4	-	4	-	4	-
9. Tripsina	-	-	-	-	-	-	-	-
10. Alfa-quimiotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-
11. Fosfatasa ácida	3	3	4	3	4	2	4	3
12. Naftol fosfohidrolasa	-	1	-	1	-	1	-	1
13. Alfa-galactosidasa (melibiosa)	-	-	-	-	-	-	-	-
14. Beta-galactosidasa (lactasa)	-	-	-	-	-	-	-	-
15. Beta-glucuronidasa (hialuronidasa)	-	-	-	-	-	-	-	-
16. Alfa-glucosidasa (maltasa)	2	1	-	-	-	-	-	-
17. Beta-glucosidasa (celulasa)	-	-	-	-	-	-	-	-
18. N-acetil-beta-glucosaminidasa (quitinasa)	-	-	-	-	-	-	-	-
19. Alfa-manosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-
20. Alfa-fucosidasa	-	1	-	-	-	-	-	-

I: primer ensayo; II: segundo ensayo

25 Se encuentran indiscutiblemente algunas actividades sea cual sea la cepa utilizada. Es el caso de la esterasa, de la esterasa lipasa, de la leucina arilamidasa, de la valina arilamidasa y de la fosfatasa ácida. Algunas actividades no parecen muy estables, como para la cistina arilamidasa.

30 La cepa AP1 presenta un perfil diferente de los otros *Arthrobacter* en la utilización de la maltosa y de la fucosa por ejemplo.

3.7 Resistencia a los antibióticos

35 Se ha realizado en laboratorio un primer ensayo. Los antibiogramas se han realizado utilizando unos discos de difusión antibiótica (BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Dises).

40 Los antibióticos ensayados se utilizaron en las cantidades siguientes: Bacitracina 10 µg, eritromicina 15 µg, penicilina G 10 µg, ampicilina 10 µg, vancomicina 30 µg, estreptomocina 300 µg, cloranfenicol 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, fosfomicina 200 µg, rifampicina 25 µg y trimetoprima/sulfametoxazol 1,25 µg / 23,75 µg. Los resultados del antibiograma son sometidos a un ábaco de lectura con el fin de determinar el nivel de sensibilidad de la cepa con respecto al diámetro de inhibición medido.

Las 4 cepas de *Arthrobacter* son sensibles a todos los antibióticos ensayados.

Tabla 6: sensibilidad a los antibióticos

	AP1	AP2	AP3	AP4
Ampicilina	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S
Kanamicina	S	S	S	S
Estreptomicina	R	R	R	R
Tetraciclina	R	S	S	S
Cloranfenicol	R/S	R/S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S
Ciprofloxacina	ND*	ND*	ND*	ND*
Linezolid	ND*	ND*	ND*	ND*
Clindamicina	R	S	S	S
Tilosina	ND*	ND*	ND*	ND*

ND*: no determinado ya que hay ausencia de break-point

5 Según estos ensayos, todas las cepas son resistentes a la estreptomicina. La cepa AP1 es la que presenta más resistencias.

3.8 Ensayos de adhesión

10 La adhesión bacteriana se estima en unas células Caco-2 (línea celular epitelial).

Tabla 7: Recuento bacteriano y tasa de adhesión

Cepas	CFU _I	CFU _A
AP1	4,90.10 ⁸	1,50.10 ³
AP2	1,50.10 ⁹	3,00.10 ³
AP3	1,75.10 ⁵	6,00.10 ³
AP4	1,42.10 ⁹	3,00.10 ⁴

CFU_I: recuento inicial CFU_A: recuento después de la adhesión

15 Aunque baja, todas las cepas de la solicitante presentan una capacidad de adhesión a las células intestinales. Las cepas AP3 y AP4 parecen adherirse más eficazmente.

Ejemplo 4: Validación del concepto

4.1 Inocuidad de las cepas

20 En un primer tiempo, las bacterias fueron observadas en microscopía electrónica con el fin de verificar la ausencia de carácter morfológico asociado a la patogenicidad.

25 La morfología de las células es variable (bastoncillos a cocoides), lo cual está de acuerdo con la caracterización del género *Arthrobacter*. Las células están desprovistas de flagelos y de pili.

30 En un segundo tiempo, se ha realizado un ensayo *in vivo*. Se administraron 10⁷ bacterias en intra-gástrico a unos ratones axénicos (3 animales por cepa). Cada día y durante 5 días, se efectúa una extracción de heces. Un análisis de estas heces por microscopía óptica ha permitido confirmar la presencia de bacterias durante por lo menos 4 días, poniendo en evidencia su supervivencia en el tubo digestivo. Se debe observar una ausencia de la mortalidad, de lesiones intestinales y de signos clínicos (postración, diarreas, etc.). Estos resultados apoyan el experimento sobre la línea celular Caco-2 (ausencia de lisis o de desprendimiento de las células).

4.2 Secuenciación de los genes *rumC*

35 Las secuencias de los diferentes genes *rumC*-like presentes en las cepas de la solicitante se compararon con las secuencias de la cepa *R. gnavus* E1 (véanse Anexos).

Tabla 8: Porcentaje de identidad de los genes *rumC-like* con respecto a los genes de *R. gnavus* E1 (los identificadores de secuencias que aparecen en la tabla siguiente corresponden a las secuencias identificadas en las cepas AP1 a AP4).

	AP1	AP2	AP3	AP4
rumC1	78,12 (SEC ID nº 17)	99,48 (SEC ID nº 22)	93,23 (SEC ID nº 27)	98,44 (SEC ID nº 30)
rumC2	97,92 (SEC ID nº 18)	55,73 (SEC ID nº 23)	86,46 (SEC ID nº 28)	84,9 (SEC ID nº 31)
rumC3	100 (SEC ID nº 19)	44,79 (SEC ID nº 24)	89,06 (SEC ID nº 29)	89,06 (SEC ID nº 32)
rumC4	60,98 (SEC ID nº 20)	75,14 (SEC ID nº 25)	/	/
rumC5	52,2 (SEC ID nº 21)	66,88 (SEC ID nº 26)	/	/

5 La conservación de los genes es diferente en función de las cepas. El gen *rumC1* es el que está más conservado. De manera general, los genes *rumC4* y *rumC5* son muy divergentes, incluso demasiado divergentes, para ser secuenciados para las cepas AP3 y AP4.

10 Se ha efectuado el mismo análisis comparando las secuencias peptídicas deducidas (véanse anexos).

Tabla 9: Porcentaje de identidad de las secuencias peptídicas deducidas con respecto a *R. gnavus* E1 (los identificadores de secuencias que aparecen en la tabla siguiente corresponden a las secuencias identificadas en las cepas AP1 a AP4).

	AP1	AP2	AP3	AP4
RumC1	55,56 (SEC ID nº 1)	98,41 (SEC ID nº 6)	62,3 (SEC ID nº 11)	75,81 (SEC ID nº 14)
RumC2	79,37 (SEC ID nº 2)	25,4 (SEC ID nº 7)	77,78 (SEC ID nº 12)	76,19 (SEC ID nº 15)
RumC3	100 (SEC ID nº 3)	3,17 (SEC ID nº 8)	92,06 (SEC ID nº 13)	92,06 (SEC ID nº 16)
RumC4	7,69 (SEC ID nº 4)	14,29 (SEC ID nº 9)		
RumC5	15,38 (SEC ID nº 5)	33,96 (SEC ID nº 10)		

15 Globalmente, se pueden sacar las mismas conclusiones. Las identidades de las secuencias deducidas son inferiores a las identidades de los genes. En algunos casos, las secuencias peptídicas están demasiado alejadas (o truncadas; véanse anexos) para pretender una actividad (RumC2_AP3 y RumC4_AP1 por ejemplo).

20 4.3 Ensayo de actividad

Los ensayos de actividad se realizan con los sobrenadantes de cultivo bacteriano contra la cepa *Clostridium perfringens*.

25 Las cuatro cepas poseen una actividad anti-*C. perfringens* (Figura 5). Con el fin de limitar la acción de un ácido orgánico, los sobrenadantes son neutralizados antes del ensayo. Se han realizado dos ensayos con el fin de confirmar la idea de que la inhibición de *C. perfringens* se debe a una actividad "RumC-like". En un primer tiempo, se calentaron los sobrenadantes durante 10 min a 95°C antes del ensayo. La actividad está bien conservada como es el caso para RumC. En un segundo tiempo, se ha realizado la primera etapa de pre-purificación (véase el documento WO 2008/152252): purificación de los sobrenadantes sobre columna Sep-Pak con una elución al 40% de acetonitrilo (ACN, Figura 6). En este caso, también se encuentra actividad.

35 4.4 Evaluación de las propiedades probióticas de las cepas de *Arthrobacter in vivo*

La evaluación del efecto de las cepas AP3 y AP4 sobre las prestaciones de crecimiento del pollo (ganancia de peso, consumo e índice de consumo) se ha realizado en unas condiciones denominadas de "régimen de competición". Este régimen consiste en un régimen a base de maíz con un contenido estándar en proteínas (23%) durante 14 días seguido de un régimen a base de trigo y de cebada, por lo tanto rico en fibras, hiperproteico (26% de proteínas) de 14 a 35 días. Este régimen de competición corresponde al "régimen" control de la tabla 10).

45 Se pulverizaron las cepas AP3 y AP4 sobre el alimento a una concentración que permite la ingesta de 10⁸ CFU por día y por animal, a partir del primer día, y durante toda la duración del ensayo, a saber 35 días. Estos regímenes corresponden respectivamente a las menciones "AP3" y "AP4" en la tabla 10.

El régimen "Lincomicina (8,8%)" corresponde a un régimen de competición al que se añade lincomicina a nivel de 8,8% (es decir 5,25 g por tonelada de alimento).

50 Estos cuatro tratamientos se efectuaron sobre unos lotes de 15 pollos y se repitieron 12 veces (es decir 720 pollos en total).

Tabla 10: resultados *in vivo*.

ET: desviación estándar; **IC:** índice de consumo (consumo de alimento necesario para el aumento de la ganancia de peso de 1 kg, IC = Consumo/ganancia de peso); %: porcentaje de mejora con respecto al control; **Consumo:** consumo de alimento por los animales sobre la totalidad del ensayo

5

	Ganancia de peso (g)	ET	%	Consumo (g)	ET	%	IC	ET	%	Mortalidad
Control	2425	21.4		3974	28.0		1.639	0.009		3.3%
AP3	2527	28.2	4.2%	3815	42.6	- 4.0%	1.51	0.012	- 7.9%	3.3%
AP4	2460	21.5	1.4%	3733	43.3	- 6.1%	1.518	0.015	- 7.4%	1.1%
Lincomicina (8,8%)	2577	22.4	6.3%	4057	37.7	2.1%	1.575	0.013	- 3.9%	1.7%

Las dos cepas ensayadas, AP3 y AP4, tienen unos efectos similares y positivos sobre las prestaciones de crecimiento de los pollos. Permiten una disminución del índice de consumo del 7 al 8%, que se debe al mismo tiempo a un aumento de la ganancia de peso y a una disminución del consumo

10

Listado de secuencias

<110> ADISSEO FRANCE SAS

15

<120> Nuevas cepas de *Arthorbacter gandavensis*

<130> BR079715

20

<160> 40

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

25

<211> 63

<212> PRT

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 1

30

Met Asn Ile Ile Ala Thr Tyr Gln Ser Leu Lys Glu Asn Gln Asn Gln
1 5 10 15

Asp Tyr Thr Pro Arg Leu Phe Val Phe Ala Gly Lys Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Asn
35 40 45

Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asn Val Ala Lys Thr Ala
50 55 60

<210> 2

<211> 64

35

<212> PRT

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 2

ES 2 712 871 T3

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Lys Gly Gly Cys Lys Cys Ser Gly Gly Ala Val Val Glu Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Asn
35 40 45

Gly Gly Asp Asn Lys Lys Cys Glu Cys Tyr Ser Cys Lys Asn Lys Ile
50 55 60

<210> 3

<211> 63

<212> PRT

<213> *Arthrobacter gandavensis*

<400> 3

Met Lys Leu Val Glu Thr Lys Thr Thr Lys Thr Gly Thr Asn Phe Glu
1 5 10 15

Gly Asn Arg Ala Gly Cys Ile Cys Asn Gly Thr Val Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Ser
35 40 45

Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asn Val Ala Lys Thr Ala
50 55 60

<210> 4

<211> 52

<212> PRT

<213> *Arthrobacter gandavensis*

<400> 4

Trp Lys Leu Asn Met Ser Asp Thr His His Phe Glu Glu Gly Lys Pro
1 5 10 15

Gly Arg Gly Gly Arg Val Thr Asn Arg Gly Glu Thr Ile Ile Met Val
20 25 30

Phe Arg Cys Trp Val Glu Cys Gly Pro Ser Asn Tyr Gln Lys Ser Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Glu
50

<210> 5

<211> 52

<212> PRT

<213> *Arthrobacter gandavensis*

<400> 5

ES 2 712 871 T3

Lys Asn Cys Glu Arg Thr Leu Ile Ser Lys Glu Arg Leu Asp Val Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Phe Leu Arg Gly Val Cys Arg Asn Pro Asn Ser Asn Lys
 20 25 30

Pro Gly Val Leu Val Val Trp Phe Trp Gly Glu Phe Gly Glu Pro Thr
 35 40 45

Arg Asn Asp Met
 50

<210> 6
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 6

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
 1 5 10 15

Gly Ser Lys Trp Gly Cys Val Cys Ser Gly Ser Thr Ala Val Ala Asn
 20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Thr Arg Asn
 35 40 45

Asn Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asn Val Ala Lys Thr Ala
 50 55 60

<210> 7
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 7

Met Arg Ser Ile Glu Glu Cys Met Glu Thr Trp Ile Leu Glu Cys Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Leu His Val Arg Asn Ala Lys Tyr Gly Arg Thr Pro Val
 20 25 30

Ala Lys Ala Ala Val Gly Leu Tyr Arg Glu Ala Arg Lys Ser Gly Gln
 35 40 45

Thr Gly Leu Asp Thr Val Gly Asn Ala Asn Ala Asn Leu Ala Arg Thr
 50 55 60

Lys
 65

<210> 8
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 8

ES 2 712 871 T3

Met Lys Leu Val Gly Gly Phe Pro Pro Gln Ala Ala Ala Ser Ile Lys
 1 5 10 15

His Leu Gln Gly Ser Met Ala Ala Arg Thr Gln Arg Lys Arg Gly Leu
 20 25 30

Leu Cys Gly Glu His Trp Ile Arg Pro Arg Arg Ser Phe Gln Leu Gln
 35 40 45

Phe Gly Val Met Met Gln Ala Val Gln Lys Ser His Asn Gln Pro
 50 55 60

5 <210> 9
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> *Arthorbacter gandavensis*

10 <400> 9

Val Arg Glu Ala Leu His Ile Ala Ser Thr Phe Arg Arg Thr Gln Ala
 1 5 10 15

Val Phe Ala Ala Asp Cys Arg Leu Glu Ile Leu Ile Met Gln Asp Gln
 20 25 30

His Ile Val Leu Gly Met Val Glu Arg Trp Ala Val Thr Arg Asn Gln
 35 40 45

Asn Tyr Thr Leu Glu Gln Arg Ser
 50 55

15 <210> 10
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> *Arthorbacter gandavensis*

20 <400> 10

Leu Gly Thr Ala Lys Pro Ile Lys Thr Gln Asn Asn Phe Glu Gly Asn
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Cys Phe Cys Gly Gly Ser Val Ala Ile Gln Ile Leu Ile
 20 25 30

Ser Arg Glu Phe Leu Leu Cys Gly Phe Gly Gly Asn Leu Gly Asn Gln
 35 40 45

Pro Ala Met Ile Cys
 50

25 <210> 11
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 11

ES 2 712 871 T3

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Lys Trp Trp Met Met Gln Trp Arg Cys Ser Ser Arg Asn Ser
20 25 30

His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Asn Gly
35 40 45

Gly Leu Glu Met Leu Met Gln Met Ser Gln Lys Arg His
50 55 60

<210> 12

<211> 63

5 <212> PRT

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 12

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Arg Ser Gly Cys Val Cys Ser Gly Ser Ala Ala Val Ala Ser
20 25 30

Ser His Tyr Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn His
35 40 45

10 Gly Ala Val Thr Arg Asn Ala Asn Tyr Asn Leu Ala Lys Lys Asn
50 55 60

<210> 13

<211> 63

15 <212> PRT

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 13

Met Lys Leu Val Glu Thr Lys Thr Thr Lys Thr Gly Thr Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Asn Arg Ala Gly Cys Ile Cys Asn Gly Thr Val Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Tyr Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Ser
35 40 45

20 Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asp Leu Ala Arg Thr Ala
50 55 60

<210> 14

<211> 62

25 <212> PRT

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 14

ES 2 712 871 T3

Met Ser Asn Ile Leu Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Lys Trp Gly Cys Val Cys Ser Gly Ser Thr Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Asn
35 40 45

Gly Val Ser Asp Lys Cys Cys Lys Cys Arg Lys Asn Gly Asn
50 55 60

<210> 15

<211> 63

5 <212> PRT

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 15

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Arg Ser Gly Cys Val Cys Ser Ala Ser Ala Ala Val Ala Ser
20 25 30

Ser His Tyr Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Arg
35 40 45

Gly Ala Val Thr Arg Asn Ala Asn Tyr Asn Leu Ala Lys Lys Asn
10 50 55 60

<210> 16

<211> 63

<212> PRT

15 <213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 16

Met Lys Leu Val Glu Thr Lys Thr Thr Lys Thr Gly Thr Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Asn Arg Ala Gly Cys Ile Cys Asn Gly Thr Val Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Tyr Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Ser
35 40 45

20

Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asp Leu Ala Arg Thr Ala
50 55 60

<210> 17

<211> 192

25 <212> DNA

<213> *Arthorbacter gandavensis*

<400> 17

ES 2 712 871 T3

ttgaacatta ttgccactta tcaatcattg aaagagaacc agaaccaaga ctacacacca 60
 cgcttgttcg tctttgccgg taaagcagta gcaaactctc ataatgcagg accggcgtat 120
 tgcgtaggat actgtggaaa caacggagta gtgactagaa atgctaatgc aaatgctgca 180
 aaaacggcat aa 192
 <210> 18
 <211> 193
 5 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 <400> 18
 atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcaaaggt 60
 ggatgtaaat gcagtggcgg tgcagtagta gaaaactctc ataatgcagg accagcgtat 120
 tgcgtgggat actgtggaaa caacggagga gataacaaga aatgcgaatg ctattcttgc 180
 10 aagaacaaaa taa 193
 <210> 19
 <211> 192
 <212> ADN
 15 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 <400> 19
 atgaaattag tagaaacaaa aacaacaaaa acaggaacaa actttgaagg gaatagagct 60
 ggatgtatatt gtaatggcac tgtagcagta gcaaattctc ataatgcagg accagcatat 120
 tgtgttgggt attgcccggaaa tagtggagta gtaacaagaa atgcgaatgc aaatgctgca 180
 aaaacagcat aa 192
 20 <210> 20
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 25 <400> 20
 tggaaagctaa attagatgag cgacacacat cactttgaag aaggtaagcc aggcccgggt 60
 ggcccgcgtaa caaacagagg cgaaactatt ataatggtgt ttagatggtg ggtggagtgt 120
 gggccctctt agaactatca aaaatcaatt aataactatg aaag 164
 30 <210> 21
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 35 <400> 21
 caaaaattgt gagagaacac ttatttcaaa ggagagactg gatgtactgc tgtcgtggt 60
 tttgcggggg gtctgtcgca atccaaattc taataagccg ggagttcttg ttgtgtggtt 120
 ttggggggaa tttggggaac caaccgcaa tgatatggt 159
 40 <210> 22
 <211> 198
 <212> ADN

ES 2 712 871 T3

<213> *Arthorbacter gandavensis*
 <400> 22
 atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcaaatgg 60
 ggatgtgttt gtagtggaag cacagcagta gcaaaactctc ataatgcagg accggcgtat 120
 tgcgtaggat actgtacata gagaacaac ggagtagtga ctagaaatgc taatgcaaat 180
 5 gtcgcaaaaa cggcataa 198
 <210> 23
 <211> 216
 <212> ADN
 10 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 <400> 23
 atgaggtcaa tcgaagaatg catggaaact tggatacttg agtgctgaag aggcagtgga 60
 ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagaaa tatggaagaa ccccagtggc gaaggcggca 120
 gtcggtctgt actgacgtga ggctcgaag tctgggtagc aaacaggatt agatacggta 180
 ggaaatgcca atgcgaatct tgcaagaaca aaataa 216
 15 <210> 24
 <211> 210
 <212> ADN
 20 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 <400> 24
 atgaaattag ttggaggggt tccgcctcaa gcggccgcta gcattaagca tcttcagggg 60
 agtatggccg caaggtgaac tcaaaggaag cgggggcttc tctgcggaga gcattggtaa 120
 atttgaagac cgcgaaggtc cttccagctg cagtttgggg tgatgtaa atgcaggcggg 180
 cagtagtaga aatctcataa tcagccataa 210
 25 <210> 25
 <211> 173
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 30 <400> 25
 gggtagcgcga agcaactgcac atcgcttcaa cttttaggag gacgcaggct gtgtttgcag 60
 cggactgtcg acttgaaatt ctcataatgc aggaccagca tattgtgttg gggatggtgg 120
 aaagatgggc agtaaccaga aatcaaaatt atactcttga acaaaggtct taa 173
 35 <210> 26
 <211> 160
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 40 <400> 26
 ttaggaacag caaaaccaat aaaaacgcaa aataatcttg aaggaaacgg ggctggttgt 60
 ttttgccggg ggtctgtcgc aatccaaatt ctaataagcc gggagttctt gttgtgtggt 120
 tttgggggga atttggggaa ccaaccgcca atgatatggt 160

ES 2 712 871 T3

<210> 27
 <211> 194
 <212> ADN
 5 <213> *Arthorbacter gandavensis*

 <400> 27
 atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcaaatgg 60
 tggatgtaaa tgcagtggcg gtgcagtagt agaaactctc ataatgcagg tccagcgtat 120
 tgcgtgggat actgtggaaa caacggaggg tagtgactag aaatgctaata gcaaatgtcg 180
 caaaaacggc ataa 194
 10
 <210> 28
 <211> 192
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 15
 <400> 28
 atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcagaagt 60
 ggatgtgttt gtagtggaag cgcagcagta gcaagctctc attatgcagg accagcatat 120
 tgcgtaggat actgtggaaa ccatggagca gtaacaagaa atgccaatta taatcttgca 180
 aaaaaaaact ag 192
 20
 <210> 29
 <211> 192
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 25
 <400> 29
 atgaaattag tagaaacaaa aacaacaaaa acaggaacag actttgaagg aaatagggct 60
 ggatgtatatt gtaatggtac tgtagcagtg gcaaattctc attatgcagg accggcatat 120
 tgtgtgggat attgtggcaa cagtggagtg gtgacaagaa atgccaatgc agatcttgca 180
 agaactgcat ag 192
 30
 <210> 30
 <211> 194
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 35
 <400> 30
 atgagcaata tcttagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcaaatgg 60
 ggatgtgttt gtagtggaag cacagcagta gcaaactctc ataatgcagg accggcgtat 120
 tgcgtaggat actgtggaaa caacggagta agtgactaga aatgctaata caaatgtcg 180
 aaaaacggca ataa 194
 40
 <210> 31
 <211> 192
 <212> ADN
 <213> *Arthorbacter gandavensis*
 45
 <400> 31

ES 2 712 871 T3

	atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcagaagt	60
	ggatgtgttt gtagtgcaag cgcagcagta gcaagctctc attatgcagg accagcatat	120
	tgcgtaggat actgtggaaa ccgtggagca gtaacgagaa atgcgaatta taatcttgca	180
	aaaaaaaaact ag	192
5	<210> 32 <211> 192 <212> ADN <213> <i>Arthrobacter gandavensis</i>	
10	<400> 32	
	atgaaattag tagaaacaaa aacaacaaaa acaggaacag actttgaagg aaatagggct	60
	ggatgtatTTT gtaatggtac tgtagcagtg gcaaattctc attatgcagg accggcatat	120
	tgtgtgggat attgtggcaa cagtggagtg gtgacaagaa atgccaatgc agatcttgca	180
	agaactgcat ag	192
15	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 33	
	tgggatgtg tttgtagtag	20
25	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 34	
35	tccgttttg cgacattgc	20
40	<210> 35 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
45	<400> 35	
	atgaatgctg ggcgagaaat ttgtcggac	30
50	<210> 36 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 712 871 T3

<223> Cebador
 <400> 36
 5 ggagaccgca cctactggac aatctccttc 30
 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 37
 gaaaggagga acaaaacatg ag 22
 <210> 38
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 38
 tcgtgccaga ttagcattg 20
 30 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 39
 40 agagttgat cctggctgag 20
 <210> 40
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 40
 aaggaggtga tccagccgca 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de *Arthorbacter gandavensis* que tiene una actividad contra *Clostridium perfringens* seleccionada de entre las cepas AP1 depositada en la DSMZ el 19 febrero de 2014 bajo el número DSM 28444, AP2 depositada en la DSMZ el 19 febrero de 2014 bajo el número DSM 28445, AP3 depositada en la DSMZ el 19 febrero de 2014 bajo el número DSM 28446 o AP4 depositada en la DSMZ el 19 febrero de 2014 bajo el número DSM 28447.
- 10 2. Composición que comprende por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1, estando dicha composición preferentemente en forma de un líquido o de un polvo.
- 15 3. Aditivo nutricional que comprende por lo menos una cepa de *Arthorbacter gandavensis* según la reivindicación 1, y/o por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1, estando dicho aditivo preferentemente en forma de un líquido o de un polvo.
- 20 4. Alimento para animales, caracterizado por que comprende un aditivo nutricional según la reivindicación 3 y una base nutricional.
- 25 5. Utilización de por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1 y/o por lo menos una cepa según la reivindicación 1 para la preparación de un aditivo nutricional, de un alimento o de un medicamento.
- 30 6. Mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1, o cepa según la reivindicación 1 para su utilización como medicamento.
- 35 7. Mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1, o cepa según la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de las disbacteriosis intestinales y más particularmente de la enteritis necrótica en los animales monogástricos y más particularmente las aves de corral y los cerdos.
8. Utilización de por lo menos una cepa según la reivindicación 1, de por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1 y/o de por lo menos un aditivo nutricional según la reivindicación 3 y/o de por lo menos un alimento según la reivindicación 4 para mejorar las prestaciones de crecimiento de los animales, de crianza en particular del pollo o del cerdo.
9. Utilización de por lo menos una cepa según la reivindicación 1, y/o de por lo menos un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 1 y/o de por lo menos un aditivo nutricional según la reivindicación 3 y/o de por lo menos un alimento según la reivindicación 4 para mejorar las prestaciones zootécnicas de los animales de crianza.

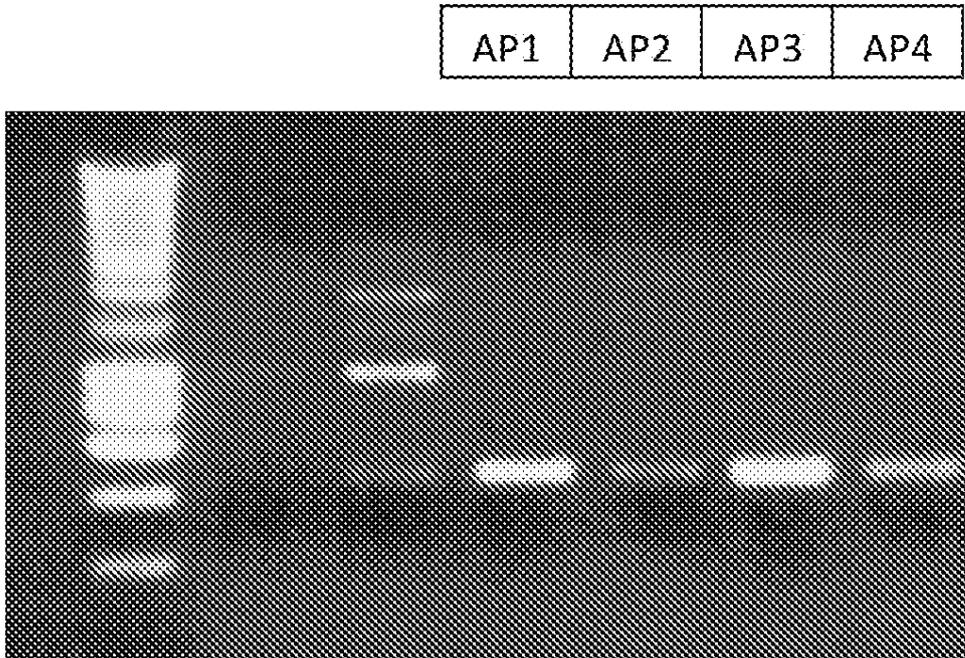


FIGURA 1

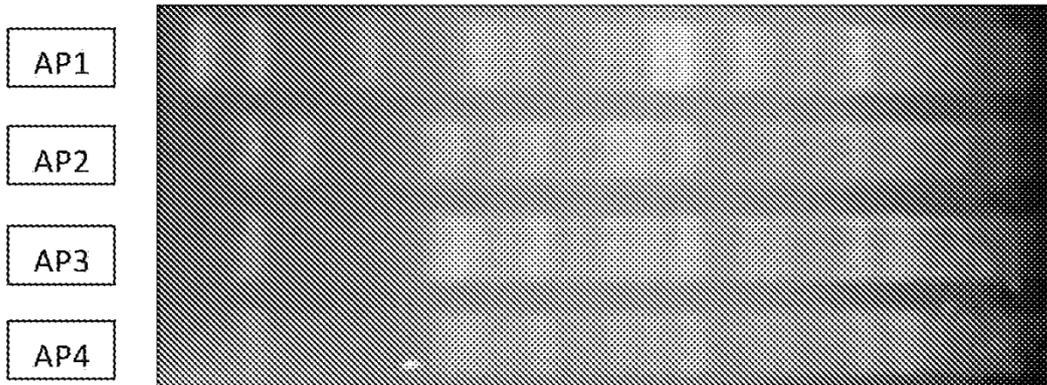


FIGURA 2

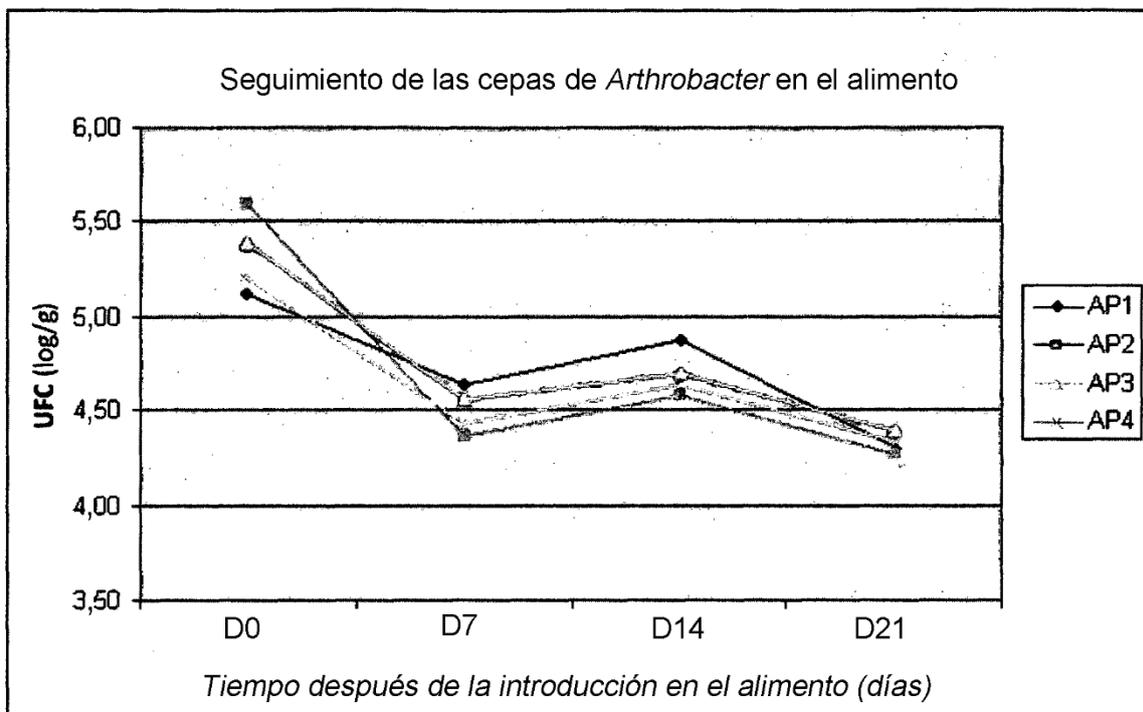


FIGURA 3

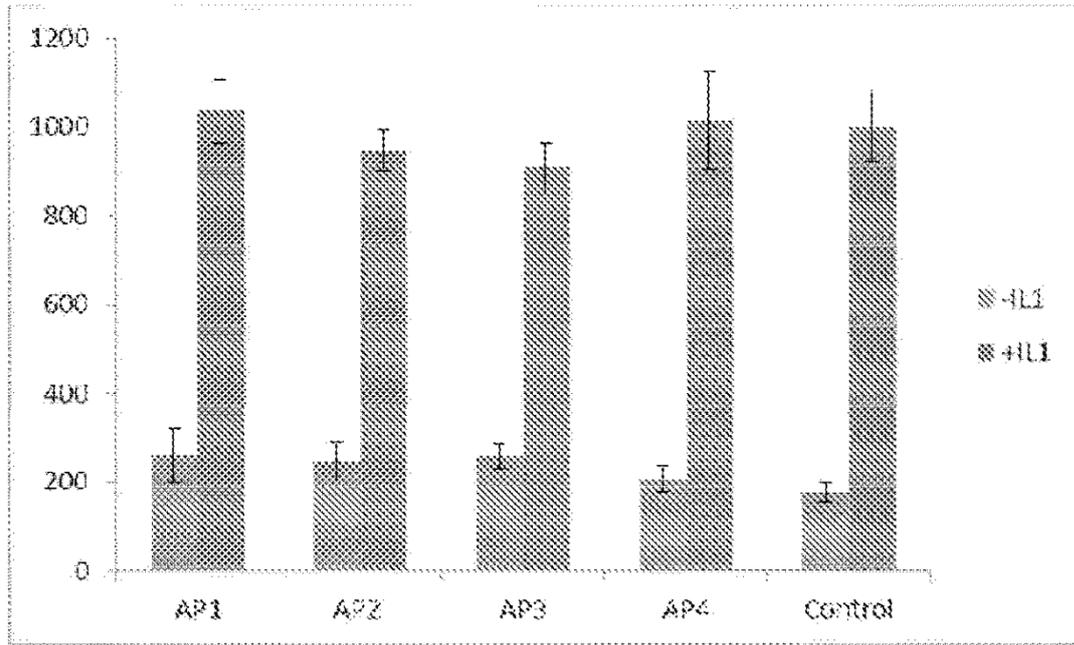


FIGURA 4

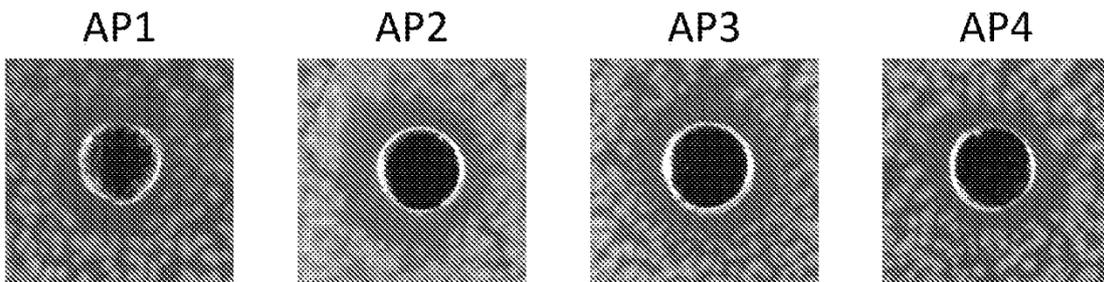


FIGURA 5

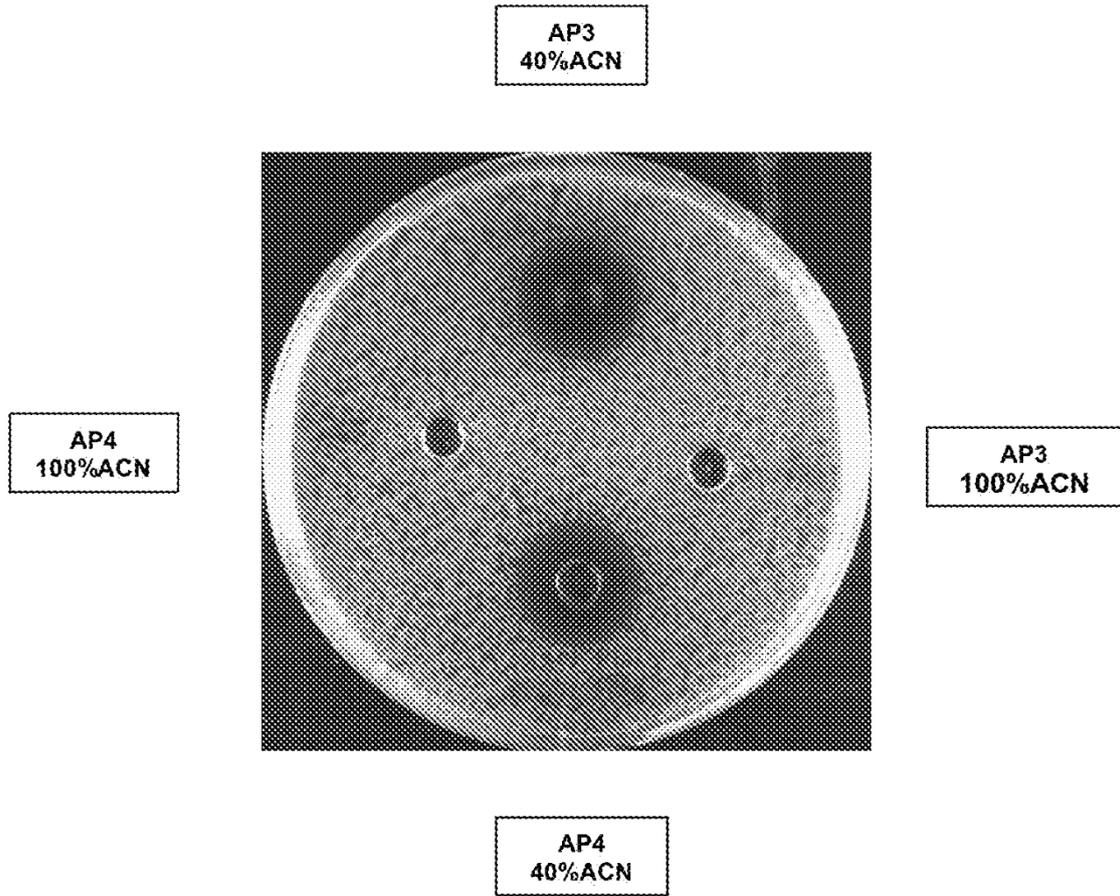


FIGURA 6

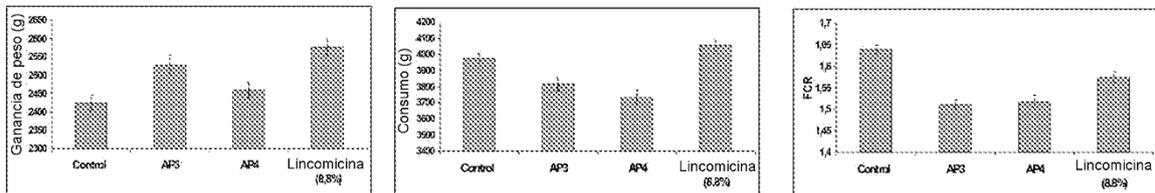


FIGURA 7