

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 823**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
C12R 1/085 (2006.01)
C12R 1/09 (2006.01)
C12R 1/10 (2006.01)
C12R 1/11 (2006.01)
C12R 1/12 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2016 PCT/JP2016/061604**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16163534**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016 E 16776700 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3282008**

54 Título: **Método de esporulación de una bacteria de Bacillus**

30 Prioridad:

09.04.2015 JP 2015079951

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

03.08.2020

73 Titular/es:

**IDEMITSU KOSAN CO., LTD (100.0%)
1-1 Marunouchi 3-chome Chiyoda-ku
Tokyo 100-8321, JP**

72 Inventor/es:

**EGUCHI, TAKANORI;
MORISHITA, YASUYUKI y
TSUKAGOSHI, YUKI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 776 823 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

Método de esporulación de una bacteria de *Bacillus*

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de producción de manera eficiente de esporas de *Bacillus*.

5 Técnica anterior

Se usan bacterias de *Bacillus* en diversos campos tales como producción de enzimas y sustancias útiles, producción de alimentos fermentados, descomposición de sustancias orgánicas, pesticidas microbianos y fertilizantes microbianos. En situaciones en las que se usan tales pesticidas microbianos, fertilizantes microbianos y similares, se utilizan comúnmente esporas de bacterias de *Bacillus*. Sin embargo, incluso las cepas que ejercen un excelente rendimiento para tales aplicaciones han sido difíciles de comercializar sin una capacidad de esporulación eficiente.

Algunos medios usados frecuentemente para cultivo líquido de bacterias de *Bacillus* incluyen caldo nutritivo (DIFCO), caldo de Luria Bertani y caldo con triptona y soja (Beckton Dickinson), pero en estos medios, no se obtuvo suficiente proliferación y apenas se observó formación de esporas en algunos casos.

El documento de patente 1 da a conocer un método para permitir la esporulación llevando a cabo cultivos que incluyen una etapa de reducción de la concentración de oxígeno disuelto después de la proliferación. En determinadas bacterias de *Bacillus*, sin embargo, es difícil permitir de manera eficiente la esporulación incluso usando la misma técnica. Además, en este método, es necesario ajustar las condiciones de agitación y ventilación en la etapa de cultivo, lo que complica el procedimiento de fabricación.

El documento de patente 2 da a conocer un método para permitir la esporulación continuando el cultivo durante un largo periodo de tiempo después de que la fuente de carbono se haya agotado. Sin embargo, este método no es adecuado para la producción real ya que el coste de cultivo será alto debido al cultivo prolongado. Además, en determinadas bacterias de *Bacillus*, es difícil permitir la esporulación incluso usando la misma técnica.

El documento de patente 3 da a conocer un método de producción de esporas definiendo el intervalo de la concentración de fosfato en el medio de cultivo y el intervalo del suministro de oxígeno y la tasa de agitación como condiciones de cultivo. En determinadas bacterias de *Bacillus*, sin embargo, es difícil formar de manera eficiente esporas incluso usando la misma técnica. Además, es necesario usar una instalación de cultivo que pueda lograr las condiciones de cultivo indicadas en la práctica.

Bibliografía de la técnica anteriorDocumentos de patentes

30 Documento de patente 1: solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2007-236286

Documento de patente 2: solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2000-217567

Documento de patente 3: solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2007-195542

Sumario de la invenciónProblemas que se van a resolver mediante la invención

35 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de cultivo que pueda producir de manera eficiente esporas de una bacteria de *Bacillus* que apenas forma esporas en medio líquido general para bacterias.

Medios para resolver los problemas

40 Los presentes inventores estudiaron intensamente con el fin de resolver los problemas anteriores, y, por consiguiente, ha encontrado composiciones de medio líquido adecuadas para proliferación y esporulación eficiente de bacterias de *Bacillus* cuya eficiencia de producción de esporas no es suficiente en cultivo usando medios líquidos convencionales para bacterias, completaron así la presente invención.

La presente invención es tal como sigue:

45 [1] Un método de producción de esporas de *Bacillus* que comprende una etapa de cultivar la bacteria de *Bacillus* usando un medio líquido que tiene una razón C/N (razón en peso del contenido de carbono con respecto al contenido de nitrógeno) de más de 4,0 y menos de 9,5, en el que la bacteria de *Bacillus* es *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex* o *Bacillus megaterium* y en el que el contenido de potasio en el medio líquido es de menos de 2,0 g/l.

[2] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en [1], en el que la razón C/N en el medio líquido usado

para cultivar es de 4,5 o más y menos de 9,5.

[3] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en [1], en el que la razón C/N en el medio líquido usado para cultivar es de 4,5 o más y 7,5 o menos.

5 [4] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en [1], en el que la razón C/N en el medio líquido usado para cultivar es de 6,0 o más y 7,5 o menos.

[5] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en uno cualquiera de [1] a [4], en el que el contenido de carbono en el medio líquido es de 50 g/l o menos.

[6] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en uno cualquiera de [1] a [4], en el que el contenido de carbono en el medio líquido es de 25 g/l o menos.

10 [7] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en uno cualquiera de [1] a [6], en el que el contenido de potasio en el medio líquido es de 1,9 g/l o menos.

[8] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en uno cualquiera de [1] a [7], en el que las fuentes de carbono y nitrógeno contenidas en el medio líquido son fuentes de carbono y nitrógeno que pueden utilizarse por la bacteria de *Bacillus*.

15 [9] El método de producción de esporas de *Bacillus* descrito en [8], en el que la fuente de carbono que puede utilizarse por la bacteria de *Bacillus* es una o más fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, glicerol, arabinosa, ribosa, xilosa, galactosa, fructosa, manosa, inositol, manitol, sorbitol, glucosamina, N-acetilglucosamina, celobiosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, xilitol, alcoholes, ácidos orgánicos, sales orgánicas y alcanos; y la fuente de nitrógeno que puede utilizarse por la bacteria de *Bacillus* es una o más fuentes de nitrógeno seleccionadas de grupo que consiste en componentes derivados de soja, componentes derivados de levadura, componentes derivados de maíz, proteínas animales y vegetales e hidrolizados de las mismas, y sales de amonio tales como nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, amoniaco, nitrato de sodio, nitrato de potasio, glutamato de sodio, urea y similares.

20

Efecto de la invención

25 La presente invención puede permitir una proliferación y esporulación estable de bacterias de *Bacillus*, y además proliferación a mayor concentración y esporulación a una mayor tasa.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

30 En la presente divulgación, las bacterias de *Bacillus* no están particularmente limitadas siempre que sean bacterias clasificadas como *Bacillus*, e incluyen *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pichinoty*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus alkalicola*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus azotoformans*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus badius*, *Bacillus bataviensis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cycloheptanicus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus aneurinilyticus*, *Bacillus migulanus*, *Bacillus abyssalis*, *Bacillus aestuarii*, *Bacillus polymyxa* o *Bacillus* sp..

35 Entre estas se prefieren *Bacillus simplex*, *Bacillus siamensis* y *Bacillus megaterium*.

En la presente invención, se usa un medio líquido que tiene una razón C/N (razón en peso del contenido de carbono con respecto al contenido de nitrógeno) de más de 4,0 y menos de 9,5 para el cultivo. La razón C/N es preferiblemente de 4,5 o más y menos de 9,5, más preferiblemente 4,5 o más y 7,5 o menos, todavía más preferiblemente 6,0 o más y 7,5 o menos. La razón C/N se calcula tal como sigue:

40 Razón C/N = contenido de carbono total en cada componente de los medios/contenido de nitrógeno total en cada componente de los medios.

El contenido de carbono en el medio líquido usado en la presente invención es preferiblemente de 50 g/l o menos, más preferiblemente de 25 g/l o menos. Por otro lado, el contenido de carbono es preferiblemente de 3 g/l o más.

45 Para las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio líquido usado para el cultivo, pueden usarse aquellas que pueden utilizarse por bacterias de *Bacillus*. Los ejemplos de la fuente de carbono que puede utilizarse incluyen azúcares que pueden utilizarse por bacterias de *Bacillus* (tales como almidón, glucosa, lactosa, glicerol, arabinosa, ribosa, xilosa, galactosa, fructosa, manosa, inositol, manitol, sorbitol, glucosamina, N-acetilglucosamina, celobiosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, xilitol), alcoholes, ácidos orgánicos, sales orgánicas, alcanos u otras fuentes de carbono comunes. Los ejemplos de la fuente de nitrógeno que puede utilizarse incluyen componentes derivados de soja, componentes derivados de levadura, componentes derivados de maíz, proteínas animales y vegetales e hidrolizados de las mismas, y sales de amonio tales como nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio y acetato de amonio, amoniaco, nitrato de sodio, nitrato de potasio, glutamato de sodio, urea.

50

En el medio líquido usado en la presente invención, el contenido de potasio es preferiblemente de menos de 2 g/l, más preferiblemente 1,9 g/l o menos, con el fin de lograr una mayor tasa de esporulación. El contenido de potasio es preferiblemente de 0,2 g/l o más. Como fuentes de potasio, por ejemplo, se seleccionan al menos uno de componente derivado de soja, componente derivado de levadura, componente derivado de maíz, proteínas animales y vegetales e hidrolizados de las mismas, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y KCl para el cultivo.

Pueden añadirse otras composiciones del medio, tales como sales de metales traza comúnmente usada para cultivar bacterias de *Bacillus*, siempre que no afecten negativamente a la esporulación y, si es necesario, por ejemplo, pueden añadirse aminoácidos o vitaminas.

Condiciones de cultivo pueden ser aquellas usadas generalmente para el cultivo líquido de bacterias de *Bacillus*, incluyendo condiciones de cultivo a de 20 a 40°C en condiciones aerobias (por ejemplo, del 15 al 50% de concentración de oxígeno) con agitación durante de 10 a 100 horas. El pH del medio es preferiblemente de 6,5 a 8,5, más preferiblemente de 7,0 a 8,0. Puede realizarse cultivo previo antes del cultivo en el medio líquido que tiene las razones C/N descritas anteriormente.

De esta manera, pueden obtenerse células bacterianas de *Bacillus* que tienen una alta tasa de esporulación (por ejemplo, el 50% o más, preferiblemente el 80% o más). Tales células bacterianas de *Bacillus* que tienen una alta tasa de esporulación pueden usarse para un fin deseado después de someterse a operaciones adecuadas tales como concentración o retirada de medio y secado.

Ejemplos

La presente invención se describirá en detalle a continuación con referencia a los ejemplos, pero no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Evaluación de la cepa de Bacillus simplex NBRC15720

Usando un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, se prepararon cada uno de 100 ml de medios que contenían glucosa (Wako Pure Chemicals), harina de soja desgrasada (Ajinomoto Healthy Supply), extracto de levadura (Difco), CSL (líquido de maceración de maíz, por sus siglas en inglés, *Corn Steep Liquor*: ROQUETTE), peptona (Difco) y KH_2PO_4 (Wako Pure Chemicals) de modo que se lograron las concentraciones finales enumeradas en la tabla 1 y que contenían además 100 ppm de MnCl_2 (Wako Pure Chemicals), 400 ppm de NaCl (Wako Pure Chemicals), 250 ppm de MgCl_2 (Wako Pure Chemicals), 75 ppm de CaCl_2 (Wako Pure Chemicals) y 0,3 ppm de FeSO_4 (Wako Pure Chemicals), y se llevó a cabo esterilización en autoclave con un SILICOSEN (la glucosa se esterilizó por separado y se mezcló de manera aséptica con el fin de evitar la reacción de Maillard).

En primer lugar, se tomó un asa de siembra de la cepa de *Bacillus simplex* NBRC15720 de una colonia que ha crecido sobre una placa de agar nutritivo, se inoculó de manera aséptica en el medio descrito en la condición del medio 1 en la tabla 1 y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm para obtener un medio de cultivo previo.

Se inoculó de manera aséptica tres mililitros del medio de cultivo previo obtenido en diversos medios descritos en la tabla 1 y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm durante de 40 horas a 72 horas para obtener un medio de cultivo.

Después del cultivo, se midieron la concentración de células bacterianas en el medio de cultivo y la tasa de esporulación de las células bacterianas usando un microscopio óptico y un contador de células bacterianas.

Algunos métodos para medir la concentración de células bacterianas, concentración de esporas y tasa de esporulación son tal como sigue. La cepa de *Bacillus simplex* que ha crecido en el medio de cultivo se diluyó con, por ejemplo, agua estéril que contenía Tween 20 al 0,01%, y entonces se contaron la concentración de células bacterianas (esporas y células vegetativas) y la concentración de esporas con un contador de células bacterianas. La tasa de esporulación se calculó mediante: concentración de esporas/concentración de células bacterianas.

La razón C/N se calculó a partir de la razón en peso del contenido de carbono con respecto al contenido de nitrógeno en cada componente del medio. Razón C/N = contenido de carbono total en cada componente de los medios/contenido de nitrógeno total en cada componente de los medios.

El contenido de carbono en cada componente del medio se calculó mediante la determinación de la concentración de azúcar reductor mediante el método de Somogyi después de hidrólisis en ácido y, posteriormente, multiplicando la cantidad de azúcar total por 0,4.

El contenido de nitrógeno en cada componente del medio se determinó mediante el método de Kjeldahl.

El contenido de potasio en cada componente del medio se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica (longitud de onda de medición: 766,5 nm).

Tabla 1. Composición del medio

Condiciones del medio	g/l					
	Glucosa	Harina de soja desgrasada	Extracto de levadura	CSL	Peptona	KH ₂ PO ₄
1	4	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
2	10,0	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
3	9,0	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
4	8,0	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
5	6,0	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
6	5,5	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
7	1,5	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
8	0,0	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
9	4,0	4,0	1,6	0,8	1,6	5,5
10	4,0	4,0	1,6	0,8	1,6	1
11	4,0	4,0	1,6	0,8	1,6	0
12	10,0	10,0	4,0	2,0	4,0	5,0
13	10,0	10,0	4,0	2,0	4,0	1,0
14	0,5	4,0	1,6	0,8	1,6	6,4
15	10	4,0	1,6	0,8	1,6	6,4
16	10	4,0	1,6	0,8	1,6	0
17	4	2,5	3,0	2,0	0	1,0
18	4	6,0	0	0	0	1,0

Los resultados se muestran en la tabla 2. A la razón C/N de 9,5 o más, aunque se observó crecimiento de las células bacterianas, se detectó una disminución en la tasa de esporulación. Por otro lado, a la razón C/N de 4,0 o menos, aunque se observó crecimiento de las células bacterianas, se detectó una disminución en la tasa de esporulación. Se encontró que el contenido de potasio preferido estaba en el intervalo de 0,2 a 1,9 g/l.

5

Tabla 2. Resultados del cultivo para la cepa NBRC15720

Condición del medio	Contenido de cada componente (g/l) y razón C/N en el medio				Resultado del cultivo		
	Contenido de potasio	Razón C/N	Contenido de carbono	Contenido de nitrógeno	Concentración de células bacterianas célula/ml	Tasa de esporulación %	Concentración de esporas espóra/ml
1	0,8	6,0	4,1	0,7	2,4E+09	75%	1,8E+09
2	0,8	9,5	6,5	0,7	1,6E+09	8%	1,3E+08
3	0,8	9,0	6,1	0,7	1,3E+09	89%	1,2E+09
4	0,8	8,4	5,7	0,7	1,6E+09	89%	1,5E+09
5	0,8	7,2	4,9	0,7	1,6E+09	67%	1,1E+09
6	0,8	6,9	4,7	0,7	1,8E+09	76%	1,4E+09
7	0,8	4,5	3,1	0,7	1,8E+09	70%	1,3E+09
8	0,8	3,7	2,5	0,7	1,1E+09	50%	5,4E+08
9	1,8	6,0	4,1	0,7	1,4E+09	97%	1,4E+09
10	0,5	6,0	4,1	0,7	2,0E+09	90%	1,8E+09
11	0,2	6,0	4,1	0,7	1,2E+09	94%	1,2E+09
12	1,9	6,0	10,2	1,7	2,2E+09	86%	1,9E+09
13	0,8	6,0	10,2	1,7	2,7E+09	82%	2,2E+09
14	2,0	4,0	2,7	0,7	1,3E+07	7%	9,4E+05
15	2,0	9,5	6,5	0,7	1,3E+07	0%	0,0E+00
16	0,2	9,5	6,5	0,7	1,2E+09	25%	3,1E+08
17	0,5	6,5	3,5	0,4	4,0E+09	68%	2,8E+09
18	0,4	7,5	3,5	0,5	1,5E+09	77%	1,2E+09

Ejemplo 2*Evaluación de la cepa de Bacillus simplex NBRC104473*

- 5 Usando un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, se prepararon cada uno de 100 ml de medios que contenían glucosa (Wako Pure Chemicals), harina de soja desgrasada (Ajinomoto Healthy Supply), extracto de levadura (Difco), CSL (ROQUETTE), peptona (Difco) y KH_2PO_4 (Wako Pure Chemicals) de modo que se lograron las concentraciones finales de las condiciones del medio 1 a 3 enumeradas en la tabla 3 y que contenían además cada uno 100 ppm de MnCl_2 (Wako Pure Chemicals), 400 ppm de NaCl (Wako Pure Chemicals), 250 ppm de MgCl_2 (Wako Pure Chemicals), 75 ppm de CaCl_2 (Wako Pure Chemicals) y 0,3 ppm de FeSO_4 (Wako Pure Chemicals), y se llevó a cabo esterilización en autoclave con un SILICOSEN (la glucosa se esterilizó por separado y se mezcló de manera aséptica con el fin de evitar la reacción de Maillard).

- 15 Se tomó un asa de siembra de la cepa de *Bacillus simplex* NBRC104473 de una colonia que ha crecido sobre una placa de agar nutritivo, se inoculó de manera aséptica en el medio descrito en la condición del medio 1 enumerada en la tabla 3 y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm para obtener un medio de cultivo previo. Se inoculó cada uno de 3 ml del medio de cultivo previo obtenido usado para cultivar la cepa de *Bacillus simplex* NBRC104473 de manera aséptica en cada medio descrito en la tabla 3 y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm durante de 40 horas a 72 horas para obtener un medio de cultivo. Después del cultivo, se midieron la concentración de células bacterianas en el medio de cultivo y la tasa de esporulación de las células bacterianas usando un microscopio óptico y un contador de células bacterianas.

Tabla 3. Composición del medio

Condición del medio	g/l					
	Glucosa	Harina de soja desgrasada	Extracto de levadura	CSL	Peptona	KH_2PO_4
1	4,0	4,0	1,6	0,8	1,6	2,0
2	0,5	4,0	1,6	0,8	1,6	6,4
3	10	4,0	1,6	0,8	1,6	6,4

Los resultados se muestran en la tabla 4. La cepa NBRC104473 también mostró la misma tendencia que en el ejemplo 1.

Tabla 4. Resultados del cultivo para la cepa NBRC104473

Condición del medio	Contenido de cada componente (g/l) y razón C/N en el medio				Resultado del cultivo		
	Contenido de potasio	Razón C/N	Contenido de carbono	Contenido de nitrógeno	Concentración de células bacterianas célula/ml	Tasa de esporulación %	Concentración de esporas espora/ml
1	0,77	6,01	4,09	0,68	1,2E+09	100%	1,2E+09
2	2,03	3,95	2,69	0,68	4,4E+07	0%	0,0E+00
3	2,03	9,54	6,49	0,68	3,2E+07	0%	0,0E+00

Ejemplo 3

Evaluación en el sistema de fermentación en bote

- 5 Usando un tanque de cultivo de 5 l, se prepararon cada uno de 2.000 ml de medios que contenían glucosa (Wako Pure Chemicals), harina de soja desgrasada (Ajinomoto Healthy Supply), extracto de levadura (Difco), CSL (ROQUETTE), peptona (Difco) y KH_2PO_4 (Wako Pure Chemicals) de modo que se lograron las concentraciones finales de las condiciones del medio 1 a 3 enumeradas en la tabla 5 y que contenían además cada uno 100 ppm de MnCl_2 (Wako Pure Chemicals), 400 ppm de NaCl (Wako Pure Chemicals), 250 ppm de MgCl_2 (Wako Pure Chemicals), 75 ppm de CaCl_2 (Wako Pure Chemicals) y 0,3 ppm de FeSO_4 (Wako Pure Chemicals), y se llevó a cabo esterilización en autoclave (la glucosa se esterilizó por separado y se mezcló de manera aséptica con el fin de evitar la reacción de Maillard).

- 15 Se tomó un asa de siembra de *Bacillus simplex* NBRC15720 de una colonia que ha crecido sobre una placa de agar nutritivo, se inoculó de manera aséptica en el medio de la condición del medio 1 descrito en el ejemplo 1 (tabla 1) preparado en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm para obtener un medio de cultivo previo. Se inoculó cada uno de 60 ml del medio de cultivo previo obtenido usado para cultivar la cepa de *Bacillus simplex* NBRC15720 de manera aséptica en cada medio descrito en la tabla 5 y se cultivó durante la noche con aireación y agitación a 37°C y 400 rpm durante 40 horas para obtener un medio de cultivo. Después del cultivo, se midieron la concentración de células bacterianas en el medio de cultivo y la tasa de esporulación de las células bacterianas usando un microscopio óptico y un contador de células bacterianas.

Tabla 5. Composición del medio

Condición del medio	g/l					
	Glucosa	Harina de soja desgrasada	Extracto de levadura	CSL	Peptona	KH_2PO_4
1	10,0	10,0	12,0	8,0	0	1,0
2	20,0	16,0	12,0	8,0	0	1,0
3	35,0	20,0	12,0	8,0	0	0

- 25 Los resultados se muestran en la tabla 6. Siempre que C/N esté dentro de un determinado intervalo, se obtuvo el 50% o más de la tasa de esporulación de la cepa de *Bacillus simplex* NBRC15720 incluso en un sistema de fermentación en bote.

Tabla 6. Resultados del cultivo para la cepa NBRC15720 (sistema de fermentación en bote)

Condición del medio	Contenido de cada componente (g/l) y razón C/N en el medio				Resultado del cultivo		
	Contenido de potasio	Razón C/N	Contenido de carbono	Contenido de nitrógeno	Concentración de células bacterianas célula/ml	Tasa de esporulación %	Concentración de esporas espora/ml
1	1,24	5,41	11,67	2,16	9,0E+09	60%	5,4E+09
2	1,36	6,68	17,53	2,62	1,5E+10	53%	7,9E+09
3	1,15	8,45	24,76	2,93	1,8E+10	61%	1,1E+10

Ejemplo 4

Evaluación de Bacillus siamensis en el sistema de fermentación en bote

Usando un tanque de cultivo de 5 l, se prepararon cada uno de 2.000 ml de medios que contenían glucosa (Wako Pure Chemicals), harina de soja desgrasada (Ajinomoto Healthy Supply), extracto de levadura (Difco), CSL (ROQUETTE), peptona (Difco) y KH_2PO_4 (Wako Pure Chemicals) de modo que se lograron las concentraciones finales de las condiciones del medio 1 a 3 enumeradas en la tabla 7 y que contenían además cada uno 100 ppm de MnCl_2 (Wako Pure Chemicals), 400 ppm de NaCl (Wako Pure Chemicals), 250 ppm de MgCl_2 (Wako Pure Chemicals), 75 ppm de CaCl_2 (Wako Pure Chemicals) y 0,3 ppm de FeSO_4 (Wako Pure Chemicals), y se llevó a cabo esterilización en autoclave (la glucosa se esterilizó por separado y se mezcló de manera aséptica con el fin de evitar la reacción de Maillard).

Se tomó un asa de siembra de *Bacillus siamensis* de una colonia que ha crecido sobre una placa de agar nutritivo, se inoculó de manera aséptica en el medio de la condición del medio 1 descrito en la tabla 7 preparado en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm para obtener un medio de cultivo previo. Se inoculó cada uno de 60 ml del medio de cultivo previo obtenido usado para cultivar el *Bacillus siamensis* de manera aséptica en diversos medios descritos en la tabla 7 y se cultivó durante la noche con aireación y agitación a 37°C y 400 rpm durante 40 horas para obtener un medio de cultivo. Después del cultivo, se midieron la concentración de células bacterianas en el medio de cultivo y la tasa de esporulación de las células bacterianas usando un microscopio óptico y un contador de células bacterianas.

Tabla 7. Composición del medio

Condición del medio	g/l					
	Glucosa	Harina de soja desgrasada	Extracto de levadura	CSL	Peptona	KH_2PO_4
1	8,0	5,0	6,0	4,0	0	0,5
2	24,0	15,0	18,0	12,0	0	0,8
3	36,0	15,0	18,0	12,0	0	0,8

Los resultados se muestran en la tabla 8. Siempre que C/N esté dentro de un determinado intervalo, se obtuvo el 88% o más de la tasa de esporulación del *Bacillus siamensis* incluso en un sistema de fermentación en bote.

Tabla 8. Resultados del cultivo para *Bacillus siamensis* (sistema de fermentación en bote)

Condición del medio	Contenido de cada componente (g/l) y razón C/N en el medio				Resultado del cultivo		
	Contenido de potasio	Razón C/N	Contenido de carbono	Contenido de nitrógeno	Concentración de células bacterianas célula/ml	Tasa de esporulación %	Concentración de esporas espora/ml
1	0,62	6,52	7,04	1,08	3,1E+09	93%	2,9E+09
2	1,64	6,52	21,11	3,24	6,8E+09	88%	6,0E+09
3	1,64	8,00	25,91	3,24	8,0E+10	95%	7,6E+10

Ejemplo 5

Resultados de cultivo para Bacillus megaterium (sistema de fermentación en bote)

Usando un tanque de cultivo de 5 l, se prepararon cada uno de 2.000 ml de medios que contenían glucosa (Wako Pure Chemicals), harina de soja desgrasada (Ajinomoto Healthy Supply), extracto de levadura (Difco), CSL (ROQUETTE), peptona (Difco) y KH_2PO_4 (Wako Pure Chemicals) de modo que se lograron las concentraciones finales de las condiciones del medio 1 a 3 enumeradas en la tabla 9 y que contenían además cada uno 100 ppm de MnCl_2 (Wako Pure Chemicals), 400 ppm de NaCl (Wako Pure Chemicals), 250 ppm de MgCl_2 (Wako Pure Chemicals), 75 ppm de CaCl_2 (Wako Pure Chemicals) y 0,3 ppm de FeSO_4 (Wako Pure Chemicals), y se llevó a cabo esterilización en autoclave (la glucosa se esterilizó por separado y se mezcló de manera aséptica con el fin de evitar la reacción de Maillard).

Se tomó un asa de siembra de *Bacillus megaterium* de una colonia que ha crecido sobre una placa de agar nutritivo, se inoculó de manera aséptica en el medio de la condición del medio 1 descrito en la tabla 9 preparado en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml y se cultivó durante la noche con agitación a 37°C y 150 rpm para obtener un medio de

cultivo previo. Se inoculó cada uno de 60 ml del medio de cultivo previo obtenido usado para cultivar el *Bacillus megaterium* de manera aséptica en diversos medios descritos en la tabla 9 y se cultivó durante la noche con aireación y agitación a 37°C y 400 rpm durante 40 horas para obtener un medio de cultivo. Después del cultivo, se midieron la concentración de células bacterianas en el medio de cultivo y la tasa de esporulación de las células bacterianas usando un microscopio óptico y un contador de células bacterianas.

5

Tabla 9. Composición del medio

Condición del medio	g/l					
	Glucosa	Harina de soja desgrasada	Extracto de levadura	CSL	Peptona	KH ₂ PO ₄
1	8,0	5,0	6,0	4,0	0	0,5
2	24,0	15,0	18,0	12,0	0	0,8
3	36,0	15,0	18,0	12,0	0	0,8

Los resultados se muestran en la tabla 10. Siempre que C/N esté dentro de un determinado intervalo, se obtuvo el 78% o más de la tasa de esporulación del *Bacillus megaterium* incluso en un sistema de cultivo a granel.

10

Tabla 10. Resultados del cultivo para *Bacillus siamensis* (sistema de fermentación en bote)

Condición del medio	Contenido de cada componente (g/l) y razón C/N en el medio				Resultado del cultivo		
	Contenido de potasio	Razón C/N	Contenido de carbono	Contenido de nitrógeno	Concentración de células bacterianas célula/ml	Tasa de esporulación %	Concentración de esporas espora/ml
1	0,62	6,52	7,04	1,08	2,7E+09	78%	2,1E+09
2	1,64	6,52	21,11	3,24	8,4E+09	95%	8,0E+09
3	1,64	8,00	25,91	3,24	9,2E+10	93%	8,6E+10

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de esporas de *Bacillus* que comprende una etapa de cultivar la bacteria de *Bacillus* usando un medio líquido que tiene una razón C/N (razón en peso del contenido de carbono con respecto al contenido de nitrógeno) de más de 4,0 y menos de 9,5, en el que la bacteria de *Bacillus* es *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex* o *Bacillus megaterium* y en el que el contenido de potasio en el medio líquido es de menos de 2,0 g/l.
2. Método de producción de esporas de *Bacillus* según la reivindicación 1, en el que la razón C/N en el medio líquido usado para cultivar es de 4,5 o más y menos de 9,5
3. Método de producción de esporas de *Bacillus* según la reivindicación 1, en el que la razón C/N en el medio líquido usado para cultivar es de 4,5 o más y 7,5 o menos.
4. Método de producción de esporas de *Bacillus* según la reivindicación 1, en el que la razón C/N en el medio líquido usado para cultivar es de 6,0 o más y 7,5 o menos.
5. Método de producción de esporas de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el contenido de carbono en el medio líquido es de 50 g/l o menos.
6. Método de producción de esporas de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el contenido de carbono en el medio líquido es de 25 g/l o menos.
7. Método de producción de esporas de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el contenido de potasio en el medio líquido es de 1,9 g/l o menos.
8. Método de producción de esporas de *Bacillus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las fuentes de carbono y nitrógeno contenidas en el medio líquido son fuentes de carbono y nitrógeno que pueden utilizarse por la bacteria de *Bacillus*.
9. Método de producción de esporas de *Bacillus* según la reivindicación 8, en el que la fuente de carbono que puede utilizarse por la bacteria de *Bacillus* es una o más fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, glicerol, arabinosa, ribosa, xilosa, galactosa, fructosa, manosa, inositol, manitol, sorbitol, glucosamina, N-acetilglucosamina, celobiosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, xilitol, alcoholes, ácidos orgánicos, sales orgánicas y alcanos; y la fuente de nitrógeno que puede utilizarse por la bacteria de *Bacillus* es una o más fuentes de nitrógeno seleccionadas de grupo que consiste en componentes derivados de soja, componentes derivados de levadura, componentes derivados de maíz, proteínas animales y vegetales e hidrolizados de las mismas, y sales de amonio tales como nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, amoniaco, nitrato de sodio, nitrato de potasio, glutamato de sodio, urea y similares.