

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 855 598**

51 Int. Cl.:

<b>A23K 10/00</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/00</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/02</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/163</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/30</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/60</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2014 PCT/EP2014/060661**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14187955**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2014 E 14725725 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3007566**

54 Título: **Uso de una composición de Bacillus para aumentar la cantidad de azúcares disponibles en pienso animal**

30 Prioridad:

**24.05.2013 EP 13169189**  
**09.04.2014 US 201414248914**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NIELSEN, BEATRICE;**  
**STYRISHAVE, TINA;**  
**CANTOR, METTE DINES;**  
**DERKX, PATRICK;**  
**NIELSEN, JONNA y**  
**LANTZ, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 855 598 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

Uso de una composición de *Bacillus* para aumentar la cantidad de azúcares disponibles en pienso animal

5 **Campo de la invención**

La actividad enzimática para degradar los polisacáridos no amiláceos (PNA) se puede analizar para cada enzima individual (es decir, endocelulasas) o por la medida de los productos de degradación cuando el PNA se degrada: azúcares reductores. Se han ensayado un número de cepas de *Bacillus* en un ensayo recién desarrollado que mide los azúcares reductores tras incubación en pienso para cerdos y aves y se ha encontrado que son capaces de aumentar la cantidad de azúcar disponible de componentes de pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos (PNA).

La invención se refiere al uso de una composición de *Bacillus* que comprende al menos una cepa de *Bacillus* para aumentar la cantidad de azúcares reductores en componentes de pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos (PNA) y al método recién desarrollado basado en pienso para ensayar la cantidad de azúcares reductores en pienso al que se ha añadido una composición de *Bacillus*. En formas de realización particulares, la invención se refiere al uso de una composición de *Bacillus* que comprende al menos una cepa de *Bacillus* para aumentar la cantidad de azúcares reductores en pienso animal que comprende el 14% (p/p) o más de polisacáridos no amiláceos (PNA) si el pienso animal es para un lechón, cerda lactante, pollo para asar o gallina ponedora o el 19% (p/p) o más de polisacáridos no amiláceos (PNA) si el pienso animal es para un cerdo de engorde o cerda gestante.

**Antecedentes de la invención**

Los precios crecientes de las materias primas en el mundo son un desafío para la producción animal con mala economía. Además, la utilización de pienso no es óptima, ya que cerdos y aves no producen enzimas PNA y por tanto hasta el 15-25% de la ración de pienso no se digiere (Barletta, 2011).

Los animales usan enzimas para digerir el pienso. Las enzimas pueden ser producidas por el animal mismo o por microbios presentes en el intestino o se pueden añadir como aditivos del pienso. El 15-25% del pienso no es digerido por los cerdos y aves debido a la falta de enzimas o debido al contenido de factores antinutricionales indigeribles que interfieren con el proceso digestivo (Barletta, 2011).

En las raciones de pienso que comprenden subproductos tal como granos de destilería secos con solubles (DDGS) o salvado de trigo incluso una cantidad mayor de nutrientes del pienso no se digerirá debido a las altas cantidades de polisacáridos no amiláceos (PNA) ya que los cerdos y las aves no pueden producir enzimas de PNA.

El documento US2012/0128827 divulga una nueva cepa de *Bacillus subtilis* NRRLB-50213 que puede degradar almidón e hidratos de carbono considerados como antinutricionales que se pueden encontrar en harina de soja. Al añadir la cepa NRRLB-50213 al alimento, se puede lograr mejor degradación de los hidratos de carbono encontrados en harinas vegetales y, como resultado, habrá más energía disponible para el animal lo que significa una disminución en los costes de alimentación y mayor crecimiento.

El documento US2013/0064927 divulga cepas de *Bacillus* productoras de enzimas aisladas que proporcionan una mejora en al menos uno de los siguientes: peso corporal, ganancia diaria media, ingesta de pienso diaria media, eficacia del pienso, características de carcasa, digestibilidad de nutrientes y problemas de desechos de estiércol.

El documento WO2012/110778 divulga una composición aditiva de pienso que comprende un microbio de alimentación directa (DFM) en combinación con una proteasa, una xilanasa, una amilasa y una fitasa. Los resultados del ejemplo 6 sugieren que el DMF funciona sinérgicamente con las enzimas exógenas para permitir que el ave utilice la energía que se hubiera gastado produciendo enzimas para la digestión del almidón en la dieta.

El documento WO2010/069990 divulga un producto que fomenta el crecimiento de probióticos que comprende *Bacillus subtilis* DSM 17231.

El documento EP 2 011 858 divulga *Bacillus subtilis* DSM 19489, una cepa de *Bacillus* resistente a la bilis que secreta altos niveles de fitasa.

El documento WO03/093420 describe métodos para la hidrólisis enzimática de sustratos de lignocelulosa para la producción de etanol y ensayos que usan sobrenadantes de cultivo esterilizados y concentrados de cepas sin identificar.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anteriores proporciona ninguna sugerencia o pista para un método para producir un pienso animal que comprenda determinar si una composición de *Bacillus* que comprende al menos una cepa de *Bacillus* es capaz de aumentar la cantidad de azúcar disponible de componentes del pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos (PNA), dicho método comprende incubar los componentes de

pienso animal con la composición de Bacillus a 37°C durante 24 horas, medir la absorbancia en un ensayo de ácido dinitrosalicílico (DNS) a DO<sub>540</sub> y calcular la cantidad de equivalentes de hexosa producidos correlacionando la absorbancia medida con una curva patrón.

## 5 Compendio de la invención

El problema que se va a resolver mediante la presente invención es proporcionar un medio para aumentar el contenido de polisacáridos no amiláceos (PNA) en pienso animal sin comprometer el rendimiento animal.

10 La solución es añadir una composición de Bacillus que comprende al menos una cepa de Bacillus que es capaz de aumentar la cantidad azúcar disponible de los componentes del pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos (PNA) y aumentar el contenido de polisacáridos no amiláceos (PNA) en el pienso animal. Esta solución se basa en un método para ensayo desarrollado por los presentes inventores para la identificación de cepas de Bacillus que tienen la propiedad de aumentar la cantidad de azúcar disponible de componentes de pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos (PNA).

15 Mientras que se sabe que ciertos Bacillus spp. tienen capacidades productoras de enzimas incluyendo enzimas de PNA, según el conocimiento de los presentes inventores nunca se ha considerado añadir una composición de Bacillus que comprende al menos una cepa de Bacillus que sea capaz de aumentar la cantidad de azúcares disponibles en el pienso animal con el fin de aumentar la disponibilidad de energía de los componentes del pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos (PNA) y así hacer posible añadir polisacáridos no amiláceos (PNA) al pienso animal en una mayor cantidad que si no se añade tal composición de Bacillus.

20 Actualmente, el pienso animal comprende menos del 14% (p/p) de polisacáridos no amiláceos (PNA) si el pienso animal es para un lechón, cerda lactante, pollo para asar o gallina ponedora o menos del 19% (p/p) de polisacáridos no amiláceos (PNA) si el pienso animal es para un cerdo de engorde o cerda gestante.

25 La presente invención hace posible aumentar la cantidad de azúcar disponible de pienso animal que comprende el 14% (p/p) o más de polisacáridos no amiláceos (PNA) si el pienso animal es para un lechón, cerda lactante, pollo para asar o gallina ponedora o el 19% (p/p) o más de polisacáridos no amiláceos (PNA) si el pienso animal es para un cerdo de engorde o cerda gestante.

## Leyenda de las figuras

35 Figura 1  
Fracciones de hidratos de carbono vegetales. FDA = fibra en detergente ácido, β-glucanos = (1→3) (1→4)-β-D-glucanos, FDN = fibra en detergente neutro, FSDN = fibra soluble en detergente neutro (incluye todos los polisacáridos no amiláceos no presentes en la FDN), NFC = hidratos de carbono no FDN. (Hall, 2003).

40 Figura 2  
Curva patrón que muestra los equivalentes de azúcar reductor (hexosa) [μmol/ml] = DO<sub>540</sub> \* 11,44 (R<sup>2</sup> = 0,95).

Figura 3a  
45 Unidades de azúcar reductor en pienso al que se han añadido diferentes productos de Bacillus (media de 4 replicados) después de la inoculación. Control = sin Bacillus añadido.

Figura 3b  
Unidades de azúcar reductor en pienso al que se han añadido diferentes cepas de Bacillus (media de 3 replicados) después de la inoculación. Control = sin Bacillus añadido, A = *Bacillus subtilis*, B = *Bacillus amyloliquefaciens*, C = *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 27033, E = *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 28634, y G = *Bacillus subtilis*.

Figura 4  
55 Azúcar reductor en muestras de pienso para aves a las que se ha añadido bilis al 0,3% y tres productos diferentes de Bacillus (media de 3 replicados).

Figura 5  
Azúcar reductor en muestras de pienso para cerdos a las que se ha añadido bilis al 0,3% y tres productos diferentes de Bacillus (media de 3 replicados).

60 Figura 6  
Azúcar reductor en muestras de pienso a las que se ha añadido amiloglucosidasa y tres cepas diferentes de Bacillus (A = *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 27033 y C = *Bacillus subtilis*) (media de 3 replicados).

65 Figura 7

Azúcar reductor en muestras de pienso a las que se ha añadido amilasa y pancreatina y dos cepas diferentes de *Bacillus* (A = *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 27033) (media de 3 replicados).

### Descripción detallada de la invención

5 Los presentes inventores han desarrollado un ensayo en pienso para determinar la cantidad de azúcares reductores en el pienso. El ensayo se basa en un método (DNS) que se ha usado para medios de laboratorio, pero que no se ha desarrollado previamente para uso en un ensayo basado en pienso.

10 Los inventores sorprendentemente encontraron usando este ensayo basado en pienso que mide azúcar reductor que ciertas especies de *Bacillus*, en particular cepas de *Bacillus subtilis* tal como *Bacillus subtilis* DSM 17231 y DSM 19489, tienen una alta capacidad para degradar polisacáridos no amiláceos a azúcares reductores que pueden ser absorbidos por animales monogástricos tal como cerdos y aves de corral.

15 Los polisacáridos no amiláceos (PNA) en una dieta se definen como la parte de la fracción de hidratos de carbono crudos cuando se retiran el azúcar (mono- y oligosacáridos), ácidos orgánicos y almidón (Figura 1).

20 Los hidratos de carbono se clasifican según el grado de polimerización (GP): mono- y disacáridos (GP = 1-2), oligosacáridos (GP = 3-9) y polisacáridos (GP ≥ 10). Los polisacáridos se dividen además en dos subgrupos según su digestibilidad: almidón y polisacáridos no amiláceos (Knudsen, K.E.B. y Lærke, H.E.N., 2013). Consistente con lo anterior, el término "polisacáridos no amiláceos (PNA)" en la presente descripción y reivindicaciones se define como polisacáridos con un grado de polimerización ≥ 10 excluyendo el almidón.

25 Los polisacáridos no amiláceos consisten en muchos polímeros vegetales diferentes, incluyendo, es decir, β-glucanos, celulosa, hemicelulosa, y sustancias pécticas. Los polisacáridos no amiláceos se pueden determinar por cromatografía de gas-líquido (azúcares de componentes neutros) y por calorimetría (ácidos urónicos) (Woyengo et al (2008)).

30 El pienso estándar para cerdos y aves de corral contiene típicamente maíz o cereales como cebada y trigo, así como harina de soja como fuente de energía y proteínas respectivamente. Como los precios del pienso han aumentado muchos subproductos diferentes se han incluido en las raciones de pienso, es decir, granos de destilería secos con solubles (DDGS) (un subproducto de la producción de etanol), salvado de trigo (la capa externa dura del trigo), harinilla de trigo (un subproducto de la industria del molido del trigo), vainas de soja (subproducto de la industria del aceite de soja y la harina de soja). Todos estos subproductos tienen un alto contenido en PNA en común, pero también componentes de pienso estándar como trigo, cereal y habas de soja contienen típicamente el 10-15% de PNA (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de cantidad y contenido de PNA en varios componentes de pienso

Ingrediente de pienso	Cantidad de PNA % (p/p) de la materia seca	Ejemplos del contenido de PNA
Cereales	10-15	Beta-glucanos, hemicelulosa (cebada)
Maíz	10-15	Hemicelulosa + celulosa
Sorgo	10-15	
DDGS	25-35	Hemicelulosa + celulosa
Salvado de trigo	25-35	
Harina de soja	20-35	Pectinas

40 La presente invención se refiere a todos los componentes de pienso que comprenden PNA y los componentes de pienso estándar anteriormente mencionados y los subproductos solo se deben ver como ejemplos no limitantes de componentes de pienso que comprenden PNA que actualmente se usan o se podrían usar en pienso animal.

45 La actividad enzimática para degradar polisacáridos no amiláceos (PNA) se puede analizar para cada enzima individual (es decir, endocelulasas y xilanasas) o mediante la medida de los productos de degradación cuando se digiere PNA: azúcares reductores. Es muy exigente ensayar todas las enzimas relevantes – y puede incluso no ser posible en la práctica ya que podemos no conocer todas las enzimas relevantes ni tener métodos para ensayarlas todas. Según esto, los presentes inventores desarrollaron un nuevo ensayo que es simular la situación *in vivo* midiendo la cantidad de azúcares reductores en pienso incubado con *Bacillus* resultantes del efecto combinado de varias enzimas. El ensayo simula la situación cuando el pienso es ingerido por el animal y se digiere en el aparato digestivo.

55 De acuerdo con lo mismo, la presente invención proporciona un método para producir un pienso animal que comprende añadir una composición de *Bacillus* a componentes de pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos, en donde el método comprende determinar la capacidad de aumentar la cantidad de azúcar disponible al incubar los componentes del pienso animal con la composición de *Bacillus* que comprende al menos una cepa de *Bacillus* a 37°C, durante 24 horas, medir la absorbancia del ácido dinitrosalicílico (DNS) a DO<sub>540</sub>, y calcular la

cantidad de equivalentes de hexosa producidos correlacionando la absorbancia medida con una curva patrón, en donde la composición de *Bacillus* es capaz de aumentar la cantidad de azúcar disponible de los componentes del pienso animal a una cantidad de al menos 120 equivalentes de hexosa expresados como  $\mu\text{mol/ml}$ .

5 Un azúcar reductor es cualquier azúcar que o bien tiene un grupo aldehído reactivo o es capaz de formar uno para permitir que el azúcar actúe como un agente reductor. Los extremos reductores se forman por el corte enzimático del enlace glucosídico entre hidratos de carbono poliméricos. Los azúcares reductores incluyen glucosa, gliceraldehído y galactosa, así como disacáridos como lactosa y maltosa, y se pueden medir por el método de Nelson-Somogyi (NS) o del ácido dinitrosalicílico (DNS). El DNS es un compuesto aromático que reacciona con  
10 azúcares reductores y otras moléculas reductoras para formar ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que absorbe luz fuertemente a 540 nm.

15 La capacidad de diferentes cepas de *Bacillus* para degradar PNA a azúcares reductores se ha investigado en el ejemplo 2 y los resultados se proporcionan en las figuras 3a y 3b. Los presentes hallazgos muestran para el control en la figura 3a 49  $\mu\text{mol/ml}$  de equivalentes de hexosa cuando se mide después de 24 horas mientras que todas las composiciones de *Bacillus* investigadas demuestran resultados más altos. Se encontró una actividad de 90 equivalentes de hexosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) o más cuando se mide después de 24 horas para todas las composiciones actualmente investigadas. Las composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* DSM 17231 ya sea solo o en combinación con *Bacillus licheniformis* DSM 17236 o *Bacillus subtilis* DSM 19489 tienen una actividad incluso mayor  
20 de 120 equivalentes de hexosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) o más cuando se mide después de 24 horas. La mayor actividad se encuentra para la composición de *Bacillus* que comprende *Bacillus subtilis* DSM 17231 o CBS 117162.

25 Se contempla que otras composiciones de *Bacillus* pueden mostrar buenos resultados similares si se ensayan mediante el método tal como una actividad de 120 equivalentes de hexosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) o más cuando se mide después de 24 horas, o incluso 150 equivalentes de hexosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) o más cuando se mide después de 24 horas. Se han hecho medidas adicionales en un número de cepas y los resultados de algunas de estas se han proporcionado en la figura 3b de la que parece que también cepas de *B. amyloliquefaciens* proporcionan buenos resultados.

30 La composición de *Bacillus* que se va a usar en el método de la presente invención comprende al menos una cepa de *Bacillus*, preferiblemente una de la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, tal como *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* o *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus simplex*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis*, *B. coagulans*, *B. lentus*, *B. clausii*, *B. fusiformis* o *Bacillus tequilensis*.  
35

40 En una forma de realización preferida la composición de *Bacillus* comprende una cepa de *Bacillus subtilis* y/o una cepa de *Bacillus licheniformis*. Lo más preferiblemente, la composición comprende al menos una de las cepas de *Bacillus subtilis* depositadas como DSM 17231 o DSM 19489, las cepas de *Bacillus licheniformis* depositadas como DSM 17236 o DSM 28634; o un mutante de cualquiera de estas cepas, o la cepa de *B. amyloliquefaciens* DSM 27033, o un mutante de esta cepa.

45 Se puede obtener una cepa mutante de las cepas de *Bacillus subtilis* con números de registro DSM 17231 o DSM 19489, o las cepas de *Bacillus licheniformis* con números de registro DSM 17236 o DSM 28634 o la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 27033 al someter la cepa a tratamiento de mutagenización como se describe en más detalle posteriormente para obtener cepas mutantes y seleccionar cepas mutantes que tienen las propiedades deseadas. Alternativamente, se realiza una selección para mutantes espontáneos.

50 Una "cepa" bacteriana como se usa en el presente documento se refiere a una bacteria que permanece genéticamente sin cambios cuando se cultiva o multiplica. Se incluye la multiplicidad de bacterias idénticas.

"Cepa de tipo salvaje" se refiere a la forma no mutada de una bacteria, como se encuentra en la naturaleza.

55 Una "bacteria mutante" o una "cepa mutante" se refiere a una bacteria mutante natural (espontánea, natural) o una bacteria mutante inducida que comprende una o más mutaciones en su genoma (ADN) que están ausentes en el ADN de tipo salvaje. Un "mutante inducido" es una bacteria donde la mutación se ha inducido por tratamiento humano, tal como tratamiento con cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo tratamiento con mutágenos químicos, tal como un mutágeno químico seleccionado de (i) un mutágeno que se asocia con o se incorpora al ADN tal como un análogo de base, por ejemplo, 2-aminopurina o un agente intercalante tal  
60 como ICR-191, (ii) un mutágeno que reacciona con el ADN incluyendo agentes alquilantes tal como nitrosoguanidina o hidroxilamina, o metilsulfonato de etano (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), radiación UV o gamma etc. En contraste, un "mutante espontáneo" o "mutante natural" no ha sido mutagenizado por el hombre.

65 Un mutante se puede haber sometido a varios tratamientos de mutagenización (un tratamiento único se debe entender una etapa de mutagenización seguida por una etapa de cribado/selección), pero es actualmente preferido que se lleven a cabo no más de 20, o no más de 10, o no más de 5, tratamientos (o etapas de cribado/selección). En

un mutante actualmente preferido menos del 1%, menos del 0,1, menos del 0,01, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han sustituido con otro nucleótido, o delecionado, comparado con la cepa madre.

5 Las bacterias mutantes como se ha descrito anteriormente son no OGM, es decir, no modificados por tecnología de ADN recombinante. Como una alternativa al método preferido anterior de proporcionar el mutante por mutagénesis aleatoria, también es posible proporcionar tal mutante por mutagénesis dirigida, por ejemplo, usando técnicas de PCR diseñadas apropiadamente o usando un elemento transponible que sea integrable en replicones bacterianos.

10 Cuando el mutante se proporciona como un mutante que aparece espontáneamente la cepa de tipo salvaje anterior se somete a la etapa de selección sin ninguna etapa de mutagenización previa.

15 Varias especies de *Bacillus* tiene estatus GRAS, es decir, en general son reconocidas como seguras. Todas las cepas de *B. subtilis* son GRAS. Las cepas de *Bacillus* descritas en el presente documento son aerobias y formadoras de esporas facultativas. Las especies de *Bacillus* son las únicas formadoras de esporas que se consideran GRAS. Alimentar microorganismos que tienen estatus GRAS a ganado es una práctica aceptable entre los productores, veterinarios, y otros en la industria ganadera.

20 La invención se refiere a una composición de *Bacillus* que comprende células de al menos una cepa de *Bacillus*. La composición puede comprender células de al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o incluso más cepas de *Bacillus*. Si la composición comprende más de una cepa, cada una de las cepas puede estar presente como el 5%, 10%, 20%, 25%, 33%, 40%, 50%, 60%, 66%, 75%, 80%, 90% o 95% de las células de *Bacillus*.

25 Las células de *Bacillus* existen como células esporas de bacilos y células vegetativas de bacilos. Cuando en el presente documento se hace referencia a composiciones de *Bacillus* o cepas de *Bacillus*, estas incluyen tanto células de esporas como células vegetativas. Cuando está presente en pienso animal, la célula de *Bacillus* pueden ser esporas o células vegetativas. Cuando se usan en el método de la invención las células de *Bacillus* son células de *Bacillus* vegetativas funcionales, que se pueden dividir para producir más células vegetativas.

30 Las cepas de *Bacillus* relevantes de la composición pueden estar presentes en una forma comercialmente relevante que conoce el experto en la materia. Según esto, en una forma de realización las cepas de *Bacillus* de la composición están presentes como células secas (por ejemplo, secadas por rociado) o como células congeladas. La composición se puede proporcionar en cualquier forma adecuada tal como en la forma de un líquido, una papilla, un polvo, o una pella.

35 En una forma de realización preferida la composición de *Bacillus* comprende de  $10^5$  a  $10^{12}$  UFC/g, más preferiblemente de  $10^6$  a  $10^{12}$  UFC/g, y lo más preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{12}$  UFC/g.

40 El término "UFC/g" se refiere al peso en gramos de la composición como tal, incluyendo los aditivos relevantes adecuados presentes en la composición. Como sabe el experto en la materia una composición bacteriana comercialmente relevante en general también comprende otros aditivos relevantes tal como, por ejemplo, un soporte/ingrediente del grupo que pertenece a suero, permeado de suero, carbonato de calcio/caliza y agentes antiaglomerantes tal como silicatos de aluminio y diatomita (tierra de diatomeas). No incluye el peso de un envase adecuado usado para embalar la composición de *Bacillus*. Una forma de realización se refiere a una composición  
45 embalada en un envase adecuado.

50 Las composiciones que se van a usar en el método de la presente invención pueden incluir una cepa de *Bacillus* y soportes que hacen estas composiciones adecuadas para alimentar a los animales como un aditivo de pienso. Alternativamente, la cepa de *Bacillus* se puede formular con ingredientes de pienso animal, incluyendo proteína de pienso y/o hidratos de carbono de pienso. Tales combinaciones pueden estar en la forma de pellas que se extruyen a través de procesos de pletización estándar.

55 La composición de *Bacillus* como se describe en el presente documento se va a usar como un aditivo para pienso animal. La invención proporciona un método para producir un pienso animal que comprende añadir una composición de *Bacillus* a componentes de pienso animal como se describe en la reivindicación 1.

60 Como se usa en el presente documento el término "premezcla" se refiere a una cepa de *Bacillus* añadida a un soporte para hacer una premezcla que se añade después al pienso a una tasa de inclusión deseada y se alimenta al animal.

65 Al suplementar una composición de *Bacillus* que puede degradar PNA a azúcares reductores se puede mejorar el valor nutricional de los ingredientes del pienso. Una digestibilidad aumentada de los PNA puede funcionar de dos maneras: 1) aumenta la disponibilidad de otros nutrientes, vitaminas y minerales que están fijados por los PNA. Los PNA absorben agua y producen una masa viscosa aumentada de partículas de pienso en el intestino del animal. En esta masa los nutrientes están atrapados y no disponibles para el animal. Aumentar la disponibilidad de nutrientes

para el animal también produce pérdida de nutrientes reducida al medio ambiente. 2) También aumenta el suministro de energía a partir del PNA mismo.

5 Los nuevos hallazgos hacen posible el uso de cepas de *Bacillus* capaces de aumentar la cantidad de azúcares reductores en el pienso que comprende polisacáridos no amiláceos en formas nuevas:

El uso de raciones de pienso con alto contenido en PNA.

10 En raciones de pienso estándar que incluyen subproductos la cantidad de PNA es menor del 14% (p/p) si el pienso animal es para un lechón, cerda lactante, pollo de asar o gallina ponedora y menor del 19% (p/p) si el pienso animal es para un cerdo de engorde. Cantidades mayores de PNA reducirían el rendimiento del cerdo o ave porque el PNA no puede ser digerido por cerdos y aves de corral. Con los nuevos hallazgos proporcionados por los presentes inventores, es posible aumentar la cantidad de subproductos tal como DDGS, salvado de trigo, harinillas de trigo o vainas de soja en el pienso o usar otros subproductos sin reducir el rendimiento del cerdo o ave.

15 La presente invención proporciona métodos en donde el pienso animal comprende el 19% de PNA o más para cerdos de engorde y cerdas gestantes tal como el 20% o más, el 21% o más, el 22% o más, el 23% o más, el 24% o más, el 25% o más, el 26% o más, el 27% o más, el 28% o más, el 29% o más, el 30% o más de la ración de pienso medida como % (p/p) de materia seca (MS).

20 Para lechones, cerdas lactantes, pollos de asar y gallinas ponedoras la presente invención proporciona métodos en donde el pienso animal comprende el 14% de PNA o más tal como el 15% o más, el 16% o más, el 17% o más, el 18% o más, el 19% o más, el 20% o más de la ración de pienso medida como % (p/p) de materia seca (MS).

25 Un ejemplo de una ración de pienso típica para cerdos de engorde podría ser el 70% de maíz, el 20% de DDGS y el 10% de harina de soja correspondiente a aproximadamente el 17% de PNA. Basado en los hallazgos proporcionados en el presente documento la cantidad de DDGS se podría aumentar al 25% o 30% aumentando el contenido de PNA al 19% y 20%, respectivamente (cf. Tabla 1). También sería posible un aumento a incluso el 40% de DDGS con la nueva invención aumentando el contenido de PNA a aprox. el 23% sin tener impacto en el rendimiento del cerdo. El contenido en PNA en los ingredientes del pienso tal como DDGS puede variar mucho dependiendo de las condiciones de crecimiento basado en, es decir, geografía, temperatura, humedad y tiempo de cosecha. Los cálculos anteriores, por tanto, se deben ver solo como ejemplos. También las raciones de pienso varían mucho dependiendo de la empresa de piensos, disponibilidad y precios del pienso y también qué especie animal y segmento del pienso se aplica. Por ejemplo, las raciones de pienso para lechones contendrán cantidades menores de PNA comparadas con las raciones de pienso para cerdos de engorde. Los lechones necesitan mucha energía y el intestino del lechón no está desarrollado por completo de modo que altas raciones de PNA tendrían alto impacto en el rendimiento del lechón. Basado en el hallazgo proporcionado en el presente documento, sin embargo, será posible incluir algunos subproductos que contienen PNA para los lechones, es decir, el 5% o el 10% o incluso el 15% de DDGS correspondiente a aprox. un contenido de NPA en la dieta del 14%, 16% y 18%.

40 Reducción de energía en la ración de pienso debido a la disponibilidad de energía mejorada

45 La composición de *Bacillus* mejora la digestión de los polisacáridos no amiláceos y libera energía que sin la composición de *Bacillus* no estaba disponible para el animal en que la cantidad de azúcar disponible aumenta al liberar los azúcares presentes en los polisacáridos no amiláceos. Los cerdos y aves de corral normalmente se alimentan según requisitos específicos de energía. Con la composición de *Bacillus* la energía añadida en el pienso se puede reducir sin reducir los requisitos necesarios por el animal. La energía está incluida como almidón, proteína y grasa de, es decir, maíz, cereal y soja. Todos estos materiales de pienso representan aproximadamente el 70% del coste de producción total y una reducción en el coste del pienso mejora la economía para el granjero.

50 La mejora del crecimiento animal - abre nuevos mercados (es decir, mercado de animales de engorde)

55 La liberación de energía mejorada del pienso produce un crecimiento mejorado del animal. Los cerdos y aves de corral (por ejemplo, pollos de asar y pavo) con frecuencia se sacrifican a un peso determinado y un crecimiento mejorado reducirá el tiempo que lleva hasta el sacrificio. Por tanto, el crecimiento mejorado produce más animales sacrificados en un periodo de tiempo determinado.

Manejo de estiércol mejorado

60 La mayoría de las dietas que contienen ingredientes con alto PNA tienen peor fluidez que las dietas estándares como dietas de maíz-harina de soja. Dependiendo del diseño y dimensiones del recipiente, esto puede producir dificultades en sacar el estiércol fuera del cubo.

65 El ámbito de la invención también incluye usos, métodos y productos según la invención para aumentar la fluidez del estiércol.

El uso de los términos “un” y “una” y “el” y “la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto. Los términos “comprender”, “tener”, “incluir” y “contener” se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan “incluyendo, pero no limitado a”) a menos que se señale de otra manera. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento se pretende solamente que sirva como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que está dentro del intervalo, a menos que se indique de otra manera en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se enumerara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o claramente de otra manera se contradiga por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, se pretende simplemente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique de otra manera. Ningún lenguaje en la especificación se debe interpretar como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

#### Cepas depositadas

La cepa de *Bacillus subtilis* ha sido depositada en DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Inhoffensatrsse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 17231 con una fecha de depósito del 7 de abril 2005 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes.

La cepa de *Bacillus licheniformis* ha sido depositada en DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Inhoffensatrsse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 17236 con una fecha de depósito del 7 de abril 2005 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes.

Una cepa adicional de *Bacillus subtilis* ha sido depositada en DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Inhoffensatrsse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 19489 con una fecha de depósito del 27 de junio 2007 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes.

Una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* ha sido depositada en DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Inhoffensatrsse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 27033 con una fecha de depósito del 21 de marzo 2013 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes.

Una cepa adicional de *Bacillus licheniformis* ha sido depositada en DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Inhoffensatrsse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de registro DSM 28634 con una fecha de depósito del 1 de abril 2014 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha hecho en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes.

Para todos los microorganismos depositados anteriormente identificados, aplican las siguientes indicaciones adicionales:

Con respecto a las respectivas Oficinas de Patentes de los respectivos estados designados, los solicitantes solicitan que una muestra de los microorganismos depositados declarados anteriormente solo se ponga a disposición de un experto nominado por el solicitante hasta la fecha en que la patente se conceda o la fecha en que la solicitud se haya rechazado o retirado o se juzgue que se va a retirar.

Se describen a continuación formas de realización de la presente invención, a modo de ejemplos no limitantes.

#### **Ejemplos**

Ejemplo 1: Ensayo enzimático *in vitro* para xilanasas y celulasas

#### Método para el ensayo de celulasas

Las cepas de *Bacillus* se hicieron crecer en medio de carboximetilcelulosa (CMC) (por l: 10 g de carboximetilcelulosa (C9481 Sigma), 2,0 g de Bacto triptona (cat. 211705, Becton Dickinson A/S, Dinamarca), 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7) a 37°C y agitación magnética vigorosa durante 24 horas. La producción de celulasa se determinó usando el kit EnzCheck Cellulase Substrat (cat. E33953, Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogieron sobrenadantes de cultivo por centrifugación y se distribuyeron en MTP (200  $\mu\text{l}$  por pocillo) en diluciones en serie. Se construyeron curvas patrón usando celulasa de *Aspergillus niger* (C1184) empezando desde 2 U  $\text{ml}^{-1}$ . Se añadió la solución de sustrato de EnzCheck a los sobrenadantes de cultivo en placas FluoroNunc negras de 96 pocillos de Nunc (cat. 237105, Thermo Fisher Scientific, NUNC Inc.). Se registró la fluorescencia a una excitación de 360 nm/emisión de 420 nm después de 30 min de incubación (Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer Inc.). La actividad celulasa se calculó a partir de las curvas patrón en dos experimentos independientes y se expresó como media (U  $\text{ml}^{-1}$ ).

#### Método para ensayo de xilanasas

Los cultivos de *Bacillus* se hicieron crecer en un medio que contenía xilano de madera de haya (por l: 5,0 g de xilano (X4252, Sigma), 2,0 g de extracto de levadura (cat. 288620, Becton Dickinson A/S, Dinamarca), 5,0 g de bacto peptona (cat. 211677, Becton Dickinson A/S, Dinamarca), 0,5 g de NaCl, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,5) a 37°C y agitación magnética vigorosa durante 24 horas. El ensayo de xilanasas se realizó con el uso del kit de ensayo EnzCheck Ultra Xylanase Assay (cat. E33650, Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogieron sobrenadantes de cultivo por centrifugación, se distribuyeron en MTP (200  $\mu\text{l}$  por pocillo) en diluciones en serie y se añadió solución de trabajo de sustrato de xilanasas. La fluorescencia en los sobrenadantes de cultivo se midió a una excitación de 360 nm/emisión de 420 nm después de 30 min de incubación (Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer Inc.). Se usó *Thermomyces lanuginosus* (X2753) como enzima estándar y se cargó en los MTP en diluciones en serie, empezando desde 25 mU  $\text{ml}^{-1}$ . La actividad xilanasas de las cepas de *Bacillus* se calculó a partir de las curvas patrón y se expresó como media (mU  $\text{ml}^{-1}$ ) de dos ensayos independientes.

#### Resultados y conclusión

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Actividad celulasa y xilanasas por cepas de *Bacillus* medida *in vitro*, mU/ml relacionada a la media de densidad óptica (DO) de 2-4 análisis  $\pm$  DE

Cepa/producto de <i>Bacilli</i>	Celulasa	Xilanasas
<i>B. licheniformis</i> DSM 17236	1673 $\pm$ 259	2,3 $\pm$ 0,4
<i>B. subtilis</i> DSM 17231	4355 $\pm$ 1738	31,9 $\pm$ 27,3
<i>B. subtilis</i> DSM 19489	276 $\pm$ 96	3,7 $\pm$ 2,6
DSM 17231 + DSM 17236 (50:50)	4436 $\pm$ 1344	2,3 $\pm$ 0,5
<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> NCIMB 40112 (Toyocerin)	95 $\pm$ 12	1,9 $\pm$ 0,4
<i>B. subtilis</i> PB6, ATCC PTA-6737 (Clostat, Kemin)	2560 $\pm$ 174	Nt
<i>B. subtilis</i> C3102, DSM 15544 (Calsporin, Calpis)	3300 $\pm$ 312	Nt

nt = no ensayado

Los resultados muestran que las cepas de *B. subtilis* tienen la mayor actividad celulasa y xilanasas. La cepa de *B. cereus* era muy baja en producción tanto de celulasa como xilanasas y por tanto no se incluyó en el ejemplo 2.

Ejemplo 2: Medida de la cantidad de azúcares reductores en pienso incubado con una composición de *Bacillus*

#### Materiales y Métodos

El objetivo de este experimento era examinar la capacidad de diferentes cepas de *Bacillus* de degradar PNA en pienso para cerdos y aumentar la cantidad de azúcar disponible. Se autoclavó pienso compuesto para cerdos de engorde basado en maíz-soja (Tabla 3) a 121°C durante 15 min para esterilización. Después la muestra de pienso se diluyó con tampón fosfato de sodio para asegurar un pH a aproximadamente 6-6,5 a lo largo del experimento entero. Los productos de *Bacillus* (Figura 3a) se añadieron a una tasa de dosis normal sugerida para cerdos de engorde. Se obtuvieron cepas (Figura 3b) por inoculación con cultivo nocturno al 2% de las cepas de *Bacillus*, hechas crecer en caldo de infusión de ternera (VIB) (Difco, 234420). Se tomó una muestra para análisis para azúcar

reductor (DNS) (T = 0). Después de incubación a 37°C durante 24 horas se tomó una muestra para la determinación de ufc. Otra muestra se centrifugó y el sobrenadante se usó para determinar DNS.

Tabla 3 Composición de pienso compuesto usado en el ensayo

Ingrediente	% de ración de pienso
Maíz molido	68
DDGS	20
Harina de soja	10,15
Caliza	1,09
Sal	0,43
Lisina	0,23
Vitaminas	0,09

Se analizó el azúcar reductor mediante el ensayo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como sigue:

Se mezcló tampón acetato de Na (100 mM, pH 6) con sobrenadante de muestras de Bacillus esterilizadas por filtración y se incubó a 40°C durante 10 min. Se añadió reactivo DNS al tubo de ensayo, se mezcló e incubó en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Después de enfriar, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

Se estableció una curva patrón con una solución madre de glucosa para presentar resultados en azúcar reductor o unidades de enzima (cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de equivalente de glucosa reductora en 1 ml por unidad de tiempo) (Figura 2).

Tabla 4. Unidades formadoras de células (ufc/g) después de 24 horas

Cepa de Bacillus	UFC a T24 (24 horas)
<i>B. subtilis</i> DSM 17231	1,3 E+0,9
<i>B. licheniformis</i> DSM 17236 + <i>B. subtilis</i> DSM 17231 (50/50)	1,5 E+09
<i>B. licheniformis</i> DSM 17236 + <i>B. subtilis</i> DSM 19489 (50/50)	4,0 E+08
<i>B. subtilis</i> C3102, DSM 15544 (Calsporin, Calpis)	1,5 E+09
<i>B. subtilis</i> CBS 117162 (Animavit )	1,3 E+09

## Resultados y conclusión

Todos los productos de Bacillus suministran más nutrientes al animal al administrar más azúcares reductores (Figura 3a). Los productos de *B. subtilis* DSM 17231 administran 3 veces o más azúcares reductores que el control mientras que *B. subtilis* C3102 (DSM 15544) administra menos de 2 veces más azúcares reductores que el control. Es reseñable que la combinación de *B. licheniformis* DSM 17236 y *B. subtilis* DSM 19489 demuestra buenos resultados en el presente ensayo a pesar de los modestos resultados de los ensayos de enzimas de las cepas individuales proporcionados en la tabla 2 lo que subraya la importancia de ensayar en condiciones realistas usando pienso como sustrato.

La figura 3b proporciona los resultados de 7 cepas de Bacillus seleccionadas y muestra que tanto muchas cepas de *B. amyloliquefaciens* como de *B. subtilis* muestran excelentes efectos comparadas con el control.

### Ejemplo 3. Simular condiciones intestinales con exposición a bilis

#### Exposición a bilis

El objetivo de este experimento era examinar la capacidad de diferentes cepas de Bacillus de degradar PNA en pienso para aves y pienso compuesto para cerdos y aumentar la cantidad de azúcar disponible cuando se simula el aparato digestivo añadiendo bilis. Las células vegetativas de *B. subtilis* son muy sensibles a las condiciones del intestino delgado. Se ha mostrado que *Bacillus subtilis* tenía baja supervivencia a un nivel del 0,0002-0,002% después de 1-3 horas con sales biliares al 0,2%.

Tanto el pienso para aves como el pienso compuesto para cerdos basado en maíz-soja (Tabla 3) se autoclavó a 121°C durante 15 min para esterilización. Después la muestra de pienso se diluyó con tampón fosfato de sodio para asegurar un pH a aproximadamente 6-6,5 a la largo del experimento entero. Se añadieron sales biliares (extracto porcino de bilis (Sigma-Aldrich B8631) a una concentración del 0,3%. Se añadieron productos de Bacillus a una tasa de dosis normal sugerida para cerdos de engorde y aves respectivamente. Se tomó una muestra para análisis para azúcar reductor (DNS) (T = 0). Después de incubación de 37°C durante 24 horas se tomó una muestra, se centrifugó y el sobrenadante se usó para determinar DNS como se describe en el ejemplo 2.

Resultados y conclusión

La mayoría de las cepas crecieron al nivel esperado por encima de 1 E +10 excepto DSM15544 que mostró bajo crecimiento por debajo de 1 E + 07 (datos no mostrados). Todos los productos de Bacillus suministraron más nutrientes al animal al administrar más azúcares reductores en comparación con el pienso control (Figura 4).

En pienso para aves los productos de *B. subtilis* administran 2,5 veces o más azúcares reductores que el control incluso cuando el ensayo simula el aparato digestivo con bilis.

En pienso para cerdos bilis ambos productos de combinación sorprendentemente administran 4-5 veces azúcares reductores que el control mientras que *B. subtilis* C3102 (DSM 15544) administra 3 veces más azúcares reductores que el control (Figura 5).

Ejemplo 4. Simular condiciones intestinales con exposición a amilasa

Exposición de amilasa

El objetivo de este experimento era examinar la capacidad de diferentes cepas de Bacillus de degradar PNA en pienso para cerdos y aumentar la cantidad de azúcar disponible cuando se simula el aparato digestivo añadiendo amilasa. El pienso compuesto para cerdos basado en maíz-soja (Tabla 3) se autoclavó a 121°C durante 15 min para esterilización. Después la muestra de pienso se diluyó con tampón fosfato de sodio para asegurar un pH a aproximadamente 6-6,5 a la largo del experimento entero. Los ensayos de pienso se inocularon con cultivo nocturno al 2% de las cepas de Bacillus, se hicieron crecer en medio VIB. Se tomó una muestra para análisis para azúcar reductor (DNS) (T = 0). Se añadió amilasa (gamma-amilasa/amiloglucosidasa (Sigma A7095)) a una concentración de 13 UI/ml de ensayo. Se ensayaron 3 replicados. Después de incubación de 37°C durante 24 horas se tomó una muestra, se centrifugó y el sobrenadante se usó para determinar DNS como se describe en el ejemplo 2.

Exposición a amilasa + pancreatina

Se usó el mismo método que se ha descrito anteriormente. Se añadió pancreatina (Sigma P7545), un producto que contiene una mezcla de enzimas producidas por células exocrinas en el páncreas porcino que incluye amilasa, tripsina y lipasa, a una concentración de 10 mg/ml junto con amilasa.

Resultados y conclusión

Los tres productos de Bacillus suministraron más nutrientes a los animales al administrar más azúcares reductores comparados con el pienso control (Figura 6) y también cuando se expusieron a pancreatina (Figura 7). Las cifras control son bastante altas, probablemente debido a la adición de amilasa.

**Referencias**

Barletta, 2011. Introduction: Current Market and Expected Developments. En "Enzymes in Farm Animal Nutrition", CABI, RU, 2ª ed. 1-11.

Hall, M.B. 2003. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. J. Animal Sci. 81, 12, 3226-3232.

Knudsen, K.E.B. y Lærke, H.N., "Capítulo 8: Carbohydrate digestion and absorption," en *Nutritional physiology of pigs*, Videnscenter for svineproduktion, 2013

Woyengo, T. A., Sands, J. S., Guenter W., y Nyachoti. C. M., 2008. Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets. J ANIM SCI 2008, 86:848-857.

extracto porcino (Sigma-Aldrich B8631) se añadieron a una concentración del 0,3%. Se añadieron productos de *Bacillus* a una tasa de dosis normal sugerida para cerdos de engorde y aves respectivamente. Se tomó una muestra para análisis para azúcar reductor (DNS) (T = 0). Después de incubación de 37°C durante 24 horas se tomó una muestra, se centrifugó y el sobrenadante se usó para determinar DNS como se describe en el ejemplo 2.

Resultados y conclusión

La mayoría de las cepas crecieron al nivel esperado por encima de  $1 \text{ E} + 10$  excepto DSM15544 que mostró bajo crecimiento por debajo de  $1 \text{ E} + 07$  (datos no mostrados). Todos los productos de *Bacillus* suministraron más nutrientes al animal al administrar más azúcares reductores en comparación con el pienso control (Figura 4).

5 En pienso para aves los productos de *B. subtilis* administran 2,5 veces o más azúcares reductores que el control incluso cuando el ensayo simula el aparato digestivo con bilis.

10 En pienso para cerdos bilis ambos productos de combinación sorprendentemente administran 4-5 veces azúcares reductores que el control mientras que *B. subtilis* C3102 (DSM 15544) administra 3 veces más azúcares reductores que el control (Figura 5).

Ejemplo 4. Simular condiciones intestinales con exposición a amilasa

15 Exposición de amilasa

El objetivo de este experimento era examinar la capacidad de diferentes cepas de *Bacillus* de degradar PNA en pienso para cerdos y aumentar la cantidad de azúcar disponible cuando se simula el aparato digestivo añadiendo amilasa. El pienso compuesto para cerdos basado en maíz-soja (Tabla 3) se autoclavó a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min para esterilización. Después la muestra de pienso se diluyó con tampón fosfato de sodio para asegurar un pH a aproximadamente 6-6,5 a la largo del experimento entero. Los ensayos de pienso se inocularon con cultivo nocturno al 2% de las cepas de *Bacillus*, hechas crecer en medio VIB. Se tomó una muestra para análisis para azúcar reductor (DNS) ( $T = 0$ ). Se añadió amilasa (gamma-amilasa/amiloglucosidasa (Sigma A7095)) a una concentración de 13 UI/ml de ensayo. Se ensayan 3 replicados. Después de incubación de  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas se tomó una muestra, se centrifugó y el sobrenadante se usó para determinar DNS como se describe en el ejemplo 2.

Exposición a amilasa + pancreatina

30 Se usó el mismo método que se ha descrito anteriormente. Se añadió pancreatina (Sigma P7545), un producto que contiene una mezcla de enzimas producidas por células exocrinas en el páncreas porcino que incluye amilasa, tripsina y lipasa, a una concentración de 10 mg/ml junto con amilasa.

#### Resultados y conclusión

35 Los tres productos de *Bacillus* suministraron más nutrientes a los animales al administrar más azúcares reductores comparados con el pienso control (Figura 6) y también cuando se expusieron a pancreatina (Figura 7). Las cifras control son bastante altas, probablemente debido a la adición de amilasa.

#### **Referencias**

- 40 Barletta, 2011. Introduction: Current Market and Expected Developments. En "Enzymes in Farm Animal Nutrition", CABI, UK, 2ª ed. 1-11.
- 45 Hall, M.B. 2003. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. J. Animal Sci. 81, 12, 3226-3232.
- Knudsen, K.E.B. y Lærke, H.N., "Capítulo 8: Carbohydrate digestion and absorption," en *Nutritional physiology of pigs*, Videnscenter for svineproduktion, 2013
- 50 Woyengo, T. A., Sands, J. S., Guenter W., y Nyachoti. C. M., 2008. Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets. J ANIM SCI 2008, 86:848-857.

## REIVINDICACIONES

1. Método para producir un pienso animal que comprende añadir una composición de *Bacillus* a componentes de pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos, en donde el método comprende determinar la capacidad de aumentar la cantidad de azúcar disponible incubando los componentes de pienso animal con la composición de *Bacillus* que comprende al menos una cepa de *Bacillus* a 37°C durante 24 horas, medir la absorbancia de ácido dinitrosalicílico (DNS) a DO<sub>540</sub>, y calcular la cantidad de equivalentes de hexosa producidos correlacionando la absorbancia medida con una curva patrón, en donde la composición de *Bacillus* es capaz de aumentar la cantidad de azúcar disponible de los componentes del pienso animal hasta una cantidad de al menos 120 equivalentes de hexosa expresados como µmol/ml.
2. El método según la reivindicación 1 en donde la composición de *Bacillus* comprende al menos una cepa de *Bacillus* de la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, tal como *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* o *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Bacillus simplex*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojaviensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus methylophilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus vallismortis*, *B. coagulans*, *B. lentus*, *B. clausii*, *B. fusiformis* o *Bacillus tequilensis*.
3. El método según la reivindicación 1 o 2 en donde la composición de *Bacillus* comprende una cepa de *Bacillus subtilis*, tal como al menos una de las cepas de *Bacillus subtilis* depositadas como DSM 17231 o DSM 19489, o un mutante de cualquiera de estas cepas.
4. El método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 3 en donde la composición de *Bacillus* comprende al menos una cepa de *Bacillus licheniformis*, tal como las cepas de *Bacillus licheniformis* depositadas como DSM 17236 o DSM 28634, o un mutante de cualquiera de estas cepas.
5. El método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 4 en donde la composición de *Bacillus* comprende al menos una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, tal como la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* depositada como DSM 27033, o un mutante de esta cepa.
6. El método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición de *Bacillus* comprende desde 10<sup>5</sup> a 10<sup>12</sup> UFC/g.
7. El método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 6, en donde los componentes de pienso animal que comprenden polisacáridos no amiláceos se seleccionan de uno o más de cereales, maíz, sorgo, granos de destilería secos con solubles (DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, vainas de soja, y harina de soja.
8. El método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 7, en donde el pienso animal que contiene polisacáridos no amiláceos para lechones, cerdas lactantes, pollos de asar y gallinas ponedoras tiene un contenido de más del 14% (p/p) de polisacáridos no amiláceos.
9. El método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 7, en donde el pienso animal que contiene polisacáridos no amiláceos para cerdos de engorde y cerdas gestantes tiene un contenido de más del 19% (p/p) de polisacáridos no amiláceos.

Figura 1

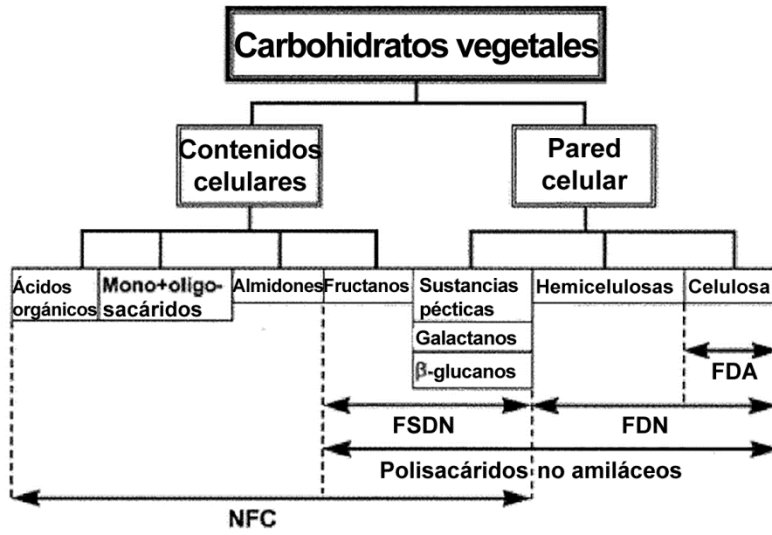


Figura 2

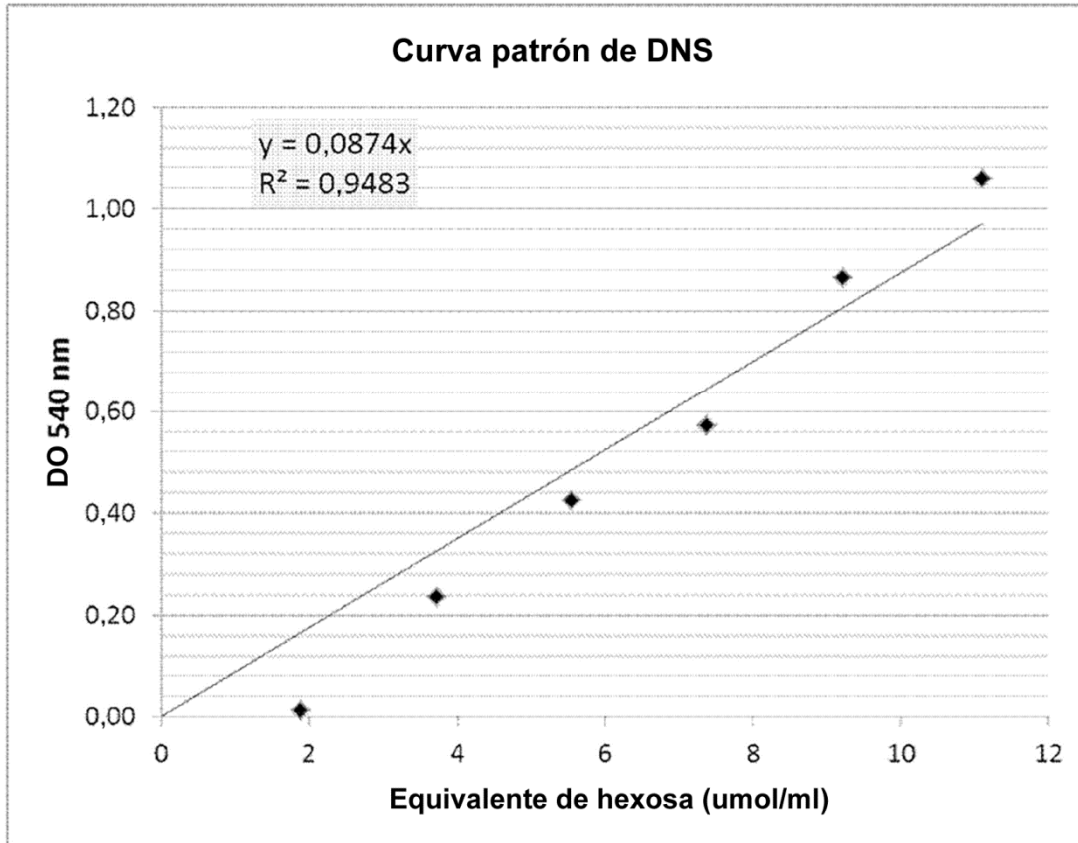


Figura 3  
Figura 3a

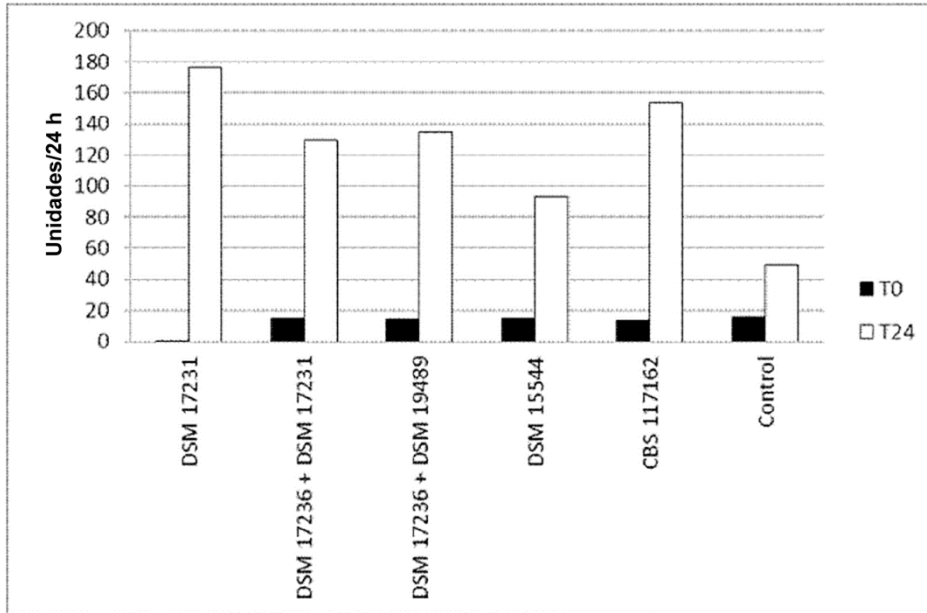


Figura 3b

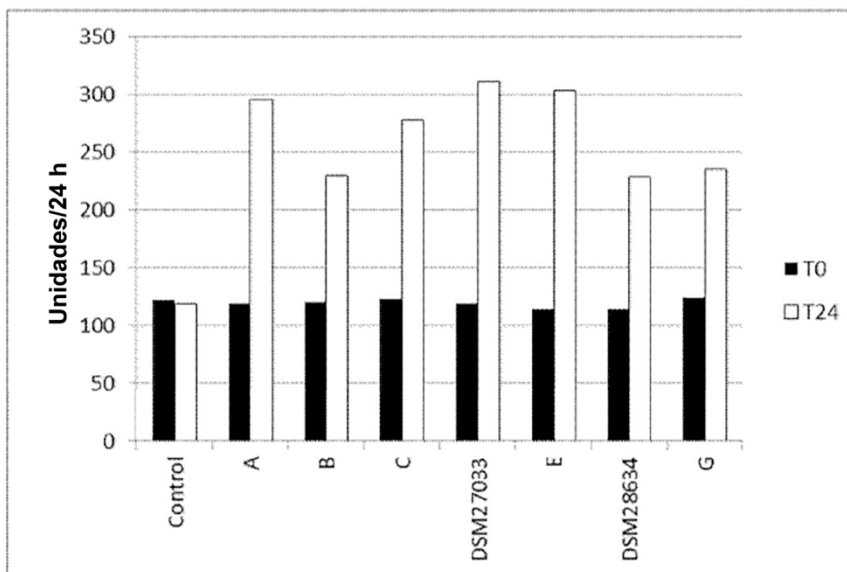


Figura 4

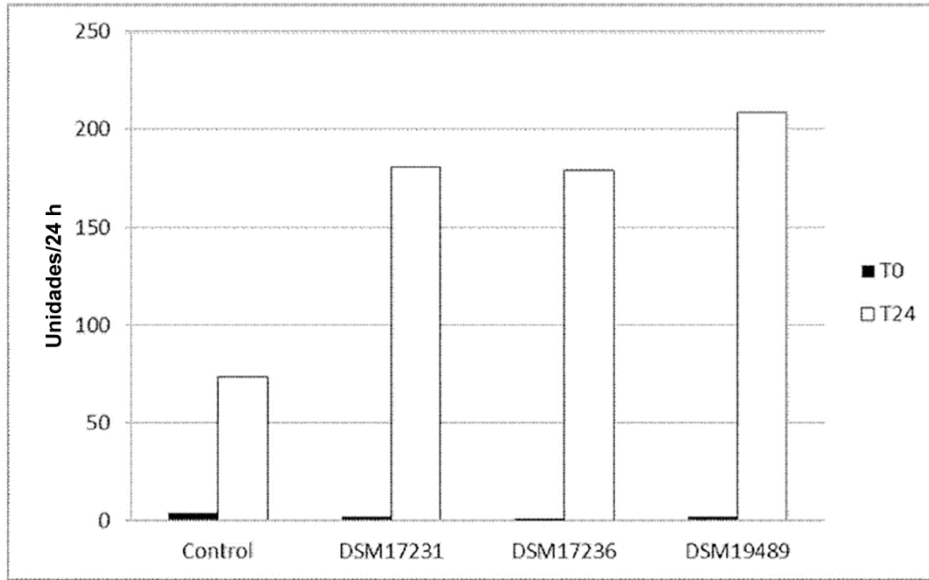


Figura 5

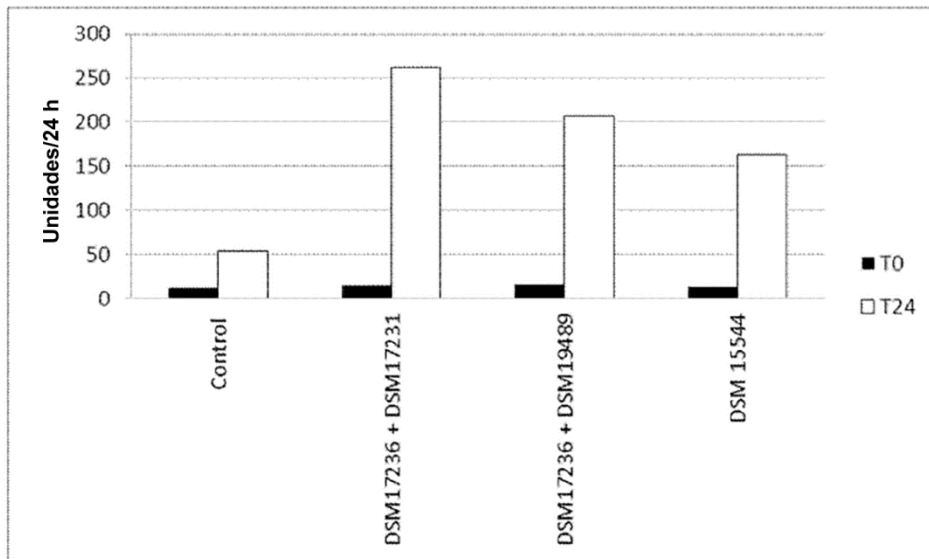


Figura 6

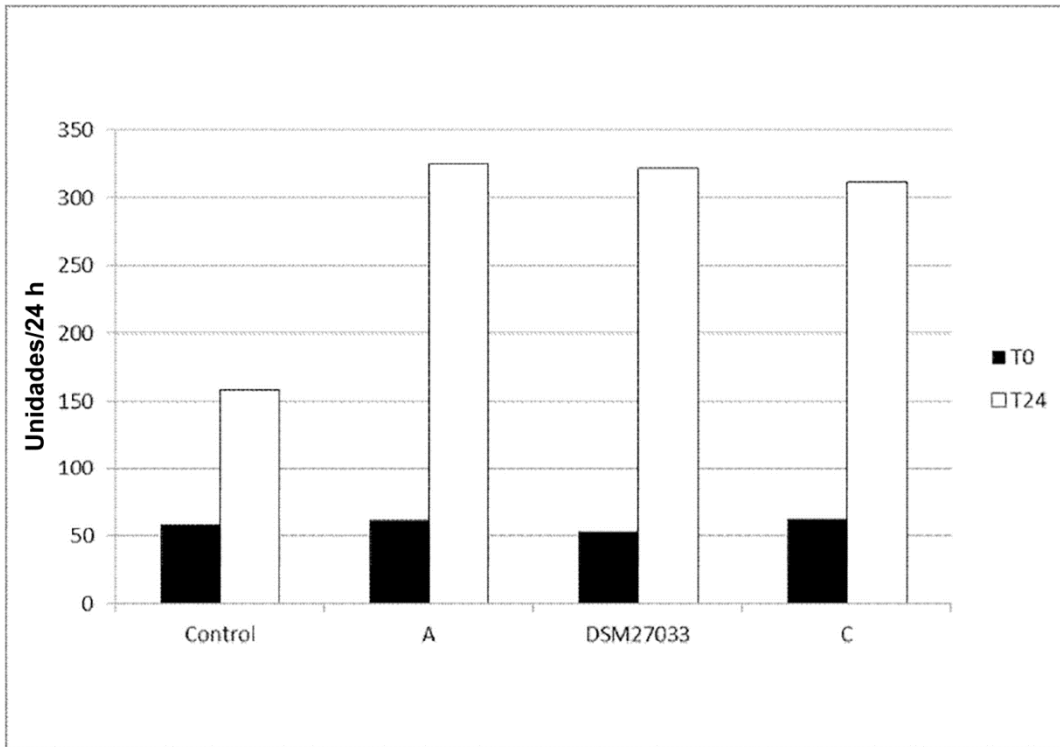


Figura 7

