



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0608859-7 A2**



* B R P I 0 6 0 8 8 5 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 22/03/2006
(43) Data da Publicação: 02/02/2010
(RPI 2039)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/32 (2010.01)
C12N 9/00 (2010.01)
C12N 15/31 (2010.01)
C12N 15/52 (2010.01)
A23K 1/00 (2010.01)

(54) Título: **POLIPEPTÍDEO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA DE BACILLUS RECOMBINANTE, USO DE POLIPEPTÍDEO, MÉTODOS PARA PRODUIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA MELHORAR A TAXA DE CONVERSÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, E PARA MODULAR A MICROFLORA INTESTINAL DE ANIMAL, ADITIVO DE RAÇÃO ANIMAL, E, COMPOSTO DE RAÇÃO ANIMAL**

(30) Prioridade Unionista: 22/03/2005 DK PA 2005 00413,
29/06/2005 DK PA 2005 00966

(73) Titular(es): NOVOZYMES A / S

(72) Inventor(es): ANNA MARIA KLUNTER, AURELIA SEON,
BJORN EGGERT CHRISTENSEN, CARLOS SIMOES- NUNES, LENE
NONBOE ANDERSEN, LEONARDO DE MARIA, PETER RAHBEK
OESTERGAARD

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000162 de 22/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/099871 de 28/09/2006

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA DE BACILLUS RECOMBINANTE, USO DE POLIPEPTÍDEO, MÉTODOS PARA PRODUIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA MELHORAR A TAXA DE CONVERSÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, E PARA MODULAR A MICROFLORA INTESTINAL DE ANIMAL, ADITIVO DE RAÇÃO ANIMAL, E, COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL. A presente invenção diz respeito aos polipeptídeos isolados e seqüências de ácido nucleico isoladas que codificam os polipeptídeos, assim como a métodos para produzir e usar os polipeptídeos em ração para animal. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção é a chamada proteína L12 de Bacillus licheniformis ATCC 14580 que melhora a Taxa de Conversão de ração (FCR) e/ou atua como um modulador da microflora intestinal. A invenção além disso diz respeito ao uso probiótico de cepas de Bacillus que produzem proteínas relacionadas com L12.

“POLIPEPTÍDEO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA DE BACILLUS RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM
5 POLIPEPTÍDEO, PARA MELHORAR A TAXA DE CONVERSÃO DE RAÇÃO, E PARA MODULAR A MICROFLORA INTESTINAL, USOS DE UM POLIPEPTÍDEO, E DE UMA CEPA DE BACILLUS, ADITIVO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, E, MICROORGANISMO”

10 **Campo da Invenção**

A presente invenção diz respeito a polipeptídeos isolados e seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam os polipeptídeos. A invenção também diz respeito a construções de ácido nucléico, vetores e células hospedeiras que compreendem as seqüências de ácido nucléico, assim
15 como métodos para produzir e usar os polipeptídeos em ração de animal, por exemplo para melhorar a Taxa de Conversão de Ração (FCR) e/ou para a modulação da microflora intestinal. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção é a chamado de proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que tem a seqüência de aminoácido dos aminoácidos de +1 a +85 da
20 SEQ ID NO: 2 aqui contida (em que segue os aminoácidos 1 a 85 da SEQ ID NO: 2). A invenção também diz respeito ao uso probiótico em ração de animal de cepas de *Bacillus* que produzem proteínas relacionada com a L12.

Fundamentos da Invenção

Fundamentos da Técnica

25 A WO 03/093453 divulga, no Exemplo 1, o planejamento de uma célula hospedeira de *Bacillus licheniformis* melhorada que não produz uma proteína extracelular pequena codificada pelos nucleotídeos de 601 a 978 da SEQ ID NO: 133 da WO 03/093453, a proteína tendo a seqüência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 134 da WO

03/093453. As SEQ ID NOs 133 e 134 da WO 03/093453 são incluídas na presente listagem de sequência como as SEQ ID NOs 3 e 4, respectivamente. a sequência de aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 aqui contida é idêntica aos aminoácidos de -41 a +85 da SEQ ID NO: 2 aqui contida. A WO 03/093453 não divulga um polipeptídeo isolado tendo os aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2. A WO 03/093453 também não divulga uma sequência de ácido nucléico isolada tendo os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1.

GenPept acesso no. YP_081375 é uma proteína BL00275 hipotética de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. GenPept acesso no. YP_081375 é idêntico aos aminoácidos de -41 a +85 da SEQ ID NO: 2 aqui contida. A sequência da proteína BL00275 hipotética de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 também foi entrada no UniProtKB/TrEMBL com o acesso primário número Q65CU4. Esta sequência também é idêntica aos aminoácidos de -41 a +85 da SEQ ID NO: 2 aqui contida.

A sequência de nucleotídeo que codifica YP_081375 tem acesso do Banco de Gene no. NC_006270. O acesso do Banco de Gene no. NC_006270 é idêntico aos nucleotídeos de 1 a 381 da SEQ ID NO: 1 aqui contida.

Surpreendentemente verificou-se que os polipeptídeos relacionados com parte desta sequência hipotética de *Bacillus licheniformis*, a saber os aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2, têm um potencial enorme para o uso em ração de animal.

SWISSPROT acesso no. Q8DQM5 é uma proteína spr0600 hipotética de 115 aminoácidos de *Streptococcus pneumoniae* (cepa ATCC BAA-255 / R6). A sequência também é divulgada em “Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6” por Hoskins *et al*, J. Bacteriol. 183: 5709 (2001). Q8DQM5 não compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 33% de identidade aos aminoácidos de 1 a

85 da SEQ ID NO: 2.

Martinez *et al*, Microbiology (1999), vol. 145, pp. 3155-3161 divulga, na Fig. 3, a seqüência de 91 aminoácidos deduzida da pré-bacteriocina lactococina 972 com uma porção madura de terminal C de 66 aminoácidos prognosticada. A porcentagem de identidade de cada um dos pré-polipeptídeo e o polipeptídeo maduro para os aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 está abaixo de 33%.

Uma pesquisa de bases de dados de nucleotídeo com nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 (que codifica os aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2) revelou um fragmento de DNA de 47% de identidade aos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1. Este fragmento é parte de uma seqüência que resulta de um projeto de seqüenciamento ainda em andamento. O organismo a partir do qual o fragmento deriva é chamado de *Bacillus* (Geobacillus) *stearothermophilus* cepa 10. O trabalho de seqüenciamento é feito no University of Oklahoma (<http://www.genome.ou.edu/bstearo.html>). Não existe nenhuma publicação de nenhuma das seqüências de aminoácido que potencialmente correspondem a este fragmento de DNA e portanto também nenhuma indicação de qualquer utilidade potencial de qualquer seqüência de aminoácido codificada.

Um produto probiótico em ração designado BioPlus®2B é oferecido para venda pelo Chr. Hansen NS, 10-12 Boege Allé, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca. O produto contém uma cepa de *Bacillus licheniformis* que entretanto não produz uma proteína relacionada com L12 (ver o Exemplo 6 aqui contido).

É um objetivo da presente invenção fornecer polipeptídeos, ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos, cepas especiais de *Bacillus*, assim como métodos para o uso dos polipeptídeos e das cepas de *Bacillus* em ração de animal.

Sumário da Invenção

A presente invenção diz respeito a polipeptídeos isolados selecionados do grupo que consiste de: (a) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%; (b) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucléico que hibridiza sob condições de severidade baixa com (i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos ou (iii) um filamento complementar de (i) ou (ii); (c) uma variante do polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 que compreendem uma substituição, deleção, extensão, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos; (d) uma variante alélica de (a) ou (b); e (e) um fragmento de (a), (b), (c) ou (d); com a condição de que o polipeptídeo não seja os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4.

A presente invenção também diz respeito às sequências de ácido nucléico isoladas que codificam os polipeptídeos e às construções de ácido nucléico, vetores e células hospedeiras que compreendem as sequências de ácido nucléico assim como métodos para produzir e usar os polipeptídeos dentro de ração de animal.

A presente invenção além disso diz respeito ao uso em ração de animal de uma cepa de *Bacillus* que é positiva no teste do Exemplo 6 aqui contido, a saber o DNA da qual, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

Descrição Detalhada da Invenção

O Polipeptídeo, suas Características e Uso

Em um primeiro aspecto, a invenção diz respeito a um polipeptídeo isolado selecionado do grupo que consiste de: (a) um

polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%; (b) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucléico que hibridiza sob condições de severidade baixa com (i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos ou (iii) um filamento complementar de (i) ou (ii); (c) uma variante do polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 que compreendem uma substituição, deleção, extensão, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos; (d) uma variante alélica de (a) ou (b); e (e) um fragmento de (a), (b), (c) ou (d); com a condição de que o polipeptídeo não seja os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4.

a invenção também diz respeito ao uso em ração de animal dos polipeptídeos definidos acima, e/ou de um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4, assim como o uso de qualquer um destes na preparação de uma composição para o uso em ração de animal. Estes polipeptídeos melhoram a utilização da ração de animal pela melhora da Taxa de Conversão de Ração (FCR), e/ou modulando a microflora do intestino.

As condições acima (que o polipeptídeo não seja os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4) serve para negar os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 134 da WO 03/093453, ver a seção Fundamentos da Técnica. A condição é opcional; em formas de realização alternativas desta (i) o polipeptídeo não inclui uma parte de peptídeo de sinal, (ii) o polipeptídeo não inclui uma parte de propeptídeo, e/ou (iii) o polipeptídeo é um polipeptídeo maduro. Em outras formas de realização alternativas, o polipeptídeo compreende, na alternativa tem ou consiste (essencialmente) de, 50 a 120 aminoácidos, preferivelmente de 55 a 115, 60 a 110, 65 a 105, 70 a 100, 75 a 95 ou mais preferivelmente de 80 a 90 aminoácidos.

em uma primeira forma de realização particular o polipeptídeo

tem, consiste essencialmente de ou consiste de uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, tal como, por exemplo, o polipeptídeo de aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2. Outros exemplos específicos são os polipeptídeos de aminoácidos de 1 a 85 de qualquer uma das SEQ ID NOs: 8, 9 e 10 (identificadas como similar a L12 com base no teste de PCR do Exemplo 6 aqui contido).

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser um polipeptídeo bacteriano ou fúngico. Em uma segunda forma de realização particular, o polipeptídeo é um Polipeptídeo bacteriano Gram positivo tal como um polipeptídeo de *Bacillus* ou uma variante deste, por exemplo um polipeptídeo de *Bacillus licheniformis* por exemplo derivado de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que é a cepa tipo de *Bacillus licheniformis* e disponível sob requisição da American Type Culture Collection, ATCC. As cepas preferidas de *Bacillus licheniformis* são positivas no teste do Exemplo 6 aqui contido, tal como as seguintes cepas de *Bacillus licheniformis*: ATCC 14580 (=NCIB 9375), NCIMB 6346 (=DSM 8785), NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689 e ATCC 53757.

Em uma terceira forma de realização, o polipeptídeo melhora a utilização de ração de animal pela melhora da Taxa de Conversão de Ração (FCR), e/ou modulando a microflora do intestino. Em formas de realização alternativas, o polipeptídeo melhora a digestibilidade da ração de animal, e/ou mantém a saúde animal ajudando na digestão apropriada e/ou sustentando a função do sistema imune.

A FCR pode ser determinada com base em um teste de crescimento de frango que compreendem um primeiro tratamento em que o polipeptídeo é adicionado à ração de animal em uma concentração de 5 mg por kg de ração e um segundo tratamento (controle) sem nenhuma adição do

polipeptídeo à ração de animal, cada tratamento que consiste de 8 grupos de 6 frangos machos, o frango sendo alimentado com pelotas de uma dieta de milho/SBM48 *ad libitum*, a FCR sendo calculada como a ingestão de ração em g/ave em relação ao ganho de peso em g/ave para os dias 8 a 29 do teste, a FCR para o primeiro tratamento sendo melhorada em relação à FCR do segundo tratamento. Em uma forma de realização particular o teste de crescimento é um teste de gaiola. Para mais detalhes, ver o Exemplo 5.

A FCR também pode ser determinada com base em um teste de crescimento de frango que compreende um primeiro tratamento em que o polipeptídeo é adicionado à ração de animal em uma concentração de (i) 2,5, (ii) 5,0 ou (iii) 7,5 mg por kg de ração e um segundo tratamento (controle) sem nenhuma adição do polipeptídeo à ração de animal, cada tratamento que consiste de 10 grupos de 6 frangos machos, o frango sendo alimentado com pelotas de uma dieta de milho/SBM48 *ad libitum*, a FCR sendo calculada como a ingestão de ração em g/ave em relação ao ganho de peso em g/ave para os dias 8 a 29 do teste, a FCR para o primeiro tratamento sendo melhorado em relação à FCR do segundo tratamento. Em uma forma de realização particular o teste de crescimento é um teste de gaiola. Para mais detalhes, ver o Exemplo 9.

A FCR também pode ser determinada com base em um teste de crescimento de frango que compreende um primeiro tratamento em que o polipeptídeo é adicionado à ração de animal em uma concentração de 7,5 mg por kg de ração e um segundo tratamento (controle) sem nenhuma adição do polipeptídeo à ração de animal, cada tratamento consistindo de 12 grupos de 20 frangos (6 grupos de 20 fêmeas, 6 grupos de 20 machos), os frangos sendo alimentados com pelotas de uma dieta com base de farinha de trigo, centeio e soja *ad libitum*, a FCR sendo calculada como a ingestão de ração em g/ave em relação ao ganho de peso em g/ave para os dias de 1 a 36 do teste, a FCR para o primeiro tratamento sendo melhorada em relação à FCR do segundo

tratamento. Em uma primeira forma de realização particular os frangos são alojados em galinheiros com cama de serragem. Em uma segunda forma de realização particular os frangos são alimentados com uma dieta iniciadora no período do dia 1 a 22 e uma dieta de crescimento rápido no período do dia 22 a 36, ambas com base em farinha de trigo, centeio e soja e com uma composição como mostrado na Tabela 9. Para mais detalhes, ver o Exemplo 12.

Como é no geral conhecido, uma FCR melhorada é mais baixa do que a FCR de controle. Em formas de realização particulares, a FCR é melhorada (isto é, reduzida) quando comparada ao controle em pelo menos 1,0%, preferivelmente pelo menos 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4% ou pelo menos 2,5%. Em outras formas de realização particulares, a FCR é melhorada (isto é reduzida) quando comparada ao controle em pelo menos 2,6%, 2,7%, 2,8%, 2,9% ou pelo menos 3,0%. Ainda em outras formas de realização particulares, a FCR é melhorada (isto é, reduzida) quando comparada ao controle em pelo menos 3,1%, 3,2%, 3,3%, 3,4%, 3,5%, 3,6%, 3,7% ou pelo menos 3,8%.

O termo “intestino” como aqui usado designa o trato gastrointestinal ou digestivo (também aludido como o canal alimentar) e o mesmo se refere ao sistema de órgãos dentro de animais multicelulares que ingere o alimento, o digere para extrair energia e nutrientes e expelle o resíduo remanescente. O intestino pode ser dividido em trato gastrointestinal superior e inferior, o primeiro compreendendo a boca e o estômago e o último compreendendo os intestinos. Os intestinos podem ser divididos em intestino delgado e grosso. Os componentes básicos do intestino delgado, entretanto com diferenças entre as espécies de animal, são duodeno, jejuno e íleo. Os componentes básicos do intestino grosso são ceco, cólon e reto (cloaca).

O termo “microflora” intestinal como aqui usado refere-se às culturas microbianas naturais que residem no intestino e mantêm a saúde

ajudando na digestão apropriada e/ou sustentação da função do sistema imune.

O termo “modular” como aqui usado em conexão com a microflora intestinal no geral significa mudar, manipular, alterar ou ajustar a sua função ou situação em um animal saudável e normalmente em atividade, isto é um uso não terapêutico. A modulação é em resposta aos polipeptídeos e/ou às cepas de *Bacillus* da invenção.

Os seguintes são exemplos particulares não limitantes do efeito de modulação da microflora intestinal obtido pelo polipeptídeo da invenção (mudanças quando comparadas a um controle sem o polipeptídeo da invenção) - para mais detalhes, ver o Exemplo 8:

(i) um aumento no número de bactérias anaeróbicas facultativas totais *in vivo*, por exemplo em leitões e/ou frangos, preferivelmente determinado depois do cultivo de conteúdos íleo-retais e/ou cecal, respectivamente, em Brucela ágar suplementado com 5% vol/vol de sangue de ovelha depois da incubação em uma cabina anaeróbica a 37 °C por cinco dias;

(ii) um aumento no número de *Escherichia coli in vivo*, por exemplo em leitões e/ou frangos, preferivelmente determinado depois do cultivo dos conteúdos íleo-retais e/ou cecais, respectivamente, no meio cromogênico Coli-ID, aerobicamente, a 37° C por 24 horas;

(iii) nenhuma mudança substancial ou um aumento, nas bactérias de ácido láctico total *in vivo*, por exemplo em leitões e/ou frangos, preferivelmente determinados depois do cultivo dos conteúdos íleo-retais e/ou cecais, respectivamente, em MRS ágar, em uma cabina anaeróbica, a 37° C por 48 horas;

(iv) nenhuma mudança substancial no *LactoBacillus* spp. total *in vivo*, por exemplo em leitões, preferivelmente determinada depois do cultivo dos conteúdos íleo-retais em Rogosa ágar, em uma cabine anaeróbica

a 37° C por 48 horas;

(v) uma diminuição no número de outras *Enterobacteriaceae* (outra que não a *E. coli*) *in vivo*, por exemplo em leitões, preferivelmente determinada depois do cultivo dos conteúdos íleo-retais em um meio cromogênico Coli-ID, aerobicamente, a 37° C por 24 horas;

(vi) uma diminuição no número de *Enterococcus* spp. *in vivo*, por exemplo em leitões, preferivelmente determinada depois do cultivo dos conteúdos íleo-retais em um Enterococos ágar, aerobicamente, a 37° C por 48 horas; e/ou

(vii) uma diminuição na frequência com que *Clostridium perfringens* ocorre *in vivo*, por exemplo em leitões, preferivelmente determinada depois do cultivo dos conteúdos íleo-retais em TSN ágar depois de aquecer a amostra a 80° C durante 10 min, em uma cabine anaeróbica a 46° C por 24 horas.

Ainda mais, também em relação ao efeito modulador da microflora intestinal e com referência a um controle sem o polipeptídeo da invenção, o polipeptídeo da invenção preferivelmente:

(iix) é mais ativo *in vitro* contra cocos Gram positivos do que bactérias Gram negativas, a saber exibindo uma redução mais forte do primeiro, por exemplo para cocos Gram positivos e bactérias Gram negativas isoladas dos conteúdos intestinais de leitão e/ou frango;

(ix) é mais ativo *in vitro* contra *Clostridium* spp., por exemplo *Clostridium perfringens*, do que as bactérias Gram negativas bacteria, a saber exibindo uma redução mais forte do primeiro, por exemplo para *Clostridium perfringens* e bactérias Gram negativas isoladas dos conteúdos intestinais de leitão e/ou frangos;

(x) não influencia substancialmente o crescimento *in vitro* de microorganismos benéficos, tais como bactérias, por exemplo como isoladas de conteúdos intestinais de leitão e/ou frangos; e/ou

(xi) não influencia substancialmente, por exemplo reduz, o crescimento *in vitro* de microorganismos nocivos, tais como bactérias, por exemplo como isoladas de conteúdos intestinais de leitão e/ou frangos.

5 Para detalhes em relação às formas de realização (iix)-(xi), favor ver a última parte do Exemplo 8.

Em formas de realização (x), os microorganismos benéficos são preferivelmente selecionados de *LactoBacillus* spp., tal como *LactoBacillus salivarius* DSM 18070, para o qual o MIC₉₀ é pelo menos 1000 microgramas/ml, preferivelmente pelo menos 2000, 3000, 4000, 4500, 5000,
10 5500, 6000 ou pelo menos 7000 microgramas/ml, em particular pelo menos 4170 microgramas/ml.

Conseqüentemente, o polipeptídeo da invenção tem um MIC₉₀ contra *LactoBacillus salivarius* DSM 18070 de pelo menos 1000 microgramas/ml, preferivelmente pelo menos 2000, 3000, 4000, 4500, 5000,
15 5500, 6000 ou pelo menos 7000 microgramas/ml, em particular pelo menos 4170 microgramas/ml.

Em formas de realização (xi), os microorganismos nocivos são preferivelmente selecionados de *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* (preferivelmente *Clostridium perfringens*); tal como *Enterococcus faecalis*
20 DSM 18047, para a qual o MIC₉₀ está abaixo de 4000 microgramas/ml, preferivelmente abaixo de 3000, 2000, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80 ou abaixo 70 microgramas/ml, preferivelmente um MIC₉₀ de 50 a 80, mais preferivelmente de 60 a 70 microgramas/ml.

Conseqüentemente, o polipeptídeo da invenção tem um MIC₉₀ contra *Enterococcus faecalis* DSM 18047 abaixo de 4000 microgramas/ml, preferivelmente abaixo 3000, 2000, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100,
25 90, 80 ou abaixo 70 microgramas/ml, preferivelmente um MIC₉₀ de 50 a 80, mais preferivelmente de 60 a 70 microgramas/ml.

MIC₉₀ designa a Concentração Inibidora Mínima requerida

para inibir o crescimento de 90% dos organismos. Para os presentes propósitos, MIC₉₀ é definida como aquela concentração do polipeptídeo da invenção que é requerida para reduzir a densidade da cultura, determinada como OD₅₉₅, em 90% em relação a um controle sem o polipeptídeo da invenção. A OD₅₉₅ é determinada depois da incubação sob condições de incubação apropriadas (que dependem do organismo em questão, como mostrado na Tabela 5 do Exemplo 8). A determinação de MIC₉₀ pode ser feita por um método de diluição de caldo de micro titulação, usando aproximadamente 10⁵ CFU/ml das bactérias puras em caldo de soja triptico, adicionando o polipeptídeo da invenção em diluição de 2 vezes em série, usando água como controle. Para mais detalhes, ver o Exemplo 8. A MIC₉₀ é aqui no geral indicada na unidade de micrograma do polipeptídeo puro por ml (micrograma/ml).

Ainda em outras formas de realização particulares, o polipeptídeo da invenção:

(xii) tem um MIC₉₀ para uma bactéria Gram negativa, tal como uma cepa de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* ou *Proteus mirabilis*, que é pelo menos 50% mais alta do que um MIC₉₀ para um coco Gram positivo, tal como uma cepa de *Enterococcus* ou *Staphylococcus*, por exemplo *Enterococcus faecalis*, preferivelmente *Enterococcus faecalis* DSM 18047 - em suas sub-formas de realização preferidas, a MIC₉₀ do primeiro é preferivelmente de pelo menos 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% ou pelo menos 500% mais alta do que a MIC₉₀, do último.

Em uma quarta forma de realização particular (ver o Exemplo 11 para detalhes), o polipeptídeo da invenção, na sua forma nativa (isto é não desnaturada), não é degradada por (i) pepsina (pH 3,5, 40° C, 2 horas); (ii) pancreatina (pH 7,0, 40° C, 4 horas); e/ou (iii) pepsina seguida por pancreatina (pepsina no pH 3,5, 40° C, 2 horas - seguida pela pancreatina no

pH 7,0, 40° C, 4 horas) - para todas as formas de realização de (i) a (iii) como julgado pela SDS-PAGE (ver o Exemplo 10).

Em uma quinta forma de realização particular (ver o Exemplo 7 para detalhes), o polipeptídeo da invenção tem as seguintes temperaturas de desnaturação, como determinado pela Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC): (i) pelo menos 54° C no pH 2,5, (ii) pelo menos 68° C no pH 4,0, e/ou (iii) pelo menos 59° C no pH 7,0; preferivelmente (iv) 55° C no pH 2,5; (v) 69° C no pH 4,0; e/ou (vi) 60° C no pH 7,0.

Identidade e Hibridização, Fragmentos e Variantes

10 A relacionabilidade entre duas seqüências de aminoácido é descrita pelo parâmetro “identidade”.

Para os propósitos da presente invenção, o alinhamento de duas seqüências de aminoácido é determinada usando-se o programa Needle do pacote EMBOSS (<http://emboss.org>) versão 2.8.0. O programa Needle
15 implementa o algoritmo de alinhamento global descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. A matriz de substituição usada é BLOSUM62, penalidade de abertura de intervalo é 10 e a penalidade de extensão de intervalo é 0,5.

O grau de identidade entre uma seqüência de aminoácido da presente invenção (“seqüência da invenção”; por exemplo aminoácidos de 1 a
20 85 da SEQ ID NO: 2 e uma seqüência de aminoácido diferente (“seqüência estranha”) é calculado como o número de emparelhamentos exatos em um alinhamento das duas seqüências, dividido pelo comprimento da “seqüência da invenção” ou pelo comprimento da “seqüência estranha”, seja qual for
25 mais curta. O resultado é expressado em identidade percentual.

Um emparelhamento exato ocorre quando a “seqüência da invenção” e a “seqüência estranha” têm resíduos de aminoácido idênticos nas mesmas posições da sobreposição (no exemplo de alinhamento abaixo isto é representado por “I”). O comprimento de uma seqüência é o número de

resíduos de aminoácido na sequência (por exemplo o comprimento de aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 é 85).

No exemplo de alinhamento puramente hipotético abaixo, a sobreposição é a sequência de aminoácido “HTWGER-NL” da sequência 1; ou a sequência de aminoácido “HGWGEDANL” da sequência 2. No exemplo um intervalo é indicado por um “-”.

Exemplo de alinhamento hipotético:

Sequência 1: ACMSHTWGER- NL

| | | | |

Sequência 2: HGWGEDANLAMNPS

Em uma forma de realização particular, a porcentagem de identidade de uma sequência de aminoácido de um polipeptídeo com ou para, aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 é determinada i) alinhando as duas sequências de aminoácido usando o programa de Needle, com a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo de 10 e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; ii) contando-se o número de emparelhamentos exatos no alinhamento; iii) dividindo-se o número de emparelhamento exatos pelo comprimento da mais curta das duas sequências de aminoácido e iv) convertendo o resultado da divisão de iii) em porcentagem. No exemplo hipotético acima, o número de emparelhamentos exatos é de 6, o comprimento da mais curta das duas sequências de aminoácido é 12, conseqüentemente a porcentagem de identidade é de 50%.

Na alternativa, o grau de identidade entre as duas sequências de aminoácido, assim como o grau de identidade entre as duas sequências de nucleotídeo, é determinada pelo programa “align” que é um alinhamento de Needleman-Wunsch (isto é um alinhamento global). O programa é usado para o alinhamento de sequências de polipeptídeo, assim como de nucleotídeo. A matriz de contagem padrão BLOSUM50 é usado para os alinhamentos de polipeptídeo e a matriz de identidade padrão é usada para alinhamentos de

nucleotídeo. A penalidade para o primeiro resíduo de um intervalo é -10 para polipeptídeos e -16 para nucleotídeos. As penalidades para outros resíduos de um intervalo são -2 para polipeptídeos e -4 para nucleotídeos. "Align" é parte do pacote FASTA versão v20u6 (ver W. R. Pearson e D. J. Lipman (1988),
 5 "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85: 2444-2448 e W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP e FASTA," Methods in Enzymology 183: 63-98). Os alinhamentos de proteína FASTA usam o algoritmo de Smith-Waterman sem nenhuma limitação no tamanho do intervalo (ver o "algoritmo de Smith-Waterman", T.
 10 F. Smith e M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197). Ver também Myers e Miller, CABIOS (1989) 4: 11-17.

em formas de realização preferidas, o grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 é de pelo menos 35% ou pelo menos 37%, 40%, 42%, 45%, 47%, 50%, 52%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%,
 15 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% ou pelo menos 99%. Os polipeptídeos com qualquer um destes graus de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 são aludidos como polipeptídeos homólogos. Em uma forma de realização alternativa, o grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 é 32%.

20 Em formas de realização particulares, os polipeptídeos da invenção compreendem (ou têm ou consistem de) uma seqüência de aminoácido que difere em (i) 57, 55, 50, 45, 40, 35, 30 ou 25 aminoácidos dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2; ou em (ii) 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 ou 11 aminoácidos dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2; ou
 25 em (iii) 10, 9, 8, 7, 6 ou 5 aminoácidos dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2. Em uma outra forma de realização particular, os polipeptídeos compreendem (ou têm ou consistem de) uma seqüência de aminoácido que difere em 4, 3 ou 2 aminoácidos ou em 1 aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2.

Um fragmento, por exemplo, dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 é um polipeptídeo tendo um ou mais aminoácidos deletados do término amino e/ou carboxila destas seqüências de aminoácido. Em uma forma de realização um fragmento contém pelo menos 30, 35, 40, 45, 50 ou
5 pelo menos 55 aminoácidos. Em uma outra forma de realização um fragmento contém pelo menos 65 resíduos de aminoácido ou pelo menos 70 resíduos de aminoácido ou pelo menos 75 resíduos de aminoácido ou pelo menos 80 resíduos de aminoácido ou pelo menos 81 resíduos de aminoácido ou pelo menos 82 resíduos de aminoácido ou pelo menos 83 resíduos de aminoácido
10 ou pelo menos 84 resíduos de aminoácido.

Uma variante alélica denota qualquer uma de duas ou mais formas alternativas de um gene que ocupam o mesmo local cromossômico. A variação alélica surge naturalmente através da mutação e pode resultar em polimorfismo dentro das populações. As mutações de gene podem ser
15 silenciosas (nenhuma mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo seqüências de aminoácido alteradas. Uma variante alélica de um polipeptídeo é um polipeptídeo codificado por uma variante alélica de um gene.

A presente invenção também diz respeito a polipeptídeos isolados que são codificados pelas seqüências de ácido nucléico que hibridizam sob condições de severidade muito baixa ou baixa ou média ou média-alta ou alta ou muito alta com uma sonda de ácido nucléico que hibridiza sob as mesmas condições com (i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) ou (iii) um filamento complementar de
20 (i) ou (ii) (J. Sambrook, E. F. Fritsch e T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor, nova Iorque). Em uma forma de realização particular a sonda de ácido nucléico é selecionada dentre as seqüências de ácido nucléico de (i), (ii) ou (iii) acima.

A subsequência de nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO:

1 pode ser de pelo menos 100 nucleotídeos ou em uma outra forma de realização pelo menos 50, 150 ou 200 nucleotídeos.

5 A seqüência de ácido nucléico dos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 ou uma subsequência deste, assim como a seqüência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 ou um fragmento deste, podem ser usadas para planejar uma sonda de ácido nucléico para identificar e clonar polipeptídeos que codificam DNA tendo um potencial para o uso em ração de animal a partir das cepas de gêneros ou espécies diferentes de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica. Em
10 particular, tais sondas podem ser usadas para a hibridização com o DNA genômico ou cDNA do gênero ou espécie de interesse, seguindo procedimentos de manchamento de Southern padrão, de modo a identificar e isolar o gene correspondente aí contido. Tais sondas podem ser consideravelmente mais curtas do que a seqüência inteira, mas devem ter pelo
15 menos 15, preferivelmente pelo menos 25 e mais preferivelmente pelo menos 35 nucleotídeos no comprimento. As sondas mais longas também podem ser usadas. Tanto sondas de DNA quanto de RNA podem ser usadas. As sondas são tipicamente rotuladas para detectar o gene correspondente (por exemplo, com ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina ou avidina). Tais sondas são abrangidas pela presente
20 invenção.

Assim, uma biblioteca de DNA genômico ou cDNA preparada a partir de tais outros organismos pode ser triada quanto ao DNA que hibridiza com as sondas descritas acima e que codificam um polipeptídeo tendo a atividade desejada. O DNA genômico ou outro DNA de tais outros
25 organismos pode ser separado pela eletroforese em gel de agarose ou gel de poliacrilamida ou outras técnicas de separação. O DNA das bibliotecas ou o DNA separado podem ser transferidos para e imobilizados em nitrocelulose ou outro material carregador adequado. de modo a identificar um clone ou DNA que seja homólogo com a SEQ ID NO: 1 ou uma subsequência desta, o

material carregador é usado em um Southern blot. para os propósitos da presente invenção, a hibridização indica que a sequência de ácido nucléico hibridiza com uma sonda de ácido nucléico rotulada correspondendo à sequência de ácido nucléico mostrada na SEQ ID NO: 1, seu filamento complementar ou uma subsequência desta, sob condições de severidade muito baixas a muito altas. As moléculas às quais a sonda de ácido nucléico hibridiza sob estas condições são detectadas usando película de raio X.

Em uma forma de realização particular, a sonda de ácido nucléico é uma sequência de ácido nucléico que codifica aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 ou subsequências destes. Em uma outra forma de realização, a sonda de ácido nucléico tem nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 (a região codificadora de polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 1).

Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, as condições de severidade muito baixas a muito altas são definidas como pré hibridização e hibridização a 42° C em 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 µg/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 25% de formamida para as severidades muito baixas e baixas, 35% de formamida para as severidades médias e médias-altas ou 50% de formamida para as severidades altas e muito altas, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão.

Para sondas mais longas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, o material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2 x SSC, 0,2% de SDS preferivelmente pelo menos a 45° C (severidade muito baixa), mais preferivelmente pelo menos a 50° C (severidade baixa), mais preferivelmente pelo menos a 55° C (severidade média), mais preferivelmente pelo menos a 60° C (severidade média-alta), ainda mais preferivelmente pelo menos a 65° C (severidade alta) e mais preferivelmente pelo menos a 70° C (severidade muito alta).

Para sondas curtas de cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 70

nucleotídeos no comprimento, as condições de severidade são definidas como pré hibridização, hibridização e lavagem pós-hibridização de 5° C a 10° C abaixo da T_m calculada usando o cálculo de acordo com Bolton e McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48: 1390) em

5 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 1X solução de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sódio, 1 mM de fosfato monobásico de sódio, 0,1 mM de ATP e 0,2 mg de RNA de levedura por ml seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão.

Para sondas curtas de cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 70

10 nucleotídeos no comprimento, o material carregador é lavado uma vez em 6X SSC mais 0,1% de SDS por 15 minutos e duas vezes cada por 15 minutos usando 6X SSC de 5° C a 10° C abaixo da T_m calculada.

A presente invenção também diz respeito a variantes do polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de aminoácidos de 1 a 85 da

15 SEQ ID NO: 2 que compreendem uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos.

A seqüência de aminoácidos dos polipeptídeos variantes podem diferir da seqüência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 por uma inserção ou deleção de um ou mais resíduos de aminoácido

20 e/ou a substituição de um ou mais resíduos de aminoácido pelos resíduos de aminoácido diferentes. Preferivelmente, as mudanças de aminoácido são de uma natureza menor, que são substituições de aminoácido conservativas que não afetam significativamente a dobra e/ou a atividade da proteína; deleções pequenas, tipicamente de um a cerca de 30 aminoácidos; extensões de

25 terminal amino ou carboxila pequenas, tais como um resíduo de metionina de terminal amino; um peptídeo de ligador pequeno de até cerca de 20 a 25 resíduos; ou uma extensão pequena que facilite a purificação pela mudança da carga líquida ou uma outra função, tal como um trato de poli-histidina.

Os exemplos de substituições conservativas estão dentro do

grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina). Conseqüentemente, por exemplo, a invenção diz respeito a um polipeptídeo tendo ou compreendendo, uma seqüência como apresentada na SEQ ID NO: 2, preferivelmente a parte madura desta, em que as substituições de aminoácido conservativas compreendem substituições, recíprocas, entre os aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), entre os aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), entre os aminoácidos polares (glutamina e asparagina), entre os aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina, isoleucina e valina), entre os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e entre os aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina) ou qualquer combinação destes ou fragmentos ativos destes.

Como aqui definido, um polipeptídeo “isolado” ou “puro” é um polipeptídeo que é essencialmente livre de outros polipeptídeos, por exemplo, pelo menos 80% puro, preferivelmente pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89% ou pelo menos 90% puro, mais preferivelmente pelo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95% ou pelo menos 96% puro, como determinado pela SDS-PAGE (por exemplo, pelo tingimento com coomassie e varredura subsequente pelos métodos conhecidos na técnica - ver os Exemplos 2 e 4). A pureza também pode ser determinada pela HPLC, preferivelmente RP-HPLC (por exemplo, usando uma coluna Waters p-Bondapak C18, Fase móvel A: 0,1% de TFA, Fase móvel B: Acetonitrila + 0,1% de TFA, detectando a 280 nm - ver o Exemplo 10). A pureza pela SDS-PAGE, assim como a pureza pela HPLC, refere-se à quantidade do polipeptídeo da invenção, em relação à quantidade de proteína total. Em formas de realização alternativas, o polipeptídeo pode ser pelo menos 20%, 40%, 60% ou pelo menos 70% puro.

A quantidade de proteína total pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo o método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC) e a quantidade do polipeptídeo da invenção pode ser determinada pela SDS-PAGE e varredura subsequente, também pelos métodos conhecidos na técnica.

O polipeptídeo codificado pelas seqüências de ácido nucléico da presente invenção também incluem polipeptídeos fundidos ou polipeptídeos de fusão cliváveis em que um outro polipeptídeo é fundido no terminal N ou no terminal C do polipeptídeo ou fragmento deste. Um polipeptídeo fundido é produzido pela fusão de uma seqüência de ácido nucléico (ou um porção deste) que codifica um outro polipeptídeo a uma seqüência de ácido nucléico (ou uma porção deste) da presente invenção. As técnicas para produzir polipeptídeos de fusão são conhecidos na técnica e incluem ligar as seqüências codificadoras que codificam os polipeptídeos de modo que as mesmas estejam na matriz e que a expressão do polipeptídeo fundido esteja sob o controle do mesmo promotor(s) e terminador.

Em uma forma de realização específica, o polipeptídeo é uma variante alergênica baixa, planejada para invocar uma resposta imunológica reduzida quando exposta aos animais, incluindo o ser humano. O termo resposta imunológica deve ser entendida como qualquer reação pelo sistema imune de um animal exposto ao polipeptídeo. Um tipo de resposta imunológica é uma resposta alérgica que leva a níveis aumentados de IgE no animal exposto. As variantes alergênicas baixas podem ser preparadas usando técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo o polipeptídeo pode ser conjugado com porções que protegem porções poliméricas ou epítomos do polipeptídeo envolvido em uma resposta imunológica. A conjugação com polímeros pode envolver a ligação química *in vitro* de polímero ao polipeptídeo, por exemplo como descrito na WO 96/17929, WO98/30682, WO98/35026, e/ou

WO99/00489. A conjugação pode além disso ou alternativamente a isto envolver a ligação *in vivo* de polímeros ao polipeptídeo. Tal conjugação pode ser obtida pelo engenheiramento genético da sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Um outro modo de fornecer variantes alergênicas
5 baixas é o engenheiramento genético da sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo de modo a fazer com que os polipeptídeos se auto-oligomerizem, fazendo com que os monômeros de polipeptídeo possam proteger os epítomos de outros monômeros de polipeptídeo e diminuindo deste modo a antigenicidade dos oligômeros. Tais produtos e a sua preparação é
10 descrita por exemplo na WO 96/16177. Os epítomos envolvidos em uma resposta imunológica podem ser identificados pelos vários métodos tais como o método de demonstração de fago descrito na WO 00/26230 e WO 01/83559 ou o método aleatório descrito na EP 561907. Uma vez que um epítomo tenha sido identificado, a sua sequência de aminoácido pode ser alterada para
15 produzir propriedades imunológicas alteradas do polipeptídeo pelas técnicas de manipulação de gene conhecidas tais como a mutagênese direcionada ao sítio (ver por exemplo a WO 00/26230, WO 00/26354 e/ou WO 00/22103) e/ou a conjugação de um polímero pode ser feita em proximidade suficiente ao epítomo para o polímero proteger o epítomo.

20 **Cepas Bacterianas; Cepas de *Bacillus* probióticas**

Em um segundo aspecto, a invenção diz respeito ao uso em ração de animal de uma cepa de *Bacillus*, o DNA da qual, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID
25 NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb. Este teste serve para identificar cepas com um gene como L12, ver o Exemplo 6 aqui contido. Estas cepas de *Bacillus* também podem ser usadas na preparação de uma composição para o uso em ração de animal. Estes usos são, por exemplo, com uma vista para melhorar a Taxa de Conversão de Ração (FCR), e/ou modulando a microflora

do intestino.

Em uma primeira forma de realização particular, a cepa de *Bacillus* é um microorganismo probiótico. O termo “probiótico” no geral refere-se a uma bactéria não patogênica alimentada aos animais, incluindo as aves, como um meio de prevenir a colonização pelas bactérias patogênicas. O conceito básico é encorajar a colonização de superfícies mucósicas como um meio de bloquear a colonização pelos patógenos sérios. Os probióticos também podem ser definidos como microorganismos vivos ou com que se pode conviver, que beneficemente afetam o equilíbrio intestinal de humanos e animais saudáveis e que funcionam normalmente, aumentando preferivelmente deste modo o ganho de peso vivo e/ou melhorando a conversão da ração.

Em uma segunda forma de realização particular, a cepa de *Bacillus* é usada na forma de esporos. Os esporos podem ser exosporos ou, preferivelmente, endosporos. Um endosporo é qualquer esporo que é produzido dentro de um organismo (usualmente uma bactéria). Os endosporos podem sobreviver por períodos de estresse ambiental e são portanto capazes de sobreviver a passagem do ambiente agressivo (ácido) do trato gastro intestinal superior, enquanto que apenas exerce seu efeito uma vez que atinja os intestinos, onde as células vegetativas normais serão formadas.

Em uma terceira forma de realização, o fragmento de PCR, quando purificado e seqüenciado codifica uma seqüência de aminoácido que tem pelo menos 33% de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2. As formas de realização particulares do primeiro aspecto da invenção (o polipeptídeo e seu uso em ração de animal) também são aplicáveis a este aspecto da invenção.

Em outras formas de realização particulares, a cepa de *Bacillus* é uma cepa de *Bacillus licheniformis*, preferivelmente selecionados das seguintes cepas de *Bacillus licheniformis*: ATCC 14580 (=NCIB 9375),

NCIMB 6346 (=DSM 8785), NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689 e ATCC 53757. Um subgrupo preferido inclui *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (=NCIB 9375) e *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (=DSM 8785).

5 Ainda em outras formas de realização particulares, as cepas de *Bacillus* para o uso de acordo com a invenção (i) não é *Bacillus licheniformis* DSMZ 5749, (ii) não é *Bacillus subtilis* DSMZ 5750, e/ou (iii) não é *Bacillus licheniformis* FERM BP-266. As cepas de (i) e (ii) são incluídas no produto BioPlus®2B, ver, por exemplo, a EP 1472933. A cepa de (iii) é descrita na
10 GB 2138023.

 Para uma classificação taxonômica e identificação de bactérias referência é feita ao Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986), vol 2, ISBN0-683-0783; ver por exemplo p 1104 seção 13, Endospore forming Gram positive rods and cocci; p. 1105 Genus *Bacillus*; pp. 1105-1129
15 description of the genus; pp. 1130-1138 description of the individual *Bacillus* species, por exemplo na p. 1132 *Bacillus licheniformis*). Na alternativa, a análise de seqüência 16SrRNA bem conhecida pode ser usada (ver por exemplo Johansen *et al*, Int. J. Syst. Bacteriol, 1999, 49, 1231-1240, em particular a seção de Métodos na p. 1233, 2ª coluna); ou peritos em taxonomia
20 podem ser consultados, por exemplo da DSMZ ou outros institutos depositários reconhecidos.

 As cepas de *Bacillus*, tais como as cepas de *Bacillus licheniformis*, são conhecidas na técnica e disponível, por exemplo, de coleções de cultura como ATTC mencionada acima ou podem ser isoladas da
25 natureza. As preparações de células de *Bacillus*, vivas ou com que se pode conviver, podem ser preparadas como é conhecido na técnica. Os exemplos de tais células são células vegetativas e esporos tais como endosporos. Em uma forma de realização um extrato de fermentação da cepa de *Bacillus* é usada, por exemplo na forma de um líquido de fermentação seca pulverizado.

O teste do Exemplo 6 é uma reação de PCR, neste exemplo conduzido com DNA isolado de várias cepas de *Bacillus licheniformis*. Em uma forma de realização particular deste teste, o DNA usado como padrão para a reação de PCR é o DNA cromossômico que pode ser isolado pelos métodos conhecidos na técnica. O resultado do teste do Exemplo 6 é positivo quando um fragmento de PCR do tamanho correto é obtido. No Exemplo 6, o tamanho correto é indicado como 0,4 kb. Em uma forma de realização particular, o tamanho correto está entre 0,35 kb e 0,44 kb (=350 pares de base a 440 pares de base). Em formas de realização alternativas, o tamanho correto é de 330 a 430 pares de base, de 340 a 420 pares de base, de 350 a 410 pares de base, de 360 a 400 pares de base, de 370 a 390 pares de base ou de 385 a 395 pares de base. O tamanho da sequência codificadora (CDS) da SEQ ID NO: 1 é de aproximadamente 380 pares de base (a saber de 378 pares de base).

15 Sequências de Ácido Nucléico

A invenção também diz respeito a uma sequência de ácido nucléico isolada que compreende uma sequência de ácido nucléico que codifica polipeptídeo, que (a) codifica o polipeptídeo da invenção; (b) hibridiza sob condições de severidade muito baixa com (i) os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i) ou (ii); e/ou (c) tem um grau de identidade aos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 de pelo menos 48%; com a condição de que a sequência de ácido nucléico não seja (iv) a SEQ ID NO: 3 e não (v) os nucleotídeos de 601 a 978 da SEQ ID NO: 3 e não (vi) os nucleotídeos de 1 a 381 da SEQ ID NO: 1. A presente invenção além disso diz respeito às sequências de ácido nucléico isoladas que codificam um polipeptídeo da invenção.

Com respeito às condições acima, referência é feita à seção Fundamentos da Técnica aqui contida. Conseqüentemente, a negação (iv)

refere-se à SEQ ID NO: 133 da WO 03/093453, negação (v) aos nucleotídeos de 601 a 978 desta e negação (vi) ao acesso do Banco de Gene no. NC_006270. Estas negações são opcionais; em formas de realização alternativas desta a sequência de ácido nucléico codifica um polipeptídeo que

5 (i) não inclui uma parte de peptídeo de sinal, (ii) não inclui uma parte de propeptídeo, e/ou (iii) é um polipeptídeo maduro. Em outras formas de realização alternativas, a sequência de ácido nucléico compreende, na alternativa tem ou consiste (essencialmente) de, 150 a 360 nucleotídeos, preferivelmente de 165 a 345, 180 a 330, 195 a 315, 210 a 300, 225 a 285 ou

10 mais preferivelmente de 240 a 270 aminoácidos.

A identidade e hibridização são definidas em uma seção anterior.

Em uma primeira forma de realização particular, a sequência de ácido nucléico codifica um polipeptídeo que melhora a utilização da ração de animal pela melhora da Taxa de Conversão de Ração (FCR), e/ou

15 modulando a microflora do intestino.

Uma sequência de ácido nucléico particular da invenção é os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, o último correspondendo à região que codifica o polipeptídeo maduro. Outras sequências de ácido

20 nucléico particulares da invenção são aquelas que codificam o polipeptídeo de 185 aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 8, 9 e 10.

A presente invenção também abrange as sequências de ácido nucléico que compreendem uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da

25 SEQ ID NO: 2, que diferem das partes correspondentes da SEQ ID NO: 1 em virtude da degenerescência do código genético. A presente invenção também diz respeito a subsequências da SEQ ID NO: 1 que codificam fragmentos da SEQ ID NO: 2.

Uma subsequência da SEQ ID NO: 1 é uma sequência de

ácido nucléico abrangida pela SEQ ID NO: 1 exceto que um ou mais nucleotídeos das extremidades 5' e/ou 3' foram deletados. Preferivelmente, uma subsequência contém pelo menos 150 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 165, 180, 195, 210, 225, 240, 270, 285, 300, 315, 330 ou mais preferivelmente pelo menos 345 nucleotídeos.

A presente invenção também diz respeito a seqüências de nucleotídeo que compreendem uma seqüência de ácido nucléico que codificam um polipeptídeo e que têm um grau de identidade aos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 de pelo menos 48%. para determinar o grau de identidade de nucleotídeo, o programa "align" é usado que é aludido acima.

Em formas de realização preferidas, o grau de identidade aos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 é de pelo menos 50%, 52%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% ou pelo menos 99%. Em formas de realização alternativas, o grau de identidade aos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 é de pelo menos 32% ou de pelo menos 35%, 37%, 40%, 42%, 45% ou pelo menos 47%.

A presente invenção também diz respeito a seqüências de ácido nucléico mutantes que compreendem pelo menos uma mutação nos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, em que a seqüência de ácido nucléico mutante codifica um polipeptídeo que (i) consiste dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 ou (ii) é uma variante da seqüência de (i), em que a variante compreende uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos ou (iii) é uma variante alélica da seqüência de (i), ou (iv) é um fragmento da seqüência de (i).

As técnicas usadas para isolar ou clonar uma seqüência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo são conhecidos na técnica e incluem a isolamento de DNA genômico, preparação de cDNA ou uma combinação destes. A clonagem das seqüências de ácido nucléico da presente

invenção a partir de tal DNA genômico pode ser efetuada, por exemplo, pelo uso da reação da cadeia da polimerase bem conhecida (PCR) ou triagem de anticorpo de bibliotecas de expressão para detectar fragmentos de DNA clonado com características estruturais compartilhadas. Ver, por exemplo, 5 Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nova Iorque. Outros procedimentos de amplificação de ácido nucléico tais como a reação da cadeia de ligase (LCR), transcrição ativada ligada (LAT) e amplificação com base na seqüência de ácido nucléico (NASBA) podem ser usados. A seqüência de ácido nucléico pode ser clonada a partir de 10 uma cepa de *Bacillus*, preferivelmente *Bacillus licheniformis* ou uma outra ou organismo relacionado e assim, por exemplo, pode ser uma variante alélica ou de espécie da região que codifica o polipeptídeo da seqüência de ácido nucléico.

O termo “seqüência de ácido nucléico isolada” como aqui 15 usado refere-se a uma seqüência de ácido nucléico que seja essencialmente livre de outras seqüências de ácido nucléico, por exemplo, pelo menos cerca de 20% puro, preferivelmente pelo menos cerca de 40% puro, mais preferivelmente pelo menos cerca de 60% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% puro e mais preferivelmente pelo menos cerca de 20 90% puro como determinado pela eletroforese em agarose. Por exemplo, uma seqüência de ácido nucléico isolada pode ser obtida pelos procedimentos de clonagem padrão usados no engenheiramento genético para relocar a seqüência de ácido nucléico da sua localização natural para um sítio diferente onde será reproduzida. Os procedimentos de clonagem podem envolver a 25 excisão e a isolamento de um fragmento de ácido nucléico desejado que compreenda a seqüência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo, a inserção do fragmento em uma molécula de vetor e a incorporação do vetor recombinante em uma célula hospedeira onde cópias múltiplas ou clones da seqüência de ácido nucléico será replicado. A seqüência de ácido nucléico

pode ser de origem genômica, cDNA, RNA, semi-sintética, sintética ou quaisquer combinações destes.

Modificação de uma seqüência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo da presente invenção pode ser necessário para a síntese de polipeptídeos substancialmente similares ao polipeptídeo. O termo “substancialmente similar” ao polipeptídeo refere-se às formas que não ocorrem naturalmente do polipeptídeo. Estes polipeptídeos podem diferir de algum modo engendrado a partir do polipeptídeo isolado de sua fonte nativa, por exemplo, variantes que diferem em termoestabilidade, estabilidade de pH, estabilidade contra enzimas digestivas, alergenicidade ou semelhante. A seqüência variante pode ser construída com base na seqüência de ácido nucléico apresentada como o polipeptídeo que codifica parte da SEQ ID NO: 1, por exemplo, uma subsequência desta, e/ou pela introdução de substituições de nucleotídeo que não dão origem a uma outra seqüência de aminoácido do polipeptídeo codificado pela seqüência de ácido nucléico, mas que correspondem ao uso de códon do organismo hospedeiro intencionado para a produção do polipeptídeo ou pela introdução de substituições de nucleotídeo que podem dar origem a uma seqüência de aminoácido diferente. Para uma descrição geral de substituição de nucleotídeo ver, por exemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107. Polipeptídeos alergênicos baixos por exemplo podem ser preparados como descrito acima.

A presente invenção também diz respeito a seqüências de ácido nucléico isoladas que compreendem uma seqüência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo e que hibridiza sob condições de severidade muito baixas, preferivelmente condições de severidade baixa, mais preferivelmente condições de severidade média, mais preferivelmente condições de severidade média-alta, ainda mais preferivelmente condições de severidade alta e mais preferivelmente condições de severidade muito alta

com uma sonda de ácido nucléico que hibridiza sob as mesmas condições com a seqüência de ácido nucléico da SEQ ID NO: 1 ou seu filamento complementar; ou variantes alélicas e subsequências destas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), como aqui definido.

5 A presente invenção também diz respeito às seqüências de ácido nucléico isoladas produzidas (a) hibridizando-se um DNA sob condições de severidade muito baixa, baixa, média, média-alta, alta ou muito alta com (i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) ou (iii) um filamento complementar de (i) ou (ii); e (b) 10 isolando-se a seqüência de ácido nucléico. A subsequência é preferivelmente uma seqüência de pelo menos 100 nucleotídeos tal como uma seqüência que codifica um fragmento de polipeptídeo.

 A presente invenção diz respeito ainda a métodos para produzir uma seqüência de ácido nucléico mutante, que compreende 15 introduzir pelo menos uma mutação na seqüência que codifica o polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 1 ou uma subsequência deste, em que a seqüência de ácido nucléico mutante codifica um polipeptídeo que consiste de aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2; ou um fragmento deste.

 A introdução de uma mutação na seqüência de ácido nucléico 20 para trocar um nucleotídeo por um outro nucleotídeo pode ser realizada pela mutagênese direcionada ao sítio usando qualquer um dos métodos conhecidos na técnica. Particularmente útil é o procedimento que utiliza um vetor de DNA superespiralado, de filamento duplo com um inserto de interesse e dois iniciadores sintéticos contendo a mutação desejada. Os iniciadores de 25 oligonucleotídeo, cada um complementar aos filamentos opostos do vetor, estendem-se durante a ciclagem de temperatura por meio da Pfu DNA polimerase. Na incorporação dos iniciadores, um plasmídeo mutado contendo entalhes escalonados é gerado. A seguir da ciclagem da temperatura, o produto é tratado com DpnI que é específico para DNA metilado e

hemimetilado para digerir o padrão de DNA precursor e para selecionar quanto o DNA sintetizado contendo a mutação. Outros procedimentos conhecidos na técnica também podem ser usados.

Construções de ácido nucléico

5 A presente invenção também diz respeito às construções de ácido nucléico que compreendem uma seqüência de ácido nucléico da presente invenção operavelmente ligado a uma ou mais seqüências de controle que direcionam a expressão da seqüência codificadora em um hospedeiro de expressão adequado. Os hospedeiros de expressão adequados
10 são células hospedeiras de *Bacillus*, o DNA das quais, quando colhidos e usados como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, como descrito no Exemplo 6, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

 Os exemplos de células hospedeiras adequadas são
15 mencionados na seção abaixo intitulada “Células Hospedeiras”.

 A expressão será entendida incluir qualquer etapa envolvida na produção do polipeptídeo incluindo, mas não limitado a, transcrição, modificação pós-transcricional, translação, modificação pós-transcricional e secreção.

20 A “construção de ácido nucléico” é aqui definida como uma molécula de ácido nucléico, de filamento único ou duplo, que é isolada de um gene que ocorre naturalmente ou que foi modificada para conter segmentos de ácido nucléico combinados e justaposto em uma maneira que de outro modo não poderia existir na natureza. O termo construção de ácido nucléico é
25 sinônimo com o termo cassete de expressão quando a construção de ácido nucléico contém todas as seqüências de controle requeridas para a expressão de uma seqüência codificadora da presente invenção. O termo “seqüência codificadora” é aqui definida como uma seqüência de ácido nucléico que diretamente especifica a seqüência de aminoácido do seu produto de proteína.

Os limites da sequência codificadora são no geral determinados por um sítio de ligação de ribossoma (procariotas) ou pelo códon de início de ATG (eucariotas) localizados exatamente a montante da matriz de leitura aberta na extremidade 5' do mRNA e uma sequência terminadora de transcrição localizada exatamente a montante da matriz de leitura aberta na extremidade 3' do mRNA. Uma sequência codificadora pode incluir, mas não é limitada a, DNA, cDNA e sequências de ácido nucléico recombinantes.

Uma sequência de ácido nucléico isolada que codifica um polipeptídeo da presente invenção pode ser manipulada em uma variedade de modos para fornecer a expressão do polipeptídeo. A manipulação da sequência de ácido nucléico antes da sua inserção em um vetor pode ser desejável ou necessária dependendo do vetor de expressão. As técnicas para modificar sequências de ácido nucléico utilizando métodos de DNA recombinante são bem conhecidas na técnica.

O termo “sequências de controle” é aqui definido para incluir todos os componentes que são necessários ou vantajosos para a expressão de um polipeptídeo da presente invenção. Cada sequência de controle pode ser nativa ou estranha à sequência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo. Tais sequências de controle incluem, mas não são limitadas a, um líder, sequência de poliadenilação, sequência de propeptídeo, promotor, sequência de peptídeo de sinal e terminador de transcrição. Em um mínimo, as sequências de controle incluem um promotor e sinais de parada transcricional e traducional. As sequências de controle podem ser fornecidas com ligadores com o propósito de introduzir sítios de restrição específicos que facilitam a ligação das sequências de controle com a região codificadora da sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo. O termo “operavelmente ligado” é aqui definido como uma configuração em que uma sequência de controle é apropriadamente colocada em uma posição em relação à sequência codificadora da sequência de DNA tal que a sequência de controle direcione a

expressão de um polipeptídeo.

A sequência promotora, isto é uma sequência de ácido nucléico que é reconhecida por uma célula hospedeira para a expressão da sequência de ácido nucléico, contém sequências de controle transcricional que
5 medeiam a expressão do polipeptídeo. O promotor pode ser qualquer sequência de ácido nucléico que mostre atividade transcricional na célula hospedeira de escolha incluindo promotores mutantes, truncados e híbridos e podem ser obtidos a partir de genes que codificam polipeptídeos extracelulares ou intracelulares homólogos ou heterólogos para a célula
10 hospedeira.

Os exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição das construções de ácido nucléico da presente invenção em uma célula hospedeira de *Bacillus licheniformis* que é positiva no teste do Exemplo 6 aqui contido são os promotores obtidos do gene da alfa-amilase de
15 *Bacillus licheniformis* (amyL), gene da amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gene da alfa-amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), um promotor de CryIIIA (ver WO 99/43835), assim como o promotor endógeno L12 de cada uma das células hospedeiras de *Bacillus licheniformis* específicas mencionadas abaixo.

20 A sequência terminadora de transcrição, isto é uma sequência reconhecida por uma célula hospedeira para terminar a transcrição, é operavelmente ligada ao terminal 3' da sequência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo. Qualquer terminador que seja funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

25 Os terminadores preferidos para as células hospedeiras de *Bacillus licheniformis* supracitadas são os terminadores do gene da alfa-amilase de *Bacillus licheniformis* (amyL) e o terminador L12 endógeno de cada uma destas células hospedeiras.

A sequência de controle também pode ser uma sequência líder

adequada, uma região não traduzida de um mRNA que é importante para a tradução pela célula hospedeira. A seqüência líder é operavelmente ligada ao terminal 5' da seqüência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo. Qualquer seqüência líder que seja funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

A região codificadora de peptídeo de sinal codifica uma seqüência de aminoácido ligada ao terminal amino de um polipeptídeo que direciona o polipeptídeo codificado no caminho secretor da célula. Em uma forma de realização preferida, a região codificadora de peptídeo de sinal tem os nucleotídeos de 1 a 123 da SEQ ID NO: 1 que codificam os aminoácidos de -41 a -1 da SEQ ID NO: 2.

De acordo com o software SignalP Versão 3.0, o peptídeo de sinal prognosticado da SEQ ID NO: 2 tem os aminoácidos de -41 a -2. Isto significa que a proteína madura prognosticada começa no aminoácido -1 da SEQ ID NO: 2, a saber Ala. Entretanto, de acordo com o Exemplo 2 aqui contido, o terminal N da proteína madura começa com o aminoácido +1 da SEQ ID NO: 2, a saber Trp, que significa que a parte do peptídeo de sinal vai do aminoácido -41 ao -1 da SEQ ID NO: 2, que é um aminoácido mais longo do que o prognosticado.

Portanto os aminoácidos de -1 a +85 da SEQ ID NO: 2 é uma forma madura alternativa da proteína L12, que também é parte da presente invenção. Conseqüentemente, qualquer reivindicação e qualquer relato aqui contidos que se refiram aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 podem portanto também ou alternativamente, referir-se aos aminoácidos de -1 a +85 da SEQ ID NO: 2. O mesmo é o caso para qualquer reivindicação e qualquer relato aqui contidos que se refiram à parte correspondente da SEQ ID NO: 1: Nucleotídeos 121 a 378 da SEQ ID NO: 1 podem ser aludidos além ou na alternativa aos, nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1.

Do mesmo modo, qualquer referência aqui contida à parte de

5 sinal da SEQ ID NO: 2 também pode ou na alternativa, ser para os aminoácidos de -41 a -2 da SEQ ID NO: 2. A parte correspondente da SEQ ID NO: 1 tem os nucleotídeos de 1 a 120 da SEQ ID NO: 1. Qualquer reivindicação e qualquer relato aqui contidos que se refiram à parte de peptídeo de sinal podem portanto também ou alternativamente, se referir aos nucleotídeos de 1 a 120 da SEQ ID NO: 1.

10 O método do SignalP V. 3.0 é descrita em Bendtsen *et al* em Journal of Molecular Biology 2004, 340(4), pp. 783-95. Ver também Nielsen *et al* em Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, Califórnia, pp 122-130, 1998 (V. 2.0); e Nielsen *et al* em Protein Engineering 10, 1-6 (1997) (V. 1.1).

Vetores de Expressão

15 A presente invenção também diz respeito a vetores de expressão recombinantes que compreendem uma construção de ácido nucléico da invenção, tal como vetores de expressão recombinantes que compreendem uma sequência de ácido nucléico da presente invenção, um promotor e sinais de parada transcricional e traducional. As várias sequências de ácido nucléico e de controle descritas acima podem ser unidas entre si para
20 produzir um vetor de expressão recombinante que pode incluir um ou mais sítios de restrição convenientes para permitir a inserção ou substituição da sequência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo em tais sítios. Alternativamente, a sequência de ácido nucléico da presente invenção pode ser expressada pela inserção da sequência de ácido nucléico ou uma
25 construção de ácido nucléico que compreende a sequência em um vetor apropriado para a expressão. Na criação do vetor de expressão, a sequência codificadora está localizada no vetor de modo que a sequência codificadora esteja operavelmente ligada com as sequências de controle apropriadas para a expressão.

O vetor de expressão recombinante pode ser qualquer vetor (por exemplo, um plasmídeo ou vírus) que possa ser convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinante e possa realizar a expressão da seqüência de ácido nucléico. A escolha do vetor tipicamente dependerá da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira na qual o vetor deva ser introduzido. Os vetores podem ser plasmídeos lineares ou circulares fechados.

O vetor pode ser um vetor que replique autonomamente, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, a replicação da qual é independente da replicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo, um elemento extracromossômico, um minicromossoma ou um cromossoma artificial. O vetor pode conter qualquer meio para garantir a auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido dentro da célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossoma(s) no(s) qual(is) o mesmo foi integrado. Além disso, um único vetor ou plasmídeo ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira ou um transposon pode ser usado.

Os vetores da presente invenção preferivelmente contêm um ou mais marcadores selecionáveis que permitem a seleção fácil de células transformadas. Um marcador selecionável é um gene o produto do qual fornece resistência a biocida ou viral, resistência a metais pesados, prototrofia a auxótrofos e outros. Os exemplos de marcadores selecionáveis bacterianos são os genes *dal* de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus licheniformis* ou marcadores que conferem resistência a antibiótico tal como resistência à ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina.

Os vetores da presente invenção preferivelmente contêm um elemento ou elementos que permitem a integração estável do vetor no genoma da célula hospedeira ou replicação autônoma do vetor na célula independente

do genoma.

Para a integração no genoma da célula hospedeira, o vetor pode contar com a sequência de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo ou qualquer outro elemento do vetor para a integração estável do vetor no
5 genoma pelas recombinações homólogas ou não homóloga. Alternativamente, o vetor pode conter sequências de ácido nucléico adicionais para direcionar a integração pela recombinação homóloga no genoma da célula hospedeira. As sequências de ácido nucléico adicionais permitem que o vetor seja integrado no genoma da célula hospedeira em um local ou locais precisos no(s)
10 cromossoma(s). Para aumentar a probabilidade de integração em uma localização precisa, os elementos integracionais devem preferivelmente conter um número suficiente de ácidos nucléicos, tais como 100 a 1.500 pares de base, preferivelmente de 400 a 1.500 pares de base e mais preferivelmente de 800 a 1.500 pares de base, que são altamente homólogos com a sequência
15 alvo correspondente para realçar a probabilidade de recombinação homóloga. Os elementos integracionais podem ser qualquer sequência que seja homóloga com a sequência alvo no genoma da célula hospedeira. Além disso, os elementos integracionais podem ser sequências de ácido nucléico não codificadoras ou codificadoras. Por outro lado, o vetor pode ser integrado no
20 genoma da célula hospedeira pela recombinação não homóloga.

Para a replicação autônoma, o vetor pode compreender ainda uma origem de replicação que permita que o vetor replique autonomamente na célula hospedeira em questão. Os exemplos de origens bacterianas de replicação são as origens de replicação de plasmídeos pBR322, pUC19,
25 pACYC177 e pACYC184 que permitem a replicação na *E. coli* e pUB110, pE194, pTA1060 e pAM β 1 que permitem a replicação em *Bacillus*. A origem de replicação pode ser uma tendo uma mutação que a faça ter a função de sensibilidade à temperatura na célula hospedeira (ver, por exemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

Mais do que uma cópia de uma seqüência de ácido nucléico da presente invenção pode ser inserida na célula hospedeira para aumentar a produção do produto de gene. Um aumento no número de cópia da seqüência de ácido nucléico pode ser obtido pela integração de pelo menos uma cópia adicional da seqüência no genoma da célula hospedeira ou pela inclusão de um gene marcador selecionável amplificável com a seqüência de ácido nucléico onde as células contendo as cópias amplificadas do gene marcador selecionável e por meio deste cópias adicionais da seqüência de ácido nucléico, podem ser selecionadas cultivando-se as células na presença do agente selecionável apropriado.

Os procedimentos usados para ligar os elementos descritos acima para construir os vetores de expressão recombinantes da presente invenção são bem conhecidos por uma pessoa habilitada na técnica (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

O polipeptídeo da invenção também pode ser co-expresso junto com pelo menos um outro componente de interesse para ração de animal, tal como um polipeptídeo com uma atividade enzimática desejada para o uso em ração de animal. O polipeptídeo da invenção e o pelo menos um outro polipeptídeo podem ser co-expressados a partir de vetores diferentes, a partir de um vetor ou usando uma mistura de ambas as técnicas.

Células Hospedeiras

A invenção além disso diz respeito a uma célula hospedeira de *Bacillus* recombinante que compreende uma construção de ácido nucléico da invenção e/ou um vetor de expressão da invenção. O DNA da célula hospedeira, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

Em uma forma de realização particular, o fragmento de PCR, quando purificado e seqüenciado codifica uma seqüência de aminoácido que

tem pelo menos 33% de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2.

As formas de realização particulares do primeiro aspecto da invenção (em particular aqueles divulgados nas seções intituladas “The Polypeptide, its Characteristics and Use” e “Identity and Hybridization, Fragments and Variants”) também são aplicáveis às células hospedeiras da invenção. Por exemplo, em outras formas de realização particulares da célula hospedeira de *Bacillus* da invenção, o fragmento de PCR, quando purificado e seqüenciado, codifica uma seqüência de aminoácido que tem um grau de
10 identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 35% ou pelo menos 37%, 40%, 42%, 45%, 47%, 50%, 52%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% ou pelo menos 99%.

Ainda em outras formas de realização particulares, a célula
15 hospedeira de *Bacillus* é uma célula hospedeira de *Bacillus licheniformis*, preferivelmente selecionada das seguintes cepas de *Bacillus licheniformis*: ATCC 14580 (=NCIB 9375), NCIMB 6346 (=DSM 8785), NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689 e ATCC 53757. Um subgrupo preferido inclui *Bacillus licheniformis*
20 ATCC 14580 (=NCIB 9375) e *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (=DSM 8785).

Estas células hospedeiras são vantajosamente usadas na produção recombinante dos polipeptídeos. Um vetor que compreende uma seqüência de ácido nucléico da presente invenção é introduzida na célula
25 hospedeira de modo que o vetor seja mantido como um integrante cromossômico ou como um vetor extra-cromossômico auto-replicante como descrita mais no princípio. O termo “célula hospedeira” abrange qualquer progênie da célula precursora que não é idêntica à célula precursora devido às mutações que ocorrem durante a replicação.

A introdução de um vetor em uma célula hospedeira bacteriana pode, por exemplo, ser efetuada pela transformação de protoplasto (ver, por exemplo, Chang e Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por exemplo, Young e Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829 ou Dubnau e Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), eletroporação (ver, por exemplo, Shigekawa e Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) ou conjugação (ver, por exemplo, Koehler e Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

10 Métodos de Produção

A invenção também diz respeito a um método para produzir um polipeptídeo da invenção, o método compreendendo (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante da invenção para produzir um sobrenadante que compreenda o polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

15 A invenção além disso diz respeito a um método para produzir um polipeptídeo da invenção, o método compreendendo (a) cultivar uma cepa de *Bacillus*, o DNA da qual, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4
20 kb; e (b) recuperar o polipeptídeo.

Os exemplos de células hospedeiras são mencionados na seção acima intitulada "Células Hospedeiras".

A presente invenção também diz respeito a métodos para produzir um polipeptídeo da presente invenção que compreendem (a) cultivar
25 uma célula hospedeira de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (=NCIB 9375) ou de *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (=DSM 8785) recombinante sob condições condutivas à produção do polipeptídeo, em que a célula hospedeira compreende uma sequência de ácido nucléico mutante que compreende pelo menos uma mutação nos nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, em que

a sequência de ácido nucléico mutante codifica um polipeptídeo que (i) consiste dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 ou (ii) é uma variante da sequência de (i), em que a variante compreende uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos ou (iii) é uma variante alélica da
5 sequência de (i) ou (iv) é um fragmento da sequência de (i).

Nos métodos de produção da presente invenção, as células são cultivadas em um meio nutriente adequado para a produção do polipeptídeo usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a célula pode ser cultivada pelo cultivo em fermentação de frasco agitado, em escala pequena
10 ou escala grande (incluindo as fermentações contínuas, por lote, lote alimentado, lote alimentado repetido ou de estado sólido) em fermentadores de laboratório ou industrial realizados em um meio adequado e sob condições que permitam que o polipeptídeo seja expressado e/ou isolado. O cultivo ocorre em um meio nutriente adequado que compreenda fontes de carbono e
15 nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na técnica. Os meios adequados são disponíveis de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (por exemplo, em catálogos do American Type Culture Collection). Se o polipeptídeo é secretado no meio nutriente, o polipeptídeo pode ser recuperado diretamente
20 do meio. Se o polipeptídeo não é secretado, o mesmo pode ser recuperado a partir de lisados de célula.

Os polipeptídeos podem ser detectados usando métodos conhecidos na técnica que são específicos para os polipeptídeos. Estes métodos de detecção podem incluir o uso de anticorpos específicos; a análise
25 em gel de SDS-PAGE revelando uma faixa de um peso molecular relativo, Mr, de cerca de 12 kDa; e/ou a determinação da sequência de terminal N, em amostras purificadas e/ou na faixa de um Mr de 12 kDa, como corte do gel de SDS-PAGE. No último caso, o terminal N deve preferivelmente ter uma identidade com a SEQ ID NO: 5 de pelo menos 33% ou pelo menos 35%,

37%, 40%, 42%, 45%, 47%, 50%, 52%, 55%, 57%, 60%, 62%, 65%, 67%, 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97% ou pelo menos 99%, a identidade sendo determinada como no geral descrito acima).

5 O polipeptídeo resultante pode ser recuperado pelos métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser recuperado a partir do meio nutriente pelos procedimentos convencionais incluindo, mas não limitado a, centrifugação, filtração (tal como ultrafiltração e/ou diafiltração), extração, secagem por pulverização, evaporação ou precipitação.

10 Os polipeptídeos da presente invenção podem ser purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoeletrica preparativa), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação com sulfato de amônio), SDS-PAGE
15 ou extração (ver, por exemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nova Iorque, 1989).

Composições e Usos

Ainda em um outro aspecto, a presente invenção diz respeito às composições que compreendem um polipeptídeo e/ou uma cepa de *Bacillus*
20 da presente invenção.

As composições de polipeptídeo podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica e podem estar na forma de uma composição líquida ou um seca. Por exemplo, a composição de polipeptídeo pode estar na forma de um granulado ou um microgranulado. O polipeptídeo
25 a ser incluído na composição pode ser estabilizado de acordo com métodos conhecidos na técnica.

Os exemplos particulares de composições da invenção são os seguintes:

Uma ração de animal aditiva que compreenda (a) i) um

polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo da invenção; e (b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura, (c) pelo menos uma vitamina solúvel em água, (d) pelo menos um traço de mineral, e/ou (e) pelo menos um mineral macro;

5 uma composição de ração de animal tendo um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e que compreende i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo da invenção;

10 um aditivo de ração de animal que compreende (a) uma cepa de *Bacillus* como definida na seção intitulada “Cepas bacterianas; Cepas de *Bacillus* probióticas”; e (b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura, (c) pelo menos uma vitamina solúvel em água, (d) pelo menos um traço de mineral, e/ou (e) pelo menos um mineral macro; e

15 uma composição de ração de animal tendo um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e que compreende uma cepa de *Bacillus* como definida na seção intitulada “Cepas bacterianas; Cepas de *Bacillus* probióticas”.

20 As chamadas pré misturas são exemplos de aditivos de ração de animal da invenção. Uma pré mistura designa uma mistura preferivelmente uniforme de um ou mais micro-ingredientes com diluente e/ou carregador. As pré misturas são usadas para facilitar a dispersão uniforme de micro-ingredientes em uma mistura maior.

25 Os exemplos de usos preferidos de acordo com a invenção são dados acima (nas seções intituladas “O Polipeptídeo, suas Características e Uso” e “Cepas bacterianas; Cepas de *Bacillus* probióticas”) e mais detalhado abaixo.

Ração de animal

O termo animal inclui todos os animais. Os exemplos de animais são não ruminantes e ruminantes. Os animais ruminantes incluem, por exemplo, animais tais como ovelha, cabra e gado, por exemplo vaca tal

como gado de corte e vacas leiteiras. Em uma forma de realização particular, o animal é um animal não ruminante. Os animais não ruminantes incluem os animais mono-gástricos, por exemplo porco ou suíno (incluindo, mas não limitado a, leitões, porcos em crescimento e porcas); aves domésticas tais como perus, patos e galinhas (incluindo mas não limitado a frango, galinhas poedeiras); peixe (incluindo mas não limitado a salmão, truta, tilápia, peixe e carpa); e crustáceos (incluindo mas não limitado a camarão e pitu).

O termo ração ou composição de ração significa qualquer composto, preparação, mistura ou composição adequados para ou intencionados para a ingestão por um animal.

No uso de acordo com a invenção o polipeptídeo e/ou a cepa de *Bacillus* podem ser alimentado ao animal antes, depois ou simultaneamente com a dieta. O último é preferido.

Em uma forma de realização particular, o polipeptídeo, na forma em que o mesmo é adicionado à ração ou quando é incluído em um aditivo de ração, é bem definido. O termo bem definido significa que a preparação de polipeptídeo é pelo menos 50% pura, determinada como anteriormente descrito ou pela cromatografia de exclusão de tamanho (ver o Exemplo 12 da WO 01/58275). Em outras formas de realização particulares a preparação de polipeptídeo bem definida é pelo menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 ou pelo menos 95% pura.

Uma preparação de polipeptídeo bem definida é vantajosa. Por exemplo, é muito mais fácil dosar corretamente à ração um polipeptídeo que é essencialmente livre de outros polipeptídeos interferentes ou contaminantes. O termo dosar corretamente refere-se em particular ao objetivo de obter resultados compatíveis e constantes e a capacidade de otimizar a dosagem com base no efeito desejado.

Para o uso em ração de animal, entretanto, o polipeptídeo não precisa ser aquele puro; o mesmo pode incluir por exemplo outros

polipeptídeos tais como enzimas de ração de animal, caso este em que o mesmo poderia ser chamado de uma preparação de polipeptídeo.

A preparação de polipeptídeo pode ser (a) adicionada diretamente à ração (ou usada diretamente em um processo de tratamento de proteínas) ou (b) a mesma pode ser usada na produção de uma ou mais composições intermediárias tais como aditivos de ração ou pré misturas que são subsequente adicionadas à ração (ou usadas em um processo de tratamento). O grau de pureza descrito acima refere-se à pureza da preparação de polipeptídeo original, seja usado de acordo com (a) ou (b) acima.

As preparações de polipeptídeo com purezas desta ordem de magnitude são em particular obteníveis usando métodos recombinantes de produção, ao passo que eles não são assim facilmente obtidos e também submetidos a uma variação de lote para lote muito maior quando o polipeptídeo é produzido pelos métodos de fermentação tradicionais.

No presente contexto, o termo Taxa de Conversão de Ração ou FCR, é usado como sinônimos com o termo conversão de ração. A FCR é calculada como a ingestão de ração em g/animal em relação ao ganho de peso em g/animal, ver por exemplo a Tabela 2 no Exemplo 5.

O polipeptídeo pode ser adicionado à ração em qualquer forma, seja como um polipeptídeo relativamente puro ou em mistura com outros componentes intencionados para a adição à ração de animal, isto é na forma de aditivos de ração de animal, tal como as chamadas pré-misturas para ração de animal.

Além do polipeptídeo e/ou da cepa de *Bacillus* da invenção, os aditivos de ração de animal da invenção contêm pelo menos uma vitamina solúvel em gordura, e/ou pelo menos uma vitamina solúvel em água, e/ou pelo menos um traço de mineral, e/ou pelo menos um mineral macro.

Além disso, os ingredientes de aditivo de ração, opcionais são agentes corantes, por exemplo carotenóides tais como beta-caroteno,

astaxantina e luteína; compostos de aroma; estabilizadores; peptídeos antimicrobianos; ácidos graxos poliinsaturados; espécies que geram oxigênio reativo; e/ou pelo menos uma enzima selecionada dentre fitase (EC 3.1.3.8 ou 3.1.3.26), xilanase (EC 3.2.1.8), galactanase (EC 3.2.1.89), alfa-galactosidase (EC 3.2.1.22), protease (EC 3.4.-.-), fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32), fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4), lisofosfolipase (EC 3.1.1.5), fosfolipase C (EC 3.1.4.3), fosfolipase D (EC 3.1.4.4), amilase tal como. por exemplo. alfa-amilase (EC 3.2.1.1), e/ou beta-glicanase (EC 3.2.1.4 ou EC 3.2.1.6). Em uma forma de realização particular estas outras enzimas são bem definidas (como definido acima para as preparações de polipeptídeo).

Os exemplos de peptídeos antimicrobianos (AMP's) são CAP18, Leucocina A, Triterpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina e Ovispirina tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas e Estatinas, incluindo os compostos e polipeptídeos divulgados na WO 03/044049 e WO 03/048148, assim como variantes ou fragmentos do acima que retenham a atividade antimicrobiana.

Os exemplos de polipeptídeos antifúngicos (AFP's) são os peptídeos de *Aspergillus giganteus* e *Aspergillus niger*, assim como variantes e fragmentos destes que retenham a atividade antifúngica, como divulgado na WO 94/01459 e WO 02/090384.

Os exemplos de ácidos graxos poliinsaturados são C18, C20 e C22 ácidos graxos poliinsaturados, tais como ácido araquidônico, ácido docosoexanóico, ácido eicosapentanóico e ácido gamalinoléico.

Os exemplos de espécies que geram oxigênio reativo são produtos químicos tais como perborato, persulfato ou percarbonato; e enzimas tais como uma oxidase, uma oxigenase ou uma sintetase.

Usualmente as vitaminas solúveis em gordura e água, assim como minerais traço formam parte de uma chamada pré mistura intencionada para a adição à ração, ao passo que os minerais macros são usualmente

adicionados em separado à ração. Cada um destes tipos de composição, quando enriquecidos com um polipeptídeo ou uma cepa de *Bacillus* da invenção, é um aditivo de ração de animal da invenção.

5 Em uma forma de realização particular, o aditivo de ração de animal da invenção é intencionado a ser incluído (ou prescrito como tendo que ser incluído) em dietas ou ração de animal em níveis de 0,01 a 10,0%; mais particular de 0,05 a 5,0%; ou 0,2 a 1,0% (% significando g de aditivo por 100 g de ração). Isto é assim em particular para as pré misturas.

10 As seguintes são listas não exclusivas de exemplos destes componentes:

Os exemplos de vitaminas solúveis em gordura são vitamina A, vitamina D3, vitamina E e vitamina K, por exemplo vitamina K3.

15 Os exemplos de vitaminas solúveis em água são vitamina B12, biotina e colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico e pantotenato, por exemplo Ca-D-pantotenato.

Os exemplos de minerais traço são manganês, zinco, ferro, cobre, iodo, selênio e cobalto.

Exemplos de minerais macro são cálcio, fósforo e sódio.

20 As exigências nutricionais destes componentes (exemplificados com aves domésticas e leitões/porcos) são listados na Tabela A da WO 01/58275. Exigência nutricional significa que estes componentes devem ser fornecidos na dieta nas concentrações indicadas.

25 Na alternativa, o aditivo de ração de animal da invenção compreende pelo menos um dos componentes individuais especificados na Tabela A da WO 01/58275. Pelo menos um significa cada um de, um ou mais de, um ou dois ou três ou quatro e assim por diante até todos treze ou até todos quinze componentes individuais. Mais especificamente, este pelo menos um componente individual é incluído no aditivo da invenção em uma tal quantidade como para fornecer uma concentração na ração dentro da faixa

indicada na coluna quatro ou coluna cinco ou coluna seis da Tabela A.

As composições ou dietas de ração de animal têm um teor relativamente alto de proteína. As dietas de aves domésticas e porco podem ser caracterizadas como indicado na Tabela B da WO 01/58275, colunas 2 a 3. As dietas de peixe podem ser caracterizadas como indicado na coluna 4 desta Tabela B. Além disso tais dietas de peixe usualmente têm um teor de gordura bruto de 200 a 310 g/kg.

A WO 01/58275 corresponde à US 09/779334 que é por meio deste incorporada por referência.

Uma composição de ração de animal de acordo com a invenção tem um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e além disso compreende pelo menos um polipeptídeo e/ou pelo menos uma cepa de *Bacillus* como aqui descrita e/ou reivindicada.

Além disso ou na alternativa (para o teor de proteína bruta indicada acima), a composição de ração de animal da invenção tem um teor de energia metabolizável de 10 a 30 MJ/kg; e/ou um teor de cálcio de 0,1 a 200 g/kg; e/ou um teor de fósforo disponível de 0,1 a 200 g/kg; e/ou um teor de metionina de 0,1 a 100 g/kg; e/ou um teor de metionina mais cisteína de 0,1 a 150 g/kg; e/ou um teor de lisina de 0,5 a 50 g/kg.

Em formas de realização particulares, o teor de energia metabolizável, proteína bruta, cálcio, fósforo, metionina, metionina mais cisteína, e/ou lisina está dentro de qualquer uma das faixas 2, 3, 4 ou 5 na Tabela B da WO 01/58275 (R. 2-5).

A proteína bruta é calculada como nitrogênio (N) multiplicado por um fator de 6,25, isto é $\text{Proteína bruta (g/kg)} = \text{N (g/kg)} \times 6,25$. O teor de nitrogênio é determinado pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

A energia metabolizável pode ser calculada com base na

publicação NRC Nutrient requirements in swine, nona edição revisada 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6 e a European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, 5 Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Bee kbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen by, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

O teor dietético de cálcio, fósforo disponível e aminoácidos nas dietas de animal completas é calculado com base nas tabelas de ração tais 10 como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

Em uma forma de realização particular, a composição de ração de animal da invenção contém pelo menos uma proteína vegetal ou fonte de 15 proteína. Esta também pode conter proteína animal, tal como Carne e Farinha de Osso e/ou Farinha de Peixe, tipicamente em uma quantidade de 0 a 25%. O termo proteínas vegetais como aqui usado refere-se a qualquer composto, composição, preparação ou mistura que inclua pelo menos uma proteína derivada de ou que se origine de um vegetal, incluindo proteínas modificadas 20 e derivados de proteína. Em formas de realização particulares, o teor de proteína das proteínas vegetais é de pelo menos 10, 20, 30, 40, 50 ou 60% (p/p).

As proteínas vegetais podem ser derivadas de fontes de proteína vegetal, tal como legumes e cereais, por exemplo materiais de 25 plantas das famílias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* e *Poaceae*, tais como farinha de feijão de soja, farinha de tremoços e farinha de colza.

Em uma forma de realização particular, a fonte de proteína vegetal é material de uma ou mais plantas da família *Fabaceae*, por exemplo

soja, tremço, ervilha ou feijão.

Em uma outra forma de realização particular, a fonte de proteína vegetal é material de uma ou mais plantas da família *Chenopodiaceae*, por exemplo beterraba, beterraba açucareira, espinafre ou quinoa.

Outros exemplos de fontes de proteína vegetal são colza, semente de girassol, semente de algodão e repolho.

Outros exemplos de fontes de proteína vegetal são cereais tais como cevada, trigo, centeio, aveia, milho, arroz, tritcale e sorgo.

Ainda em outras formas de realização particulares, a composição de ração de animal da invenção contém de 0 a 80% de milho; e/ou de 0 a 80% de sorgo; e/ou de 0 a 70% de trigo; e/ou de 0 a 70% de cevada; e/ou de 0 a 30% de aveia; e/ou de 0 a 30% de centeio; e/ou de 0 a 40% de farinha de soja; e/ou de 0 a 25% de farinha de peixe; e/ou de 0 a 25% de carne e farinha de osso; e/ou de 0 a 20% de soro de leite.

As dietas de animal por exemplo podem ser fabricadas como ração em pasta (mão pelotizada) ou ração pelotizada. Tipicamente, os gêneros alimentícios moídos são misturados e quantidades suficientes de vitaminas essenciais e minerais são adicionados de acordo com as especificações para a espécie em questão. O(s) polipeptídeo(s) e/ou a cepa de *Bacillus* podem ser adicionadas como formulações sólidas ou líquidas. Por exemplo, uma formulação de polipeptídeo sólida é tipicamente adicionada antes ou durante a etapa de mistura; e uma preparação de polipeptídeo líquida é tipicamente adicionada depois da etapa de pelotização. O polipeptídeo também pode ser incorporado em um aditivo de ração ou pré mistura.

A concentração de polipeptídeo final na dieta está dentro da faixa de 0,01 a 200 mg de proteína por kg de dieta, por exemplo na faixa de 0,1 a 20 mg de proteína por kg de dieta de animal.

O polipeptídeo e/ou a cepa de *Bacillus* naturalmente deve ser

aplicada em uma quantidade eficaz, isto é em uma quantidade adequada para melhorar a conversão de ração.

É no presente considerado que o polipeptídeo é administrado em uma ou mais das seguintes quantidades (faixas de dosagem): 0,01 a 200; 0,01 a 100; 0,5 a 100; 1 a 50; 5 a 100; 10 a 100; 0,05 a 50; 1 a 10; ou 0,10 a 10, todas estas faixas estando em mg de proteína de polipeptídeo por kg de ração (ppm). Em uma forma de realização particular, a faixa de dosagem é de 1 a 9, 1 a 8, 2 a 7, 2 a 6 ou 2 a 5 ppm. Os exemplos de faixa de dosagem particularmente preferida são; 0,5 a 15,0, 1,0 a 12,5, 1,5 a 10,0 e 2,5 a 7,5 ppm. A quantidade do polipeptídeo é determinada como descrito para a proteína L12 no Exemplo 10.

É no presente considerado que a cepa de *Bacillus* é administrada em uma ou mais das seguintes quantidades (faixas de dosagem): 10 E2-14, 10 E4-12, 10 E6-10, 10 E7-9, preferivelmente 10 E8 CFU/g de ração (a designação E significa expoente, a saber, por exemplo, 10 E2-14 significa 10^2 a 10^{14}).

Para determinar mg de proteína de polipeptídeo por kg de ração, o polipeptídeo é purificado da composição de ração e a dosagem em mg de proteína de polipeptídeo por kg de ração é calculada, por exemplo como descrito no Exemplo 10. Os mesmos princípios aplicam-se para a determinação de mg de proteína de polipeptídeo em aditivos de ração.

Depósito de Material biológico

Os seguintes materiais biológicos, que foram isolados de conteúdos intestinais de frangos, como descrito no Exemplo 8, foram depositados sob os termos do Tratado de Budapeste com a DSMZ (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemanha) e dados os seguintes números de acesso:

Depósito	Número de Acesso	Data do Depósito
----------	------------------	------------------

Enterococcus faecalis DSM 18047 10 de março de 2006

LactoBacillus salivarius DSM 18070 16 de março de 2006

Os depósitos foram feitos pela Novozymes NS, Krogshoejvej 36, DK-2880, Dinamarca. Estas cepas foram depositadas sob condições que garantam que o acesso às culturas estarão disponíveis durante a pendência deste pedido de patente a uma pessoa determinada pelo Representante de Patentes e Marcas Registradas a ser designado para isso sob 37 C.F.R. §1,14 e 35 U.S.C. §122. Os depósitos representam uma cultura substancialmente pura das cepas depositadas. Os depósitos estão disponíveis como requerido pelas leis de patente estrangeiras nos países em que as contrapartes do presente pedido ou sua progênie são depositadas. Entretanto, deve ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para a prática da invenção objeto em detrimento dos direitos de patente outorgados por ação governamental.

A invenção aqui descrita e reivindicada não deve ser limitada no escopo pelas formas de realização específicas aqui contidas divulgadas, visto que estas formas de realização são intencionadas como ilustrações de diversos aspectos da invenção. Quaisquer formas de realização equivalentes são intencionadas a estarem dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção além daquelas aqui mostradas e descritas tornar-se-ão evidentes àqueles habilitados na técnica a partir da descrição precedente. Tais modificações também são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas. No caso de conflito, a presente divulgação incluindo as definições comandarão.

Várias referências são aqui citadas, as divulgações das quais são incorporadas por referência em suas totalidades.

Exemplos

Exemplo 1: Fermentação em frasco agitado de *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis ATCC 14580 foi propagado durante a

noite a 37° C em meio de TY ágar (caldo TY solidificado com 2% de ágar) e inoculado em um frasco agitado contendo 100 ml de caldo TY com a seguinte composição: Triptona: 20 g/litro, Extrato de levedura: 5 g/litro, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 7 mg/litro, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1 mg/litro, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg/litro, pH 7,3. O
5 frasco agitado foi incubado a 37° C por 20 horas com uma velocidade de agitação de 225 rpm. As células foram removidas pela centrifugação.

A eletroforese em gel de SDS poliacrilamida do sobrenadante revelou uma faixa de um peso molecular relativo de 12 kDa que corresponde ao polipeptídeo desejado. O polipeptídeo da invenção é designado “a proteína
10 L12,” devido ao seu peso molecular relativo de 12 kDa, pela SDS-PAGE (entretanto, o peso molecular teórico pode ser calculado a 9591,56 Da).

Exemplo 2: Purificação da fermentação em frasco agitado de *Bacillus licheniformis*

O caldo de fermentação do Exemplo 1 foi centrifugada (20000
15 x g, 20 min) e os sobrenadantes foram cuidadosamente decantados dos precipitados. Os sobrenadantes combinados foram filtrados através de uma placa Seitz EKS de modo a remover as células de *Bacillus*. O filtrado de EKS foi ultrafiltrado e diafiltrado em cartuchos de corte Filtron 3k de modo a concentrar as proteínas e reduzir a condutividade no filtrado Seitz EKS. O
20 concentrado Filtron foi filtrado através de uma outra placa Seitz EKS.

O pH do concentrado foi ajustado ao pH 4,5 com 20% de CH_3COOH . Alguma coisa (não a proteína L12) na solução precipitou pelo ajuste do pH e este precipitado foi removido pela filtração através de uma placa Seitz K-250. O filtrado K-250 foi aplicado a uma coluna de SP-
25 sepharose FF de 100 ml equilibrada em 20 mM de CH_3COOH , 50 mM de H_3BO_3 , 1 mM de CaCl_2 , ajustado ao pH 4,5 com NaOH. Depois de lavar a coluna extensivamente com o tampão de equilíbrio, a proteína L12 foi eluída com um gradiente de NaCl linear (0 → 0,5M) no mesmo tampão. As frações contendo a proteína L12 foram identificadas pela análise de SDS-PAGE e

estas frações foram reunidas e diluídas 10 vezes com água desmineralizada para reduzir a condutividade da combinação. A combinação foi aplicada a uma coluna SOURCE S de 8 ml equilibrada no mesmo tampão de equilíbrio (20 mM de CH_3COOH , 50 mM de H_3BO_3 , 1 mM de CaCl_2 , ajustado ao pH 4,5 com NaOH) e depois de lavar a coluna extensivamente com o tampão de equilíbrio, a proteína L12 foi eluída com um gradiente linear de NaCl (0 → 1,0 M) no mesmo tampão.

As frações da coluna foram analisadas pela análise de SDS-PAGE e as frações contendo a proteína L12 foram reunidas, o pH foi ajustado ao pH 8 com 3% de NaOH e a combinação foi deixada no ambiente frio até o dia seguinte. O ajuste ao pH 8 fez com que a proteína L12 precipitasse e no dia seguinte o precipitado L12 foi coletado pela centrifugação (5000 x g, 10 min).

O precipitado da proteína L12 foi lavado com 20 mM de Tris/HCl, pH 8 para aumentar a pureza da proteína L12 precipitada. Depois de uma segunda centrifugação (5000 x g, 10 min) o precipitado da proteína L12 foi dissolvido em um volume mínimo de (20 mM de CH_3COOH , 50 mM de H_3BO_3 , 1 mM de CaCl_2 , 100 mM de NaCl ajustado ao pH 4,5 com NaOH) e aplicado a uma coluna de exclusão por tamanho Superdex 75 de 300 ml equilibrada no mesmo tampão.

A coluna Superdex 75 foi eluída com o mesmo tampão e as frações da coluna foram analisadas pela análise de SDS-PAGE. As frações, onde apenas uma faixa foi observada no gel de SDS-PAGE tingido com coomassie, foram combinados como a preparação de proteína L12 purificada. Glicerol foi adicionado às frações L12 combinadas a 50% (p/p) de concentração final.

A proteína L12 formulada com glicerol foi armazenada fria em um refrigerador. A preparação foi essencialmente pura como determinada em um gel de SDS-PAGE tingido com coomassie (uma faixa).

Características:

O peso molecular relativo como determinado pela SDS-PAGE foi: Mr = 12 kDa.

A seqüência de terminal N foi: WVNPGYHYQYPSEGG

5 (SEQ ID NO: 5)

Exemplo 3: Fermentação pela retroalimentação de *Bacillus licheniformis*

Um processo de fermentação pela retroalimentação de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 foi conduzida como descrito abaixo. Todos os
10 meios foram esterilizados pelos métodos conhecidos na técnica. A menos que de outro modo descrito, água de torneira foi usada. As concentrações de ingredientes aludidas nas receitas abaixo são antes de qualquer inoculação.

Meios

LB ágar: 10 g/litro de peptona de caseína (tal como, o no. de
15 catálogo da Fluke no. 95039, digestão triptica da caseína); 5 g/litro de extrato de levedura (fabricado pela autólise de *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo catálogo no. 9512 da Organotechnie S.A., 27, avenue Jean Mermoz, F-93120 La Courneuve, França); 10 g/litro de cloreto de sódio; 12 g/litro de Bacto-ágar (LB-ágar (Miller), catálogo Merck no. 110283) ajustado ao pH 7,0
20 +/- 0,2.

Tampão M-9: Dihidrogeno fosfato de sódio. 2H₂O 8,8 g/litro; diidrogeno fosfato de potássio 3 g/litro; cloreto de sódio 4 g/litro; sulfato de magnésio. 7H₂O 0,2 g/litro (água deionizada é usado neste tampão).

PRK-50: 110 g/litro de farinha grossa de soja; Dihidrogeno
25 fosfato de sódio. 2H₂O 5 g/litro; antiespumante (tal como, por exemplo, Struktol SB2121, Schill & Seilacher, Hamburg, Alemanha) 1 ml/litro; pH ajustado a 8,0 com NaOH/H₃PO₄ antes da esterilização.

Meio de composição: Triptona (Hidrolisado de caseína tal como, por exemplo, digestão pancreática de Bacto[®] Triptona de caseína

catálogo no. 211699) 30 g/litro; sulfato de magnésio. $7\text{H}_2\text{O}$ 4 g/litro; dihidrogeno fosfato de potássio 7 g/litro; dihidrogeno fosfato de sódio, $2\text{H}_2\text{O}$ 7 g/litro; di-sulfato de amônio 4 g/litro; ácido cítrico 0,78 g/litro; vitaminas (dicloreto de tiamina 34,2 mg/litro; riboflavina 2,9 mg/litro; ácido nicotínico 23 mg/litro; D-pantotenato de cálcio 28,5 mg/litro; piridoxal-HCl 5,7 mg/litro; D-biotina 1,1 mg/litro; ácido fólico 2,9 mg/litro); metais traço ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 39,2 mg/litro; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 157 mg/litro; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15,6 mg/litro; ZnCl_2 15,6 mg/litro); Antiespumante (Struktol SB2121, ver acima) 1,25 ml/litro; pH ajustado a 6,0 com $\text{NaOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$ antes da esterilização. Monopropileno glicol (MPG) 24 ml/litro foi adicionado 28 e 47 horas depois da inoculação (isto é depois de aproximadamente 1 e 2 dias, respectivamente), no total 48 ml/litro de MPG foram adicionados.

Meio de alimentação: Glicose. $1\text{H}_2\text{O}$ 820 g/litro

Procedimento de Fermentação:

Bacillus licheniformis ATCC 14580 foi cultivado em inclinações de LB ágar por um dia a 37°C . O ágar foi depois lavado com tampão M-9 e a densidade ótica (OD) a 650 nm da suspensão de célula resultante foi medida. O frasco de inóculo agitado (com 100 ml de meio PRK-50) foram inoculados com um inóculo de OD (650 nm) x ml de suspensão de célula = 0,1 (que significa que a quantidade requerida de inóculo em ml é encontrada dividindo-se 0,1 pela OD (650 nm) da suspensão de célula de inóculo). Os frascos agitados foram incubados a 37°C a 300 rpm por 20 horas.

Os fermentadores usados foram fermentadores de laboratório padrão equipados com um sistema de controle de temperatura, controle de pH com água amoniacal e ácido fosfórico, elétron de oxigênio dissolvido para medir >20% de saturação de oxigênio através da fermentação inteira.

A fermentação no fermentador principal (tanque de fermentação) foi iniciada pela inoculação do fermentador principal com a

cultura em crescimento de um frasco de inóculo agitado. O volume inoculado foi de 10% do meio de composição (80 ml para 720 ml de meio de composição, resultando em 800 ml de caldo inicial depois da inoculação).

Os parâmetros de fermentação foram: Temperatura 41° C; pH entre 6,8 e 7,2 (usando água amoniacal e ácido fosfórico, controle 6,8 (água amoniacal), 7,2 ácido fosfórico). Aeração: 1,5 litro/min/kg de peso do caldo de fermentação, agitação: 1500 rpm.

O meio de alimentação foi adicionado como segue: Taxa de alimentação inicial 0,05 g/min/kg no início da fermentação, aumentando linearmente para 0,16 g/min/kg depois de 8 horas e permanecendo a 0,16 g/min/kg até o final da fermentação (por referência ao peso de partida do caldo de fermentação, exatamente depois da inoculação).

Depois de 3 dias (70 horas) o caldo de fermentação foi colhido e purificado como descrito no Exemplo 4 abaixo.

15 **Exemplo 4: Purificação da fermentação pela retroalimentação de *Bacillus licheniformis***

O caldo de fermentação do Exemplo 3 foi centrifugado (20000 x g, 20 min) e os sobrenadantes foram cuidadosamente decantados dos precipitados. Os sobrenadantes combinados foram filtrados através de uma placa Seitz K-250 e depois através de uma placa Seitz EKS de modo a remover o resto das células hospedeiras de *Bacillus*. A condutividade do filtrado EKS foi de 10 mS/cm. 100 ml de filtrado de EKS foi diluído 10x em 20 mM de CH₃COOH, 50 mM de H₃BO₃, 1 mM de CaCl₂, ajustado ao pH 4,5 com NaOH e o pH do filtrado EKS diluído foi ajustado ao pH 4,5 com 20% de CH₃COOH. O filtrado de EKS diluído foi aplicado a uma coluna de 19 ml de SP-sepharose FF equilibrada em 20 mM de CH₃COOH, 50 mM de H₃BO₃, 1 mM de CaCl₂, ajustado ao pH 4,5 com NaOH. Depois de lavar a coluna extensivamente com o tampão de equilíbrio, a proteína L12 foi eluída com um gradiente de NaCl linear (0 → 0,5 M) no mesmo tampão. As frações contendo

a proteína L12 foram identificadas pela análise de SDS-PAGE e combinadas e diluída 10 vezes com água desmineralizada para reduzir a condutividade da combinação. A combinação foi aplicada a uma coluna SOURCE S de 8 ml equilibrada no mesmo tampão de equilíbrio (20 mM de CH₃COOH, 50 mM de H₃BO₃, 1 mM de CaCl₂, ajustado ao pH 4,5 com NaOH) e depois de lavar a coluna extensivamente com o tampão de equilíbrio, a proteína L12 foi eluída com um gradiente de NaCl linear (0 → 1,0 M) no mesmo tampão. As frações da coluna foram analisadas pela análise de SDS-PAGE e as frações contendo a proteína L12 foram combinadas e aplicadas a uma coluna de exclusão de tamanho Superdex 75 de 120 ml equilibrada em 20 mM de CH₃COOH, 50 mM de H₃BO₃, 100 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂, ajustado ao pH 4,5 com NaOH. A coluna Superdex 75 foi eluída com o mesmo tampão e as frações da coluna foram analisadas pela análise de SDS-PAGE. As frações que dão origem a uma faixa forte a 12 kDa no gel de SDS-PAGE tingido com coomassie foram combinadas como a preparação da proteína L12 purificada. A preparação foi pelo menos 90% pura julgada a partir de um gel de SDS-PAGE tingido com coomassie e o peso molecular relativo como determinado pela SDS-PAGE foi de Mr = 12 kDa. A sequência de terminal N foi: WNVPGYHYQY (aminoácidos de 1 a 10 da SEQ ID NO: 5).

20 **Exemplo 5: Desempenho em ração de animal *in vivo* (teste de gaiola)**

O desempenho da proteína L12 em ração de animal foi avaliada em um teste de crescimento de frango com os seguintes parâmetros:

Teste de crescimento: Dia 8 ao dia 29 (dia 0 = dia do choco)

Tratamentos: A: Controle; B: 5 mg de proteína L12 purificada
25 por kg de ração

Dietas: dieta de Milho / SBM48 (ver a composição de ração, Tabela 1)

Depois de misturar a ração foi pelotizada em cerca de 70° C (3 x 25 mM). A proteína L12 foi diluída em 500 ml de água e pulverizada sobre

as pelotas. Para o tratamento de controle a mesma quantidade de água foi pulverizada sobre as pelotas.

Réplicas: 8 grupos de 6 frangos machos, ROSS PM3, por tratamento

5 Alimentação: Pelotas *ad libitum*

Tabela 1: Composição de ração da dieta experimental

<u>Ingredientes (%):</u>	
Milho ⁴	64,34
SBM 48 ⁵	29,20
Óleo de soja	2,50
DL-Metionina	0,08
Mono Fosfato de Cálcio	1,50
Calcário	1,18
Sal	0,10
TiO ₂ ¹	0,10
Pré mistura no. UH 12699002 ²	1,00
<u>Teor calculado:</u>	
Proteína bruta (%)	19,0
ME _N (MJ/kg) ⁵	12,8
Gordura bruta (%)	6,2
Lisina (%)	1,02
Metionina (%)	0,39
Metionina + Cistina (%)	0,71

¹ TiO₂ como marcador indigerível foi incluído na mistura de ração

² Comercialmente disponível da DSM Nutritional Products NV, Dorpsstraat 4, B-9800 Deinze, Bélgica e incluindo Lasalocid Sódico

10 ³ Calculado com equação EC (EEC (1986) Directive de la Commission du 9 avril 1986 fixant la méthode de calcul de la valeur energetique des aliments composes destines a la volaille; Journal Officiel des Communautés Europeennes, L 130, 53-54)

⁴ Matéria-prima para gêneros alimentícios; disponível da Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França

15 ⁵ Farinha de soja, resíduos da fabricação de óleo, matéria-prima para gêneros alimentícios; disponível da Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França

Tabela 2: Desempenho de frangos machos; média \pm desvio padrão

Produto	Controle	L12
Tratamento	A	B
Dose (proteína/kg)	0	5 mg
Gaiolas x aves	8 x 6	8 x 6
Ganho de peso (g/ave) dia 8 a 29	1308 ^A ± 61	1375 ^A ± 80
%	100,0	105,2
Ingestão de ração (g/ave) dia 8 a 29	2095 ^A ± 103	2119 ^A ± 90
%	100,0	101,1
Conversão de ração (g de ração/g de ganho) dia 8-29	1,603 ^A $\pm 0,028$	1,542 ^B $\pm 0,038$
%	100,0	96,2

Teste de Newman-Keuls: Médias dentro de uma fileira, que não compartilham um sobrescrito comum, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

5 Exemplo 6: Cepas de *Bacillus* com genes equivalentes a L12, como identificadas pela PCR

Os genes similares ao gene que codifica a proteína L12 (SEQ ID NO: 1) foram identificados em várias outras cepas de *Bacillus licheniformis* pela PCR. O DNA para o uso como um padrão para a reação de PCR foi isolada de onze cepas de *Bacillus licheniformis* diferentes cultivadas durante a noite a 37° C em placas de TY ágar (para a receita, ver o Exemplo 1). Um tubo de inoculação com células de cada cepa foi colocado em suspensão em 0,1 ml de H₂O e fervido por 10 min, centrifugado e 5 microlitros de sobrenadante de cada um foi usado como padrão de DNA nas reações de PCR como descrito abaixo.

As reações de PCR foram conduzidas em “Puro Taq[®] Ready-To-Go[®] PCR Beads” da Amersham Biosciences: 5 microlitros de padrão de DNA + 2 x 1 microlitro de iniciador Pep481 (SEQ ID NO: 6) e Pep482 (SEQ ID NO: 7) + 18 microlitros de H₂O.

Programa de PCR: 1) 95° C 3 min; 2) 95° C 10 segundos; 3)

65° C 30 segundos -1° C pr. ciclo; 4) 72° C 1 min; 5) Ir Para 2) 9 vezes; 6) 95° C 10 segundos; 7) 55° C 30 segundos; 8) 72° C 1 min; 9) Ir Para 6) 19 vezes; 10) 72° C 5 min; 11) 4° C continuamente, que significa que na etapa 10) seguinte a temperatura é diminuída para 4° C.

5 Iniciadores:

Pep481 AATTACGCGTGTGGTGCGATAGTAGTAACG-3' (SEQ ID NO: 6)

Pep482 TTAAGAATTCGAATGAAAGAGGAGGAATG -3' (SEQ ID NO: 7)

10 O fragmento de PCR de 0,4 kb resultante das cinco cepas positivas (positivo significando dar a faixa de DNA do tamanho correto) foi purificado e usado em um experimento de seqüenciamento de DNA, usando de novo como iniciadores de seqüência os iniciadores Pep481 (SEQ ID NO: 6) e Pep482 (SEQ ID NO: 7).

15 Três das cinco cepas positivas deram a mesma seqüência de DNA: *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Bacillus licheniformis* NCIMB 6346 (=DSM 8785) e *Bacillus licheniformis* cepa 712, resultando na seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2. Na cepa 470 de *Bacillus licheniformis* as mudanças de DNA resultaram em duas mudanças de aminoácido (SEQ ID NO: 9), entretanto nenhuma no peptídeo maduro. Na

20 cepa 009 de *Bacillus licheniformis* as mudanças de DNA resultaram em quinze mudanças de aminoácido (SEQ ID NO: 8), oito das quais no peptídeo maduro. Além disso, uma seqüência de consenso (SEQ ID NO: 10) foi derivada das SEQ ID NOs: 2, 8 e 9.

25 Observe que, neste experimento, os nucleotídeos que codificam os sete aminoácidos de terminal C da SEQ ID NO: 2 são incluídos no iniciador Pep481 (SEQ ID NO: 6) e os sete resíduos de aminoácido de terminal C das SEQ ID NOs: 8 e 9 podem não ser portanto corretos. Entretanto a correção das SEQ ID NOs: 8 e 9 foi mais tarde confirmada.

Uma cepa de *Bacillus licheniformis* que foi isolada do produto probiótico na ração designada BioPlus® 2B (oferecida por Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca) foi incluída entre as onze cepas testadas mas foi negativa.

5 Além disso, 44 outras cepas de *Bacillus licheniformis* foram testadas como descrito acima. Uma resposta de PCR positiva foi encontrada em 27 destas cepas. Os exemplos de cepas adicionais publicamente disponíveis de *Bacillus licheniformis* descobertos serem positivos em L12 têm os seguintes números de depósito: NCTC 1024, NCTC 1025, NCTC 2120, 10 NCTC 7589, NCTC 9932, ATCC 21424, NCIMB 10689, ATCC 53757. NCTC é a National Collection of Type Cultures. ATCC é a American Type Culture Collection. NCIMB é a National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria.

Exemplo 7: Termoestabilidade

15 A Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) foi usada para determinar a estabilidade da temperatura da proteína L12 no pH 2,5, 4,0 e 7,0. L12 purificado em uma concentração de cerca de 2 mg/ml foi dialisado durante a noite a 4° C contra tampão apropriado e conduzido em um instrumento VP-DSC (MicroCal) com uma razão de varredura constante de 20 1,5° C/min de 20 a 90° C. o manuseio dos dados foi realizado usando o software MicroCal Origin (versão 4.10) e a temperatura de desnaturação foi definida como a temperatura no ápice do pico de entalpia. Em 10 mM de ácido cítrico, 50 mM de cloreto de sódio, pH 2,5, L12 verificou-se ter uma temperatura de desnaturação de 55° C. Em 10 mM de acetato de sódio, 50 25 mM de NaCl, pH 4,0, L12 desnaturou a 69° C e em 10 mM de fosfato de sódio, 50 mM de NaCl, pH 7,0 a temperatura de desnaturação foi de 60° C.

Exemplo 8: Modulação da microflora intestinal *in vivo* e *in vitro*

A influência da proteína L12 sobre a microflora intestinal foi avaliada a) *in vivo*, em leitões e frangos; e b) *in vitro*, em microorganismos

isolados da microflora intestinal.

Estudo de Leitão

5 Este estudo, que foi realizado de acordo com as regulamentações legais francesas sobre experimentos com animais vivos, foi realizado para avaliar o efeito de 5 ppm de L12 (5 mg de L12 purificado por kg de ração) na microflora intestinal de leitões.

10 Dez leitões (híbridos de Large-White, Landrace e Piêtrain, obtidos da GAEC Leclerc, Ostheim, França) de um peso corporal inicial de $25,3 \pm 1,3$ kg foram submetidos a uma anastomose íleo-retal (conectando o íleo terminal à extremidade do reto, desviando o ceco e o cólon). Em tais porcos, a microflora do íleo terminal pode ser coletada ao nível do ânus e é representativa da população bacteriana de todas as partes digestivas consecutivas dos intestinos. Depois da cirurgia, durante a recuperação da cirurgia e durante o período experimental os animais foram colocados em
15 gaiolas metabólicas permitindo uma amostragem fácil dos conteúdos íleo-retais.

Durante o período experimental de seis semanas, os leitões foram alimentados cada um e alternativamente (em um planejamento de quadrado latino duplo, para reduzir o efeito da variação individual e também
20 qualquer influência potencial da seqüência dos tratamentos) uma dieta basal suplementada ou não com os compostos de teste. as dietas foram compostas como segue:

Dieta A: KLIBA, disponível da Provimi-Kliba, Kaiseraugst, Suíça, com 18% de farinha de soja, 53% de milho, 13% de cevada, 6% de
25 farinha de aveia, 5,4% de farelo de trigo, 1% de óleo de soja, 3,6% de minerais, vitaminas e aminoácidos sintéticos (p/p).

Dieta E: Dieta A com a adição de 5 mg/kg da proteína L12.

As Dietas B, C e D incluíram outros compostos de teste sem nenhuma relevância para a presente invenção.

Os compostos de teste (incluindo L12) foram incorporados nas dietas em um misturador de Buhler (Buhler, Aschwill, Suíça). As dietas experimentais foram preparadas e administradas aos animais em uma forma pastosa.

5 As dietas experimentais foram deixadas para os animais no nível de 2 kg por dia distribuídos em duas farinhas iguais às 8:00 e 15:30.

Os conteúdos íleo-retais foram amostrados a partir de cada animal nos dois últimos dias de cada período de tratamento e as concentrações de matéria seca e dos constituintes diferentes da microflora foram
10 determinados.

Os animais não mostram quaisquer sintomas de toxicose ou de enfermidade durante o experimento. Seu ganho de peso diário durante a observação foi de $1,14 \pm 0,1$ kg que é um desempenho zootécnico muito bom. No final dos experimentos os animais foram eutanizados por injeção letal
15 depois da tranquilização.

Os conteúdos de matéria seca das amostras foram determinados depois da secagem durante a noite a 105°C , 1 g de amostra, de acordo com o procedimento padrão da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1009) (Association of Official Analytical Chemists.
20 (1990). (Official methods of analysis. 15^a edição. Association of Official Analytical Chemists. Arlington).

A análise da microflora foi realizada como segue:

Imediatamente depois da emissão, 10 g de conteúdos íleo-retais foram transferidos e homogeneizados em frascos contendo 100 ml de
25 caldo de cloreto de sódio peptona (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 10582). Menos do que 5 min passados entre as emissões e a remoção dos conteúdos íleos que foram rapidamente transferidos para uma câmara anaeróbica (AES Cheminex, Combours, França). Subseqüentemente, as amostras foram diluídas em série em etapas de 10 vezes usando caldo de

cloreto de sódio peptona de 10^{-1} a 10^{-8} (p/vol). Todas as contagens bacterianas foram obtidas com duas placas duplicadas.

5 As contagens anaeróbicas facultativas totais representam o número médio de colônias que cresceram em Brucella ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 10490) suplementado com sangue de ovelha (5% vol/vol, fornecido pela AES Cheminex, Combours, França). As placas foram incubadas em uma cabine anaeróbica a 37° C durante 5 dias.

10 As bactérias de ácido láctico foram enumerados em MRS ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 110660) e *LactoBacillus* spp. em Rogosa ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 105413). Ambas as placas foram incubadas em uma cabine anaeróbica a 37° C durante 48 horas.

15 As Enterobacteriaceae foram contadas em V.R.B.D ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 110275). *Escherichia coli* e outras Enterobacteriaceae foram analisadas em um meio cromogênico Coli-ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França, catálogo no. 42017). Este meio contém dois substratos cromogênicos: Um para a detecção de beta-D-glicuronidase (*E. coli*) que produz colônias rosas e um para a detecção de galactosidase (outra Enterobacteriaceae) que produz colônias azuis. Ambas as placas foram incubadas aerobicamente a 37° C durante 24 horas.

20 *Enterococcus* spp. foram avaliados em Enterococo ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 65009) e *Staphylococcus* spp. em Baird Parker ágar (AES Cheminex, Combours, França, catálogo no. AEB150302) depois da incubação aeróbica a 37° C durante 48 horas.

25 Depois de aquecer a amostra em um banho de água a 80° C durante 10 min, *Clostridium perfringens* foi isolado usando TSN ágar (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França, catálogo n° 51048) incubado em uma câmara anaeróbica a 46° C durante 24 horas.

As identidades de colônias representativas foram além disso confirmadas pela examinação microscópica depois do tingimento de Gram e o

teste bioquímico usando o sistema API apropriado (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França).

Para cada grupo de teste, a análise estatística dos dados envolvidos no cálculo da média e desvio padrão da média assim como uma análise de variação seguida pelo teste “t” de Student para avaliar a significância de diferenças inter-grupo.

As respectivas contagens bacterianas (número de unidades formadoras de colônia (CFU) por grama de conteúdo íleo de matéria seca (DM), \pm o desvio padrão (SD) são apresentados na Tabela 3 abaixo, que também mostra a melhora nas respectivas contagens bacterianas causadas pela adição de 5 ppm de L12, em relação ao controle.

Tabela 3: Teor bacteriano da microflora íleo-retal de leitões

Contagem bacteriana de:	Controle (CFU/g de DM)	5 ppm de L12 (CFU/g de DM)	Melhora (%)	Teste t
Bactérias anaeróbicas facultativa	$2,78 \times 10^{10}$ $\pm 1,94 \times 10^{10}$	$4,13 \times 10^{10}$ $\pm 3,34 \times 10^{10}$	+49%	0,1 0,15
Bactérias de ácido láctico totais	$1,21 \times 10^{10}$ $\pm 1,28 \times 10^{10}$	$1,17 \times 10^{10}$ $\pm 1,13 \times 10^{10}$	-4%	0 0,9
<i>LactoBacillus</i> spp.	$1,09 \times 10^{10}$ $\pm 7,98 \times 10^9$	$1,04 \times 10^{10}$ $\pm 8,15 \times 10^9$	-5%	0,84
<i>Enterobacteriaceae</i>	$1,49 \times 10^8$ $\pm 3,03 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$ $\pm 2,04 \times 10^8$	-1%	0,98
<i>Escherichia coli</i>	$1,27 \times 10^8$ $\pm 2,57 \times 10^8$	$1,51 \times 10^8$ $\pm 2,40 \times 10^8$	+19%	0,77
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	$1,05 \times 10^7$ $\pm 2,66 \times 10^7$	$2,22 \times 10^5$ $\pm 2,15 \times 10^5$	-98%	0,31
<i>Enterococcus</i> spp.	$3,89 \times 10^7$ $\pm 6,82 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$ $\pm 2,82 \times 10^7$	-54%	0,22
<i>Staphylococcus</i> spp.	$8,82 \times 10^5$ $\pm 1,10 \times 10^6$	$7,86 \times 10^5$ $\pm 1,29 \times 10^6$	-11%	0,80
<i>Clostridium perfringens</i>	13 observações positivas/ 20 $2,99 \times 10^3$ $\pm 8,51 \times 10^3$	6 observações positivas/ 20 $2,59 \times 10^1$ $\pm 5,03 \times 10^1$	-99%	0,14

Neste ensaio, nenhuma diferença significativa nas contagens

bacterianas foram encontradas, apenas efeitos numéricos foram observados, mas algumas vezes eles foram muito fortes.

Um efeito positivo de L12 foi observado na média de bactérias anaeróbicas facultativas totais, onde as contagens foram aumentadas em 49% em relação ao controle.

Um efeito neutro de L12 foi observado nas bactérias de ácido láctico totais e *LactoBacillus* spp. totais, que são representativos das bactérias benéficas do microbiota intestinal. O mesmo é o caso para a Enterobacteriaceae total. O componente principal da população de Enterobacteriaceae na microflora de leitão, *Escherichia coli*, foi aumentada em 19% ao passo que o grupo de outras Enterobacteriaceae (outras que não *E. coli*) que são potencialmente patogênicas foi fortemente reduzida.

Um efeito negativo de L12 foi observado na população de *Enterococcus* spp.

Clostridium perfringens foi verificado em treze das vinte amostras de controle (Dieta A), ao passo que a mesma foi encontrada apenas em seis das vinte amostras com dieta suplementada por L12 (Dieta E). Esta população de bactérias patogênicas foi portanto fortemente reduzida (em 99%) com L12.

Estudo de frango

No teste de crescimento de frango descrito no Exemplo 5, o efeito de L12 (5 mg de L12 purificado por kg de ração) na microflora intestinal de frango também foi avaliada.

A análise da microflora de doze animais por grupo foi realizada como descrito acima (o estudo de leitão), usado o conteúdo fecal, depois do sacrifício do frango, como material de partida.

Os resultados das contagens da população bacteriana nos conteúdos cecais do frango são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Teor bacteriano da microflora cecal de frango

Contagem bacteriana de:	Controle (CFU/g DM)	5 ppm L12 (CFU/g DM)	Melhora (%)	Teste t
Bactérias anaeróbicas facultativas	$1,40 \times 10^{10}$ $\pm 1,09 \times 10^{10}$	$2,49 \times 10^{10}$ $\pm 1,19 \times 10^{10}$	+178%	0,03
Bactérias do ácido láctico totais	$2,15 \times 10^9$ $\pm 2,31 \times 10^9$	$3,58 \times 10^9$ $\pm 5,15 \times 10^9$	+166%	0,39
<i>Escherichia coli</i>	$1,64 \times 10^8$ $\pm 1,64 \times 10^8$	$5,10 \times 10^8$ $\pm 8,41 \times 10^9$	+311%	0,19

Um efeito positivo de L12 foi observado na flora anaeróbica facultativa total que aumentou de modo estatisticamente significante em 178%.

5 Esta variação pode ser explicada pelo aumento (numérico) observado de bactérias do ácido láctico total observadas no grupo suplementado com L12. As bactérias do ácido láctico totais representam a população principal da flora anaeróbica facultativa total e são compostas principalmente de espécies de *LactoBacillus* que desempenham um papel importante nos benefícios comunicados pelos microbiotas normais para a saúde do hospedeiro.

15 As contagens de *Escherichia coli* foram numericamente, mas não estatisticamente significantes, aumentaram no grupo suplementado com L12. Isto é compatível com o aumento nas contagens de outros dois grupos de microorganismos. Todos os animais envolvidos neste experimento tiveram a microflora cecal saudável e equilibrada e nenhuma doença diarreica nos animais foi observada durante o teste, sugerindo que foram as cepas de *Escherichia coli* comensais que podem ter sido aumentadas.

Modulação da microflora intestinal *in vitro*

20 O efeito de L12 sobre a microflora foi ainda avaliado *in vitro*. As bactérias representativas de microorganismos benéficos e nocivos dos microbiotas intestinais foram isolados dos conteúdos intestinais de leitão e

frango. As suas identidades foram confirmadas pela examinação microscópica depois do tingimento de Gram e teste bioquímico usando o sistema API apropriado (BioMORieux, Marcy l'Etoile, França).

O efeito de L12 sobre o crescimento bacteriano destas bactérias foi determinado pelo método da diluição de caldo de micro título medindo a absorbância a 595 nm. Todos estes ensaios *in vitro* foram realizados em placas de 96 reservatórios esterilizada (placas de microtítulo Falcon 353072, Becton Dickinson Labware, Meilan, França) em um volume final de 110 microlitros como segue: 100 microlitros de suspensão contendo aproximadamente 10^5 CFU/ml das bactérias puras em caldo de soja trípico (Merck, Darmstadt, Alemanha, catálogo no. 105459) foram adicionados a 10 microlitros de água contendo L12 em diluições de 2 vezes em série ou a 10 microlitros de água como controle. A inibição de crescimento foi determinada medindo-se a absorbância a 595 nm com um Multiskan Ascent (ThermoLabsystems, Helsinki, Finlândia) depois do tempo apropriado de incubação na temperatura apropriada para o crescimento ótimo das bactérias puras, ver a Tabela 5.

Tabela 5: Condições de incubação

Tipo de bactéria	Cepa Bacteriana	Condição de incubação	Temperatura de incubação	Tempo de Incubação
Bactérias Gram negativas	todas	Aeróbia	37° C	24 horas
Cocos Gram positivos	<i>Enterococcus</i> sp	Aeróbia	44° C	48 horas
	<i>Staphilococcus</i> sp	Aeróbia	37° C	48 horas
Bactérias Gram Positivas	<i>LactoBacillus</i> sp	Anaeróbia	37° C	48 horas
bactérias	<i>Clostridium perfringens</i>	Anaeróbia	46° C	24 horas

A redução na densidade da cultura foi determinada subtraindo-se a OD₅₉₅ da cultura de teste depois de 24 ou 48 horas (de acordo com a Tabela 5) da OD₅₉₅ da cultura de controle. A redução na densidade da cultura foi normalizada expressando-a como uma porcentagem da OD₅₉₅ da cultura de

controle e da MIC₉₀ correspondeu à concentração de L12 requerida para reduzir a densidade da cultura em 90%, que significa inibir o crescimento de 90% dos organismos testados (MIC₉₀ sendo definido como a Concentração Inibidora Mínima requerida para inibir o crescimento de 90% dos organismos).

Os resultados destas avaliações são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: MIC₉₀ contra bactérias isoladas de conteúdo intestinal de leitão e frango.

Tipo de Bactéria	Isolada de	Cepa Bacteriana	MIC ₉₀ (microgramas/ml)
Bactérias Gram negativas	Suíno	<i>Escherichia coli</i>	> 1800
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 1800
		<i>Salmonella enteritidis</i>	> 1800
		<i>Salmonella typhimurium</i>	> 1800
	Frango	<i>Escherichia coli</i>	> 4170
		<i>Proteus mirabilis</i>	> 2085
		<i>Salmonella enteritidis</i>	> 4170
		<i>Salmonella typhimurium</i>	> 4170
Gram positive cocci	Suíno	<i>Enterococcus faecalis</i>	33
		<i>Enterococcus faecium</i>	4
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	112
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	450
	Frango	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM18047	65
		<i>Enterococcus durans</i>	33
		<i>Staphylococcus xilosus</i>	1003
Bactérias Gram positivas	Suíno	<i>LactoBacillus fermentum</i>	> 1800
	Frango	<i>LactoBacillus salivarius</i> DSM 18070	> 4170
		<i>Clostridium perfringens</i>	< 130

L12 é mais ativo contra cocos Gram positivos e clostridia isolados de conteúdos de porco e frango do que as bactérias Gram negativas isoladas dos mesmos.

Estes resultados pelo menos parcialmente explicaram a influência de L12 sobre os microbiotas gastro-intestinais:

O efeito observado de L12 *in vitro* sobre *Enterococcus faecalis*

e *Enterococcus faecium* confirmaram a redução observada em *Enterococcus* spp. observada *in vivo* em leitões.

O efeito observado de L12 *in vitro* nas espécies de *LactoBacillus* confirmaram a descoberta dos estudos *in vivo* de leitão e frango que o L12 não tem nenhuma influência negativa *in vivo* sobre as espécies de *LactoBacillus* do suíno e aves domésticas.

O efeito observado de L12 *in vitro* sobre *Clostridium perfringens* isolado do conteúdo intestinal de frango confirmou a forte redução desta população observada *in vivo* em leitões.

10 **Exemplo 9: Desempenho em ração de animal *in vivo* (teste de gaiola) - várias dosagens**

O desempenho da proteína L12 em ração de animal foi avaliada em um teste de crescimento de frango com os seguintes parâmetros:

Teste de crescimento: Dia 8 ao dia 29 (dia 0 = dia do choco)

15 Tratamentos: A: Controle; B: 2,5, 5,0 e 7,5 mg de proteína L12 purificada por kg de ração

Dietas: Dieta de milho / SBM48 (ver composição de ração, Tabela 7)

20 Depois de misturar a ração foi pelotizada em cerca de 70° C (3 x 25 mM). A proteína L12 foi dissolvida em 500 ml de água e pulverizada sobre as pelotas. Para o tratamento de controle a mesma quantidade de água foi pulverizada sobre as pelotas.

Réplicas: 10 grupos de 6 frangos machos, ROSS PM3, por tratamento

25 Alimentação: Pelotas *ad libitum*

Tabela 7: Composição de ração da dieta experimental

<u>Ingredientes (%):</u>	
Milho ⁴	62,94
SBM 48 ⁵	30,00
Óleo de soja	3,10
DL-Metionina	0,08
Mono Fosfato de Cálcio	1,50

Calcário	1,18
Sal	0,10
TiO ₂ ¹	0,10
Pré mistura no. UH 12699002 ²	1,00
<u>Teor calculado:</u>	
Proteína bruta (%)	19,0
ME _N (MJ/kg) ³	12,7
Gordura bruta (%)	6,4
Lisina (%)	1,03
Metionina (%)	0,39
Metionina + Cistina (%)	0,71

¹ TiO₂ como marcador indigerível foi incluído na mistura de ração

² Comercialmente disponível da DSM Nutritional Products NV, Dorpsstraat 4, B-9800 Deinze, Bélgica, e incluindo Lasalocid Sódico

³ Calculado com a equação EC (EEC (1986) Directive de la Commission du 9
5 avril 1986 fixant la méthode de calcul de la valeur énergétique des aliments
composes destines a la volaille; Journal Officiel des Communautés
Europeennes, L 130, 53-54)

⁴ Matéria-prima para gêneros alimentícios; disponível da Moulin Moderne
Hirsingue, Hirsingue, França

10 ⁵ Farinha de soja, resíduos da fabricação do óleo, matéria-prima para gêneros
alimentícios; disponível da Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França

Tabela 8: Desempenho de frangos machos; média ± desvio padrão

Produto	Controle		Proteína L12	
	0	2,5	5,0	7,5
Dose (mg/kg de ração)				
Gaiolas x aves	10 x 6	10 x 6	10 x 6	10 x 6
Ganho de peso	1366 ^A	1412 ^A	1394 ^A	1415 ^A
(g/ave)				
dia 8-29	± 81	± 90	± 76	± 52
%	100,0	103,3	102,0	103,6
Ingestão de ração	2210 ^A	2214 ^A	2195 ^A	2207 ^A
(g/ave)				
dia 8-29	± 96	± 89	± 91	± 55
%	100,0	100,2	99,3	99,9
Conversão de ração				
(g de ração/g de ganho)	1,619 ^A	1,571 ^B	1,576 ^B	1,560 ^B
dia 8-29	± 0,034	± 0,046	± 0,031	± 0,033
%	100,0	97,1	97,4	96,4

Teste de Newman-Keuls: A média dentro de uma fileira, que não compartilham um sobrescrito comum, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Exemplo 10: Determinação de concentração

5 Uma preparação de proteína L12 purificada foi usada como um padrão de proteína L12. A mesma foi preparada como descrito no Exemplo 4 e foi formulada com glicerol como descrito no Exemplo 2. A pureza foi acima de 96%, como medido pela HPLC (usando um módulo de separação Waters 2690 e um detector de UV Waters 2487, que detecta a 280
10 nm, usando colunas ACE C18 5 μ m 100A 150 x 3,0 mM e Waters p-Bondapak C18 20 x 3,9 mM (coluna de proteção), uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min, um volume de injeção de 10 microlitros, fase móvel A: H₂O 18 M Ω + 0,1% de TFA (Ácido Tri-Fluoro Acético), fase móvel B Acetonitrila + 0,1% de TFA).

15 A concentração de L12 do padrão foi 3,6 mg de proteína pura/ml, como determinada pela Análise de Aminoácido (como descrito abaixo).

 A pureza e concentração de várias outras amostras L12 foram determinadas por um método em gel de SDS-PAGE como também descrito
20 abaixo, por referência ao seu padrão.

Análise de Aminoácido (AAA) – concentração de padrão de proteína L12

 As ligações de peptídeo da amostra de padrão de proteína L12 foram submetidas à hidrólise ácida, seguida pela separação e quantificação dos aminoácidos liberados em um Analisador de Aminoácido Biochrom 20
25 Plus, comercialmente disponível da Bie & Berntsen A/S, Sandbaekvej 5-7, DK-2610 Roedovre, Dinamarca, de acordo com as instruções do fabricante. Para a hidrólise ácida, a amostra de proteína foi secada em uma centrífuga a vácuo, dissolvida em 18,5% (vol/vol) de HCl + 0,1% (vol/vol) de fenol e incubada por 16 horas a 110° C. Depois da incubação, a amostra foi

novamente secada na centrífuga a vácuo, dissolvida em tampão de carga (0,2 M de Na-Citrato, pH 2,2) e carregada no Analisador de Aminoácido Biochrom 20 Plus.

5 Para a quantificação, a amostra hidrolisada foi carregada em uma coluna da resina de troca catiônica UltroPac no. 8, forma Sódica, que é comercialmente disponível da Bie & Berntsen A/S, catálogo no. 80-2104-15. Os tampões de pH variável (pH 1 a pH 8) e concentração iônica foram bombeada através da coluna de acordo com as instruções do fabricante aludido acima, para separar os vários aminoácidos. A temperatura da coluna
10 foi acuradamente controlada, também de acordo com as instruções do fabricante (de 53° C a 92° C e de volta para 53° C) de modo a garantir a separação requerida. O eluente da coluna foi misturado com reagente de ninhidrina (Bie & Berntsen, catálogo no. 80-2038-07) e a mistura passada
15 Aminoácido. Na espiral de reação, a ninhidrina reagiu com os aminoácidos para formar compostos coloridos, a quantidade dos quais foi diretamente proporcional à quantidade de aminoácido presente.

Concentração de amostras de proteína L12

20 A concentração de várias amostras L12 foi determinada pelos seguintes procedimentos (todos os produtos Novex aludidos são comercialmente disponíveis da Invitrogen, ver www.invitrogen.com):

50 microlitros de solução de L12 (0,1 a 1,0 mg de L12 por ml) foram misturados com 5 microlitros de EDTA a 1% (p/v) + 10 microlitros de PMSF a 6% + 10 microlitros de DTT 0,5 M + 25 microlitros de tampão de
25 amostra NuPage LDS (NP0007 da NOVEX) em um tubo de Eppendorf e o tubo foi aquecido a 95° C por 5 minutos. 10 microlitros de amostra foram aplicados a um gel de pré moldagem de Tris-Bis a 10% (NP0301 BOX da NOVEX). A eletroforese foi realizada com um tampão de condução MES (MÊS = ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico; NP0002 da NOVEX) +

antioxidante (NP0005 da NOVEX) a uma voltagem constante de 200 V de acordo com as instruções do fabricante. Depois da eletroforese, o gel foi suavemente agitado em ácido acético a 10% + 50% de EtOH por 10 minutos. O gel foi depois suavemente agitado com solução de tingimento de Azul Coloidal (46-7016 da NOVEX) por mínimo de três horas e lavado agitando-se suavemente por 2 a 4 horas com água destilada com diversas mudanças de água destilada. O gel úmido foi escaneado com um Densitômetro Calibrado BioRad GS-800 equipado com o software Quantity One (versão 4.6.0, BioRad) e a proteína L12 foi quantificada de acordo com as instruções do fabricante. O padrão de L12 descrito acima foi usado como um padrão, a saber em três a quatro diluições dentro da faixa de 0,1 a 1,0 mg/ml.

Exemplo 11: Estabilidade para pepsina e pancreatina

L12 Nativa: Proteína L12 purificada, diluída a 1 mg/ml em 10 mM de tampão de Tris/CH₃COOH pH 4,5.

L12 desnaturada: Uma amostra de L12 purificada (1 mg/ml em 10 mM de tampão de Tris/CH₃COOH pH 4,5) foi fervida por 5 minutos de modo a desnaturar a proteína.

Pepsina: Pepsina porcina (Sigma P-7000, 453 unidades/mg de sólido). 30000 unidades/ml foram dissolvidas em 10 mM de ácido succínico pH 3,0.

Pancreatina: Pancreatina porcina (Sigma P-7545, 8 x USP). 80 mg/ml foram colocados em suspensão em 0,5 M de tampão de Na-fosfato pH 7,0.

Tampão de pH 3: 10 mM de ácido succínico pH 3,0.

Tampão de pH 7: 0,5 M de tampão de Na-fosfato pH 7,0.

As seguintes amostras foram preparadas:

1) L12 incubada com Pepsina e Pancreatina

278 microlitros de L12 nativa ou desnaturada + 100 microlitros de solução de pepsina + 122 microlitros de tampão de pH 3 foram

incubados por 2 horas a 40° C com agitação, o pH foi medido a 3,5. Depois 400 microlitros de tampão de pH 7 + 100 microlitros de suspensão de pancreatina foram adicionados e seguidos pela incubação por 4 horas a 40° C com agitação, o pH foi medido a 7,0.

5 2) L12 incubada com Pepsina

278 microlitros de L12 nativa ou desnaturada + 100 microlitros de solução de pepsina + 122 microlitros de tampão de pH 3 foram incubados por 2 horas a 40° C com agitação (o pH 3,5 foi medido). Depois 500 microlitros de tampão de pH 7 foram adicionados (o pH 7,0 foi medido).

10 3) L12 incubada com Pancreatina

278 microlitros de L12 nativo ou desnaturado + 222 microlitros de tampão de pH 3 foram incubados por 2 horas a 40° C com agitação. Depois 400 microlitros de tampão de pH 7 + 100 microlitros de suspensão de pancreatina foram adicionados e seguidos pela incubação por 4 horas a 40° C com agitação.

15 4) Amostra de controle de L12

278 microlitros de L12 nativo ou desnaturado + 100 microlitros de solução de pepsina + 122 microlitros de tampão de pH 3 + 400 microlitros de tampão de pH 7 + 100 microlitros de suspensão de pancreatina foram misturados em gelo e mantidos frio.

20 5) Amostra de controle de Pepsina

100 microlitros de solução de pepsina + 400 microlitros de tampão de pH 3 foram incubados por 2 horas a 40° C com agitação (o pH 3,5 foi medido). Depois 500 microlitros de tampão de pH 7 foram adicionados.

25 6) Amostra de controle de pancreatina

500 microlitros de tampão de pH 3 + 400 microlitros de tampão de pH 7 + 100 microlitros de suspensão de pancreatina foram incubados por 4 horas a 40° C com agitação (o pH 7,0 foi medido).

7) amostra de controle de Pepsina + Pancreatina

100 microlitros de solução de pepsina + 400 microlitros de tampão de pH 3 foram incubados por 2 horas a 40° C com agitação (o pH 3,5 foi medido). Depois 400 microlitros de tampão de pH 7 + 100 microlitros de suspensão de pancreatina foram adicionados e seguidos pela incubação por 4 horas a 40° C com agitação (o pH 7,0 foi medido).

Todas as amostras foram analisadas pela SDS-PAGE como descrito no Exemplo 10. Julgada pela SDS-PAGE, a L12 nativa não foi degradada pelo tratamento com pepsina, pancreatina ou pepsina seguida pela pancreatina. A L12 desnaturada foi extensivamente degradada pelo tratamento com pepsina, pancreatina ou pepsina seguida pela pancreatina visto que nenhuma faixa de L12 foi detectável no gel de SDS nas amostras correspondentes.

Exemplo 12: Desempenho de ração de animal *in vivo* (teste do galinheiro)

Este exemplo avalia os efeitos da proteína L12 sobre o desempenho de crescimento de frangos em um ciclo de crescimento completo de 36 dias.

Um teste de desempenho de crescimento com frangos foi realizado do dia 1 ao dia 36.

Os animais foram alojados em chiqueiros com cama de serragem. Durante o período iniciador (dias 1 a 22) e durante o período de crescimento (dia 22 a 36) os frangos receberam uma dieta com base em farinha de trigo, centeio e soja (composição ver a Tabela 9). Além de um tratamento de controle não suplementado, a proteína L12 foi incluída em uma dosagem de 7,5 mg de proteína por kg de ração.

Teste de crescimento: Dia 1 ao dia 36 (dia 0 = dia do choco)

Dietas: Dieta de trigo / centeio / SBM48 (ver a composição de ração na Tabela 9)

Alimentação: Pelotas *ad libitum*

Depois de misturar, a ração foi pelotizada a cerca de 70° C (3 x 25 mM). A proteína L12 foi dissolvida em 800 ml de água para a ração iniciadora e 1200 ml de água para a ração de crescimento, respectivamente e pulverizada sobre as pelotas. Para o tratamento de controle a mesma quantidade de água sem a proteína L12 foi pulverizada sobre as pelotas, respectivamente.

Tratamentos: Controle, 7,5 mg de proteína L12 por kg de ração

Réplicas: 6 grupos de 20 frangos por sexo e tratamento (6 grupos de 20 fêmeas, 6 grupos de 20 machos)

Tabela 9: Composição de ração da dieta experimental

<u>Ingredientes (%):</u>	<u>Iniciador</u>	<u>Crescimento</u>
Trigo ⁴	41,20	46,00
Centeio ⁴	15,00	15,00
SBM 48 ⁵	34,30	30,73
Óleo de soja	5,50	4,90
DL-Metionina	0,10	0,04
DCP (Fosfato de Di-Cálcio)	2,05	1,65
Calcário	0,65	0,43
Sal	0,20	0,15
TiO ₂ ¹	--	0,10
Pré mistura no. UH 12699002 ²	1,00	1,00
<u>Teor calculado:</u>		
Proteína bruta (%)	22,5	21,0
ME _N (MJ/kg) ³	12,8	12,8
Lisina (%)	1,23	1,13
Metionina (%)	0,42	0,36
Metionina + Cistina (%)	0,91	0,73

¹ TiO₂ como marcador indigerível foi incluído na mistura de ração

² Comercialmente disponível da DSM Nutritional Products NV, Dorpsstraat 4, B-9800 Deinze, Bélgica e incluindo Lasalocid Sódico

³ Calculado com a equação EC (EEC (1986) Directive de la Commission du 9 avril 1986 fixant la méthode de calcul de la valeur energetique des aliments composes destines a la volaille; Journal Officiel des Communaute's Européennes, L 130, 53-54)

⁴ Matéria-prima para gêneros alimentícios; disponível da Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França

⁵ Farinha de soja, resíduos da fabricação do óleo, matéria-prima para gêneros alimentícios; disponível da Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França

5 Tabela 10: Desempenho de frangos; média \pm desvio padrão

Produto	Controle	proteína L12
Tratamento	A	B
Dose (mg/kg)	-	7,5
Número de galinheiros x aves	11* x 20	11* x 20
Ganho de peso (g)	2234 ^A	2278 ^A
Dias 1 a 36	± 181	± 157
(%)	100,0	102,0
Ingestão de ração (g)	3671 ^A	3646 ^A
Dias 1 a 36	± 203	± 199
(%)	100,0	99,3
Conversão de ração (g de ração/g de ganho)	1,646 ^A	1,602 ^B
dias 1 a 36	$\pm 0,045$	$\pm 0,047$
(%)	100,0	97,3

Teste de Newman-Keuls: Média dentro de uma fileira, que não compartilha um sobrescrito comum, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

* uma gaiola excluída devido a problemas técnicos

10 A proteína L12 melhorou o ganho de peso dos frangos levemente (Tabela 10), entretanto este efeito não foi significativo. A ingestão de ração dos frangos que receberam a proteína L12 não foi diferente daquela dos frangos de controle. A Taxa de Conversão de Ração (FCR) foi significativamente melhorada pela proteína L12 comparada ao controle, a
15 saber em 2,7%.

Exemplo 13: Ração de animal e aditivo

Aditivo de Ração de Animal

Um aditivo de ração de animal é preparado adicionando-se 25 g de um granulado T revestido compreendendo a proteína L12 purificada em
20 uma quantidade de 20 g/kg (preparada como descrito no Exemplo 3 da EP

569468 B1, entretanto com um revestimento de aprox. 7% de óleo de palma hidrogenado e aprox. 13% de CaCO_3) às seguintes pré misturas (por quilo de pré mistura):

5	1100000 IE de Vitamina A
	300000 IE de Vitamina D3
	4000 IE de Vitamina E
	250 mg de Vitamina B1
	800 mg de Vitamina B2
10	1200 mg de Ca-D-Pantotenato
	500 mg de Vitamina B6
	2,5 mg de Vitamina B12
	5000 mg de Niacina
	10000 mg de Vitamina C
15	300 mg de Vitamina K3
	15 mg de Biotina
	150 mg de Ácido fólico
	50004 mg de Cloreto de colina
	6000 mg de Fe
20	3000 mg de Cu
	5400 mg de Zn
	8000 mg de Mn
	124 mg de I
	60 mg de Co
25	29,7 mg de Se
	9000 mg de Lasalocid Sódico (Avatec)
	17,3% de Ca
	0,8% de Mg
	11,7% de Na

Ração de animal

Uma dieta de desenvolvedora de frango tendo a seguinte composição (% p/p) é preparada misturando-se os ingredientes. Trigo, centeio e SBM 48 são disponíveis da Moulin Moderne Hirsingue, Hirsinaue.

- 5 França. Depois de misturar a ração é pelotizada em uma temperatura desejada, por exemplo, de cerca de 70° C (3 x 25 mM).

Trigo	46,00
Centeio	15,00
Farinha de feijão de soja (SBM 48)	30,73
Óleo de soja	4,90
DL-Metionina	0,04
DCP (Fosfato de Di-Cálcio)	1,65
Calcário	0,43
Sal	0,15
TiO ₂	0,10
Aditivo de ração de animal (acima)	1,00

A ração de animal resultante compreende 5,0 mg de proteína L12 purificada por kg (5 ppm).

- 10 As composições de ração de animal e aditivo de ração adicionais são preparadas da mesma maneira, entretanto substituindo 25 g de granulado de L12 CT revestido por kg da pré mistura com 1018 Unidades Formadoras de Colônia (CFU), preferivelmente na forma de endosporos, de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que resulta em uma ração de animal com aproximadamente 10⁸ CFU por g da composição de ração.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> Polypeptides

<130> 10799.204-WO

<160> 10

<170> PatentIn Versão 3.3

<210> 1

<211> 381

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis ATCC 14580

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (378)

<220>

<221> mat_peptídeo

<222> (124) .. (378)

<400> 1

atg	aaa	aat	cat	ttg	tat	gag	aaa	aaa	aag	agg	aaa	cct	ttg	act	cgg	48
Met	Lys	Asn	His	Leu	Tyr	Glu	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Pro	Leu	Thr	Arg	
	-40					-35					-30					

aca	att	aaa	gcg	acg	ctc	gcc	gtg	ttg	aca	atg	tcc	atc	gct	ttg	gtg	96
Thr	Ile	Lys	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Thr	Met	Ser	Ile	Ala	Leu	Val	
-25					-20				-15					-10		

gga	ggc	gct	acg	gtg	cct	tca	ttt	gca	tgg	gtg	aat	ccg	ggt	tat	cac	144
Gly	Gly	Ala	Thr	Val	Pro	Ser	Phe	Ala	Trp	Val	Asn	Pro	Gly	Tyr	His	
			-5				-1	1				5				

tac	cag	tac	cca	tcg	gaa	ggg	ggg	aca	tgg	agg	tat	gga	ttc	gta	aac	192
Tyr	Gln	Tyr	Pro	Ser	Glu	Gly	Gly	Thr	Trp	Arg	Tyr	Gly	Phe	Val	Asn	
	10					15					20					

gcc	ggg	ctc	cgt	tca	gag	tac	aac	cac	ccg	aca	aag	gtc	cac	ggc	tcg	240
Ala	Gly	Leu	Arg	Ser	Glu	Tyr	Asn	His	Pro	Thr	Lys	Val	His	Gly	Ser	
25					30				35							

aca	gtg	caa	aag	ctc	atc	gat	gga	aaa	gtg	gat	aaa	acg	aat	aga	agt	288
Thr	Val	Gln	Lys	Leu	Ile	Asp	Gly	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Asn	Arg	Ser	
40				45					50					55		

att	gat	acg	gct	gcg	ggc	cgc	tac	tct	aat	gcc	tat	gtc	gga	gcc	ata	336
Ile	Asp	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Asn	Ala	Tyr	Val	Gly	Ala	Ile	
			60					65					70			

aac	tca	cct	ggt	ctt	aag	ggt	cgt	tac	tac	tat	cgc	acc	aac	taa		381
Asn	Ser	Pro	Gly	Leu	Lys	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Thr	Asn			
	75						80					85				

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis ATCC 14580

<400> 2

Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
-40 -35 -30

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
-25 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
-5 -1 1 5

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
10 15 20

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
25 30 35

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
40 45 50 55

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
60 65 70

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
75 80 85

<210> 3

<211> 1581

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> CDS

<222> (601)..(978)

<400> 3

gaattttccg gaagctgaaa caccogtgat atatataacc ataaattaaa cagcataggc	60
ggattgtgcg agttcctcca cattcggagt atttctgaat gatagagcca cacggtccac	120
gttctcactg gctaaccgga tcaaatgata ttcaggagtc agcataatac atccagttca	180
ggtagataag atttgaattt ggtgacttgc ttttgttctt cttctttcat tttctgacta	240
atccaaactg gaaaaagcag gtcttttaac agattaggag gtttctgaca tgcaccattc	300
ggtcactaac cgaatgcagt aaaggacact gtggtgcttg ccagccatta ggggtattgag	360
gaggtgatca aaatgctagg tgacagtatt tcgtcgaagt ggacaagtcg tgaccaaagc	420
acctcggatc gagggttggt catggaggaa aaaattgatg tctggtgaca aagaggagtc	480

atgatcatgg caccgccaac gagggaaaaa actottcccg catcgacacg gtatgtgggc 540
 ggtgacaaac taacttatag agtaaattta ttagtogaat gaaagaggag gaatgaaata 600
 atg aaa aat cat ttg tat gag aaa aaa aag agg aaa cct ttg act cgg 648
 Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
 1 5 10 15
 aca att aaa gcg acg ctc gcc gtg ttg aca atg tcc atc gct ttg gtg 696
 Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
 20 25 30
 gga ggc gct acg gtg cct tca ttt gca tgg gtg aat ccg ggt tat cac 744
 Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
 35 40 45
 tac cag tac cca tcg gaa ggt ggt aca tgg agg tat gga ttc gta aac 792
 Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
 50 55 60
 gcc ggg ctc cgt tca gag tac aac cac ccg aca aag gtc cac ggc tcg 840
 Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
 65 70 75 80
 aca gtg caa aag ctc atc gat gga aaa gtg gat aaa acg aat aga agt 888
 Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
 85 90 95
 att gat acg gct gcg ggc cgc tac tct aat gcc tat gtc gga gcc ata 936
 Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
 100 105 110
 aac tca cct ggt ctt aag ggt cgt tac tac tat cgc acc aac 978
 Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
 115 120 125
 taatcaaagg gaaaacggtt gctgtcaacg gggctagcat ggcaagacct agaaaagttc 1038
 tgggagatcc cgctttgcat aagcgtatta tagtggatga cgcgggcttt gttgtttaca 1098
 cttcttgac ctgctgacgg caatcatccc tatctatgaa atcgagatgt cagcaggccg 1158
 ttattttcga gagagttaaa tctatattca ttgtttttat tttggtaagg acataccgga 1218
 ttttaggttt ggattaccgg togagttagc ttgtcttttc gccactacc gtgtcgatgc 1278
 gggagcaatt taccagaagc acttaccgat tgatagtttt ttattccggt gattgcaaag 1338
 tttcataaac tctgagaatt caataggggt aataccccgc tttgaggggc gcggcatttt 1398
 atgcgccccg agtattttatt cttaaaattt ttaaattaat gtatctatat aaaaaggaga 1458
 tgctttcgggt gtactgccaa agcatctcca caaaagatag tgcatactctg caggaaaaaa 1518
 cataaaatgc aactaacatt tttttgaaa gcaatagggt tatttaattt tgtagtttta 1578
 tct 1581

<210> 4
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Bacillus licheniformis

<400> 4

Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
 1 5 10 15

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
 20 25 30

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ser Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
 35 40 45

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
 50 55 60

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
 65 70 75 80

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
 85 90 95

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
 100 105 110

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
 115 120 125

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bacillus licheniformis ATCC 14580

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> N-terminal

<400> 5

Trp Val Asn Pro Gly Tyr His Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador Pep 481

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Iniciador

<400> 6
aattacgcgt gttggtgcga tagtagtaac g

31

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador Pep 482

<220>
<221> misc_feature
<223> Iniciador

<400> 7
ttaagaattc gaatgaaaga ggaggaatg

29

<210> 8
<211> 125
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis strain 009

<220>
<221> mat_peptideo
<222> (41)..(125)

<400> 8

Met Lys Asn Leu Leu Asn Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg Thr
-40 -35 -30 -25

Ile Lys Ala Thr Phe Ala Val Leu Thr Val Ser Ile Gly Leu Val Gly
-20 -15 -10

Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Asp Tyr His Tyr
-5 -1 1 5

Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn Leu
10 15 20

Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Lys Lys Val His Gly Ser Thr
25 30 35 40

Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Glu Lys Thr Asn Arg Ser Leu
45 50 55

Asp Thr Ala Pro Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Val Val Asn
60 65 70

Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn

75

80

85

<210> 9
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Bacillus licheniformis strain 470

<220>
 <221> mat_peptideo
 <222> (42)..(126)

<400> 9

Met Lys Asn Tyr Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg
 -40 -35 -30

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
 -25 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
 -5 -1 1 5

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
 10 15 20

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
 25 30 35

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
 40 45 50 55

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
 60 65 70

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
 75 80 85

<210> 10
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência de Consenso

<220>
 <221> mat_peptideo
 <222> (42)..(126)

<400> 10

Met Lys Asn His Leu Tyr Glu Lys Lys Lys Arg Lys Pro Leu Thr Arg

-40

-35

-30

Thr Ile Lys Ala Thr Leu Ala Val Leu Thr Met Ser Ile Ala Leu Val
 -25 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Thr Val Pro Ala Phe Ala Trp Val Asn Pro Gly Tyr His
 -5 -1 1 5

Tyr Gln Tyr Pro Ser Glu Gly Gly Thr Trp Arg Tyr Gly Phe Val Asn
 10 15 20

Ala Gly Leu Arg Ser Glu Tyr Asn His Pro Thr Lys Val His Gly Ser
 25 30 35

Thr Val Gln Lys Leu Ile Asp Gly Lys Val Asp Lys Thr Asn Arg Ser
 40 45 50 55

Ile Asp Thr Ala Ala Gly Arg Tyr Ser Asn Ala Tyr Val Gly Ala Ile
 60 65 70

Asn Ser Pro Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asn
 75 80 85

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste de:

(a) um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácido que tem um grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%;

(b) um polipeptídeo que é codificado por uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de baixa estringência com

(i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1,

(ii) uma subseqüência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos,

ou

(iii) um filamento complementar de (i), ou (ii);

(c) uma variante do polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 que compreende uma substituição, deleção, extensão, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos;

(d) uma variante alélica de (a) ou (b); e

(e) um fragmento de (a), (b), (c), ou (d);

com a condição de que o polipeptídeo não é nenhum dos aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que melhora a utilização da ração animal pela melhora da Taxa de Conversão de Alimento (FCR), e/ou pela modulação da microflora intestinal.

3. Seqüência de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência de ácido nucleico que codifica polipeptídeo, que

(a) codifica o polipeptídeo como definido na reivindicação 1;

(b) hibridiza sob condições de estringência muito baixas com

- (i) os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1,
- (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos,

e/ou

- (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii); e/ou

(c) tem um grau de identidade com os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 de pelo menos 48%; com a condição de que a sequência de ácido nucleico não é

- (iv) a SEQ ID NO: 3, e não

- (vi) os nucleotídeos de 601 a 978 da SEQ ID NO: 3, e não

- (vi) os nucleotídeos de 1 a 381 da SEQ ID NO: 1.

4. Sequência de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que codifica o polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2.

5. Construção de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 3 a 4 operavelmente ligado a uma ou mais sequências de controle que direcionam a produção do polipeptídeo em uma célula hospedeira de *Bacillus*, célula hospedeira esta cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

6. Vetor de expressão recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 5.

7. Célula hospedeira de *Bacillus* recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 5 ou o vetor como definido na reivindicação 6, célula hospedeira esta cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à

geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

8. Método para produzir um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que compreende (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante como definido na reivindicação 7 para produzir um sobrenadante que compreenda o polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

9. Método para produzir um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, o método caracterizado pelo fato de que compreende (a) cultivar uma cepa de Bacillus, o DNA do qual, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb; e (b) recuperar o polipeptídeo.

10. Uso de i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4; e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de ser em ração para animal.

11. Uso de i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para o uso em ração para animal.

12. Método para melhorar a taxa de conversão de ração para animal (FCR), caracterizado pelo fato de que i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, é adicionado à ração.

13. Método para modular a microflora intestinal de animal, caracterizado pelo fato de que i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, são adicionados à ração.

14. Aditivo de ração para animal, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2; e

(b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura,

(c) pelo menos vitamina solúvel em água,

(d) pelo menos um traço de mineral, e/ou

(e) pelo menos um mineral macro.

15. Composição de ração para animal, caracterizada pelo fato de que tem um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e que compreende i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2.

16. Uso de uma cepa de *Bacillus*, cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb, caracterizado pelo fato de ser em ração para animal

18. Uso de uma cepa de *Bacillus* de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para o uso em ração para animal.

19. Método para melhorar a taxa de conversão de ração (FCR), caracterizado pelo fato de que uma cepa de *Bacillus* como definido na reivindicação 16 é adicionada à ração para animal.

20. Método para modular a microflora intestinal, caracterizado pelo fato de que uma cepa de *Bacillus* como definida na reivindicação 16 é adicionada à ração para animal.

21. Aditivo de ração para animal, caracterizado pelo fato de que compreende

- (a) uma cepa de *Bacillus* como definida na reivindicação 16; e
- (b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura,
- (c) pelo menos uma vitamina solúvel em água,
- (d) pelo menos um traço de mineral, e/ou
- (e) pelo menos um mineral macro.

5

22. Composição de ração para animal, caracterizada pelo fato de que têm um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e que compreende uma cepa de *Bacillus* como definido na reivindicação 16.

23. Microorganismo, caracterizado pelo fato de ser
10 *Enterococcus faecalis* DSM 18047.

24. Microorganismo, caracterizado pelo fato de ser
LactoBacillus salivarius DSM 18070.

RESUMO

“POLIPEPTÍDEO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA DE *BACILLUS* RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA MELHORAR A TAXA DE CONVERSÃO DE RAÇÃO, E PARA MODULAR A MICROFLORA INTESTINAL, USOS DE UM POLIPEPTÍDEO, E DE UMA CEPA DE *BACILLUS*, ADITIVO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, E, MICROORGANISMO”

A presente invenção diz respeito aos polipeptídeos isolados e seqüências de ácido nucleico isoladas que codificam os polipeptídeos, assim como a métodos para produzir e usar os polipeptídeos em ração para animal. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção é a chamada proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 que melhora a Taxa de Conversão de ração (FCR) e/ou atua como um modulador da microflora intestinal. A invenção além disso diz respeito ao uso probiótico de cepas de *Bacillus* que produzem proteínas relacionadas com L12.

“POLIPEPTÍDEO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA DE *BACILLUS* RECOMBINANTE, USO DE POLIPEPTÍDEO, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA MELHORAR A TAXA DE CONVERSÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, E PARA MODULAR A MICROFLORA INTESTINAL DE ANIMAL, ADITIVO DE RAÇÃO ANIMAL, E, COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL”

Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito a polipeptídeos isolados e seqüências de ácido nucléico isoladas que codificam os polipeptídeos. A invenção também diz respeito a construções de ácido nucléico, vetores e células hospedeiras que compreendem as seqüências de ácido nucléico, assim como métodos para produzir e usar os polipeptídeos em ração de animal, por exemplo para melhorar a Taxa de Conversão de Ração (FCR) e/ou para a modulação da microflora intestinal. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção é a chamado de proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, que tem a seqüência de aminoácido dos aminoácidos de +1 a +85 da SEQ ID NO: 2 aqui contida (em que segue os aminoácidos 1 a 85 da SEQ ID NO: 2). A invenção também diz respeito ao uso probiótico em ração de animal de cepas de *Bacillus* que produzem proteínas relacionada com a L12.

Fundamentos da Invenção

Fundamentos da Técnica

A WO 03/093453 divulga, no Exemplo 1, o planejamento de uma célula hospedeira de *Bacillus licheniformis* melhorada que não produz uma proteína extracelular pequena codificada pelos nucleotídeos de 601 a 978 da SEQ ID NO: 133 da WO 03/093453, a proteína tendo a seqüência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 134 da WO

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado que melhora a utilização da ração animal pela melhora da Taxa de Conversão de Alimento (FCR), e/ou pela modulação da microflora intestinal, caracterizado pelo fato de que é
5 selecionado do grupo que consiste de:

(a) um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácido que tem um grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado no programa Needle, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de
10 intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5;

(b) um polipeptídeo que é codificado por uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de baixa estringência com (i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou
15 (ii);
com a condição de que o polipeptídeo não é nenhum dos aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4.

2. Seqüência de ácido nucleico isolada que codifica o polipeptídeo como definido na reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que:

(a) hibridiza sob condições de estringência muito baixas com
20 (i) os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii); e/ou

(b) tem um grau de identidade com os nucleotídeos de 124 a
25 378 da SEQ ID NO: 1 de pelo menos 48%; como determinado pelo programa "align" usando a matriz de identidade padrão, uma penalidade de -16 para o primeiro resíduo de um intervalo e penalidades de -4 para resíduos adicionais de um intervalo;

com a condição de que a seqüência de ácido nucleico não é

SEQ ID NO: 3, não nucleotídeos de 601 a 978 da SEQ ID NO: 3, e não nucleotídeos de 1 a 381 da SEQ ID NO: 1.

3. Construção de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende a seqüência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo como definido na reivindicação 2 operavelmente ligado a uma ou mais seqüências de controle que direcionam a produção do polipeptídeo em uma célula hospedeira de *Bacillus*, célula hospedeira esta cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

4. Vetor de expressão recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 3.

5. Célula hospedeira de *Bacillus* recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 3 ou o vetor como definido na reivindicação 4, célula hospedeira esta cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

6. Método para produzir um polipeptídeo como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante como definido na reivindicação 5 para produzir um sobrenadante que compreenda o polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

7. Método para produzir um polipeptídeo como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende (a) cultivar uma cepa de *Bacillus*, o DNA do qual, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores,

leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb, cujo fragmento de PCR codifica uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 33% de identidade com aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2, como determinado pelo programa Needle, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; e (b) recuperar o polipeptídeo.

8. Uso de polipeptídeo, caracterizado pelo fato de ser em ração animal, o polipeptídeo sendo selecionado do grupo consistindo de:

(a) um polipeptídeo tendo aminoácidos 1-126 de SEQ ID NO:

10 4;

(b) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade com aminoácidos 1-85 de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado pelo programa Needle, usando a matriz de substituição, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; e

(c) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de estringência médias com (i) nucleotídeos 124-378 de SEQ ID NO:1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii).

9. Uso de um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para uso em ração animal, o polipeptídeo sendo selecionado do grupo consistindo de:

(a) um polipeptídeo tendo aminoácidos 1-126 de SEQ ID NO:

25 4;

(b) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade com aminoácidos 1-85 de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado pelo programa Needle, usando a matriz de substituição, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma

penalidade de abertura de intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; e

(c) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de estringência médias com (i) nucleotídeos 124-378 de SEQ ID NO:1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii).

10. Método para melhorar a taxa de conversão de ração para animal (FCR), caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é adicionado à alimentação, o polipeptídeo sendo selecionado do grupo consistindo de:

10 (a) um polipeptídeo tendo aminoácidos 1-126 de SEQ ID NO: 4;

(b) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade com aminoácidos 1-85 de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado pelo programa Needle, usando a matriz de substituição, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; e

(c) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de estringência médias com (i) nucleotídeos 124-378 de SEQ ID NO:1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii).

11. Método para modular a microflora intestinal de animal, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é adicionado à ração, o polipeptídeo sendo selecionado do grupo consistindo de:

25 (a) um polipeptídeo tendo aminoácidos 1-126 de SEQ ID NO: 4;

(b) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade com aminoácidos 1-85 de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado pelo programa Needle, usando

a matriz de substituição, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; e

5 (c) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de estringência médias com (i) nucleotídeos 124-378 de SEQ ID NO:1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii).

10 12. Aditivo de ração animal, caracterizado pelo fato de compreender um polipeptídeo e pelo menos um componente adicional selecionado a partir do grupo consistindo de vitaminas solúveis em gordura, vitaminas solúveis em água, traço de minerais, e minerais macro, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo de:

(a) um polipeptídeo tendo aminoácidos 1-126 de SEQ ID NO: 4;

15 (b) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade com aminoácidos 1-85 de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado pelo programa Needle, usando a matriz de substituição, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma penalidade de abertura de intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de
20 intervalo de 0,5; e

(c) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de estringência médias com (i) nucleotídeos 124-378 de SEQ ID NO:1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii).

25 13. Composição de ração animal, caracterizada pelo fato de ter um teor de proteína crua de 50 a 800 g/kg e compreendendo um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo de:

(a) um polipeptídeo tendo aminoácidos 1-126 de SEQ ID NO: 4;

(b) um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácido que tem um grau de identidade com aminoácidos 1-85 de SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%, como determinado pelo programa Needle, usando a matriz de substituição, usando a matriz de substituição BLOSUM62, uma
5 penalidade de abertura de intervalo de 10, e uma penalidade de extensão de intervalo de 0,5; e

(c) um polipeptídeo que é codificado por uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de estringência médias com (i) nucleotídeos 124-378 de SEQ ID NO:1, (ii) uma subsequência de (i) de pelo
10 menos 100 nucleotídeos, e/ou (iii) um filamento complementar de (i), ou (ii).

RESUMO

“POLIPEPTÍDEO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA DE *BACILLUS* RECOMBINANTE, USO DE POLIPEPTÍDEO, MÉTODOS PARA 5 PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA MELHORAR A TAXA DE CONVERSÃO DE RAÇÃO PARA ANIMAL, E PARA MODULAR A MICROFLORA INTESTINAL DE ANIMAL, ADITIVO DE RAÇÃO ANIMAL, E, COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO ANIMAL”

A presente invenção diz respeito aos polipeptídeos isolados e sequências de ácido nucleico isoladas que codificam os polipeptídeos, assim como a métodos para produzir e usar os polipeptídeos em ração para animal. Um exemplo de um polipeptídeo da invenção é a chamada proteína L12 de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 que melhora a Taxa de Conversão de ração (FCR) e/ou atua como um modulador da microflora intestinal. A invenção além disso diz respeito ao uso probiótico de cepas de *Bacillus* que produzem proteínas relacionadas com L12.

cópia

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste de:

5 (a) um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácido que tem um grau de identidade aos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 de pelo menos 33%;

(b) um polipeptídeo que é codificado por uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições de baixa estringência com

(i) nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1,

10 (ii) uma subseqüência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos, ou

(iii) um filamento complementar de (i), ou (ii);

(c) uma variante do polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido dos aminoácidos de 1 a 85 da SEQ ID NO: 2 que compreende
15 uma substituição, deleção, extensão, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos;

(d) uma variante alélica de (a) ou (b); e

(e) um fragmento de (a), (b), (c), ou (d);

20 com a condição de que o polipeptídeo não é nenhum dos aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que melhora a utilização da ração animal pela melhora da Taxa de Conversão de Alimento (FCR), e/ou pela modulação da microflora intestinal.

25 3. Seqüência de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência de ácido nucleico que codifica polipeptídeo, que

(a) codifica o polipeptídeo como definido na reivindicação 1;

(b) hibridiza sob condições de estringência muito baixas com

- (i) os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1,
 - (ii) uma subsequência de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos,
- e/ou

(iii) um filamento complementar de (i), ou (ii); e/ou

- 5 (c) tem um grau de identidade com os nucleotídeos de 124 a 378 da SEQ ID NO: 1 de pelo menos 48%; com a condição de que a sequência de ácido nucleico não é

(iv) a SEQ ID NO: 3, e não

(vi) os nucleotídeos de 601 a 978 da SEQ ID NO: 3, e não

- 10 (vi) os nucleotídeos de 1 a 381 da SEQ ID NO: 1.

4. Sequência de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que codifica o polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2.

- 15 5. Construção de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 3 a 4 operavelmente ligado a uma ou mais sequências de controle que direcionam a produção do polipeptídeo em uma célula hospedeira de *Bacillus*, célula hospedeira esta cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação
- 20 de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

6. Vetor de expressão recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 5.

- 25 7. Célula hospedeira de *Bacillus* recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende a construção de ácido nucleico como definida na reivindicação 5 ou o vetor como definido na reivindicação 6, célula hospedeira esta cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à

geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb.

8. Método para produzir um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que
5 compreende (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante como definido na reivindicação 7 para produzir um sobrenadante que compreenda o polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

9. Método para produzir um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, o método caracterizado pelo fato de
10 que compreende (a) cultivar uma cepa de Bacillus, o DNA do qual, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb; e (b) recuperar o polipeptídeo.

15 10. Uso de i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4; e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de ser em ração para animal.

11. Uso de i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma
20 das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para o uso em ração para animal.

12. Método para melhorar a taxa de conversão de ração para animal (FCR), caracterizado pelo fato de que i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como
25 definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, é adicionado à ração.

13. Método para modular a microflora intestinal de animal, caracterizado pelo fato de que i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, são adicionados à ração.

14. Aditivo de ração para animal, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2; e

(b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura,

(c) pelo menos vitamina solúvel em água,

(d) pelo menos um traço de mineral, e/ou

(e) pelo menos um mineral macro.

15. Composição de ração para animal, caracterizada pelo fato de que tem um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e que compreende i) um polipeptídeo tendo os aminoácidos de 1 a 126 da SEQ ID NO: 4 e/ou ii) um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2.

16. Uso de uma cepa de *Bacillus*, cujo DNA, quando colhido e usado como um padrão de DNA em uma reação de PCR com as SEQ ID NOs: 6 e 7 como iniciadores, leva à geração de um fragmento de PCR de um tamanho de aproximadamente 0,4 kb, caracterizado pelo fato de ser em ração para animal

17. Uso de uma cepa de *Bacillus* de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para o uso em ração para animal.

18. Método para melhorar a taxa de conversão de ração (FCR), caracterizado pelo fato de que uma cepa de *Bacillus* como definido na reivindicação 16 é adicionada à ração para animal.

19. Método para modular a microflora intestinal, caracterizado pelo fato de que uma cepa de *Bacillus* como definida na reivindicação 16 é adicionada à ração para animal.

20. Aditivo de ração para animal, caracterizado pelo fato de que compreende

- (a) uma cepa de *Bacillus* como definida na reivindicação 16; e
- (b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura,
- (c) pelo menos uma vitamina solúvel em água,
- (d) pelo menos um traço de mineral, e/ou
- (e) pelo menos um mineral macro.

5

21. Composição de ração para animal, caracterizada pelo fato de que têm um teor de proteína bruta de 50 a 800 g/kg e que compreende uma cepa de *Bacillus* como definido na reivindicação 16.

22. Microorganismo, caracterizado pelo fato de ser
10 *Enterococcus faecalis* DSM 18047.

23. Microorganismo, caracterizado pelo fato de ser
LactoBacillus salivarius DSM 18070.