



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0814817-1 B1**



**(22) Data do Depósito:** 11/06/2008

**(45) Data de Concessão:** 27/09/2022

---

**(54) Título:** MÉTODOS PARA SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE NOVA CÉLULA DE BACILLUS

**(51) Int.Cl.:** C12N 1/20; A23K 10/18; A23K 50/30; A23K 50/75; A23K 50/80; (...).

**(52) CPC:** C12N 1/20; A23K 10/18; A23K 50/30; A23K 50/75; A23K 50/80; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 06/07/2007 EP 07111939.0.

**(73) Titular(es):** CHR. HANSEN A/S.

**(72) Inventor(es):** INGE KNAP; ANE KNARREBORG; THOMAS DYRMANN LESER; BENTE LUND.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2008057296 de 11/06/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/007192 de 15/01/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 06/01/2010

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO DE BACILLUS RESISTENTE A BILE SECRETANDO ALTOS NÍVEIS DE FITASE. A presente invenção refere-se a uma composição de bacillus caracterizada por rápida germinação e crescimento em sais de bile (ambiente de intestino simulado) e por alto nível de secreção de fitase. A composição de bacillus pode ser usada como suplemento em alimentação animal onde ela tem um efeito probiótico (promoção de saúde) e aumenta a digestão e disponibilidade de nutrientes a partir de alimentações animais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS PARA SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE NOVA CÉLULA DE BACILLUS**".

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a uma composição de bacillus caracterizada por rápida germinação e crescimento em saís de bile (ambiente de intestino simulado) e por alto nível de secreção de fitase. A composição de bacillus pode ser usada como suplemento em alimentação animal onde ela tem um efeito probiótico (promoção de saúde e crescimento) e aumenta a digestão e disponibilidade de nutrientes de alimentações animais.

Antecedentes da Técnica

[0002] Bactérias probióticas como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são usadas na indústria de alimentação animal como suplementos para a dieta. Sua utilização está relacionada à habilidade de bacillus para substituir ou reduzir o uso de antibióticos, que são usados como promotores de crescimento na indústria de alimentação animal.

[0003] Christian Hansen A/S, Denmark comercializa um exemplo de um tal produto promotor de crescimento probiótico sob a marca registrada GalliPro® (depositada como DSM 17231). GalliPro® é uma composição de célula de esporo de *Bacillus subtilis*.

[0004] Além de modo sugerido de ações (por exemplo, modulação imune, modificador de flora intestinal) bacillus probióticos são capazes de produzir muitos componentes benéficos, tais como enzimas, que são excretadas no trato gastrointestinal (GIT) quando usadas como suplemento de alimentação animal. Enzimas tais como fitase são excretadas e aperfeiçoam a digestão e melhor tomada de alimentação animal (maior capacidade de digestão). A dieta (alimentação) é principalmente composta de origem de planta como grãos, milho, soja, óleo de soja e aminoácidos. No total estes efeitos contribuem para a produção de produtos animais

de custo efetivo. Uma das enzimas amplamente usadas na indústria animal é fitase. Fitase é aplicada para aperfeiçoamento da capacidade de digestão de fosforosos em dietas animais. Fitase é a forma predominante de fósforo em grãos cereais, sementes de óleos e legumes. Entretanto, animais monogástricos, tais como porcos, aves domésticas e peixes, utilizam pobremente esta fonte de fosfato porque eles carecem de enzima de trato gastrointestinal requisitada para liberação do fosfato a partir do complexo orgânico de fitato. Consequentemente, uma grande proporção de fitato na alimentação é consumida e passada através de trato GI e excretada no estrume. Em solo e ambientes de água a liberação catalisada de fosfato ocorre, e fitato em estrume possui um sério problema de poluição com fósforo contribuindo para eutroficação de águas de superfície. Em adição, produtores têm de usar um oneroso fósforo de alimentação suplementar para satisfazer requisitos de dieta de animais. Ainda, fitato tem propriedades antinutritivas incluindo formação de complexos com proteínas e cátions divalentes, assim reduzindo sua biodisponibilidade. É bem documentado que suplementação com fitase aperfeiçoa uso de fosfato em animais de produção monogástricos, e tem um efeito positivo sobre a biodisponibilidade de minerais.

[0005] Esporos de *Bacillus* podem passar a barreira gástrica ácida e germinar e crescer dentro de trato gastrointestinal (GIT) dos animais. Isto tem grandes vantagens, uma vez que quando ingeridos eles podem excretar numerosos tipos de componentes benéficos, por exemplo, bacteriocinas e também excretar enzimas úteis como fitase. Além disso, os esporos de *Bacillus* são termoestáveis durante um processo de pelotização de alimentação e são por meio do qual um excelente sistema de liberação para obter ambas, bacteriocinas e enzimas no trato gastrointestinal.

[0006] No processo de sobrevivência e proliferação de *Bacillus* no trato gastrointestinal, o papel da bile é importante. A bile é produzida

no fígado e estocada na vesícula biliar. A bile contém água, lecitina, bilirrubina e biliverdina e sais de bile.

[0007] É conhecido da literatura que a bile tem algumas influências negativas sobre a sobrevivência e germinação e crescimento de células de esporos de bacillus para células vegetativas no trato gastrointestinal de animais. Por isso a pesquisa está em andamento para encontrar linhagens de Bacillus resistentes a bile probióticas.

[0008] O artigo (Antonie Van Leeuwenhoek. 2006 Aug; 90(2):139-46. Epub 2006 Jul 4) descreve isolamento de um número de amostras/células Bacillus diretamente do intestino de galinhas. As células bacillus isoladas foram testadas para atividade probiótica. Os seis bacilli com mais alta atividade probiótica foram testes para resistência a sal de bile e foi verificado que um bacillus altamente probiótico específico tem uma resistência a sal de bile relativamente alta. Neste artigo não há especial foco sobre quaisquer períodos de tempo para o teste de resistência de bile. Na parte experimental as células de esporos de bacillus são simplesmente testadas para resistência após 5 dias de presença em sal de bile (ver parágrafo "teste simulado de tolerância a fluido de intestino delgado" na página 141).

[0009] US2003/0124104<sup>a</sup> descreve que endoesporos bacillus convencionais probióticos são sensíveis a baixa concentração de sais de bile, isto é, germinação e/ou reidratação de esporos são inibidas pela presença de mesmo baixas concentrações de sais de bile. Isto é contrário a outras bactérias tais como patógenos entéricos, tais como E. coli ou S. aureus (ver seção [0014] a [0015]). Em vista disto é sugerido separar/selecionar esporos de bacillus que sejam resistentes à atividade inibidora de sais de bile, e como um resultado, germinem em células vegetativas, que então colonizam o cólon (ver [0019]).

[00010] Os exemplos de trabalho são todos em presença e nenhum dado experimental real de célula de Bacillus específica realmente se-

leccionado é provido na descrição. Ainda as condições de seleção de sal de bile são relativamente geralmente descritas. Em particular não existem indicações de quaisquer períodos de tempo para as seleções de resistência a bile. Dito em outras palavras, baseado no ensinamento somente amplo/genérico deste documento pode-se selecionar células de *Bacillus* que somente podem crescer (germinar) lentamente, isto é, são capazes de germinação a partir de esporos para células vegetativas após, por exemplo, 20 horas na presença de quantidade relevante de sal de bile.

[00011] Neste documento não há descrição ou sugestão de seleção de células de *bacillus* que possam crescer (germinar) rapidamente, isto é, capazes de germinarem ou crescerem a partir de esporos para células vegetativas atingindo um definido ponto de crescimento dentro de um certo intervalo de tempo na presença de uma quantidade relevante de sal de bile.

[00012] Em resumo, as referências da técnica anterior com relação a seleção/separação de células de *bacillus* resistentes a bile não são focalizadas em rápido crescimento/germinação a partir de células de esporos para células de *bacillus* vegetativas.

[00013] A técnica anterior descreve um número de sistemas de testes/separação para seleção de linhagens de *bacillus* produzindo enzimas fitase. Um exemplo é US 6255098 na qual linhagens *bacillus* produzindo enzimas fitase são identificadas. Nada é mencionado sobre resistência a bile das linhagens de *bacillus* identificadas.

#### Sumário da Invenção

[00014] O problema a ser resolvido pela presente invenção é prover uma composição de *bacillus* que excreta altas quantidades de fitase no trato gastrointestinal (GIT) de um animal.

[00015] A solução é baseada em que os presentes inventores desenvolveram um novo processo de seleção para a identificação de no-

vas composições de bacillus aperfeiçoadas. Uma nova etapa importante do novo processo de seleção aqui descrito é para especificamente separar/selecionar células de esporos de bacillus com aperfeiçoada/rápida velocidade de germinação e crescimento a partir de esporos para células vegetativas na presença de sais de bile.

[00016] Como descrito acima, a técnica anterior descreveu processos para seleção de células de bacillus capazes de crescerem na presença de sais de bile, mas os processos de separação/seleção da técnica anterior NÃO focalizam sobre a velocidade de germinação e crescimento na presença de sal de bile. Da mesma maneira, as células de bacillus resistentes a bile selecionadas da técnica anterior não germinam e crescem rápido o suficiente para aquiescer com os critérios de velocidade ou germinação e crescimento como aqui descrito. Por exemplo, células bacillus isoladas diretamente do intestino de, por exemplo, galinhas (como, por exemplo, descrito no artigo de Antonie Van Leeuwenhoek discutido acima) no ambiente de intestino não são selecionadas (sob pressão natural) para germinarem e crescerem rapidamente no intestino.

[00017] Como aqui mostrado em exemplos de trabalho isto é também verdade para a composição de Bacillus comercialmente disponível GalliPro®, que simplesmente germina e cresce muito lentamente e não atinge o definido ponto de crescimento dentro das primeiras 20 horas na presença ou níveis fisiológicos de sais de bile para aquiescer com a velocidade de germinação e critérios de crescimento como aqui descritos. GalliPro® é uma composição de Bacillus subtilis que é bem sucedida comercialmente.

[00018] A nova DSM 19467 aqui descrita foi selecionada através de uso de GalliPro® como uma linhagem de partida e um processo de pressão seletivo e um subsequente isolamento para rápida germinação e crescimento a partir de esporos para células vegetativas na pre-

sença de sal de bile como aqui descrito. Ver, por exemplo, tabela 1 para ainda detalhes (GaliPro também pode ser aqui chamado DSM 17231). Na figura 1 isto é ilustrado esquematicamente .

[00019] Em resumo, é acreditado que nenhuma técnica anterior descreve uma composição de Bacillus isolada, que compreende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de bacillus, onde as células ou a composição de bacillus aquiesce com a rápida germinação e crescimento na presença de critérios de sal de bile como aqui descrito.

[00020] Sem ser limitado por teoria, os presentes inventores identificaram que rápida germinação e crescimento são aspectos muito importantes da invenção na medida em que esporos de bacillus, que são resistentes a bile mas não germinam e crescem rápido o suficiente, serão excretados antes de quaisquer características positivas, como produção de fitase, possam ser produzidas em quantidades significantes pelas células vegetativas de bacillus. Esporos de bacillus germinando muito lentamente simplesmente passarão através de trato gastrointestinal (GIT) antes das bactérias poderem produzir qualquer quantidade significativa de, por exemplo, fitase.

[00021] Após um número de testes e análises detalhadas, os inventores por isso escolhem trabalhar com uma faixa de tempo de até 20 horas e selecionar os esporos germinando e crescendo mais rápido dentro deste período de tempo na presença de altas concentrações fisiológicas de sais de bile. Sem ser limitado a teoria e baseado no trabalho experimental aqui mostrado, os presentes inventores identificaram que é importante ter uma rápida germinação e crescimento dentro das primeiras 18 e 19 horas na presença de 4 e 6 mM de sal de bile, respectivamente. Os presentes inventores então identificaram que uma vez células de bacillus, com rápida germinação e crescimento em meio de sal de bile, tenham sido selecionadas estas células são altamente úteis como células de partida para mutagênese para obter-se

novas células com aperfeiçoada produção de fitase.

[00022] Como mostrado na figura 1 e tabela 2, a linhagem selecionada resistente a bile, de rápido crescimento, DSM 19467, foi usada como linhagem de partida para mutação clássica e a linhagem DSM 19489 de alta produção de fitase foi selecionada. Similarmente uma linhagem DSM 19466 de organismo modificado genético (GMO) foi obtida através de uso de DSM 19467 como linhagem de partida. Como pode ser visto na tabela 2 e a descrição relacionada de exemplo 4, DSM 19489 e DSM 19466 produzem significativamente mais fitase que DSM 19467 e GalliPro. As linhagens DSM 19489 e DSM 19466 de alta produção de fitase foram novamente verificadas para suas habilidades para germinarem e crescerem rápido como aqui descrito e elas mantiveram a rápida germinação e crescimento da linhagem DSM 19467 selecionada resistente a bile, de rápido crescimento (ver exemplo 5 aqui).

[00023] Na figura 1 aqui isto é ilustrado esquematicamente.

[00024] As novas células de bacillus probióticas aqui descritas são assim aquelas que são resistentes a bile, de rápida germinação e crescimento, e excretando altas quantidades de fitase. As linhagens obtidas são extremamente úteis como composições de bacillus probióticas para adição a alimentação animal. Ela combina todas as habilidades benéficas das bactérias probióticas para sobreviverem e proliferarem no intestino de animais (com altos níveis de sal de bile presentes), inibem bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas), e adicionalmente excretam altas quantidades de fitase benéfica e útil para a digestão e tomada de fosforo disponível a partir de fitato.

[00025] Da mesma maneira, um primeiro aspecto da invenção refere-se a a uma composição de bacillus, que compreende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de esporos de bacillus, onde a composição de bacillus é caracterizada por:

(i): os esporos de bacillus têm uma rápida germinação e crescimento de esporo para célula vegetativa na presença de um meio de sal de bile compreendendo 4 e 6 mM de sais de bile, definido em que os esporos de bacillus atingem um ponto de crescimento de célula vegetativa de 0,4 OD<sub>630</sub> com menos de 18 e 19 horas, respectivamente, onde o ponto de crescimento de célula vegetativa é o ponto na curva de crescimento onde o valor de OD começa a aumentar (devido a crescimento das células vegetativas) em uma maneira contínua e atinge uma OD<sub>630</sub> de 0,4;

(I): onde o meio de sal de bile é o meio de caldo de infusão de vitela não-seletivo conhecido padrão (VIB) de exemplo 1 aqui suplementado com uma mistura de sal de bile compreendendo os sais de bile conjugados taurodesoxicolato e glicodesoxicolato e o sal de bile desconjugado desoxicolato nas proporções de 60% do taurodesoxicolato, 30% do glicodesoxicolato e 10% de desoxicolato; e onde as análises de ensaio OD são realizadas através das seguintes etapas:

(a): enchimento de uma cavidade em uma placa de microtitulação com 0,150 mL de meio de sal de bile tendo 10<sup>8</sup> esporos de bacillus por mL de meio (isto é, este é o tempo zero); e

(b): incubação de placa a 37°C sob condições atmosféricas e medindo os valores de OD<sub>630</sub>, usando um espectrofotômetro e com agitação antes de cada leitura, para obter uma curva de crescimento representativa sobre tempo;

e

(ii) as células vegetativas de bacillus estão produzindo fitase em uma quantidade de pelo menos 1,25 vezes mais que a célula bacillus referência DSM 19467, onde a quantidade de fitase produzida é medida através de ensaio de fitase padrão de presente exemplo 2 após crescimento de 4 horas a 37°C no meio de caldo de infusão de

coração (HIB) não-seletivo, padrão, conhecido, de presente exemplo 2; e

onde a análise de ensaio fitase é realizada através das seguintes etapas:

(a): obtenção de uma cultura por toda noite de células vegetativas de bacillus em um meio de cultura enriquecido; e

(b): transferência de um inoculum 1% da cultura de toda noite para meio HIB (isto é, este é o tempo zero) e incubação a 37°C até medição de atividade fitase.

[00026] Como discutido acima, a célula de bacillus de referência DSM 19467 é selecionada para rápida germinação e crescimento na presença de sal de bile através de uso de GalliPro® como linhagem de partida. DSM 19467 não é selecionada para aperfeiçoada produção de fitase. Sem ser limitado por teoria, é acreditado que aqui relevante produção de fitase de DSM 19467 corresponde a GalliPro®. Em relação a ponto (i) o ponto de crescimento de célula vegetativa para GalliPro é pelo menos 20 horas após incubação em 4 e 6 mM de sal de bile e para a nova linhagem DSM 19489, como aqui descrito, é após 14 e 15 horas em 4 e 6 mM de sais de bile, respectivamente (ver presente figura 2 e exemplo de trabalho).

[00027] É aqui relevante notar que os presentes inventores também testaram o produto CALSPORIN® comercialmente disponível (Calpis Co., Ltd., Japan) para determinar o ponto de crescimento de célula vegetativo sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto. Como para GalliPro® o produto comercial CALSPORIN® é uma composição de Bacillus subtilis usado como um aditivo de alimentação probiótico. O ponto de crescimento de célula vegetativo sob as condições de ponto (i) do primeiro aspecto para CALSPORIN® foi mais que 20 horas em sais de bile a 4 e 6 mM, respectivamente. Isto é consideravelmente mais que as 18 e 19 horas requeridas sob o ponto (i) e isto ilustra que

produtos comercialmente disponíveis não foram até agora selecionados para rápida germinação e crescimento. Como discutido acima, células bacillus "naturais" não estiveram sob qualquer pressão seletiva para obter rápida germinação e crescimento. Sem estar limitado a teoria, por isso é acreditado que células bacillus "naturais" não estão aquiescendo com as condições de ponto (i) de primeiro aspecto.

[00028] Ambas, a resistência a bile [de ponto (i)] e ensaio fitase [de ponto (ii)] são baseados em elementos padrões comercialmente disponíveis, conhecidos (tais como, por exemplo, meios padrões, sais de bile; medições OD padrões e testes padrões). A célula de bacillus referência é depositada como DSM 19467 e é por isso publicamente disponível. A célula de *Bacillus subtilis* GalliPro® é depositada como DSM 17231 (chamada "GalliPro®") e é por isso publicamente disponível.

[00029] Da mesma maneira, baseado na presente descrição detalhada de ensaio (ver, por exemplo, presente exemplo 1 para ensaio de resistência a bile e presente exemplo 2 para ensaio fitase) aqueles versados na técnica são rotineiramente capazes de repetir estes ensaios para determinar objetivamente se uma específica célula de bacillus de interesse aquiesce com os níveis de resistência a bile [de ponto (i)] e fitase [de ponto (ii)] do primeiro aspecto da invenção.

[00030] A nova composição de bacillus como aqui descrita pode ser usada como um suplemento probiótico para alimentação animal. A dose e administração podem ser feitas de acordo com a técnica como, por exemplo, feito para a técnica anterior de composições de bacillus GalliPro®.

[00031] Da mesma maneira, um segundo aspecto da invenção refere-se a um processo para alimentação de um animal compreendendo administração de composição de bacillus de primeiro aspecto e realizações relacionadas aqui descritas a um animal em conjunção com outros ingredientes de alimentação animal.

[00032] Um terceiro aspecto da invenção refere-se a um processo para seleção e isolamento de uma nova célula bacillus compreendendo as seguintes etapas:

(a): seleção e isolamento a partir de uma reunião de células esporos de bacillus individuais de uma nova célula de esporo de bacillus que é capaz de germinar e crescer tão rapidamente que ela atinge um ponto de crescimento de célula vegetativa dentro de menos que 18 e 19 horas sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto;

(b): obtenção de uma célula de bacillus vegetativa da célula de esporo isolada de etapa (a) e obtendo mutação de nova célula selecionada e isolada para obter uma reunião de novas células vegetativas de bacillus individuais;

(c): seleção e isolamento da reunião de novas células vegetativas de bacillus individuais de etapa (b) de uma nova célula vegetativa de bacillus que é capaz de produzir fitase em uma quantidade de pelo menos 1,25 vezes mais que a célula de bacillus referência depositada como número de registro DSM 19467 sob as condições de ponto (ii) de primeiro aspecto; e

(d): análise de célula de bacillus vegetativa de alta produção de etapa (c) para confirmar que ela manteve a rápida germinação e crescimento de etapa (a) e isolando a célula de bacillus selecionada.

[00033] É evidente para aqueles versados na técnica que uma vez que os presentes inventores tenham mostrado os relevantes ensaios testes (em particular o ensaio para testar rápida germinação e crescimento de exemplo 1) mais a linhagem referência DSM 19467 será trabalho de rotina para aqueles versados na técnica selecionar outras novas células de bacillus aquiescendo com os critérios do presente primeiro aspecto.

[00034] Como aqui discutido, através do uso de novo processo de separação/seleção como aqui descrito os inventores selecionaram e

isolaram um número de novas células de bacillus aperfeiçoadas, que foram depositadas.

[00035] Da mesma maneira, um quarto aspecto da invenção refere-se a uma célula bacillus selecionada do grupo consistindo em:

(a) uma célula de Bacillus subtilis com número de registro DSM 19467;

(b) uma célula de Bacillus subtilis com número de registro DSM 19489; e

(c) uma célula de Bacillus subtilis com número de registro DSM 19466;

ou uma sua linhagem mutante, onde a linhagem mutante é obtida através do uso de uma das linhagens depositadas como material de partida e onde a linhagem mutante retém as propriedades essenciais da linhagem depositada.

[00036] Uma modalidade da presente invenção é descrita abaixo, somente a título de exemplo.

#### Definições

[00037] Todas as presentes definições de termos relevantes estão de acordo com o que pode ser entendido por aqueles versados na técnica em relação ao presente contexto técnico relevante.

[00038] O termo "célula bacillus" refere-se aqui a ambas, uma célula de esporo bacillus e uma célula vegetativa bacillus.

[00039] O termo "esporo bacillus" em relação a célula de esporo bacillus refere-se aqui a um esporo que de acordo com a técnica pode ser caracterizado como uma estrutura dormente, embora, não-reprodutiva, produzida por bactérias bacillus. A função primária de esporos é geralmente assegurar a sobrevivência de uma bactéria através de períodos de tensão ambiental. Por isso eles são resistentes a radiação ultravioleta e gama, dessecação, lisozima, temperatura, privação prolongada e contínua de alimento, e desinfetantes químicos. Esporos

são comumente encontrados no solo e água, onde eles podem sobreviver por longos períodos de tempo. O revestimento de esporo é impermeável a muitas moléculas tóxicas e também podem conter enzimas que estão envolvidas em germinação. O núcleo tem estruturas de célula normal, como ADN e ribossomas, mas é metabolicamente inativo. Quando uma bactéria detecta que condições ambientais estão se tornando desfavoráveis ela pode iniciar o processo de esporulação, que leva cerca de oito horas.

[00040] O termo "célula vegetativa de bacillus" refere-se a células de bacillus vegetativas funcionais, que podem se dividir para produção de mais células vegetativas.

[00041] O termo "germinação e crescimento" refere-se àqueles esporos de bacillus que germinam e crescem para células vegetativas de bacillus. Como conhecido por aqueles versados na técnica reativação do esporo ocorre quando condições são favoráveis e envolve germinação e crescimento. Germinação envolve o esporo dormente iniciar atividade metabólica e assim quebrando hibernação. Ela é comumente caracterizada por ruptura ou absorção do revestimento de esporo, intumescimento do esporo, um aumento em atividade metabólica, e perda de resistência a tensão ambiental. Crescimento segue germinação e envolve o núcleo do esporo fabricando novos componentes químicos e exibindo o velho revestimento de esporo para desenvolver em uma célula bacteriana vegetativa funcional, que pode se dividir para produzir mais células.

[00042] Curvas de crescimento (OD versus tempo) de células de bacillus mostram distintas fases de crescimento. Quando os esporos são transferidos para um meio rico em nutriente a germinação é iniciada seguida por uma diminuição temporária em OD (fase I), que é devida à liberação de ácido dipicolínico e consequentemente hidratação do revestimento de esporo. Na segunda fase (fase II = fase de crescimen-

to) há um período com uma mudança relativamente pequena em OD, até os esporos serem desenvolvidos em células bacterianas vegetativas funcionais, que podem se dividir para produzir mais células e pelo que renderem um aumento contínuo em valor de OD. O ponto quando se começa a obter o aumento contínuo em valores OD atingindo uma OD de 0,4 é aqui chamado "ponto de crescimento de célula vegetativo".

[00043] O termo "densidade ótica" é definido como uma medida de absorbância ótica usando um espectrofotômetro. Densidade ótica (OD) é a absorbância de um elemento ótico para um dado comprimento de onda  $\lambda$  por unidade de distância. Se OD é, por exemplo, medida em comprimento de onda de 630 nm ele pode ser referido como OD<sub>630</sub>.

#### Desenhos

[00044] Figura 1: Nesta figura as etapas para obtenção das presentes novas linhagens aperfeiçoadas são ilustradas. Os presentes exemplos de trabalho foram iniciados a partir de DSM 17231 (GalliPro), que foi submetida a mutação clássica e separada/selecionada para rápida germinação e crescimento na presença de sal de bile para obtenção da nova linhagem selecionada DSM 19467. DSM 19467 foi usada como linhagem de partida para mutação clássica e a linhagem DSM 19489 de alta produção de fitase foi selecionada. Similarmente um linhagem DSM 19466 de organismo modificado genético (GMO) foi obtida através do uso de DSM 19467 como linhagem de partida.

[00045] Figuras 2a e 2b: Estas figuras mostram claramente a germinação e crescimento rápidos, aperfeiçoados, de esporos de bacillus DSM 19489 da presente invenção comparado a DSM 17231 na presença de 4 e 6 mM de sal de bile como aqui descrito.

#### Descrição Detalhada da Invenção

##### Composição de bacillus:

[00046] O termo "composição de bacillus" deve ser entendido de

acordo com a técnica. Ele é aqui entendido como uma composição de bacillus compreendendo um número de células de esporos de bacillus com uma característica de interesse.

[00047] A composição de bacillus pode compreender diferentes tipos de células de bacillus, por exemplo, *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis*). Em essência a composição pode simplesmente compreender a quantidade de células de esporos de bacillus dada aqui no primeiro aspecto, onde as células de bacillus aquiescem com os critérios dados no primeiro aspecto.

[00048] Como é conhecido por aqueles versados na técnica, composições de células de esporos de bacillus comercialmente relevantes aqui são geralmente fabricadas por fermentação. As células de esporos obtidas são geralmente concentradas, secadas, misturadas com um carreador e embaladas em um recipiente apropriado.

[00049] As relevantes, por exemplo,  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de bacillus da composição podem estar presentes em uma forma comercialmente relevante conhecida por aqueles versados na técnica.

[00050] Da mesma maneira, em uma realização  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de esporos de bacillus da composição estão presentes como células secadas (por exemplo, secadas por espargimento) ou como células de esporos congeladas.

[00051] Em uma realização preferida a composição de bacillus compreende de  $10^6$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de esporos de bacillus, mais preferivelmente de  $10^7$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de esporos de bacillus. O termo "CFU/g" refere-se ao peso em gramas da composição como tal, incluindo apropriados aditivos relevantes presentes na composição. Ele não inclui o peso de um apropriado recipiente usado para embalar a composição de bacillus.

[00052] Uma realização refere-se a que a composição de bacillus é embalada em um recipiente apropriado.

[00053] Como conhecido por aqueles versados na técnica uma composição bacteriana comercialmente relevante também geralmente compreende outros aditivos relevantes tais como, por exemplo, um veículo/ingrediente do grupo pertencendo a soro de leite coalhado, permeado de soro de leite coalhado, carbonato de cálcio/calcário e agentes anti-formação de torta como silicatos de alumínio e kieselgur (terra diatomácea).

[00054] Além das células de bacillus aqui relevantes a composição também pode compreender outros micro-organismos relevantes de interesse, tais como, por exemplo, bactérias de ácido láctico de interesse.

#### Células Bacillus

[00055] A célula de bacillus pode ser qualquer célula bacillus relevante de interesse.

[00056] Em uma modalidade preferida a célula bacillus é pelo menos uma célula bacillus selecionada de uma espécie bacillus selecionada do grupo consistindo em: *Bacillus subtilis*, *Bacillus uniflagellatus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laterosporus* BOD, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, e *Bacillus stercorophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus thermophilus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, e *Bacillus circulans*.

[00057] Em uma modalidade mais preferida a célula de bacillus é uma célula de *B. subtilis* ou uma célula de *B. licheniformis*.

[00058] É mais preferido que a célula de bacillus seja uma célula de *B. subtilis*.

#### Ensaio para selecionar rápida germinação e crescimento na presença de sal de bile

[00059] Como discutido acima o ensaio de resistência a bile de ponto (i) de primeiro aspecto é baseado em elementos padrões comercialmente disponíveis (tais como, por exemplo, meios padrões, sais de

bile; medições de OD padrões).

[00060] Da mesma maneira, baseado na presente descrição de ensaio detalhada (ver, exemplo 1 aqui) aqueles versados na técnica são rotineiramente capazes de repetir este ensaio para determinar objetivamente se uma específica célula de esporo de bacillus de interesse aquiesce com os critérios de uma rápida germinação e crescimento a partir de esporo para célula vegetativa como descrito no ponto (i).

[00061] No ponto (i) é explicado que ponto de crescimento de célula vegetativa é o ponto em uma curva de crescimento partindo com  $10^8$  esporos/mL correspondendo a OD de ao redor de 0,2-0,3 até o momento onde o valor de OD aumentou (devido a crescimento das células vegetativas) em uma maneira contínua e atingiu OD de 0,4. Isto está de acordo como aqueles versados na técnica podem entender um tal ponto de crescimento de célula vegetativa e baseado em uma curva de crescimento aqueles versados na técnica podem rotineiramente determinar o mesmo, dentro de uma variabilidade limitada de cerca de +/- 30 minutos, como aqui explicado.

[00062] O presente exemplo de trabalho 1 provê uma descrição detalhada de um ensaio de resistência a bile apropriado para selecionar rápida germinação e crescimento na presença de sal de bile. As condições detalhadas deste exemplo 1 são um ensaio preferido para determinar se uma célula de esporo de Bacillus de interesse aquiesce com os critérios de ponto (i) de primeiro aspecto.

[00063] O termo "sal de bile" refere-se ao sal de ácidos de bile. Ácidos de bile são ácidos esteróides encontrados predominantemente na bile de mamíferos. Eles são produzidos no fígado através de oxidação de colesterol, e são estocados na vesícula biliar e secretados no intestino na forma de sais. Eles atuam como tensoativos, emulsificando lipídeos e auxiliando com sua absorção e digestão. Os sais de bile usados no exemplo 1 foram preparados imitando as concentrações fisio-

lógicas e composições de sais de bile suína. Como conhecido por aqueles versados na técnica composições de sais de bile suína podem ser aqui consideradas como condições relativamente 'duras' como comparadas a composições de sal de bile de ave.

[00064] O termo "meio sal de bile" refere-se a um meio compreendendo ingredientes relevantes de crescimento de bacillus tais como nutrientes relevantes e sal de bile.

Ponto de crescimento de célula vegetativa – em ensaio de sal de bile – ponto (i) de primeiro aspecto

[00065] Como dito acima, em relação a ponto (i) de primeiro aspecto as células de esporos de bacillus, como aqui descritas, têm uma germinação e crescimento a partir de esporos para célula vegetativa que é tão rápido que elas atingem um ponto de crescimento de célula vegetativa de OD de 0,4 dentro de menos que 18 e 19 horas em 4 e 6 mM de sais de bile, respectivamente. Como dito acima, a nova linhagem DSM 19467 atinge o ponto de crescimento de célula vegetativa após 14 e 15 horas de incubação em 4 e 6 mM de sal de bile, respectivamente.

[00066] Da mesma maneira, em uma realização preferida os esporos de bacillus atingem o ponto de crescimento de célula vegetativa após 17 e 18 horas de incubação em 4 e 6 mM de sal de bile sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto, mais preferivelmente os esporos de bacillus atingem o ponto de crescimento de célula vegetativa após 15 e 16 horas de incubação em 4 e 6 mM de sal de bile sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto.

[00067] Como explicado acima e mostrado esquematicamente na figura 1 a nova linhagem DSM 19467 aqui descrita foi selecionada através do uso de GalliPro® comercialmente disponível como uma linhagem de partida para mutagênese e seleção para rápido crescimento na presença de sal de bile como aqui descrito. GalliPro® é uma

composição compreendendo células de *Bacillus subtilis* e o *Bacillus subtilis* é depositado como DSM 17231. Da mesma maneira, GalliPro® pode ser visto aqui como uma linhagem referência.

[00068] Como dito acima, o ponto de início de crescimento de célula vegetativa para GalliPro® é após 20 horas de incubação em 4 e 6 mM de sais de bile sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto. Da mesma maneira, em uma modalidade os esporos de bacillus atingem o ponto de crescimento de célula vegetativa pelo menos 3 horas mais cedo que as células de esporos de *Bacillus subtilis* referência depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto, mais preferivelmente os esporos de bacillus atingem o ponto de crescimento de célula vegetativa pelo menos 4 horas antes que as células de esporos de *Bacillus subtilis* referência depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") sob as condições de ponto (i) de primeiro aspecto, e mais preferivelmente os esporos de bacillus atingem o ponto de início de crescimento de célula vegetativa pelo menos 5 horas antes que as células de esporos de *Bacillus subtilis* referência depositadas como DSM 17231 ("GalliPro®") sob as condições de ponto (i) do primeiro aspecto.

#### Ensaio Fitase

[00069] Como discutido acima o ensaio fitase de ponto (ii) de primeiro aspecto é baseado em elementos comercialmente disponíveis, conhecidos, padrões (tais como, por exemplo, meios padrões, testes padrões).

[00070] Da mesma maneira, baseado na presente detalhada descrição de ensaio (ver presente exemplo 2) aqueles versados na técnica são rotineiramente capazes de repetir este ensaio para determinar objetivamente se uma específica célula vegetativa de bacillus de interesse aquiesce com a quantidade de fitase produzida como descrito no ponto (ii).

[00071] O exemplo de trabalho 2 aqui provê uma descrição deta-

lhada de um ensaio fitase. As condições detalhadas deste exemplo 2 são aqui um ensaio fitase preferido para determinar se uma célula vegetativa de bacillus de interesse aquiesce com os critérios de ponto (ii) de primeiro aspecto.

Quantidade produzida de fitase – ponto (ii) de primeiro aspecto

[00072] Como dito acima, em relação a ponto (ii) de primeiro aspecto, as células vegetativas de Bacillus estão produzindo fitase em uma quantidade de pelo menos 1,25 vezes mais que a célula Bacillus referência DSM 19467 sob as condições de ponto (ii) de primeiro aspecto.

[00073] Em uma modalidade preferida, as células vegetativas de Bacillus estão produzindo fitase em uma quantidade de pelo menos 1,5 vezes mais que a célula Bacillus referência DSM 19467 sob as condições de ponto (ii) de primeiro aspecto, mais preferivelmente as células vegetativas de Bacillus estão produzindo fitase em uma quantidade de pelo menos 1,75 vezes mais que a célula Bacillus referência DSM 19467 sob as condições de ponto (ii) de primeiro aspecto.

Um processo para alimentação/administração de esporos de bacillus a um animal

[00074] Como dito acima um segundo aspecto da invenção refere-se a um processo para alimentação de um animal compreendendo administração de composição de bacillus de primeiro aspecto e realizações relacionadas aqui descritas, a um animal em conjunção com outros ingredientes de alimentação animal.

[00075] O animal pode ser qualquer animal de interesse. Preferivelmente, o animal é um animal selecionado do grupo consistindo em aves domésticas, ruminantes, bezerros, porcos, coelhos, cavalos, peixes e animais domésticos.

[00076] Quando administrando GalliPro® de acordo com a técnica isto é normalmente feito em uma dose de cerca de  $10^4$ - $10^8$  CFU/g de alimentação, comumente  $10^5$ - $10^6$  CFU/g de alimentação ou em doses

equivalentes para tomada de alimentação normal/kg de peso de animal vivo.

[00077] Alternativamente, os esporos de bacillus podem ser administrados ao animal em uma das seguintes maneiras:

(1): colocação dos mesmos em água de beber para animais;

(2): espargidos sobre animais; ou

(3): aplicação via pasta, gel ou pílula de quantidade relativamente grande.

#### Um processo para separação e isolamento de uma nova célula bacillus

[00078] Como dito acima, o terceiro aspecto refere-se a um processo para seleção e isolamento de uma nova célula de bacillus.

[00079] No processo do terceiro aspecto é selecionada uma célula de bacillus capaz de satisfazer as condições de ponto (i) e (ii) do primeiro aspecto. Como entendido por aqueles versados na técnica, os específicos parâmetros aqui detalhados descreveram ensaio de resistência a bile e ensaio de quantidade de fitase (ver, por exemplo, presente exemplo 1 para ensaio de resistência a bile e presente exemplo 2 para ensaio de fitase) e podem ser alterados para obter um alternativo processo de seleção que ainda obtém as principais metas como aqui descrito, isto é, uma célula de bacillus que é capaz de satisfazer as condições de ponto (i) e (ii) do primeiro aspecto.

[00080] Em uma modalidade preferida, o ensaio de resistência a bile de exemplo 1 é usado em etapa (a) do processo de seleção de terceiro aspecto e o ensaio de fitase de exemplo 2 é usado na etapa (c) de processo de seleção de terceiro aspecto.

[00081] Na etapa (d) do processo de seleção de terceiro aspecto uma célula bacillus vegetativa é isolada. Esta célula bacillus vegetativa pode ser usada para obtenção de células de bacillus a partir da mes-

ma.

[00082] Da mesma maneira, em uma modalidade o processo de seleção de terceiro aspecto é seguido por uma etapa extra (e), onde a célula vegetativa de bacillus isolada de etapa (d) é fermentada para obter de  $10^5$  a  $10^{12}$  células vegetativas de bacillus e estas  $10^5$  a  $10^{12}$  células vegetativas de bacillus são usadas para obtenção de  $10^5$  a  $10^{12}$  células de esporos de bacillus, que são isoladas para renderem uma composição de Bacillus, que compreende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de esporos de bacillus.

[00083] O resultado final de etapa (e) é uma nova composição Bacillus, que compreende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g células de esporos de bacillus, e onde as células de bacillus são capazes de satisfazer as condições de ponto (i) e (ii) do primeiro aspecto.

[00084] Da mesma maneira, um aspecto separado da invenção refere-se a uma composição de Bacillus, que compreende de  $10^5$  a  $10^{12}$  CFU/g de células de esporos de bacillus, e onde as células de bacillus são capazes de satisfazer as condições de ponto (i) e (ii) do primeiro aspecto obtível através de processo de seleção de terceiro aspecto seguido por etapa (f) extra descrita acima.

[00085] Na etapa (b) do processo de seleção de terceiro aspecto são feitas mutações para a célula de bacillus resistente a bile selecionada anteriormente para selecionar células produzindo alta quantidade de fitase em etapa (c). Como entendido por aqueles versados na técnica isto pode, por exemplo, ser através de mutação clássica (por exemplo, através de tratamentos químicos ou UV) de específicas mudanças de genes para obter um assim chamado Organismo Modificado Genético (GMO). Por exemplo, a aqui descrita nova linhagem GMO DSM 19466 foi derivada de GalliPro® e foi primeiro feita resistente a bile como descrito no presente exemplo de trabalho para obter DSM 19467. A seguir, o promotor de fitase na linhagem DSM 19467 foi tro-

cado com um outro promotor bacillus para tornar o mesmo um alto produtor de enzima fitase e assim DSM 19466 foi obtida. Similarmente, a nova linhagem de alta produção de fitase DSM 19489 foi obtida através do uso de mutação clássica partindo de DSM 19467. Ver, por exemplo figura 1.

#### Linhagens Depositadas

[00086] Como dito acima um quarto aspecto da invenção refere-se a uma célula de bacillus selecionada do grupo consistindo em:

(a) uma célula de Bacillus subtilis com número de registro DSM 19467;

(b) uma célula de Bacillus subtilis com número de registro DSM 19489; e

(c) uma célula de Bacillus subtilis com número de registro DSM 19466;

ou uma sua linhagem mutante, onde a linhagem mutante é obtida através de uso de uma das linhagens depositadas como material de partida e onde a linhagem mutante retém as propriedades essenciais da linhagem depositada.

[00087] O quarto aspecto da invenção refere-se à nova linhagem aqui descrita ou "um seu mutante".

[00088] É claro para aqueles versados na técnica que através do uso de linhagem depositada como material de partida, o leitor versado na técnica pode rotineiramente, através de convencionais técnicas de mutagênese ou reisolamento, obter ainda mutantes ou seus derivados que retêm aqui as relevantes características e vantagens descritas. Da mesma maneira, o termo "um seu mutante" do primeiro aspecto refere-se a linhagens mutantes obtidas através de linhagem depositada como material de partida.

[00089] Isto pode ser alternativamente formulado como um processo para obter uma linhagem, compreendendo uso de uma das linha-

gens aqui depositadas como linhagem de partida, obtendo mutantes da linhagem depositada e isolando uma nova linhagem onde o mutante reteve as propriedades essenciais da linhagem depositada.

[00090] Uma amostra da nova linhagem de *Bacillus subtilis* foi depositada em DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) sob o número de acesso DSM 19467 com uma data de depósito de 27 de junho de 2007. O depósito foi feito sob as condições do Tratado de Budapeste do Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para os Propósitos de Procedimento de Patente.

[00091] Uma amostra da nova linhagem de *Bacillus subtilis* foi depositada em DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) sob o número de acesso DSM 19489 com a data de depósito de 27 de junho de 2007. O depósito foi feito sob as condições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para os Propósitos de Procedimento de Patente.

[00092] Uma amostra da nova linhagem de *Bacillus subtilis* DSM 19466 foi depositada em DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) sob o número de acesso DSM 19466 com uma data de depósito de 27 de junho de 2007. O depósito foi feito sob as condições do tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Micro-organismo para os Propósitos de Procedimento de Patente.

### Exemplos

#### Exemplo 1: Ensaio de resistência a bile

#### Meio:

[00093] O meio foi meio comercialmente disponível não-seletivo padrão de caldo de infusão de vitela (VIB) (Difco, 234420). Na data de

depósito do presente pedido de patente o catálogo de produto ("Difco/BBL o caldo de infusão de vitela:

[00094] "Infusão de vitela magra e peptona provê o nitrogênio, vitaminas, carbono e aminoácidos em meios de infusão de vitela. Cloreto de sódio mantém o balanço osmótico das formulações"; e

[00095] O meio foi preparado de acordo com as instruções de fabricação através de suspensão de 25 g do pulverizado de caldo de infusão de vitela em 1 L de água purificada (solução 2,5%) e aquecido com agitação frequente e colocado em ebulição por 1 minuto para dissolver completamente o pulverizado. Uma solução de caldo de infusão de vitela 2,5% compreendeu por litro:

Vitela magra, infusão: 10 g

Peptona proteose: 10 g

Cloreto de sódio: 5 g

[00096] O meio foi distribuído em garrafas estéreis e autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Soluções de sal de bile/meio:

[00097] Misturas de sais de bile foram preparadas imitando a composição e concentração fisiológicas de sais de bile em bile de porco e os sais de bile foram dissolvidos no meio de caldo de infusão de vitela como preparado acima para renderem uma concentração final de sal de bile de 8 mM. Os sais de bile conjugados foram taurodesoxicolato (Sigma T-0875, US) e glicodesoxicolato (Sigma G-9910, U.S.) e o sal de bile desconjugado desoxicolato (Sigma D-5670 U.S.) e a solução de sal de bile mista 8 mM conteve 60% do taurodesoxicolato, 30% do glicodesoxicolato e 10% de desoxicolato. Antes de autoclavagem por 15 minutos a 121°C, as soluções foram ajustadas para pH 7,4 usando hidróxido de sódio. O meio de sal de bile 8 mM preparado foi diluído para render concentrações de sal de bile de 0, 1, 2, 4, 6 e 8 mM.

[00098] Os sais de bile foram adicionados ao meio de caldo de infu-

são de vitela na forma de concentrado. Assim, a quantidade final do caldo de infusão de vitela magra, peptona Proteose e cloreto de sódio foi essencialmente de 2,5% do meio de caldo de infusão de vitela, antes da adição dos sais de bile.

[00099] Para distinguir entre células vegetativas e esporos e para assegurar produtos de esporos puros para inoculação, as contagens de esporos do produto de bacillus foram determinadas usando tratamento térmico a  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após tratamento térmico e subsequente resfriamento para temperatura ambiente, diluições seriadas de 10 vezes foram conduzidas em peptona água salina. Duplicatas de placas de Agar Sangue Triptose (Difco 0232-01) foram inoculadas com 0,1 mL a partir das apropriadas diluições decimais. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  até o dia seguinte. Baseado em determinações de contagem de esporos precedentes dos produtos, suspensões de esporos foram preparadas em água destilada estéril para atingir concentração de esporos calculada final de  $10^8$  CFU/mL. As contagens de células vegetativas e esporos nos inocula finais foram determinadas usando o processo descrito acima. A concentração final de  $10^8$  CFU/mL correspondeu a uma  $\text{OD}_{630}$  de partida em 0,2-0,3.

Medição de crescimento: medições de densidade ótica

[000100] Para evitar condensação sobre o interior da cobertura de placa, as tampas foram expostas a uma solução diluída de Triton X-100.

[000101] As cinéticas de germinação e crescimento de linhagens de Bacillus foram medidas usando um espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm ( $\text{OD}_{630}$ ) (Bio-tek Instruments, Inc. VE). Leituras foram realizadas com intervalos de 10 minutos e analisadas usando o software KC4 (Bio-tek Instruments, Inc., USA). Após 20 h, dados foram exportados para planilhas Excel para ainda análises, importadas em SAS versão 9.0 e analisadas estatisticamente.

Exemplo 2: Ensaio de atividade de fitase

[000102] O processo para medir e quantificar as unidades de enzima fitase produzidas pelas células bacillus usadas neste estudo foi adaptado de Walsh et al. 2004, Biochemistry & Molecular Biology Education vol. 32 no 5 (336-340). Essencialmente, a única adaptação significativa que foi feita de modo a padronizar o processo para o propósito de cinéticas de crescimento, foi através de medição de atividade fitase em relação ao número de células Bacillus viáveis usando um espectrofotômetro e medindo a densidade ótica (OD) em comprimento de onda 600 diluindo as células 1:4 com água de diluição se necessário. Através deste processo, é obtido um desvio padrão relativamente limitado.

Crescimento de células de Bacillus

[000103] As células de Bacillus são inoculadas e crescidas em um meio rico de crescimento de Bacillus a 37°C e o crescimento das linhagens de Bacillus e a atividade fitase acompanhados em intervalos de tempo de até 24 horas.

[000104] Os esporos de bacillus são propagados em meios baseados em caldo de infusão de coração (HIB) com a seguinte composição:

|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| HIB (Bacto 238400)                            | 25 g/L    |
| Extrato de levedura Bacto 0,5% (Difco 212750) | 5 g/L     |
| CaCl <sub>2</sub> 2 mM (Merck 1.02382)        | 0,294 g/L |

[000105] Autoclavado por 15 minutos a 121°C e adicionados manose 1% e glicose 1% filtradas e estéreis. HIB é um meio não-seletivo comercialmente disponível. Na data de depósito do presente pedido de patente o catálogo de produto do provedor BD Diagnostic

Caldo de infusão por litro foi:

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Coração bife, infusão a partir de 500 g: | 10,0 g |
| Triptose:                                | 10,0 g |
| Cloreto de sódio:                        | 5,0 g  |

[000106] O HIB suplementado é um meio com um baixo teor de fosfato e por isso é apropriado para ensaios de fitase. Após cultura por toda noite inoculum 1% é usado em meio HIB novo e incubação a 37°C até medição de atividade (por exemplo, após 4, 6, 8 e 24 horas).

[000107] Incubação do meio foi feita em blue cap Nunc de 50 mL ou em menores quantidades (0,150 mL) em placas ELISA de 96 cavidades com boa aeração.

#### Ensaio fitase

[000108] O ensaio fitase é realizado em sobrenadantes de células, uma vez que a enzima é secretada para os meios. As placas de microtitulação são centrifugadas em 3600 rpm por 15 minutos. Maiores volumes são centrifugados em 2400-3600 rpm e por 15 minutos em uma centrífuga Eppendorf. Remover cuidadosamente o sobrenadante, omitindo células antes de ensaio fitase.

#### Soluções:

0,1 M TRIS/malato pH 7,0

[000109] Solução A: 0,1 M TRIS/malato (ácido l-málico, Sigma M1000) pH 7,0 + 0,1 peso/volume sal de sódio de ácido fítico de milho (Sigma P8810) + CaCl<sub>2</sub> 2 mM (preparado recentemente antes de ensaio) = substrato

[000110] Solução B: 8 g de molibdato de amônio (Sigma A7302) + 50 mL de H<sub>2</sub>O + 27 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 M + H<sub>2</sub>O ad 100 mL.

[000111] Solução C: 5 g de FeSO<sub>4</sub> (Sigma F7002) + 90 mL de H<sub>2</sub>O (agitado até dissolvido) + 10 mL de solução B (feita recentemente) TCA 0,5 M (Merck 1.00807.1000) 8% peso/volume KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM

[000112] O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 cavidades contendo 0,020 mL de sobrenadante de Bacillus onde 0,080 mL de solução tampão de 0,1 M Tris/ácido málico pH 7,0 contendo ácido fítico 0,1% e CaCl<sub>2</sub> 2 mM (Solução A) foram adicionados. A placa foi incubada a 50°C por 30 minutos (placa coberta para evitar eva-

poração).

#### Reação de cor:

[000113] Adicionar 0,100 mL de ácido tricloro acético TCA 0,5 M

[000114] Adicionar 0,100 mL de solução de Fé++ (solução C)

[000115] Deixar por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma cor azul aparecerá.

[000116] Ler absorbância em 600 nm.

[000117] Este ensaio está medindo fosfato livre total no sobrenadante. De modo a determinar a quantidade de fundo de fosfato livre, o ensaio fitato também tem de ser realizado sem a presença do substrato (ácido fítico) para a enzima fitase. Isto significa que a Solução A no ensaio (ver acima) é substituída com um tampão TRIS/malato simples pH 7,0.

#### Cálculo de atividade fitase

[000118] A absorbância medida no ensaio representará o fosfato livre no meio e o fosfato liberado a partir de atividade fitase e por isso o fosfato livre no meio precisa ser subtraído. Para realizar isto, a amostra é medida em um tampão com e sem ácido fítico, e os dois são subtraídos, para obter atividade fitase pura. Corrigida para densidade de células ( $OD_{600}$ ) a atividade fitase da cultura de *Bacillus* é expressa como a atividade (unidades de absorbância) como foi feito neste caso:

#### Amostra com tampão + ácido fítico – amostra e tampão – ácido fítico

[000119] OD medida antes de centrifugação

#### Exemplo 3: Seleção de célula de *Bacillus subtilis* resistente a bile DSM 19467

[000120] A célula de bacillus de partida foi a célula de bacillus subtilis GalliPro®. GalliPro® sofreu mutagênese para obter-se uma reunião de novas células de bacillus individuais. Esporos foram obtidos e selecionados para rápida germinação e crescimento a partir de esporo para célula vegetativa na presença de um meio de sal de bile compreendendo 4 e 6 mM de sal de bile como descrito no exemplo 1 acima.

[000121] Célula de *Bacillus subtilis* DSM 19467 foi selecionada.

[000122] A Tabela 1 abaixo mostra dados de germinação e crescimento.

[000123] Tempo (horas) a partir de  $10^8$  CFU/mL correspondendo a OD 0,2-0,3 até OD 0,4 ser atingida (média de 3 réplicas).

| B. subtilis                                                  | Bile 4 mM         | Bile 6 mM |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| Produto existente GalliPro®<br>(DSM 17231)                   | >20               | >20       |
| Tolerante a bile e superexpressando<br>fitase<br>(DSM 19489) | 13 h e 40 minutos | 15 h      |
| Produto comercial: Calsporin                                 | >20               | >20       |

[000124] Seleção de DSM 19489 tolerante a bile e superexpressando fitase é descrita no Exemplo 4 abaixo. DSM 19467 tem germinação e crescimento grosseiramente como DSM 19489.

#### Conclusão

[000125] DSM 19489 e DSM 19467 são linhagens resistentes a bile e claramente germinando e crescendo mais rápido que GalliPro®.

Exemplo 4: Seleção de células de bacillus DSM 19489 (clássica) e DSM 19466 (GMO) de alta produção de fitase

[000126] A célula bacillus de partida foi a célula de bacillus subtilis DSM 19467 selecionada no exemplo 3.

[000127] DSM 19467 sofreu mutação através de mutação clássica pra obter uma reunião de novas células vegetativas de bacillus individuais. As células vegetativas foram selecionadas para produção de alta quantidade de fitase através do uso de ensaio fitase descrito no exemplo 2 acima. Célula de bacillus subtilis DSM 19489 (clássica) de alta produção de fitase foi selecionada.

[000128] O promotor de fitase na linhagem DSM 19467 foi trocado com um outro promotor bacillus tornando a mesma uma alta produtora de enzima fitase e assim DSM 19466 (GMO) foi obtida.

### Resultados de medições de fitase

#### Linhagens

[000129] DSM 19489 Bacillus subtilis resistente a bile e alta produção de fitase

[000130] DSM 19467 Bacillus subtilis resistente a bile linhagem mãe de DSM 19489

[000131] DSM 19466 Bacillus subtilis resistente a bile e gene modificado geneticamente codificando fitase (alto produtor de fitase)

[000132] Tabela 2. Resultados de fitase produzida pelas linhagens selecionadas medidas como descrito no exemplo 2 acima

| Tempo (horas) | 4    | 6    | 8    | 24   |
|---------------|------|------|------|------|
| DSM 19489     | 2,68 | 0,83 | 1,06 | 0,44 |
| DSM 19467     | 1,10 | 0,57 | 0,68 | 0,59 |
| DSM 19466     | 2,30 | 1,07 | 1,37 | 0,44 |

[000133] Linhagem DSM 19489 produz 2,68 unidades de fitase comparada a 1,10 unidades para DSM 19467 (que é a linhagem mãe resistente a bile referência). Um nível similar como DSM 19489 é obtido pela linhagem geneticamente modificada DSM 19466 resistente a bile (2,30) e assim também é uma alta produtora de fitase.

#### Conclusão

[000134] DSM 19489 é uma célula bacillus resistente a bile e de alta produção de fitase e neste exemplo produz 2 vezes mais fitase como comparada a DSM 19467, após 4 horas de crescimento no meio.

[000135] DSM 19466 (GMO) é a linhagem resistente a bile, onde o gene fitase é geneticamente modificado para ser um alto produtor de fitase, e similar a DSM 19489 produz 2 vezes mais fitase que a linhagem mãe (DSM 19467), medida após 4 horas de crescimento no meio.

[000136] DSM 19467 é originária de GalliPro e não é selecionada para alta produção de fitase. Da mesma maneira, é acreditado que GalliPro produz grosseiramente a mesma quantidade de fitase como

DSM 19467.

Exemplo 5: "Verificação" de resistência a bile de células de bacillus DSM 19489 (clássica) e DSM 19466 (GMO) de alta produção de fitase [000137] As células de bacillus de alta produção de fitase DSM 19489 (Clássica) e DSM 19466 (GMO) selecionadas no exemplo 4 foram reavaliadas para sua habilidade de rápida germinação e crescimento a partir de esporos para células vegetativas como descrito no exemplo 1.

[000138] Os resultados foram que ambas DSM 19489 e DSM 19466 mantiveram grosseiramente as mesmas rápida germinação e crescimento como a célula de partida DSM 19467 usada para obtenção das mesmas.

#### Referências

1. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006 Aug; 90(2):139-46.  
Epub 2006 Jul 4
2. US2003/0124104A
3. US6255098

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para seleção e isolamento de nova célula de bacillus, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(A) seleção e isolamento de uma coleção de células de esporos de bacillus individuais de uma nova célula de esporo de bacillus que é capaz de germinar e crescer tão rapidamente que ela atinge um ponto de crescimento de célula vegetativa dentro de menos do que 18 horas na presença de um meio de sal de bile compreendendo 4 mM de sais de bile e dentro de menos do que 19 horas na presença de um meio de sal de bile compreendendo 6 mM de sais de bile;

em que o ponto de crescimento de célula vegetativa é o ponto na curva de crescimento onde o valor de OD começa a aumentar (devido ao crescimento das células vegetativas) de forma contínua e atinge uma OD<sub>630</sub> de 0,4;

(I): em que o meio de sal biliar é o meio de caldo de infusão de vitela (VIB) não-seletivo do exemplo 1 aqui suplementado com uma mistura de sais biliares compreendendo os sais biliares conjugados taurodeoxicolato e glicodeoxicolato e o sal biliar desoxicolato desconjugado nas proporções de 60% de taurodeoxicolato, 30% do glicodeoxicolato e 10% de desoxicolato; e

(II): em que as análises de ensaio OD são realizadas através das seguintes etapas:

(a): encher uma cavidade em uma placa de microtitulação com 0,150 mL de meio de sal biliar tendo 10<sup>8</sup> esporos de bacillus por mL de meio (isto é, este é o tempo zero); e

(b): incubar a placa a 37°C sob condições atmosféricas e medir os valores de OD<sub>630</sub>, usando um espectrofotômetro e com agitação antes de cada leitura, para obter uma curva de crescimento representativa ao longo do tempo;

(B) obtenção de uma célula de bacillus vegetativa a partir

da célula de esporo isolada da etapa (A) e mutação da nova célula selecionada e isolada para obter uma reunião de novas células vegetativas de bacillus individuais;

(C) seleção e isolamento a partir da reunião de novas células vegetativas de bacillus individuais da etapa (B) de uma nova célula vegetativa de bacillus que é capaz de produzir fitase em uma quantidade de pelo menos 1,25 vezes mais do que a célula de bacillus de referência depositada com o número de registro DSM 19467,

em que a quantidade de fitase produzida é medida através de ensaio de fitase padrão do presente exemplo 2 após 4 horas de crescimento a 37°C no meio de caldo de infusão de coração (HIB) não-seletivo do presente exemplo 2; e

em que a análise de ensaio fitase é realizada através das seguintes etapas:

(a): fazer uma cultura durante a noite de células vegetativas de bacillus em um meio de cultura enriquecido; e

(b): transferir um inóculo de 1% da cultura durante a noite para meio HIB (isto é, este é o tempo zero) e incubar a 37°C até a medição da atividade de fitase; e

(D) análise da célula de bacillus vegetativa de alta produção da etapa (C) para confirmar que ela manteve sua rápida germinação e crescimento da etapa (A) e isolamento das células de bacillus selecionadas.

2. Método para seleção e isolamento de uma nova célula de bacillus, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula de bacillus é uma célula de *B. subtilis*.

FIG. 1

: *B. subtilis* strains

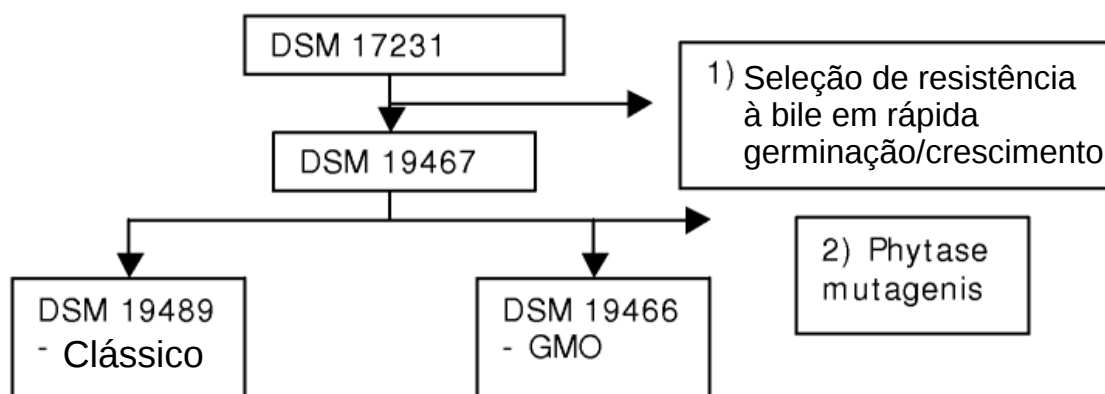


FIG. 2A

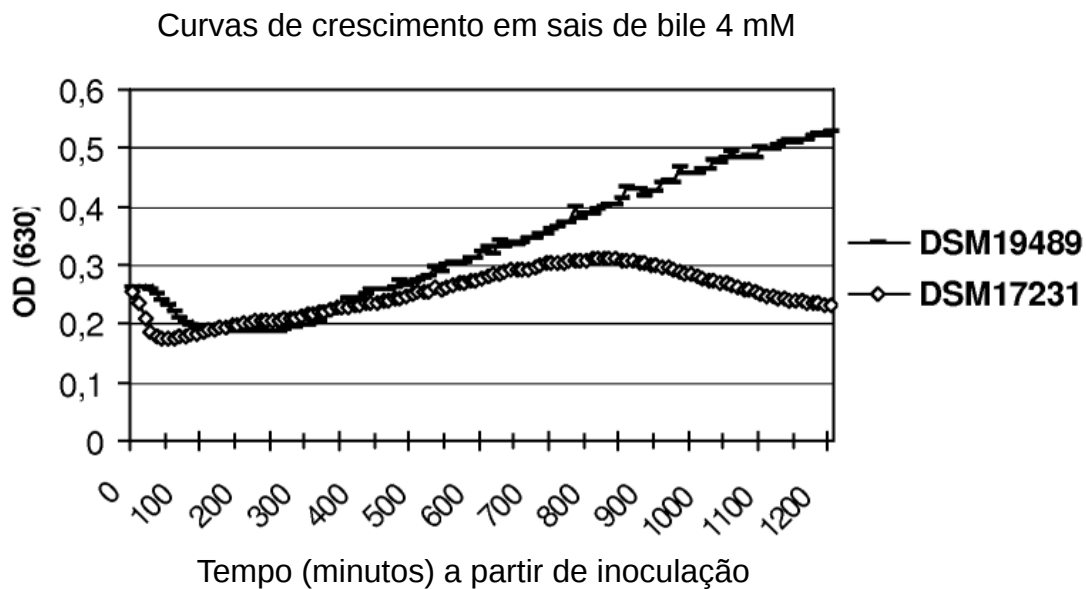
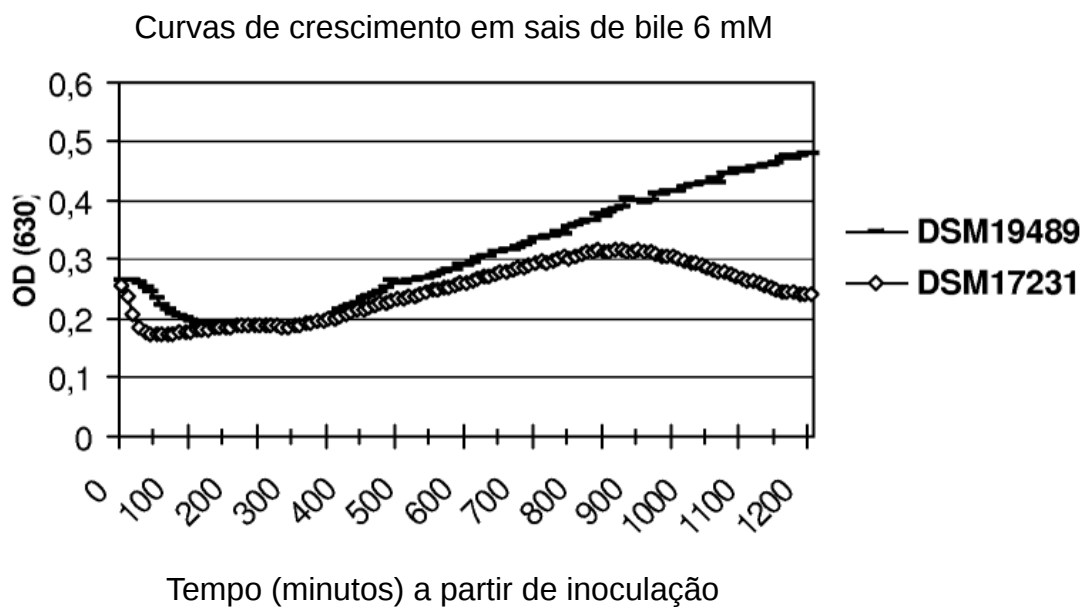


FIG. 2B



A Figura 2A (4 mM) e 2B (6 mM). Tempo (minutos) a partir de 10 elevado a 8 esporos/mL até OD 0,4 630 ser atingida