



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

(21) BR 112020007032-7 A2



(22) Data do Depósito: 10/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES DE RAÇÃO ANIMAL E MÉTODOS DE USO MELHORADOS

(51) Int. Cl.: A23K 20/189; A23K 50/10; C12N 9/24; C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2017 US 62/571,378.

(71) Depositante(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.

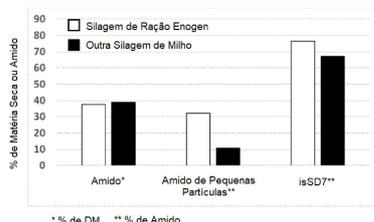
(72) Inventor(es): EILEEN DOROTHEA WATSON; DAVID WITHERSPOON; TAMMIRAJ KUMAR IRAGAVARAPU.

(86) Pedido PCT: PCT US2018055169 de 10/10/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/075028 de 18/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 08/04/2020

(57) Resumo: A invenção fornece uma composição de ração animal que compreende a-amilase microbiana, por exemplo, uma composição de ração animal que compreende material vegetal transgênico que compreende uma a-amilase microbiana (por exemplo, uma a-amilase microbiana termoestável). A invenção fornece, ainda, métodos para aumentar o desempenho do animal e/ou a eficácia de utilização de ração por um animal (por exemplo, para produção de leite ou carne) que compreende alimentar o animal com uma composição de ração animal da presente invenção.



COMPOSIÇÕES DE RAÇÃO ANIMAL E MÉTODOS DE USO MELHORADOS

DECLARAÇÃO DIZENDO RESPEITO À

SUBMISSÃO ELETRÔNICA DE UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0001] Uma Listagem de Sequências no formato de texto ASCII, submetida sob o título 37 do CFR § 1.821, intitulada "81471-US-L-ORG-NAT-1", de tamanho 15.179 *bytes*, gerada em 8 de outubro de 2018 e depositada através de EFS-WEB é proporcionada em vez de uma cópia em papel. Esta Listagem de Sequências é deste modo incorporada por referência no relatório descritivo pelas suas revelações.

INFORMAÇÃO DE PEDIDO RELACIONADO

[0002] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório de Patente dos Estados Unidos nº 62/571.378, depositado a 12 de outubro, 2017, a divulgação do qual é incorporada por referência aqui na sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se a composições de ração animal e métodos de uso das mesmas para melhorar o desempenho de animais e/ou a eficácia da utilização da ração.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] As rações animais podem ser classificadas em dois grupos: (1) concentrados ou rações compostas e (2) forragens. Os concentrados ou rações compostas são ricos em valor energético, incluindo gordura, grãos de cereais e seus subprodutos (cevada, milho, aveia,

centeio, trigo), farinhas ou bolos oleosos ricos em proteína (soja, canola, semente de algodão, amendoim e similares), e subprodutos do processamento de beterrabas-sacarinas, cana-de-açúcar, animais e peixe, que podem ser produzidos na forma de péletes ou migalhas. Os concentrados ou rações compostas podem ser completos na medida em que conseguem proporcionar todas as necessidades alimentares requeridas diárias ou podem proporcionar uma parte da ração, suplementando qualquer outra coisa que possa ser proporcionado como uma ração alimentar. A forragem inclui pastagens, fenos, silagens, culturas de raízes, palheta e palha (hastes de milho).

[0005] A ração constitui o maior custo da criação de animais para produção alimentar. Assim, a presente invenção está dirigida a composições e métodos para melhoria do desempenho de animais e/ou da eficácia de utilização de ração animal, reduzindo deste modo o custo de produção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] Um aspecto da presente invenção proporciona uma composição de ração animal compreendendo α -amilase microbiana. Em alguns aspectos, a α -amilase microbiana compreende um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou um polipeptídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5.

[0007] Outro aspecto da presente invenção proporciona uma composição de ração animal compreendendo

material vegetal, em que o material vegetal compreende uma α -amilase heteróloga expressa. Em algumas modalidades particulares, a α -amilase heteróloga expressa é codificada por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 ou compreende um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

[0008] A presente invenção proporciona adicionalmente uma composição de ração animal compreendendo material vegetal de uma planta ou parte de planta transgênica compreendendo uma α -amilase recombinante codificada por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 ou compreendendo um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

[0009] Em outros aspectos, a presente invenção proporciona uma ração de milho compreendendo material vegetal de uma planta ou parte de planta de milho transgênica estavelmente transformada com uma α -amilase recombinante codificada por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5. Aspectos adicionais da invenção proporcionam uma composição de ração animal compreendendo a ração de milho da invenção.

[0010] A invenção também abrange uma silagem de maís que compreende material vegetal de maís transgênica que compreende um polinucleotídeo que codifica uma α -amilase recombinante (conforme descrito no presente documento).

[0011] Um aspecto adicional da invenção proporciona um método de aumento do ganho de peso diário médio de um animal, compreendendo alimentação do animal com uma composição de ração animal da presente invenção, opcionalmente em que o ganho de peso diário médio do animal é aumentado em cerca de 0,05 lbs/dia a cerca de 10 lbs/dia. Opcionalmente, o animal é um animal criada para consumo, por exemplo, gado de corte. Em modalidades o gado de corte é um animal em confinamento. Em modalidade, o animal é bezerro de corte em desenvolvimento (*por exemplo*, um animal de recria/cria).

[0012] Um aspecto adicional da invenção proporciona um método de aumento da taxa de crescimento (ganho de peso) de um animal, compreendendo a alimentação do animal com uma composição de ração animal da presente invenção, em que a taxa de crescimento é aumentada em cerca de 0,05 lb/dia a cerca de 10 lbs/dia. Opcionalmente, o animal é um animal criada para consumo, por exemplo, gado de corte. Em modalidades o gado de corte é um animal em confinamento. Em modalidade, o animal é bezerro de corte em desenvolvimento (*por exemplo*, um animal de recria/cria).

[0013] Um aspecto ainda adicional da invenção proporciona um método para redução do número de dias necessários para alcançar um peso desejado em um animal, compreendendo a alimentação do animal com uma composição de ração animal da presente invenção, reduzindo deste modo o número de dias necessários para alcançar um peso desejado.

[0014] Em outros aspectos, é proporcionado um método de aumento da eficácia de utilização de ração por um animal, sendo que o método compreende a alimentação do animal

com uma composição de ração animal da presente invenção em uma quantidade eficaz para aumentar a eficácia de utilização de ração (*por exemplo*, para produção de carne, leite, ovo e/ou lã) pelo animal. Opcionalmente, o animal é um animal criada para consumo, *por exemplo*, gado de corte. Em modalidades o gado de corte é um animal em confinamento. Em modalidade, o animal é bezerro de corte em desenvolvimento (*por exemplo*, um animal de recria/cria). Em modalidades, o animal é um animal produtor de leite.

[0015] A invenção contempla, ainda, um método para aumentar a quantidade (*por exemplo*, conforme determinada em peso e/ou volume) de leite produzido por um animal produtor de leite, sendo que o método compreende a alimentação do animal produtor de leite com uma composição de ração animal da invenção em uma quantidade eficaz para aumentar a quantidade de leite produzido pelo animal produtor de leite. Em modalidade, o animal produtor de leite é uma vaca leiteira ou uma cabra leiteira.

[0016] Em aspectos adicionais, a invenção fornece um método para aumentar a eficácia de utilização de ração para a produção de leite por um animal produtor de leite, sendo que o método compreende a alimentação do animal, em uma quantidade eficaz para aumentar a eficácia de utilização de ração pelo animal produtor de leite, com uma composição de ração animal da invenção.

[0017] O acima mencionado e outros aspectos da presente invenção serão agora descritos em mais detalhe no que diz respeito a outras modalidades descritas aqui. Deve ser apreciado que a invenção pode ser realizada de diferentes formas e não deve ser interpretada como limitada às

modalidades apresentadas aqui. Ao invés, estas modalidades são proporcionadas tal que esta divulgação seja minuciosa e completa, e irão transmitir totalmente o escopo da invenção àqueles peritos na técnica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0018] A Figura 1 é um gráfico de barras que mostra características da silagem de ração Enogen® em comparação com a silagem de milho, que não contém um traço de alfa-amilase. O amido total ("amido"), o amido de partículas pequenas (pode se difundir através de um poro de 50 µM) e a digestibilidade de amido 7 horas *in situ* no rúmen ("isSD7"; desaparecimento de amido durante 7 horas no rúmen) foram determinados por química analítica.

[0019] A Figura 2 é um gráfico de barras que mostra características de açúcar da silagem de ração Enogen® em comparação com a silagem de milho, que não contém um traço de alfa-amilase. Carboidratos solúveis em etanol ("açúcar ESC") representam carboidratos que podem ser solubilizados e extraídos em etanol a 80%. Carboidratos solúveis em água ("açúcar WSC") são carboidratos que podem ser solubilizados e extraídos em água. Açúcar ESC e açúcar WSC foram, ambos, determinados por espectroscopia de refletância no infravermelho proximal (NIR). O total de açúcares foi medido com o uso de química analítica e reflete a soma de glicose total, frutose, lactose, sacarose e manitol.

[0020] A Figura 3 é um gráfico que mostra a digestibilidade de fibras de detergente neutro (NDFd) da silagem de ração Enogen® em comparação com a silagem de milho, que não contém um traço de alfa-amilase. NDFd foi

avaliada por NIR a partir de um período de tempo de 30 a 240 horas. As diferenças foram significativamente diferentes em todos os pontos no tempo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0021] A não ser que o contexto indique de outro modo é especificamente pretendido que as várias características da invenção descrita aqui possam ser usadas em qualquer combinação.

[0022] Além do mais, a presente invenção contempla também que, em algumas modalidades da invenção, qualquer característica ou combinação de características apresentada aqui possa ser excluída ou omitida. Para ilustrar, se a especificação afirma que uma composição compreende os componentes A, B e C, se pretende especificamente que qualquer um de A, B ou C, ou uma sua combinação, possa ser omitido e negado singularmente ou em qualquer combinação.

[0023] A não ser que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por um perito na técnica à qual esta invenção pertence. A terminologia usada na descrição da invenção aqui é para o propósito somente de descrição de modalidades particulares e não se destina a ser limitante da invenção.

[0024] Como usado na descrição da invenção e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" se destinam a incluir as formas singulares e plurais, a não ser que o contexto claramente indique de outro modo.

[0025] Como usado aqui, "e/ou" se refere a e engloba todas e quaisquer combinações possíveis de um ou mais dos itens listados associados, bem como a falta de combinações quando interpretados na alternativa ("ou").

[0026] O termo "cerca de", como usado aqui quando se refere a um valor mensurável tal como uma dosagem, uma quantidade ou período de tempo e similares, se destina a englobar variações de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, ou mesmo $\pm 0,1\%$ da quantidade especificada (por exemplo, uma quantidade de peso ganho ou ração proporcionada).

[0027] Como usadas aqui, frases tais como "entre X e Y" e "entre cerca de X e Y" devem ser interpretadas como incluindo X e Y. Como usadas aqui, frases tais como "entre cerca de X e Y" significam "entre cerca de X e cerca de Y". Como usadas aqui, frases tais como "de cerca de X a Y" significam "de cerca de X a cerca de Y".

[0028] Os termos "compreendem", "compreende" e "compreendendo", como usados aqui, especificam a presença de características, números inteiros, passos, operações, elementos, e/ou componentes apresentados, mas não excluem a presença ou adição de uma ou mais de outras suas características, números inteiros, passos, operações, elementos, componentes e/ou seus grupos.

[0029] Como usada aqui, a frase de transição "consistindo essencialmente em" significa que o escopo de uma reivindicação deve ser interpretado como englobando os materiais ou etapas especificados recitados na reivindicação e aqueles que não afetam materialmente a(s) característica(s) básica(s) e nova(s) da invenção reivindicada. Assim, o termo "consistindo essencialmente

em", quando usado em uma reivindicação desta invenção, não se destina a ser interpretado como sendo equivalente a "compreendendo".

[0030] A presente invenção refere-se a composições e métodos para melhorar o desempenho do animal (*por exemplo*, aumentar a eficácia de utilização de ração animal, aumento do ganho de peso em animais criados para o consumo, aumento da produção de leite em animais produtores de leite, aumento da produção de ovos em aves e/ou aumento da produção de lã e pelos em animais criados devido a sua lã ou pelos), reduzindo, assim, os custos de produção. Os presentes inventores constataram surpreendentemente que animais alimentados com uma composição de ração animal que compreende α -amilase microbiana pode ter um aumento no ganho de peso diário médio ou na taxa de crescimento, um aumento na produção de leite, um aumento na eficácia de utilização de ração, um aumento na produção de ovos, um aumento na produção de lã e pelos e/ou uma redução no número de dias necessários para alcançar um peso desejado em comparação com animais não alimentados com a composição de ração animal.

[0031] Conformemente, em um aspecto da invenção, é proporcionada uma composição de ração animal compreendendo α -amilase microbiana. Em aspectos adicionais da invenção, a α -amilase microbiana compreende um polipeptídeo tendo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou um polipeptídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5. Em algumas modalidades, a α -amilase é um líquido. Assim, em algumas

modalidades da invenção, uma composição de ração animal da invenção pode ser um suplemento que compreende uma α -amilase microbiana líquida que pode ser adicionada à ração proporcionada a um animal.

[0032] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição de ração animal compreendendo material vegetal, em que o material vegetal compreende uma α -amilase recombinante expressa. Em algumas modalidades particulares, a α -amilase recombinante expressa é codificada por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 ou compreende um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Assim, em modalidades adicionais, a invenção proporciona adicionalmente uma composição de ração animal compreendendo material vegetal de uma planta ou parte de planta transgênica compreendendo uma α -amilase recombinante codificada por uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 ou compreendendo um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

[0033] Em modalidades particulares, a planta ou parte de planta transgênica pode compreender cerca de 1% a cerca de 100% em peso do material vegetal. Assim, por exemplo, a planta ou parte de planta transgênica pode compreender cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%,

34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% em peso do material vegetal, e similares, ou qualquer gama intermédia. Assim, em algumas modalidades, o material vegetal pode compreender um ou mais tipos diferentes de plantas. Assim, por exemplo, o material vegetal pode ser de uma planta na qual α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, microbiana) é expressa. Em outras modalidades, o material vegetal compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em material de uma planta na qual α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, microbiana) é expressa e material de uma planta não expressando a α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, uma planta de *commodity*). Assim, em algumas modalidades, quando o material vegetal compreende material de uma planta na qual α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, microbiana) é expressa e material de uma planta não expressando a α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, uma planta de *commodity*), o material de uma planta na qual α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, microbiana) é expressa pode compreender de cerca de 1% a cerca de 99% em peso do material vegetal e o material de uma planta não expressando a α -amilase recombinante ou heteróloga pode compreender de cerca de 99% a cerca de 1% em peso do material vegetal.

[0034] Em modalidades adicionais, o material vegetal pode compreender de cerca de 5% a cerca de 100% em

peso da composição de ração animal. Assim, por exemplo, o material vegetal pode compreender cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% em peso da composição de ração animal, e similares, e/ou qualquer gama intermédia.

[0035] A ração animal da invenção pode estar em qualquer forma que seja útil com esta invenção. Assim, em algumas modalidades, a forma da ração animal pode ser, mas não está limitada a, péletes, grão incluindo um ou mais tipos de grão misturado (isto é, grão misto), uma mistura de grãos e péletes, silagem, miolo inteiro, floculado a vapor, laminado a seco, grãos grosseiramente rachados (por exemplo, milho grosseiramente rachado), milho com elevada umidade e/ou qualquer sua combinação. Em algumas modalidades, a ração animal pode compreender outros componentes, incluindo mas não se limitando a grãos grosseiramente rachados, grãos úmidos destilados, grãos secos destilados, silagem de milho, suplementos/suplementos líquidos, ração de glúten de milho, e/ou feno triturado.

[0036] Como usado aqui, o termo "material vegetal" inclui qualquer parte de planta, incluindo mas não se limitando a endosperma, embriões (gérmen), pericárpico (revestimento de farelo), pedículo (tampa da ponta), pólen, óvulos, sementes (grão), folhas, flores, ramos, caules,

fruto, grãos, espigas, sabugos, cascas, hastes, raízes, pontas de raízes, anteras, células vegetais incluindo células vegetais que estão intactas em plantas e/ou partes de plantas, protoplastos vegetais, tecidos vegetais, culturas de células de tecidos vegetais, calos vegetais, tufos vegetais, e similares. Adicionalmente, como usado aqui, "célula vegetal" se refere a uma unidade estrutural e fisiológica da planta, que compreende uma parede celular e pode também se referir a um protoplasto. Uma célula vegetal da invenção pode estar na forma de uma única célula isolada ou pode ser uma célula cultivada ou pode ser uma parte de uma unidade de organização superior tal como, por exemplo, um tecido vegetal ou um órgão vegetal. Um "protoplasto" é uma célula de planta isolada sem uma parede celular ou somente com partes da parede celular. Assim, em algumas modalidades da invenção, uma planta ou parte de planta transgênica compreendendo uma α -amilase recombinante codificada por uma sequência de nucleotídeos da invenção compreende uma célula compreendendo a α -amilase recombinante codificada por uma sequência de nucleotídeos da invenção, em que a célula é uma célula de qualquer planta ou parte de planta incluindo, mas não se limitando a, uma célula da raiz, uma célula da folha, uma célula da cultura de tecidos, uma célula da semente, uma célula da flor, uma célula do fruto, uma célula do pólen e similares. Em modalidades representativas, o material vegetal pode ser uma semente ou grão.

[0037] O material vegetal pode ser de qualquer planta. Em algumas modalidades, o material vegetal é de uma planta na qual α -amilase recombinante ou heteróloga (por

exemplo, microbiana) pode ser expressa. Adicionalmente, como discutido aqui, em outras modalidades, o material vegetal pode ser uma mistura de material vegetal de uma planta na qual α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, microbiana) é expressa e de uma planta não expressando a α -amilase recombinante ou heteróloga (por exemplo, uma planta de *commodity*). Assim, em modalidades representativas, o material vegetal pode ser uma mistura de material vegetal "de *commodity*" normal (por exemplo, milho de *commodity*) e material vegetal de uma planta transgênica da presente invenção expressando α -amilase recombinante ou heteróloga.

[0038] Assim, em algumas modalidades, o material vegetal pode ser de uma planta de milho, uma planta de sorgo, uma planta de trigo, uma planta de cevada, uma planta de centeio, uma planta de aveia, uma planta de arroz, e/ou uma planta de milheto. Em modalidades representativas, o material vegetal pode ser de uma planta de milho. Em outras modalidades, o material vegetal pode ser uma semente, miolo ou grão de uma planta de milho. Em modalidades, o material vegetal pode ser de uma planta de milho que expressa uma alfa-amilase termoestável, por exemplo, alfa-amilase 797GL3 ou D45. A alfa-amilase 797GL3 é descrita na publicação de patente U.S. nº US2010/0240082 (como SEQ ID NO: 1) e em Richardson et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26.501 a 26.507. A alfa-amilase D45 foi descrita na publicação de patente nº US2010/0240082 (como SEQ ID NO: 2) e por Atichokudomchai et al. (2006) *Carbohydrate Polymers* 64:582 a 588. Em modalidades específicas, o material vegetal pode ser de uma planta de milho compreendendo o evento de milho 3272 (ver, Patente dos E.U.A. nº 8.093.453). Em modalidades,

a alfa-amilase não é uma amilase termoestável. Em modalidades, a alfa-amilase pode tolerar uma ampla faixa de pH (*por exemplo*, é ativa através de uma ampla faixa de pH, incluindo pH ácido). Em modalidades representativas, a ração animal é uma silagem de milho que compreende um polinucleotídeo que codifica uma alfa-amilase que é termoestável e/ou é ativa em uma ampla faixa de valores de pH, por exemplo alfa-amilase 797GL3 e/ou D45. Sem o desejo de se vincular a qualquer teoria específica da invenção, o processo de triturar material vegetal de milho antes de ensilagem pode ativar uma enzima termoestável. Adicionalmente, uma alfa-amilase que é ativa em uma ampla faixa de pH (*por exemplo*, inclusive na faixa ácida) pode ser vantajoso na produção de silagem, visto que o pH do material vegetal diminuirá à medida que a fermentação progride.

[0039] Quando o material vegetal é uma silagem (*por exemplo*, uma silagem de milho), a silagem pode opcionalmente ser fermentada na presença de um inoculante microbiano e/ou estabilizante químico. Sabe-se na técnica que um inoculante, tal como bactérias formadoras de ácido láctico e/ou um estabilizante químico pode aumentar a estabilidade aeróbica da silagem e, assim, reduzir a deterioração. Exemplos de inoculantes adequados incluem, sem limitação, bactérias formadoras de ácido láctico homofermentativas e/ou heterofermentativas, tais como: *Lactobacillus* spp. (*por exemplo*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis* e/ou *L. acidophilus*), *Pediococcus* spp. (*por exemplo*, *P. pentosaceus* e/ou *P. acidilactici*), *Lactococcus* spp. *Enterococcus* spp. (*por exemplo*, *E. faecium*), *Streptococcus* spp. e/ou *Leuconostoc* spp. Um inoculante

comercialmente disponível, designado LB500, está disponível junto à Lallemand Animal Nutrition. Estabilizantes químicos incluem, sem limitação, ácidos orgânicos e/ou minerais (*por exemplo*, ácido acético, ácido fórmico, ácido butírico, ácido láctico, ácido propiônico, ácidos graxos voláteis, ácido sulfúrico e/ou ácido clorídrico), cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, sacarose e/ou ureia, e semelhantes. Assim, em modalidades, a silagem compreende um inoculante microbiano e/ou estabilizante químico. Adicionalmente, sabe-se na técnica que o processamento de miolo (*por exemplo*, milho quebrado) antes da ensilagem aumenta o valor nutritivo da silagem de milho. Entretanto, o processamento de miolo pode retardar a taxa de colheita/ensilagem e consome energia e, assim, podem incorrer despesas adicionais. Em modalidades, a silagem de milho da invenção (*por exemplo*, preparada a partir de uma planta de milho transgênica que expressa alfa-amilase) pode alcançar valor nutritivo igual ou menor que a silagem de milho convencional (sem alfa-amilase exógena) e/ou pode suportar nível igual ou melhor de desempenho do animal (*por exemplo*, produção de leite, produção de carne e semelhantes) sem processamento de miolo ou processamento reduzido de miolo que a silagem de milho convencional. Assim, em modalidades, a silagem de milho da invenção é produzida a partir de plantas de milho sem ou essencialmente sem processamento de miolo ou processamento reduzido de miolo do que é convencionalmente usado na indústria. Em modalidades, os miolos são processados de modo a serem maiores que cerca de 2 mm (*por exemplo*, pelo menos 3 mm ou maior, 4 mm ou maior, 5 mm ou maior, 6 mm ou maior,

7 mm ou maior, 8 mm ou maior, 9 mm ou maior, 10 mm ou maior e semelhantes).

[0040] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma "ração mista total" que compreende a ração animal. Em modalidades, a ração mista total compreende uma ração animal que compreende material vegetal de uma planta transgênica (*por exemplo*, planta de milho transgênica) ou parte de planta estavelmente transformada com uma α -amilase recombinante, opcionalmente codificada por uma sequência de nucleotídeos que tem cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 e/ou que compreende um polipeptídeo que tem pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Conforme usado no presente documento, "ração mista total" refere-se a uma ração que combina todos os alimentos para animais (*por exemplo*, grãos, fibra alimentar/forragem, proteínas, minerais, vitaminas e/ou aditivos de ração e semelhantes) em uma ração completa formulada para uma concentração de nutrientes específica em uma única mistura de alimentos, frequentemente calculada com base nas necessidades nutricionais em 24 horas para um animal individual. Em modalidades, a ração mista total inclui, *por exemplo*, grão de milho (*por exemplo*, miolos de milho, milho grosseiramente quebrado e semelhantes), suplementos e aditivos, (*por exemplo*, vitaminas e minerais) e/ou "fibras alimentares" (*por exemplo*, gramíneas de pastagem, feno, silagem, culturas de raízes, palha e restolho (caules de milho)). Em modalidades, o componente de grão de milho (*por exemplo*, grão de milho) e/ou fibra alimentar (*por exemplo*, silagem de milho) é proveniente de material vegetal

transgênico (*por exemplo*, material vegetal de milho transgênico) e compreende um polinucleotídeo que codifica a alfa-amilase.

[0041] Em algumas modalidades, o material vegetal de uma planta de milho transgênica ou parte de planta (*por exemplo*, grão de milho e/ou silagem de milho) compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso com base na matéria seca da ração mista total. Assim, *por exemplo*, a planta transgênica ou parte de planta pode compreender pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou até 100% em peso com base na matéria seca do material vegetal e semelhantes, e/ou qualquer faixa intermediária.

[0042] Em modalidades ainda adicionais, a invenção proporciona uma ração de milho compreendendo material vegetal de uma planta ou parte de planta de milho transgênica estavelmente transformada com uma α -amilase recombinante opcionalmente codificada por uma sequência de nucleotídeos tendo cerca de 80% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 e/ou compreendendo um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Conforme usado no presente

documento, "ração de milho" significa a tolerância de milho (por exemplo, tolerância de milho de 24 horas) para um animal individual.

[0043] Em algumas modalidades, o material vegetal de uma planta de milho transgênica ou parte de planta compreende de cerca de 1% a cerca de 100% em peso com base na matéria seca da ração de milho. Assim, por exemplo, a planta transgênica ou parte de planta pode compreender pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou até 100% em peso com base na matéria seca do material vegetal e semelhantes e/ou qualquer faixa intermediária.

[0044] Em outras modalidades é proporcionada uma composição de ração animal que compreende uma ração de milho da invenção. Em algumas modalidades, a ração de milho pode compreender cerca de 5% a cerca de 100% em peso com base na matéria seca da composição de ração animal. Assim, por exemplo, a ração de milho pode compreender pelo menos cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,

64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% em peso com base na matéria seca da composição de ração animal e semelhantes, e/ou qualquer faixa intermediária. Em modalidades representativas, a composição de ração animal compreende pelo menos cerca de 50%.

[0045] Em algumas modalidades, a ração mista total pode compreender ração de glúten de milho úmida que pode ser cerca de 10% a cerca de 40% em peso com base na matéria seca da composição de ração animal. Em modalidades adicionais, a ração mista total pode compreender ração de glúten de milho úmida que pode ser pelo menos cerca de 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, ou mais em peso com base na matéria seca da composição de ração animal.

[0046] Em outras modalidades, a ração mista total pode compreender grãos destilados modificados com solúveis que podem ser cerca de 5% a cerca de 25% em peso com base na matéria seca da composição de ração animal. Em modalidades adicionais, a ração mista total pode compreender grãos destilados modificados com solúveis que podem ser pelo menos cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, em peso com base na matéria seca da composição de ração animal.

[0047] Em modalidades adicionais, a ração mista total pode compreender grãos destilados úmidos com solúveis que podem ser cerca de 5% a cerca de 25% em peso com base na matéria seca da composição de ração animal. Em modalidades

adicionais, a ração mista total pode compreender grãos destilados úmidos com solúveis que podem ser pelo menos cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, em peso com base na matéria seca da composição de ração animal.

[0048] Adicionalmente, no caso de material vegetal de milho transgênico que expressa a alfa-amilase, a ração total de grão de milho pode compreender todo ou essencialmente todo o material vegetal de milho transgênico que expressa a alfa-amilase, ou apenas uma porção da ração de grão de milho pode ser proveniente de uma planta de milho transgênica que expressa a alfa-amilase, *por exemplo*, pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% em peso com base na matéria seca da ração de grão de milho é proveniente de uma planta de milho transgênica que compreende um polinucleotídeo que codifica a alfa-amilase. A porção restante da ração de grão de milho pode ser proveniente de qualquer outra fonte adequada, incluindo, sem limitação, grão de milho convencional que não expressa uma alfa-amilase.

[0049] Em modalidades, a fibra alimentar/forragem com a qual o animal é alimentado compreende uma silagem de milho. A ração diária de fibra

alimentar do animal pode compreender toda ou essencialmente toda a silagem de material vegetal de milho transgênico, ou apenas uma porção da ração de fibra alimentar pode ser silagem de uma planta de milho transgênica que expressa a alfa-amilase, *por exemplo*, pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% em peso com base na matéria seca da ração de fibra alimentar é silagem de uma planta de milho transgênica que compreende um polinucleotídeo que codifica a alfa-amilase. A porção restante do componente de fibra alimentar pode ser proveniente de qualquer fonte adequada, incluindo, sem limitação, silagem de milho convencional que não expressa uma alfa-amilase, outras silagens convencionais (*por exemplo*, silagem de alfafa), gramínea de pastagem e semelhantes.

[0050] Em modalidades, pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, ou até 100% em peso com base na matéria seca da silagem de milho com a qual o animal é alimentado é proveniente de uma planta de maïs transgênica que compreende um polinucleotídeo que codifica a alfa-amilase.

[0051] Ácidos nucleicos ou proteínas diferentes tendo homologia são referidos aqui como "homólogos". O termo homólogo inclui sequências homólogas da mesma e outras espécies e sequências ortólogas da mesma e outras espécies. "Homologia" se refere ao nível de similaridade entre duas ou mais sequências de ácidos nucleicos e/ou aminoácidos em termos de percentagem de identidade posicional (*isto é*, similaridade ou identidade de sequências). Homologia se refere também ao conceito de propriedades funcionais similares entre ácidos nucleicos ou proteínas diferentes. Assim, as composições e métodos da invenção compreendem adicionalmente homólogos das sequências de nucleotídeos e sequências de polipeptídeos desta invenção (por exemplo, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5). "Ortólogo", como usado aqui, se refere a sequências de nucleotídeos e/ou sequências de aminoácidos homólogas em diferentes espécies que têm origem a partir de um gene ancestral comum durante especiação. Um homólogo nesta invenção tem uma identidade de sequência significativa (por exemplo, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e/ou 100%) com a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:5.

[0052] Um homólogo de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 pode ser utilizado

com qualquer composição de razão ou método da invenção, sozinho ou em combinação com um outro e/ou com SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5.

[0053] Como usada aqui, "identidade de sequências" se refere à extensão à qual duas sequências de polinucleotídeos ou peptídeos otimamente alinhadas são invariantes ao longo de uma janela de alinhamento de componentes, por exemplo, nucleotídeos ou aminoácidos. A "identidade" pode ser prontamente calculada por métodos conhecidos incluindo aqueles, mas não se limitando àqueles, descritos em: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, Nova York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, Nova York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M. e Griffin, H. G., eds.) Humana Press, Nova Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); e *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. e Devereux, J., eds.) Stockton Press, Nova York (1991).

[0054] Como usado aqui, o termo "percentagem de identidade de sequências" ou "percentagem de identidade" se refere à percentagem de nucleotídeos idênticos em uma sequência de polinucleotídeos linear de uma molécula de polinucleotídeo de referência ("query") (ou sua fita complementar) em comparação com uma molécula de polinucleotídeo de teste ("objeto") (ou sua fita complementar) quando as duas sequências estão otimamente alinhadas. Em algumas modalidades, "percentagem de identidade" pode referir-se à percentagem de aminoácidos idênticos em uma sequência de aminoácidos.

[0055] A frase "substancialmente idêntica", no contexto de duas moléculas de ácido nucleico, sequências de nucleotídeos ou sequências de proteína, se refere a duas ou mais sequências ou subsequências que têm pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 81%, pelo menos cerca de 82%, pelo menos cerca de 83%, pelo menos cerca de 84%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 86%, pelo menos cerca de 87%, pelo menos cerca de 88%, pelo menos cerca de 89%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos, quando comparadas e alinhadas quanto a correspondência máxima, como medida usando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequências, descritos aqui e como conhecidos na técnica, ou por inspeção visual. Em algumas modalidades da invenção, a identidade substancial existe ao longo de uma região das sequências que tem pelo menos cerca de 50 resíduos a cerca de 200 resíduos, cerca de 50 resíduos a cerca de 150 resíduos e similares, em comprimento. Assim, em algumas modalidades da invenção, a identidade substancial existe ao longo de uma região das sequências que tem pelo menos cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 110, cerca de 120, cerca de 130, cerca de 140, cerca de 150, cerca de 160, cerca de 170, cerca de 180, cerca de 190, cerca de 200, ou mais resíduos em comprimento. Em uma modalidade adicional, as sequências são substancialmente idênticas ao longo do comprimento inteiro das regiões codificantes. Além do mais, em modalidades representativas, sequências de

nucleotídeos ou proteínas substancialmente idênticas desempenham substancialmente a mesma função (por exemplo, atividade de α -amilase). Assim, em algumas modalidades particulares, as sequências são substancialmente idênticas ao longo de pelo menos cerca de 150 resíduos e têm atividade de α -amilase.

[0056] Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência com a qual as sequências de teste são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de sequências, as sequências de referência e de teste são inseridas em um computador, as coordenadas de subsequência são designadas se necessário e os parâmetros do programa de algoritmo de sequências são designados. O algoritmo de comparação de sequências calcula depois a percentagem de identidade de sequências para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa designados.

[0057] O alinhamento ótimo de sequências para alinhamento de uma janela de comparação é bem conhecido por aqueles peritos na técnica e pode ser conduzido por ferramentas tais como o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, o algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, o método de busca de similaridade de Pearson e Lipman, e opcionalmente por implementações computadorizadas destes algoritmos tais como GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA disponíveis como parte do pacote GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA). Uma "fração de identidade" para segmentos alinhados de uma sequência de teste e uma sequência de referência é o número

de componentes idênticos que são compartilhados pelas duas sequências alinhadas dividido pelo número total de componentes no segmento da sequência de referência, isto é, a sequência de referência inteira ou uma parte definida mais pequena da sequência de referência. A percentagem de identidade de sequência é representada como a fração de identidade multiplicada por 100. A comparação de uma ou mais sequências de polinucleotídeos pode ser com uma sequência de polinucleotídeos de comprimento total ou uma sua porção ou com uma sequência de polinucleotídeos mais longa. Para propósitos desta invenção, "percentagem de identidade" pode ser também determinada usando BLASTX versão 2.0 para sequências de nucleotídeos traduzidas e BLASTN versão 2.0 para sequências de polinucleotídeos.

[0058] O *software* para realizar análises BLAST está publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve identificação em primeiro lugar de pares de sequência de pontuação elevada (HSPs) por identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência de consulta, que corresponde ou satisfaz alguma pontuação T limiar de valor positivo-quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de base de dados. T é referido como uma pontuação limiar de palavra de proximidade (Altschul *et al.*, 1990). Estas correspondências de palavra de proximidade iniciais atuam como sementes para iniciação de pesquisas para se encontrarem HSPs mais longos contendo os mesmos. As correspondências de palavras são depois prolongadas em ambas as direções ao longo de cada sequência tanto quanto a pontuação de alinhamento cumulativa possa ser

aumentada. As pontuações cumulativas são calculadas usando, para sequências de nucleotídeos, os parâmetros M (pontuação de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre > 0) e N (pontuação de penalidade para resíduos não correspondentes; sempre < 0). Para sequências de aminoácidos é usada uma matriz de pontuação para calcular a pontuação cumulativa. A extensão das correspondências de palavra em cada direção é interrompida quando a pontuação do alinhamento cumulativo cai de uma quantidade X a partir do seu valor máximo alcançado, a pontuação cumulativa tende para zero ou menos devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontuação negativa ou é alcançada a extremidade de qualquer uma das sequências. Os parâmetros W, T e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um corte de 100, $M=5$, $N=-4$ e uma comparação de ambas as fitas. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10 e a matriz de pontuação BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89: 10915 (1989)).

[0059] Adicionalmente a calcular a percentagem de identidade de sequências, o algoritmo BLAST realiza também uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (ver, por exemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 90: 5.873 a 5.787 (1993)). Uma medida da similaridade proporcionada pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma ($P(N)$), que proporciona uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas

sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria por acaso. Por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos de teste é considerada similar a uma sequência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação da sequência de nucleotídeos de teste com a sequência de nucleotídeos de referência for menor do que cerca de 0,1 a menor do que cerca de 0,001. Assim, em algumas modalidades da invenção, a menor probabilidade de soma em uma comparação da sequência de nucleotídeos de teste com a sequência de nucleotídeos de referência é menor do que cerca de 0,001.

[0060] Duas sequências de nucleotídeos podem ser também consideradas como sendo substancialmente idênticas quando as duas sequências hibridam uma com a outra sob condições estringentes. Em algumas modalidades representativas, duas sequências de nucleotídeos consideradas como sendo substancialmente idênticas hibridam uma com a outra sob condições altamente estringentes.

[0061] "Condições de hibridação estringentes" e "condições de lavagem de hibridação estringentes" no contexto de experiências de hibridação de ácidos nucleicos tais como hibridações de Southern e Northern são dependentes da sequência e são diferentes sob diferentes parâmetros ambientais. Um guia extenso para a hibridação de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nova Iorque (1993). Geralmente, condições de hibridação e lavagem altamente estringentes são selecionadas para serem cerca de 5 °C mais baixas do que o

ponto térmico de fusão (T_m) para a sequência específica a uma força iônica e pH definidos.

[0062] A T_m é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) à qual 50% da sequência alvo hibrida com uma sonda perfeitamente correspondente. Condições muito estridentes são selecionadas para serem iguais à T_m para uma sonda particular. Um exemplo de condições de hibridação estridentes para hibridação de sequências de nucleotídeos complementares que têm mais do que 100 resíduos complementares em um filtro em uma transferência de Southern ou Northern é formamida a 50% com 1 mg de heparina a 42 °C, com a hibridação sendo levada a cabo durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem altamente estridentes é NaCl a 0,15 M a 72 °C durante cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem estridentes é uma lavagem com 0,2x SSC a 65 °C durante 15 minutos (ver, Sambrook, *infra*, para uma descrição de tampão SSC). Frequentemente, uma lavagem de estringência elevada é precedida de uma lavagem de baixa estringência para remover o sinal de fundo da sonda. Um exemplo de uma lavagem de estringência média para um dúplex de, por exemplo, mais do que 100 nucleotídeos, é 1x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Um exemplo de uma lavagem de estringência baixa para um dúplex de, por exemplo, mais do que 100 nucleotídeos, é 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos. Para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10 a 50 nucleotídeos), as condições estridentes envolvem tipicamente concentrações de sais de menos do que cerca de 1,0 M de íon Na, tipicamente concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íon Na (ou outros sais) a pH 7,0 a 8,3, e a temperatura é tipicamente pelo menos cerca de 30 °C.

Condições estringentes podem ser também alcançadas com a adição de agentes desestabilizantes tais como formamida. Em geral, uma razão de sinal em relação a ruído de 2x ou mais elevada do que aquela observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridação particular indica detecção de uma hibridação específica. Sequências de nucleotídeos que não hibridam umas com as outras sob condições estringentes são ainda substancialmente idênticas se as proteínas que elas codificam forem substancialmente idênticas. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando uma cópia de uma sequência de nucleotídeos é criada usando a degeneração de códons máxima permitida pelo código genético.

[0063] Os seguintes são exemplos de conjuntos de condições de hibridação/lavagem que podem ser usados para clonar sequências de nucleotídeos homólogas que são substancialmente idênticas a sequências de nucleotídeos de referência (por exemplo, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5). Em uma modalidade, uma sequência de nucleotídeos de referência hibrida com a sequência de nucleotídeos de "teste" em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 7%, NaPO₄ a 0,5 M, EDTA a 1 mM a 50 °C com lavagem em 2X SSC, SDS a 0,1% a 50 °C. Em outra modalidade, a sequência de nucleotídeos de referência hibrida com a sequência de nucleotídeos de "teste" em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 7%, NaPO₄ a 0,5 M, EDTA a 1 mM a 50 °C com lavagem em 1X SSC, SDS a 0,1% a 50 °C ou em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 7%, NaPO₄ a 0,5 M, EDTA a 1 mM a 50 °C com lavagem em 0,5X SSC, SDS a 0,1% a 50 °C. Em modalidades ainda adicionais, a sequência de nucleotídeos de referência hibrida com a sequência de nucleotídeos de "teste" em dodecil sulfato de

sódio (SDS) a 7%, NaPO₄ a 0,5 M, EDTA a 1 mM a 50 °C com lavagem em 0,1X SSC, SDS a 0,1% a 50 °C, ou em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 7%, NaPO₄ a 0,5 M, EDTA a 1 mM a 50 °C com lavagem em 0,1X SSC, SDS a 0,1% a 65 °C.

[0064] Em modalidades particulares, uma indicação adicional de que duas sequências de nucleotídeos ou duas sequências de polipeptídeos são substancialmente idênticas pode ser que a proteína codificada pelo primeiro ácido nucleico é imunologicamente reativa de modo cruzado com a, ou se liga especificamente à, proteína codificada pelo segundo ácido nucleico. Assim, em algumas modalidades, um polipeptídeo pode ser substancialmente idêntico com um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois polipeptídeos diferem somente por substituições conservativas.

[0065] Conformemente, em algumas modalidades da invenção, são proporcionadas sequências de nucleotídeos tendo identidade de sequências significativa com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5. "Identidade de sequências significativa" ou "similaridade de sequências significativa" significa pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e/ou 100% de identidade ou similaridade com outra sequência de nucleotídeos. Assim, em modalidades adicionais, "identidade de sequências significativa" ou "similaridade de sequências significativa" significa uma gama de cerca de 70% a cerca de 100%, cerca de 75% a cerca de 100%, cerca de 80% a cerca de 100%, cerca de 81% a cerca de 100%, cerca de 82% a cerca de 100%, cerca de 83% a cerca de 100%, cerca de 84%

a cerca de 100%, cerca de 85% a cerca de 100%, cerca de 86% a cerca de 100%, cerca de 87% a cerca de 100%, cerca de 88% a cerca de 100%, cerca de 89% a cerca de 100%, cerca de 90% a cerca de 100%, cerca de 91% a cerca de 100%, cerca de 92% a cerca de 100%, cerca de 93% a cerca de 100%, cerca de 94% a cerca de 100%, cerca de 95% a cerca de 100%, cerca de 96% a cerca de 100%, cerca de 97% a cerca de 100%, cerca de 98% a cerca de 100%, e/ou cerca de 99% a cerca de 100% de identidade ou similaridade com outra sequência de nucleotídeos. Portanto, em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeos da invenção é uma sequência de nucleotídeos que tem identidade de sequências significativa com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:5 e codifica um polipeptídeo tendo atividade de α -amilase. Em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeos da invenção é uma sequência de nucleotídeos que tem 80% a 100% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:5 e codifica um polipeptídeo tendo atividade de α -amilase. Em modalidades representativas, uma sequência de nucleotídeos da invenção é uma sequência de nucleotídeos que tem 95% de identidade com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:5 e codifica um polipeptídeo tendo atividade de α -amilase.

[0066] Em algumas modalidades, um polipeptídeo da invenção compreende, consiste essencialmente em ou consiste em uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70% idêntica, *por exemplo*, pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e/ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 e tem atividade de α -amilase.

[0067] Em algumas modalidades, uma sequência de polipeptídeos ou nucleotídeos pode ser uma variante conservativamente modificada. Como usada aqui, "variante conservativamente modificada" se refere a sequências de polipeptídeos e nucleotídeos contendo substituições, deleções ou adições individuais que alteram, adicionam ou eliminam um único aminoácido ou nucleotídeo ou uma pequena percentagem de aminoácidos ou nucleotídeos na sequência, onde a alteração resulta na substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituições conservativas proporcionando aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica.

[0068] Como usada aqui, uma variante conservativamente modificada de um polipeptídeo é biologicamente ativa e, portanto, possui a atividade desejada do polipeptídeo de referência (por exemplo, atividade de α -amilase) como descrito aqui. A variante pode resultar de, por exemplo, um polimorfismo genético ou manipulação humana. Uma variante biologicamente ativa do polipeptídeo de referência pode ter pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais de identidade ou similaridade de sequências (por exemplo, cerca de 40% a cerca de 99% ou mais identidade ou similaridade de sequências e qualquer gama intermédia) com a sequência de aminoácidos para o polipeptídeo de referência como determinado por programas e parâmetros de alinhamento de sequências descritos em outro lado aqui. Uma variante ativa pode diferir

da sequência do polipeptídeo de referência por tão poucos quantos 1-15 resíduos de aminoácidos, tão poucos quantos 1-10, tal como 6-10, tão poucos quantos 5, tão poucos quantos 4, 3, 2, ou mesmo 1 resíduo de aminoácidos.

[0069] Variantes ocorrendo naturalmente podem existir dentro de uma população. Tais variantes podem ser identificadas por uso de técnicas de biologia molecular bem conhecidas, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), e hibridação como descrito em baixo. Sequências de nucleotídeos sinteticamente derivadas, por exemplo, sequências geradas por mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR que codificam um polipeptídeo da invenção, estão também incluídas como variantes. Uma ou mais substituições, adições, ou deleções de nucleotídeos ou aminoácidos podem ser introduzidas em uma sequência de nucleotídeos ou aminoácidos divulgadas aqui, tal que as substituições, adições, ou deleções sejam introduzidas na proteína codificada. As adições (inserções) ou deleções (trunicações) podem ser feitas na extremidade N-terminal ou C-terminal da proteína nativa, ou em um ou mais locais na proteína nativa. Similarmente, uma substituição de um ou mais nucleotídeos ou aminoácidos pode ser feita em um ou mais locais na proteína nativa.

[0070] Por exemplo podem ser feitas substituições de aminoácidos conservativas em um ou mais resíduos de aminoácidos previstos preferencialmente não essenciais. Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da sequência de tipo selvagem de uma proteína sem alterar a atividade biológica, enquanto um aminoácido "essencial" é requerido para a

atividade biológica. Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais similares são conhecidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais com ramificação beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Tais substituições não seriam feitas para resíduos de aminoácidos conservados, ou para resíduos de aminoácidos residindo dentro de um motivo conservado, onde tais resíduos são essenciais para a atividade da proteína.

[0071] Por exemplo, variantes da sequência de aminoácidos do polipeptídeo de referência podem ser preparadas por mutação da sequência de nucleotídeos codificando a enzima. Os mutantes resultantes podem ser expressos recombinantemente em plantas, e rastreados quanto àqueles que retêm atividade biológica por avaliação da atividade de α -amilase usando métodos bem conhecidos na técnica. Métodos para mutagênese e alterações na sequência de nucleotídeos são conhecidos na técnica. *Ver, por exemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82: 488 a 492;*

Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154: 367 a 382; e *Techniques in Molecular Biology* (Walker & Gaastra eds., MacMillan Publishing Co. 1983) e as referências citadas aí; bem como a Patente dos EUA nº 4.873.192. Evidentemente, as mutações feitas no DNA codificando a variante não podem perturbar a grelha de leitura e preferencialmente não criarão regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA secundária. Ver, Publicação de Pedido de Patente EP nº 75.444. Orientação quanto às substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade biológica da proteína de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.), aqui incorporado por referência.

[0072] Não é expectável que as deleções, inserções e substituições nos polipeptídeos descritas aqui produzam mudanças radicais nas características do polipeptídeo (por exemplo, a atividade do polipeptídeo). No entanto, quando é difícil prever o efeito exato da substituição, deleção ou inserção antes de a fazer, um perito na técnica apreciará que o efeito pode ser avaliado por ensaios de rastreio padrão que podem rastrear quanto às atividades de interesse do polipeptídeo particular (por exemplo, atividade de α -amilase).

[0073] Em algumas modalidades, as composições da invenção podem compreender fragmentos ativos do polipeptídeo. Como usado aqui, "fragmento" significa uma porção do polipeptídeo de referência que retêm a atividade de polipeptídeo de α -amilase. Um fragmento significa também uma porção de uma molécula de ácido nucleico codificando o

polipeptídeo de referência. Um fragmento ativo do polipeptídeo pode ser preparado, por exemplo, por isolamento de uma porção de uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo que expressa o fragmento codificado do polipeptídeo (por exemplo, por expressão recombinante *in vitro*), e avaliação da atividade do fragmento. As moléculas de ácido nucleico codificando tais fragmentos podem ter pelo menos cerca de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, ou 2200 nucleotídeos contíguos, ou qualquer gama intermédia, ou até ao número de nucleotídeos presentes em uma molécula de ácido nucleico codificando polipeptídeo de comprimento total. Como tal, os fragmentos de polipeptídeos podem ter pelo menos cerca de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 525, 550, 600, 625, 650, 675, ou 700 resíduos de aminoácidos contíguos, ou qualquer gama intermédia, ou até ao número total de resíduos de aminoácidos presentes no polipeptídeo de comprimento total. Assim, em algumas modalidades, a invenção proporciona um polipeptídeo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em pelo menos cerca de 150 resíduos de aminoácidos contíguos de um polipeptídeo da invenção (por exemplo, SEQ ID NO:1) e tendo atividade de α -amilase.

[0074] Como usados aqui, os termos "expressam", "expressa", "expresso" ou "expressão", e similares, no que diz respeito a uma molécula de ácido nucleico e/ou sequência de nucleotídeos (por exemplo, RNA ou DNA) indicam que a molécula de ácido nucleico e/ou sequência de nucleotídeos é

transcrita e opcionalmente, traduzida. Assim, uma molécula de ácido nucleico e/ou sequência de nucleotídeos pode expressar ou produzir um polipeptídeo de interesse ou um RNA não traduzido funcional.

[0075] Uma sequência de nucleotídeos "heteróloga" ou "recombinante" é uma sequência de nucleotídeos não naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual é introduzida, incluindo múltiplas cópias não ocorrendo naturalmente de uma sequência de nucleotídeos ocorrendo naturalmente.

[0076] Um ácido nucleico, sequência de nucleotídeos, polipeptídeo ou sequência de aminoácidos "nativo" ou de "tipo selvagem" se refere a um ácido nucleico, sequência de nucleotídeos, polipeptídeo ou sequência de aminoácidos ocorrendo naturalmente ou endógeno. Assim, por exemplo, um "mRNA de tipo selvagem" é um mRNA que ocorre naturalmente no ou é endógeno ao organismo. Uma sequência de ácidos nucleicos "homóloga" é uma sequência de nucleotídeos naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual é introduzida.

[0077] Também como usados aqui, os termos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "sequência de ácidos nucleicos", e "polinucleotídeo" podem ser usados indistintamente e englobam ambos RNA e DNA, incluindo cDNA, DNA genômico, mRNA, DNA ou RNA sintético (por exemplo, quimicamente sintetizado) e quimeras de RNA e DNA. O termo polinucleotídeo, sequência de nucleotídeos, ou ácido nucleico se refere a uma cadeia de nucleotídeos sem ter em conta o comprimento da cadeia. O ácido nucleico pode ser de fita dupla ou fita simples. Onde de fita simples, o ácido

nucleico pode ser uma fita senso ou uma fita antissenso. O ácido nucleico pode ser sintetizado usando análogos ou derivados de oligonucleotídeos (por exemplo, nucleotídeos de inosina ou fosforotioato). Tais oligonucleotídeos podem ser usados, por exemplo, para preparar ácidos nucleicos que têm capacidades de emparelhamento de bases alteradas ou resistência aumentada a nucleases. A presente invenção proporciona adicionalmente um ácido nucleico que é o complemento (que pode ser ou um complemento completo ou um complemento parcial) de um ácido nucleico, sequência de nucleotídeos, ou polinucleotídeo desta invenção. As moléculas de ácido nucleico e/ou sequências de nucleotídeos proporcionadas aqui são apresentadas aqui na direção 5' para 3', da esquerda para a direita e são representadas usando o código padrão para representação dos caracteres de nucleotídeos como estabelecido nas regras de sequências dos E.U.A., 37 CFR §§1.821 - 1.825 e o Padrão ST.25 da World Intellectual Property Organization (WIPO).

[0078] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico recombinantes, sequências de nucleotídeos e polipeptídeos da invenção são "isolados". Uma molécula de ácido nucleico "isolada", uma sequência de nucleotídeos "isolada" ou um polipeptídeo "isolado" é uma molécula de ácido nucleico, sequência de nucleotídeos ou polipeptídeo que, pela mão do homem, existe separadamente de seu ambiente nativo e não é, portanto, um produto da natureza. Uma molécula de ácido nucleico, sequência de nucleotídeos ou polipeptídeo isolado pode existir em uma forma purificada que é pelo menos parcialmente separada de pelo menos alguns dos outros componentes do organismo ou vírus ocorrendo

naturalmente, por exemplo, a célula ou componentes estruturais virais ou outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos comumente encontrados associados ao polinucleotídeo. Em formas de realização representativas, a molécula de ácido nucleico isolada, a sequência de nucleotídeos isolada e/ou o polipeptídeo isolado é pelo menos cerca de 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou mais puro.

[0079] Em outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico, sequência de nucleotídeos ou polipeptídeo isolado pode existir em um ambiente não nativo tal como, por exemplo, uma célula hospedeira recombinante. Assim, por exemplo, no que diz respeito a sequências de nucleotídeos, o termo "isolado" significa que está separado do cromossomo e/ou célula no qual ocorre naturalmente. Um polinucleotídeo está também isolado se estiver separado do cromossomo e/ou célula no qual ocorre naturalmente e for depois inserido em um contexto genético, um cromossomo e/ou uma célula no qual não ocorre naturalmente (por exemplo, uma célula hospedeira diferente, sequências reguladoras diferentes, e/ou posição diferente no genoma do que como encontrado na natureza). Conformemente, as moléculas de ácido nucleico, sequências de nucleotídeos e seus polipeptídeos codificados recombinantes são "isolados" na medida em que, pela mão do homem, existem separados do seu ambiente nativo e não são, portanto, produtos da natureza, no entanto, em algumas modalidades, podem ser introduzidos em e existirem em uma célula hospedeira recombinante.

[0080] Em algumas modalidades, as sequências de nucleotídeos e/ou moléculas de ácido nucleico da invenção

podem estar operacionalmente associadas a uma variedade de promotores para expressão em células hospedeiras (por exemplo, células vegetais). Como usado aqui, "operacionalmente associada a", quando se refere a uma primeira sequência de ácido nucleico que está operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico, significa uma situação quando a primeira sequência de ácido nucleico está colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor está operacionalmente associado a uma sequência codificante se o promotor efetuar a transcrição ou expressão da sequência codificante.

[0081] Um "promotor" de DNA é uma sequência de DNA não traduzida a montante de uma região codificante que contém o local de ligação para RNA polimerase e inicia a transcrição do DNA. Uma "região promotora" pode também incluir outros elementos que atuam como reguladores da expressão de genes. Os promotores podem incluir, por exemplo, promotores constitutivos, induzíveis, temporalmente regulados, regulados pelo desenvolvimento, quimicamente regulados, preferenciais quanto a tecidos e específicos quanto a tecidos para uso na preparação de moléculas de ácido nucleico recombinantes, isto é, genes quiméricos. Em aspectos particulares, um "promotor" útil da invenção é um promotor capaz de iniciar a transcrição de uma sequência de nucleotídeos em uma célula de uma planta.

[0082] Um "gene quimérico" é uma molécula de ácido nucleico recombinante na qual um promotor ou outra sequência de nucleotídeos reguladora está operacionalmente associado a uma sequência de nucleotídeos que codifica um

mRNA ou que é expresso como uma proteína, tal que a sequência de nucleotídeos reguladora seja capaz de regular a transcrição ou expressão da sequência de nucleotídeos associada. A sequência de nucleotídeos reguladora do gene quimérico não está normalmente operacionalmente ligada à sequência de nucleotídeos associada como encontrada na natureza.

[0083] A escolha do promotor irá variar dependendo dos requisitos temporais e espaciais para expressão, e também dependendo da célula hospedeira a ser transformada. Assim, por exemplo, a expressão de uma sequência de nucleotídeos pode ser em qualquer planta e/ou parte de planta (por exemplo, em folhas, em hastes ou caules, em espigas, em inflorescências (por exemplo espigões, panículas, sabugos, *etc.*), em raízes, sementes e/ou plântulas, e similares). Embora tenha sido mostrado que muitos promotores de dicotiledôneas são operacionais em monocotiledôneas e vice-versa, idealmente são selecionados promotores de dicotiledôneas para expressão em dicotiledôneas, e promotores de monocotiledôneas para expressão em monocotiledôneas. No entanto, não existe restrição quanto à proveniência de promotores selecionados; é suficiente que eles sejam operacionais no direcionamento da expressão das sequências de nucleotídeos na célula desejada.

[0084] Promotores úteis com a invenção incluem aqueles, mas não estão limitados àqueles, que dirigem a expressão de uma sequência de nucleotídeos constitutivamente, aqueles que dirigem a expressão quando induzidos, e aqueles que dirigem a expressão de um modo

específico quanto aos tecidos ou ao desenvolvimento. Estes vários tipos de promotores são conhecidos na técnica.

[0085] Exemplos de promotores constitutivos incluem, porém sem limitação, promotor do vírus Cestrum (cmp) (patente U.S. nº 7.166.770), promotor 1 da actina do arroz (Wang *et al.* (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12:3.399 a 3.406; bem como a patente US nº 5.641.876), promotor 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810 a 812), promotor 19S de CaMV (Lawton *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315 a 324), promotor nos (Ebert *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 84:5.745 a 5.749), promotor Adh (Walker *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 84:6.624 a 6.629), promotor da sacarose sintase (Yang & Russell (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87:4.144 a 4.148) e o promotor da ubiquitina. O promotor constitutivo derivado da ubiquitina se acumula em muitos tipos de células. Promotores da ubiquitina foram clonados de várias espécies de plantas para uso em plantas transgênicas, por exemplo, girassol (Binet *et al.*, 1991. *Plant Science* 79: 87 a 94), milho (Christensen *et al.*, 1989. *Plant Molec. Biol.* 12: 619 a 632) e *Arabidopsis* (Norris *et al.* 1993. *Plant Molec. Biol.* 21: 895 a 906). O promotor da ubiquitina (*UbiP*) do milho foi desenvolvido em sistemas de monocot transgênicas e a sua sequência e vetores construídos para transformação de monocot são divulgados na publicação de patente EP 0 342 926. Adicionalmente, os cassetes de expressão de promotor descritos por McElroy *et al.* (*Mol. Gen. Genet.* 231: 150 a 160 (1991)) podem ser facilmente modificados para a expressão de sequências de nucleotídeos e são particularmente adequados para uso em hospedeiras monocotiledôneas.

[0086] Em algumas modalidades podem ser usados promotores específicos quanto a tecidos/preferenciais quanto a tecidos. Padrões de expressão específicos ou preferenciais quanto aos tecidos incluem, mas não estão limitados a, específicos ou preferenciais quanto aos tecidos verdes, específicos ou preferenciais quanto às raízes, específicos ou preferenciais quanto aos caules, específicos ou preferenciais quanto às sementes e específicos e preferenciais quanto às flores. Promotores adequados para expressão em tecido verde incluem muitos que regulam genes envolvidos na fotossíntese e muitos destes foram clonados a partir de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Em uma modalidade, um promotor útil com a invenção é o promotor PEPC do milho do gene da fosfoenol carboxilase (Hudspeth & Grula, *Plant Molec. Biol.* 12: 579 a 589 (1989)). Exemplos não limitantes de promotores específicos quanto aos tecidos incluem aqueles associados a genes codificando as proteínas de armazenamento de sementes (tais como β -conglucina, cruciferina, napina e faseolina), zeína (por exemplo, gama zeína) ou proteínas de corpos oleosos (tais como oleosina), ou proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos (incluindo a proteína transportadora de acila, esteroil-ACP desaturase e ácido graxo desaturases (fad 2-1)), e outros ácidos nucleicos expressos durante o desenvolvimento do embrião (tais como Bce4, ver, por exemplo, Kridl *et al.* (1991) *Seed Sci. Res.* 1:209 a 219; bem como Patente EP nº 255378). Promotores específicos quanto aos tecidos ou preferenciais quanto aos tecidos úteis para a expressão de sequências de nucleotídeos em plantas, particularmente milho, incluem aqueles, mas não estão limitados àqueles que dirigem

a expressão na raiz, medula, folha ou pólen. Tais promotores são divulgados, por exemplo, na Publicação PCT WO 93/07278, aqui incorporada por referência na sua totalidade. Outros exemplos não limitantes de promotores específicos quanto aos tecidos ou preferenciais quanto a tecidos úteis incluem o promotor de rubisco do algodão divulgado na Patente dos EUA 6.040.504; o promotor de sacarose sintase do arroz divulgado na Patente dos EUA 5.604.121; o promotor específico quanto às raízes descrito por de Framond (*FEBS* 290: 103 a 106 (1991); EP 0 452 269 em nome de Ciba-Geigy); o promotor específico quanto aos caules descrito na Patente dos E.U.A. 5.625.136 (em nome de Ciba-Geigy) e que dirige a expressão do gene *trpA* do milho; e o promotor do vírus de enrolamento das folhas amarelas *Cestrum* divulgado na Publicação PCT WO 01/73087, todos incorporados por referência aqui.

[0087] Exemplos adicionais de promotores específicos quanto aos tecidos/preferenciais quanto aos tecidos incluem os, mas não estão limitados aos, promotores específicos quanto às raízes *RCc3* (Jeong et al. *Plant Physiol.* 153: 185 a 197 (2010)) e RB7 (Patente dos E.U.A. nº 5459252), o promotor da lectina (Lindstrom et al. (1990) *Der. Genet.* 11:160 a 167; e Vodkin (1983) *Prog. Clin. Biol. Res.* 138:87 a 98), promotor 1 da álcool desidrogenase 1 do milho (Dennis et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3.983 a 4.000), S-adenosil-L-metionina sintetase (SAMS) (Vander Mijnsbrugge et al. (1996) *Plant and Cell Physiology*, 37(8):1.108 a 1.115), promotor do complexo de coleta leve do milho (Bansal et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89:3.654 a 3.658), promotor da proteína de choque térmico do milho (O'Dell et al. (1985) *EMBO J.* 5:451 a 458; e Rochester

et al. (1986) *EMBO J.* 5:451 a 458), promotor de RuBP carboxilase de pequena subunidade da ervilha (Cashmore, "Nuclear genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase" páginas 29 a 39 Em: *Genetic Engineering of Plants* (Hollaender ed., Plenum Press 1983; e Poulsen *et al.* (1986) *Mol. Gen. Genet.* 205:193 a 200), promotor de manopina sintase do plasmídeo Ti (Langridge *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:3.219 a 3.223), promotor de nopalina sintase do plasmídeo Ti (Langridge *et al.* (1989), *supra*), promotor de chalcona isomerase da petúnia (van Tunen *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1.257 a 1.263), promotor da proteína 1 rica em glicinas do feijão (Keller *et al.* (1989) *Genes Dev.* 3:1.639 a 1.646), promotor truncado de 35S de CaMV (O'Dell *et al.* (1985) *Nature* 313:810 a 812), promotor da platatina da batata (Wenzler *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:347 a 354), promotor das células de raízes (Yamamoto *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7.449), promotor da zeína do milho (Kriz *et al.* (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207:90 a 98; Langridge *et al.* (1983) *Cell* 34:1.015 a 1.022; Reina *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6.425; Reina *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7.449; e Wandelt *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2.354), promotor da globulina-1 (Belanger *et al.* (1991) *Genetics* 129:863 a 872), promotor cab da α -tubulina (Sullivan *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:431 a 440), promotor da PEPCase (Hudspeth & Grula (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:579 a 589), promotores associados ao complexo do gene R (Chandler *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:1.175 a 1.183) e promotores da chalcona sintase (Franken *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:2.605 a 2.612).

[0088] Particularmente útil para expressão específica quanto às sementes é o promotor da vicilina da ervilha (Czako *et al.* (1992) *Mol. Gen. Genet.* 235: 33 a 40); bem como os promotores específicos quanto às sementes divulgados na Patente dos E.U.A. nº 5.625.136. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor específico quanto ao endosperma incluindo mas não se limitando a um promotor da gama-zeína do milho ou um promotor de ADP-gpp do milho.

[0089] Promotores úteis para expressão em folhas maduras são aqueles que são ativados quando do início da senescência, tais como o promotor de SAG de *Arabidopsis* (Gan *et al.* (1995) *Science* 270: 1.986 a 1.988).

[0090] Adicionalmente podem ser usados promotores funcionais em plastídeos. Exemplos não limitantes de tais promotores incluem a 5' UTR do gene 9 do bacteriófago T3 e outros promotores divulgados na Patente dos E.U.A. nº 7.579.516. Outros promotores úteis com a invenção incluem o, mas não estão limitados ao, promotor da carboxilase de RuBP de pequena subunidade S-E9 e o promotor do gene do inibidor de tripsina Kunitz (Kti3).

[0091] Em algumas modalidades da invenção podem ser usados promotores induzíveis. Assim, por exemplo, podem ser usados promotores regulados por químicos para modular a expressão de um gene em uma planta através da aplicação de um regulador químico exógeno. A regulação da expressão de sequências de nucleotídeos através de promotores que são quimicamente regulados permite que os polipeptídeos da invenção sejam sintetizados somente quando as plantas de cultura são tratadas com os químicos indutores. Dependendo

do objetivo, o promotor pode ser um promotor induzível por químicos, onde a aplicação de um químico induz a expressão de genes, ou um promotor repressível por químicos, onde a aplicação do químico reprime a expressão de genes.

[0092] Promotores induzíveis químicos são conhecidos na técnica e incluem o, mas não limitados ao, promotor *In2-2* do milho, que é ativado por fitoprotetores herbicidas de benzenossulfonamida, o promotor GST do milho, que é ativado por compostos eletrofílicos hidrofóbicos que são usados como herbicidas de pré-emergência, e o promotor *PR-1* do tabaco, que é ativado por ácido salicílico (*por exemplo*, o sistema *PR1a*), promotores responsivos a esteroides (*ver, por exemplo*, o promotor induzível por glucocorticoides em Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 88, 10.421 a 10.425 e McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14, 247 a 257) e promotores induzíveis por tetraciclina e repressíveis por tetraciclina (*ver, por exemplo*, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227, 229 a 237, e Patentes dos E.U.A. Números 5.814.618 e 5.789.156), promotores do sistema repressor Lac, promotores do sistema induzível por cobre, promotores do sistema induzível por salicilato (*por exemplo*, o sistema *PR1a*), promotores induzíveis por glucocorticoides (Aoyama et al. (1997) *Plant J.* 11: 605 a 612), e promotores do sistema induzível por ecdisona.

[0093] Outros exemplos não limitantes de promotores induzíveis incluem promotores induzíveis por ABA e turgor, o promotor do gene da proteína de ligação à auxina (Schwob et al. (1993) *Plant J.* 4: 423 a 432), o promotor da glicosil-transferase do flavonoide de UDP glucose (Ralston et al. (1988) *Genetics* 119: 185 a 197), o promotor do

inibidor da MPI proteínase (Cordero *et al.* (1994) *Plant J.* 6: 141 a 150), e o promotor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Kohler *et al.* (1995) *Plant Mol. Biol.* 29: 1.293 a 1.298; Martinez *et al.* (1989) *J. Mol. Biol.* 208: 551 a 565; e Quigley *et al.* (1989) *J. Mol. Evol.* 29: 412 a 421). Estão também incluídos os sistemas induzível por benzenossulfonamida (Patente dos E.U.A. No. 5,364,780) e induzível por álcool (Pedidos de Patentes Internacionais Nos. de Publicação WO 97/06269 e WO 97/06268) e promotores da glutationala-S-transferase. Da mesma forma, se pode usar qualquer um dos promotores induzíveis descritos em Gatz (1996) *Current Opinion Biotechnol.* 7: 168 a 172 e Gatz (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 89 a 108. Outros promotores quimicamente induzíveis úteis para direcionamento da expressão das sequências de nucleotídeos desta invenção em plantas são divulgados na Patente dos E.U.A. 5.614.395 aqui incorporada por referência na sua totalidade. A indução química da expressão de genes está também detalhada no pedido publicado EP 0 332 104 (em nome de Ciba-Geigy) e Patente dos E.U.A. 5.614.395. Em algumas modalidades, um promotor para indução química pode ser o promotor PR-1a do tabaco.

[0094] Um polipeptídeo desta invenção pode ou não ser dirigido para um compartimento dentro da planta através do uso de uma sequência sinal. Numerosas sequências sinal são conhecidas por influenciarem a expressão ou direcionamento de um polinucleotídeo para um compartimento/tecido particular ou fora de um compartimento/tecido particular. Sequências sinal e promotores do direcionamento adequados são conhecidos na

técnica e incluem aqueles, mas não estão limitados àqueles, proporcionados aqui (ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. nº 7.919.681). Exemplos de alvos incluem o, mas não estão limitados ao, vacúolo, retículo endoplasmático (ER), cloroplasto, amiloplasto, grânulo de amido, parede celular, semente, ou a um tecido particular, por exemplo, endosperma. Assim, uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo da invenção (por exemplo, SEQ ID NO:1) pode estar operacionalmente ligada a uma sequência sinal para direcionamento e/ou retenção do polipeptídeo para um compartimento dentro de uma planta. Em algumas modalidades, a sequência sinal pode ser uma sequência sinal N-terminal de cera, uma sequência sinal N-terminal de gama-zeína, um domínio de ligação ao amido, ou um domínio de ligação ao amido C-terminal. Em modalidades adicionais, a sequência sinal pode ser uma sequência sinal do ER, uma sequência de retenção do ER, uma sequência sinal do ER e uma sequência de retenção do ER adicional. Assim, em algumas modalidades da invenção, os polipeptídeos de α -amilase podem ser fundidos com uma ou mais sequências sinal (e/ou as sequências de nucleotídeos codificando os polipeptídeos podem estar operacionalmente ligadas a sequências de nucleotídeos codificando as sequências sinal).

[0095] Como usado aqui, "cassete de expressão" significa uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos de interesse (por exemplo, as sequências de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5), em que a sequência de nucleotídeos está operacionalmente associada a pelo menos uma sequência de controle (por exemplo, um promotor). Assim, algumas

modalidades da invenção proporcionam cassetes de expressão concebidos para expressar a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5. Deste modo, por exemplo, um ou mais promotores de plantas operacionalmente associados à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 ou uma sequência de nucleotídeos tendo identidade substancial com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5 podem ser proporcionados em um cassete de expressão para expressão em um organismo ou sua célula (por exemplo, uma planta, parte de planta e/ou célula vegetal).

[0096] Um cassete de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeos de interesse pode ser quimérico, significando que pelo menos um dos seus componentes é heterólogo no que diz respeito a pelo menos um dos seus outros componentes. Um cassete de expressão pode ser também um que ocorra naturalmente mas que tenha sido obtido em uma forma recombinante útil para expressão heteróloga. Tipicamente, no entanto, o cassete de expressão é heterólogo no que diz respeito ao hospedeiro, ou seja, a sequência de ácidos nucleicos particular do cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e tem de ser introduzida na célula hospedeira ou em um antepassado da célula hospedeira por um evento de transformação.

[0097] Adicionalmente aos promotores operacionalmente ligados a uma sequência de nucleotídeos a ser expressa, um cassete de expressão pode também incluir outras sequências reguladoras. Como usada aqui, uma "sequência reguladora" significa uma sequência de

nucleotídeos localizada a montante (sequências não codificantes 5'), dentro e/ou a jusante (sequências não codificantes 3') de uma sequência codificante, e/ou que influencia a transcrição, processamento ou estabilidade de RNA, ou tradução da sequência codificante associada. As sequências reguladoras incluem, mas não estão limitadas a, promotores, intensificadores, íntrons, sequências líder de tradução, sinais de terminação, e sequências sinal de poliadenilação. Em algumas modalidades, um cassete de expressão pode também incluir sequências de nucleotídeos codificando sequências sinal operacionalmente ligadas a uma sequência de polinucleotídeos da invenção.

[0098] Para propósitos da invenção, as sequências ou regiões reguladoras podem ser nativas/análogas em relação à planta, parte da planta e/ou célula vegetal e/ou as sequências reguladoras podem ser nativas/análogas em relação às outras sequências reguladoras. Alternativamente, as sequências reguladoras podem ser heterólogas em relação à planta (e/ou parte da planta e/ou célula vegetal) e/ou uma em relação à outra (*isto é*, sequências reguladoras). Assim, por exemplo, um promotor pode ser heterólogo quando está operacionalmente ligado a um polinucleotídeo de uma espécie diferente da espécie da qual o polinucleotídeo foi derivado. Alternativamente, um promotor pode ser também heterólogo em relação a uma sequência de nucleotídeos selecionada se o promotor for da mesma/análoga espécie da qual o polinucleotídeo é derivado, mas um ou ambos (*isto é*, promotor e/ou polinucleotídeo) são substancialmente modificados em relação à sua forma original e/ou locus genômico, e/ou o

promotor não é o promotor nativo do polinucleotídeo operacionalmente ligado.

[0099] Um número de sequências líder não traduzidas derivadas de vírus é conhecido como intensificando a expressão de genes. Especificamente foi mostrado que sequências líder do Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV, a "sequência ω "), Vírus do Mosqueado Clorótico do Maís (MCMV) e Vírus do Mosaico da Alfalfa (AMV) são eficazes na intensificação da expressão (Gallie *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 8.693 a 8.711; e Skuzeski *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 15: 65 a 79). Outras sequências líder conhecidas na técnica incluem, mas não estão limitadas a, líderes de picornavírus, tais como um líder da região não codificante 5' (EMCV) da encefalomiocardite (Elroy-Stein *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86: 6.126 a 6.130); líderes de potivírus tais como um líder do Vírus Etch do Tabaco (TEV) (Allison *et al.* (1986) *Virology* 154: 9 a 20); líder do Vírus do Mosaico Anão (MDMV) do Maís (Allison *et al.* (1986), *supra*); líder da proteína de ligação (BiP) à cadeia pesada da imunoglobulina humana (Macejak & Samow (1991) *Nature* 353: 90 a 94); líder não traduzido do mRNA da proteína de revestimento de AMV (AMV RNA 4; Jobling & Gehrke (1987) *Nature* 325: 622 a 625); líder de TMV de mosaico do tabaco (Gallie *et al.* (1989) *Molecular Biology of RNA* 237 a 256); e líder de MCMV (Lommel *et al.* (1991) *Virology* 81: 382 a 385). Ver também, Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965 a 968.

[0100] Um cassete de expressão pode também incluir opcionalmente uma região de terminação transcricional e/ou translacional (isto é, região de

terminação) que é funcional em plantas. Uma variedade de terminadores transcricionais está disponível para uso em cassetes de expressão e é responsável pela terminação da transcrição para além da sequência de nucleotídeos heteróloga de interesse e poliadenilação correta de mRNA. A região de terminação pode ser nativa em relação à região de iniciação transcricional, pode ser nativa em relação à sequência de nucleotídeos de interesse operacionalmente ligada, pode ser nativa em relação à planta hospedeira, ou pode ser derivada de outra fonte (*isto é*, estranha ou heteróloga em relação ao promotor, à sequência de nucleotídeos de interesse, à hospedeira de planta, ou qualquer sua combinação). Terminadores transcricionais apropriados incluem o, mas não estão limitados ao, terminador de 35S do CAMV, o terminador de tml, o terminador da nopalina sintase e/ou o terminador de rbcS E9 da ervilha. Estes podem ser usados tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas. Adicionalmente pode ser usado um terminador da transcrição nativo de uma sequência codificante.

[0101] Um cassete de expressão da invenção pode também incluir uma sequência de nucleotídeos para um marcador selecionável, que pode ser usado para selecionar uma planta, parte de planta e/ou célula de planta transformadas. Como usado no presente documento, "marcador selecionável" significa uma sequência de nucleotídeos que, quando expressa, fornece um fenótipo distinto à planta, parte da planta e/ou célula de planta expressando o marcador, permitindo assim que tais plantas, partes da planta e/ou células de planta transformadas sejam distinguidas daquelas que não têm o marcador. Uma tal sequência de nucleotídeos

pode codificar tanto um marcador selecionável como um marcador rastreável, dependendo de se o marcador confere um traço que pode ser selecionado por meios químicos, tal como por uso de um agente seletivo (*por exemplo*, um antibiótico, herbicida ou similares), ou se o marcador é simplesmente um traço que se pode identificar através de observação ou teste, tal como por rastreamento (*por exemplo*, o traço do locus R). Obviamente, muitos exemplos de marcadores selecionáveis adequados são conhecidos na técnica e podem ser usados nos cassetes de expressão descritos no presente documento.

[0102] Exemplos de marcadores selecionáveis incluem, mas não estão limitados a, uma sequência de nucleotídeos codificando *neo* ou *nptII*, que confere resistência à canamicina, G418, e similares (Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199: 183 a 188); uma sequência de nucleotídeos codificando *bar*, que confere resistência à fosfinotricina; uma sequência de nucleotídeos codificando uma 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase alterada, que confere resistência ao glifosato (Hinchee *et al.* (1988) *Biotech.* 6: 915 a 922); uma sequência de nucleotídeos codificando uma nitrilase tal como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confere resistência ao bromoxinil (Stalker *et al.* (1988) *Science* 242: 419 a 423); uma sequência de nucleotídeos codificando uma acetolactato sintase (ALS) alterada que confere resistência à imidazolinona, sulfonilureia ou outros químicos inibindo ALS (Pedido de Patente EP nº 154204); uma sequência de nucleotídeos codificando uma di-idrofolato reductase (DHFR) resistente ao metotrexato (Thillet *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 12.500 a 12.508); uma sequência de nucleotídeos codificando uma

dalapon de-halogenase que confere resistência ao dalapon; uma sequência de nucleotídeos codificando uma manose-6-fosfato isomerase (também referida como fosfomanose isomerase (PMI)) que confere uma capacidade de metabolizar a manose (Patentes dos E.U.A. nºs 5.767.378 e 5.994.629); uma sequência de nucleotídeos codificando uma antranilato sintase alterada que confere resistência ao triptofano de 5-metila; e/ou uma sequência de nucleotídeos codificando *hph* que confere resistência à higromicina. Um perito na técnica é capaz de escolher um marcador selecionável adequado para uso em um cassete de expressão da invenção.

[0103] Marcadores selecionáveis adicionais incluem, mas não estão limitados a, uma sequência de nucleotídeos codificando β -glucuronidase ou *uidA* (GUS) que codifica uma enzima para a qual são conhecidos vários substratos cromogênicos; uma sequência de nucleotídeos do locus R que codifica um produto que regula a produção de pigmentos de antocianina (cor vermelha) em tecidos de plantas (Dellaporta *et al.*, "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac", páginas 263 a 282 Em: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press 1988)); uma sequência de nucleotídeos codificando β -lactamase, uma enzima para a qual são conhecidos vários substratos cromogênicos (*por exemplo*, PADAC, uma cefalosporina cromogênica) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 75: 3.737 a 3.741); uma sequência de nucleotídeos codificando *xyle* que codifica uma catechol dioxigenase (Zukowsky *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 80: 1.101 a 1.105); uma sequência de nucleotídeos

codificando tirosinase, uma enzima capaz de oxidar tirosina até DOPA e dopaquinona, que por seu turno condensa para formar melanina (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2.703 a 2.714); uma sequência de nucleotídeos codificando β -galactosidase, uma enzima para a qual existem substratos cromogênicos; uma sequência de nucleotídeos codificando luciferase (lux) que permite detecção de bioluminescência (Ow *et al.* (1986) *Science* 234: 856 a 859); uma sequência de nucleotídeos codificando aquorina, que pode ser empregue na detecção da bioluminescência sensível ao cálcio (Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 1.259 a 1.268); ou uma sequência de nucleotídeos codificando uma proteína verde fluorescente (Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14: 403 a 406). Um perito na técnica é capaz de escolher um marcador selecionável adequado para uso em um cassete de expressão da invenção.

[0104] Em outros aspectos da invenção, um método para aumentar a taxa de crescimento (ganho de peso) ou o ganho de peso diário médio de um animal (*por exemplo*, um animal que é criado para a produção de carne) é fornecido, sendo que o método compreende alimentar o animal com uma composição de ração animal da presente invenção. Em modalidades, a taxa de crescimento do animal ou o ganho de peso diário médio do animal é aumentado em cerca de 0,05 lb/dia a cerca de 10 lbs/dia em comparação com a taxa de crescimento de um animal de controle que não é provido com a composição de ração animal da invenção. Assim, em algumas modalidades, o aumento na taxa de crescimento ou no ganho de peso diário médio pode ser pelo menos cerca de 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225,

0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,1, 4,2, 4,21, 4,22, 4,23, 4,24, 4,25, 4,26, 4,27, 4,28, 4,29, 4,3, 4,31, 4,32, 4,33, 4,34, 4,35, 4,36, 4,37, 4,38, 4,39, 4,4, 4,41, 4,42, 4,43, 4,44, 4,45, 4,46, 4,47, 4,48, 4,49, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9, 9,25, 9,5, 9,75, 10 lbs/dia e semelhantes e/ou qualquer faixa intermediária. Em algumas modalidades particulares, o aumento na taxa de crescimento ou ganho de peso diário médio pode ser de cerca de 0,05 lb/dia a cerca de 0,5 lb/por dia. Em modalidades adicionais, o aumento na taxa de crescimento ou ganho de peso diário médio pode ser cerca de 0,1 lb/dia em comparação com o crescimento de um animal de controle ao qual não é proporcionada a composição de ração animal.

[0105] Em aspectos ainda adicionais da invenção, é proporcionado um método para redução do número de dias necessários para alcançar um peso desejado em um animal, sendo que o método compreende a alimentação do animal com uma composição de ração animal da invenção, reduzindo deste modo o número de dias necessários para alcançar um peso desejado em comparação com o número de dias necessários para alcançar o mesmo peso desejado em um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal.

[0106] Como usado, um "peso desejado" ou "peso acabado desejado" pode significar um peso vivo ou um peso de carcaça quente. Assim, por exemplo, para gado, um peso vivo desejado pode ser entre cerca de 950 a cerca de 1.600 lbs e

um peso de carcaça quente desejado pode ser entre cerca de 700 a cerca e 1.000 lbs.

[0107] Convencionalmente, após o desmame e antes de entrar no parque de engorda, o gado de corte "de recria" (também conhecido como gado "de cria") passa a maioria da sua vida a pastorear em campo ou pastagem e depois é transportado para um parque de engorda para acabamento onde é alimentado com grão e outros concentrados de ração. De acordo com a presente invenção, no entanto, os métodos da invenção podem ser praticados com gado de corte de recria, *por exemplo*, um bezerro de corte em crescimento (macho e/ou fêmeo) após o desmame, que é opcionalmente criado para ser levado a um parque de engorda para acabamento.

[0108] Geralmente, o gado entra em um parque de engorda a um peso de cerca de 600 a cerca de 750 lbs. Dependendo do peso aquando da colocação, das condições de alimentação, e do peso acabado desejado, o período em um parque de engorda pode estar em uma gama de cerca de 90 dias a cerca de 300 dias. O ganho médio pode ser de cerca de 2,5 a cerca de 5 libras por dia.

[0109] Conformemente, em outro aspecto da invenção, o número de dias necessários para alcançar um peso desejado em um animal alimentado com as composições de ração animal da invenção pode ser reduzido em cerca de 1 dia a cerca de 30 dias em comparação com um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal. Em algumas modalidades, o número de dias necessários para alcançar um peso desejado em um animal alimentado com as composições de ração animal da invenção pode ser reduzido em cerca de 1 dia a cerca de 25 dias, cerca de 1 dia a cerca de 20 dias, cerca

de 5 dias a cerca de 20 dias, cerca de 5 dias a cerca de 15 dias, e similares, em comparação com um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal. Assim, em algumas modalidades, o número de dias necessários para alcançar um peso desejado em um animal alimentado com uma composição de ração animal da invenção pode ser reduzido em cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 dias e similares e/ou qualquer gama intermédia.

[0110] Em outros aspectos da invenção, é fornecido um método para aumentar a eficácia de utilização de ração por um animal (*por exemplo*, para carne, leite, ovos e/ou produção de lã), sendo que o método compreende alimentar o animal com uma composição de ração animal da invenção em uma quantidade eficaz para aumentar a eficácia de utilização de ração pelo animal em comparação com um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal.

[0111] A eficácia de utilização de ração pode ser calculada como a ingestão de matéria seca dividida pelo ganho de peso corporal do animal. Em algumas modalidades, o peso corporal é o peso corporal acabado antes do abate. Em modalidades adicionais, a ração fornecida é a quantidade de ração fornecida ao longo de um período de cerca de 15, 30, 45, 60 ou 90 dias a cerca de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 ou 300 dias, e qualquer faixa intermediária, desde que o valor da faixa inferior seja menor do que o valor da faixa superior. Em algumas modalidades, a ração proporcionada é a quantidade de ração que é proporcionada ao longo de um período de cerca de 100 dias a cerca de 275 dias, cerca de

125 dias a cerca de 250 dias, cerca de 150 dias a cerca de 225 dias, cerca de 180 dias a cerca de 200 dias e similares.

[0112] Conformemente, em algumas modalidades, o período de tempo (número de dias) ao longo do qual o ganho de peso é medido é 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300 dias, e similares, e/ou qualquer gama intermédia.

[0113] Em aspectos adicionais da invenção, o valor de ração do milho pelo animal é aumentado em cerca de

1% a cerca de 25% em comparação com um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal. O valor de ração do milho iguala a diferença na eficácia de ração da composição de ração da presente invenção e a eficácia de ração de um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração, dividida pela eficácia de ração do animal de controle que não é alimentado com a composição de ração, toda a qual é dividida pela percentagem de inclusão de milho da composição de ração. Conformemente, em algumas modalidades, o aumento no valor de ração do milho pode ser cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% e similares e/ou qualquer gama intermédia. Em modalidades particulares, o aumento no valor de ração do milho é cerca de 1% a cerca de 10% em comparação com um controle. Em uma modalidade representativa, o aumento no valor de ração é cerca de 5% em comparação com um controle.

[0114] Em aspectos adicionais da invenção, a razão entre ração e ganho pelo animal é reduzida, opcionalmente em cerca de 0,005 a cerca de 0,1, em comparação com um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal. A eficácia de utilização de ração, também conhecida como "F:G", é a ingestão de matéria seca por dia dividida pela média de ganho diário do animal. Consequentemente, em algumas modalidades, a diminuição na razão entre ração e ganho pode ser pelo menos cerca de 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,011, 0,012, 0,013, 0,014, 0,015, 0,016, 0,017, 0,018, 0,019, 0,02, 0,021, 0,022, 0,023, 0,024, 0,025, 0,026, 0,027, 0,028, 0,029, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05 e semelhantes, ou qualquer faixa intermediária.

Em modalidades específicas, a diminuição na razão entre ração e ganho é cerca de 0,005, 0,01, ou 0,015 a cerca de 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035. 0,040, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, ou 0,075, incluindo qualquer combinação de valores inferior e superior, desde que o valor inferior seja menor que o valor superior, em comparação com um controle.

[0115] Em modalidades adicionais, a invenção fornece um método para aumentar a eficácia de utilização de ração para produção de leite por um animal produtor de leite, sendo que o método compreende alimentar o animal, em uma quantidade eficaz para aumentar a eficácia de utilização de ração pelo animal produtor de leite, com uma composição de ração animal da invenção. A eficácia de utilização de ração pode ser calculada como a quantidade (libras) de leite produzido por cabeça por dia dividida pela quantidade de ração consumida, com base na matéria seca. Em modalidades, a eficácia de produção de leite é aumentada em pelo menos cerca de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 ou 0,1. Em modalidades adicionais, a eficácia de produção de leite é aumentada em cerca de 0,01 a cerca de 0,01, 0,0125, 0,015 ou 0,2; em cerca de 0,02 a cerca de 0,01, 0,0125, 0,015 ou 0,2; em cerca de 0,03 a cerca de 0,01, 0,0125, 0,015 ou 0,2; em cerca de 0,04 a cerca de 0,01, 0,0125, 0,015 ou 0,2; ou em cerca de 0,05 a cerca de 0,01, 0,0125, 0,015 ou 0,2.

[0116] Em algumas modalidades, o animal é alimentado com cerca de 1 lb a cerca de 30 lb de uma composição de ração animal da invenção por animal por dia. Conformemente, em algumas modalidades, o animal é alimentado

com cerca de 1 lb, 2 lbs, 3 lbs, 4 lbs, 5 lbs, 6 lbs, 7 lbs, 8 lbs, 9 lbs, 10 lbs, 11 lbs, 12 lbs, 13 lbs, 14 lbs, 15 lbs, 16 lbs, 17 lbs, 18 lbs, 19 lbs, 20 lbs, 21 lbs, 22 lbs, 23 lbs, 24 lbs, 25 lbs, 26 lbs, 27 lbs, 28 lbs, 29 lbs, 30 lbs da composição de ração animal da invenção por animal por dia, e similares, e/ou qualquer gama intermédia. Em algumas modalidades, o animal é alimentado com cerca de 9 lbs a cerca de 21 lb da composição de ração animal da invenção por animal por dia. Em algumas modalidades, um animal pode ser alimentado com a composição de ração animal da invenção *ad libitum*, ou cerca de uma vez a cerca de três vezes por dia (por exemplo, 1, 2, 3) ou qualquer sua combinação.

[0117] A composição de ração animal da presente invenção pode ser alimentada a qualquer animal, por exemplo, um animal de quinta, um animal de zoo, um animal de laboratório e/ou um animal de companhia. Em modalidades, o animal é um animal ruminante. Em algumas modalidades, o animal pode ser, mas não está limitado a, um bovino (por exemplo, gado doméstico, incluindo *Bos taurus* e/ou *B. indicus*, [por exemplo, gado leiteiro e/ou de corte], bisonte, búfalo), um equino (por exemplo, cavalo, burro, zebra e similares), uma ave (por exemplo, uma galinha, uma codorniz, um peru, um pato, e similares; por exemplo, aves de capoeira), uma ovelha, uma cabra, um antílope, um porco (por exemplo, suíno), um canino, um felino, um roedor (por exemplo, camundongo, rato, porquinho-da-índia); um coelho, um peixe e similares. Gado doméstico inclui bezerros, bois, novilhos e/ou vacas. Em modalidades, um bovino domesticado que é criado para consumo é um boi e/ou novilho (por exemplo, em um parque de engorda). Em modalidades, um bovino

domesticado que é criado para consumo é um bezerro em crescimento após o desmame (*por exemplo*, um bezerro de corte de recria ou de cria), sendo que é opcionalmente criado para ser levado a um parque de engorda para acabamento. Animais domésticos produtores de leite incluem vacas e/ou cabras. Em algumas modalidades, o animal pode ser aves de capoeira. Em outras modalidades, o animal pode ser uma galinha. Em modalidades adicionais, o animal pode ser suíno. Em modalidades ainda adicionais, o animal pode ser um porco.

[0118] De acordo com os métodos da invenção, para aumentar o ganho de peso e/ou a eficácia de utilização de ração de um animal que é criado para a produção de carne, o animal pode ser alimentado com uma composição de ração animal da invenção durante qualquer tempo adequado, até alcançar o resultado desejado. Em modalidades, o animal é alimentado com uma composição da invenção por pelo menos cerca de 15, 30, 45, 60 ou 90 dias a cerca de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 ou 300 dias, e qualquer faixa intermediária, desde que o valor inferior seja menor que o valor superior. Em algumas modalidades, o animal é alimentado com uma ração animal da invenção por um período de cerca de 30 dias a cerca de 275 dias, cerca de 45 dias a cerca de 250 dias, cerca de 60 dias a cerca de 225 dias, cerca de 75 dias a cerca de 200 dias, cerca de 100 dias a cerca de 275 dias, cerca de 125 dias a cerca de 250 dias, cerca de 150 dias a cerca de 225 dias, cerca de 180 dias a cerca de 200 dias e semelhantes.

[0119] Consequentemente, em algumas modalidades, o animal é alimentado com uma composição de ração animal da invenção por pelo menos cerca de 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 , 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300 ou mais dias e semelhantes, e/ou qualquer faixa intermediária.

[0120] No caso de gado de corte, o animal pode ser alimentado com a composição de ração animal durante o estágio de recria e/ou acabamento (parque de engorda).

[0121] Em modalidades adicionais, a presente invenção fornece um método para aumentar a quantidade (por exemplo, medida como volume ou peso) de leite produzido por

um animal produtor de leite (por exemplo, uma vaca, uma cabra e semelhantes) que compreende alimentar o animal produtor de leite com uma composição de ração animal da presente invenção. Em modalidades, a quantidade de leite produzido pelo animal é aumentada em cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5% a cerca de 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ou 200% (incluindo faixas abrangidas por qualquer combinação de valor inferior e valor superior) em comparação com a quantidade de leite produzido por um animal de controle que não é proporcionada pela composição de ração animal da invenção. Em outras modalidades, a quantidade de leite produzido pelo animal é aumentada em cerca de 1% a cerca de 50%, cerca de 2% a cerca de 50%, cerca de 1% a cerca de 25%, cerca de 2% a cerca de 25%, cerca de 1% a cerca de 15%, cerca de 2% a cerca de 15%, cerca de 1% a cerca de 10%, cerca de 2% a cerca de 10% e semelhantes. Em modalidades adicionais, a quantidade de leite produzido pelo animal é aumentada em pelo menos cerca de 1%, 2% 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 185%, 190%, 195% e/ou 200% em comparação com um animal de controle que não foi alimentado com a composição de ração animal da invenção. O aumento na produção de leite pode ser medido ao longo de qualquer período de tempo adequado, *por exemplo*, em uma base diária (*por exemplo*, 24 horas), cerca de 48 horas, cerca de 72 horas, semanalmente, mensalmente ou até mesmo a produção total de leite ao longo de todo o ciclo de lactação.

[0122] De acordo com os métodos da invenção, para aumentar a produção de leite e/ou eficácia de utilização

de ração de um animal produtor de leite, o animal pode ser alimentado com uma composição de ração animal da invenção por qualquer tempo adequado para alcançar o resultado desejado. Em modalidades, o animal é alimentado com uma composição da invenção por pelo menos cerca de 15, 30, 45, 60 ou 90 dias a cerca de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 ou 300 dias, e qualquer faixa intermediária, desde que o valor inferior seja menor que o valor superior. Em algumas modalidades, o animal é alimentado com uma ração animal da invenção por um período de cerca de 30 dias a cerca de 275 dias, cerca de 45 dias a cerca de 250 dias, cerca de 60 dias a cerca de 225 dias, cerca de 75 dias a cerca de 200 dias e semelhantes.

[0123] Conseqüentemente, em algumas modalidades, o animal produtor de leite é alimentado com uma composição de ração animal da invenção por pelo menos cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198,

199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300 ou mais dias e semelhantes, e/ou qualquer faixa intermediária.

[0124] Adicionalmente, animais produtores de leite podem ser alimentados com a composição de ração animal durante o período seco (*por exemplo*, durante a gestação, opcionalmente, pelo menos as últimas 2, 3, 4, 6 ou 8 semanas de gestação) e/ou durante o período de lactação.

[0125] A invenção também contempla métodos para tratar, prevenir e/ou reduzir o início, a duração e/ou a severidade de uma infecção microbiana ou fúngica em um animal. Em modalidades, o animal é um animal ruminante (*por exemplo*, um sujeito animal bovino, conforme descrito acima, incluindo gado de corte e vacas leiteiras). Em modalidades, a infecção é uma infecção com um organismo bacteriano, de levedura e/ou protozoário. Em modalidades, a infecção é uma infecção do intestino (*por exemplo*, do intestino grosso). Em modalidades, a infecção é uma infecção com uma espécie de *Clostridium*, *por exemplo*, *C. perfringens*, opcionalmente *C. perfringens* Tipo A. Sem se ater a qualquer teoria da invenção, sabe-se na técnica que amido não digerido no intestino, particularmente no intestino grosso, pode resultar em infecção microbiana. A digestibilidade melhorada

do amido nas rações animais da presente invenção pode, portanto, ser vantajosa para tratar, prevenir e/reduzir o início, a duração e/ou severidade de infecções microbianas.

[0126] Os termos "aumentar", "aumentando", "aumento", "melhorar", "melhorado", "melhorando" e "melhoria" (e variações gramaticais dos mesmos), conforme usado no presente documento, descrevem um aumento no parâmetro especificado alimentando-se um animal com uma composição de ração animal da invenção, em que o parâmetro especificado é elevado em comparação com um animal não alimentado com uma composição de ração animal da invenção (isto é, um controle), por exemplo, é alimentado com uma ração convencionais que não compreende a alfa-amilase exógena.

[0127] Conforme usado no presente documento, os termos "reduzir", "reduzido", "reduzindo", "redução", "depreciar", "suprimir" e "diminuir" (e variações gramaticais dos mesmos) descrevem, por exemplo, uma redução ou diminuição no parâmetro especificado alimentando-se um animal com uma composição de ração animal da invenção, em que o parâmetro especificado é menor em comparação com um animal de controle adequado (por exemplo, um animal de controle que não é alimentado com a composição de ração animal que compreende a alfa-amilase exógena).

[0128] A presente invenção é mais particularmente descrita nos seguintes exemplos que se destinam a ser ilustrativos somente, uma vez que numerosas modificações e variações neles serão aparentes àqueles peritos na técnica.

EXEMPLO 1**Estudos de acabamento de gado***Experiência 1*

[0129] Trezentos novilhos mestiços (BW Inicial = 658 ± 36 lbs) foram utilizados em um ensaio de acabamento de parque de engorda no parque de engorda de UNL Agricultural Research and Development Center (ARDC) próximo de Mead, NE. O gado foi alimentado até ao limite com um regime alimentar a BW a 2% consistindo em grãos úmidos destilados de milho mais solúveis a 32%, feno de alfafa a 32%, milho laminado a seco a 32%, e suplemento (base de DM) a 4% durante cinco d antes do início da experiência. Os pesos iniciais de dois dias foram registrados aos d 0 a 1 cuja média foi calculada e que foram usados como o BW inicial. Os novilhos foram bloqueados por BW em blocos de BW leves, médios e pesados (n = 3, 2 e 1 replicados de cela, respectivamente), estratificados por BW e atribuídos aleatoriamente a uma de 30 celas com as celas atribuídas aleatoriamente a um de cinco tratamentos de regime alimentar. Existiram 10 cabeças/cela e 6 replicações/tratamento. Os tratamentos de regime alimentar incluíram 1) fonte de milho comercial (CON), 2) milho de teste Enogen® (SYN), 3) combinação 50:50 de CON e SYN, 4) CON com ração de glúten de milho úmida (CON-SB) e 5) SYN com ração de glúten de milho úmida (SYN-SB) em um desenho em blocos randomizado (Tabela 1). Os novilhos foram adaptados aos regimes alimentares de acabamento ao longo de um período de 21 d com milho substituindo feno de alfafa, enquanto a inclusão de silagem de milho, grão úmido destilado de milho mais solúveis (WDGS) e suplemento permaneceu a mesma em todos os regimes alimentares. Em regimes alimentares contendo

ração de glúten de milho úmida (Sweet Bran® (Cargill); SB), a concentração permaneceu a mesma em todos os regimes alimentares com adaptação de grãos. Os regimes alimentares foram formulados para cumprirem ou excederem os requisitos de NRC para proteína e minerais. Os regimes alimentares de acabamento finais proporcionaram 360 mg/novilho diariamente de Rumensin® (30 g/ton de DM) e 90 mg/novilho diariamente de Tylan® (9 g/ton de DM). Os novilhos foram implantados ao d 1 com Revalor®-XS.

[0130] Todos os novilhos foram coletados em um matadouro comercial (Greater Omaha Pack, Omaha, NE) ao d 173. O BW vivo final foi coletado ao d de abate e um encolhimento a 4% foi aplicado para cálculo do rendimento de carcaça. A ração oferecida ao dia 173 foi 50% da DMI do dia prévio e pesada às 4 h da tarde. Os novilhos foram depois enviados e mantidos até ao abate no dia seguinte. O peso de carcaça quente e pontuações dos fígados foram registrados ao d de abate. A espessura de gordura, área de LM e pontuação de marmorização USDA foram registradas após um resfriamento de 48 h. Os BW, ADG e F:G finais foram calculados usando HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

Experiência 2

[0131] Duzentos e quarenta novilhos mestiços (BW Inicial = 634 ± 34 lbs) foram utilizados em um ensaio de acabamento de parque de engorda no parque de engorda de UNL Panhandle Research and Extension Center (PHREC) próximo de Scottsbluff, NE. A alimentação até ao limite do gado e os protocolos de BW iniciais foram os mesmos que *Exp 1*. Os novilhos foram bloqueados por BW em blocos de BW leves,

médios e pesados, estratificados por BW e atribuídos aleatoriamente a uma de 24 celas com as celas atribuídas aleatoriamente a um de quatro tratamentos de regime alimentar. Existiram 10 cabeças por cela e 6 replicações por tratamento. Os tratamentos de regime alimentar incluíram 1) CON, 2) SYN, 3) COMBINAÇÃO e 4) CON com enzima (Amaize; Alltech, Inc.) adicionada ao regime alimentar a uma taxa de 5 g/novilho diariamente (NZ; Tabela 2). A alimentação até ao limite, pesagem, bloqueio, implante e procedimentos de adaptação aos grãos foram os mesmos que *Exp 1*. Os novilhos nos blocos de BW pesados, médios e leves foram coletados em um matadouro comercial (Cargill Meat Solutions, Fort Morgan, CO) aos dias 148, 169 e 181 (respectivamente). Ao dia final, os novilhos foram impedidos de se alimentarem e pesados às 8 h da manhã antes de serem enviados e abatidos no mesmo dia. Os dados foram analisados como um desenho em blocos randomizado com bloco de BW inicial como um efeito fixo e cela como a unidade experimental.

Tabela 1. Tratamentos de regime alimentar avaliando milho de teste e milho convencional com ou sem Sweet Bran (*Exp 1*).

Ingrediente, DM	%	CON	SYN	COMBINAÇÃO	CON- CGF ¹	SYN- CGF ²
Milho Comercial	68,0	-	34,0	58,0	-	
Milho de teste ³	-	68,0	34,0	-	58,0	
Sweet Bran	-	-	-	25,0	25,0	

MDGS ⁴	15,0	15,0	15,0	-	-
Silagem de milho	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Suplemento de farinha ⁵	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Milho triturado fino	2,174	2,174	2,174	2,435	2,435
Calcário	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Ureia	0,6	0,6	0,6	0,4	0,4
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Sebo	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Pré-mistura de minerais vestigiais	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Cloreto de potássio	0,02	0,02	0,02	--	--
Rumensin-90	0,0165	0,0165	0,0165	0,0165	0,0165
Pré-mistura de Vitamina ADE	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Tylan-40	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Composição de Nutrientes Analisada, %					
Amido	52,48	52,55	52,52	47,75	47,81

CP	12,84	12,91	12,88	12,58	12,64
Gordura	4,07	4,01	4,04	3,19	3,13
NDF	15,91	15,16	15,54	18,80	18,16
S	0,16	0,15	0,15	0,19	0,18
P	0,40	0,39	0,39	0,46	0,44
K	0,57	0,58	0,57	0,67	0,68
Mg	0,17	0,17	0,17	0,19	0,19

¹Milho convencional com ração de glúten de milho úmida, Sweet Bran

²Milho de teste da Syngenta com ração de glúten de milho úmida, Sweet Bran

³Milho de teste proporcionado pela Syngenta sob procedimento preservação da identidade. Armazenado, processado, e alim separadamente

⁴ MDGS = grãos destilados modificados com solúveis

⁵O suplemento incluiu 30 g/ton de Rumensin® e 9 g/ton de Tylan®.

Tabela 2. Tratamentos de regime alimentar avaliando milho de teste e milho convencional com ou sem enzima adicionada (Exp 2).

Ingrediente	CON	SYN	COMBINAÇÃO	CON-NZ
Milho	64,0	-	32,0	64,0
Milho de teste	-	64,0	32,0	-
WDGS	15,0	15,0	15,0	15,0
Silagem de milho	15,0	15,0	15,0	15,0

Suplemento Líquido ^{2,3}	6,0	6,0	6,0	6,0 ⁴
-----------------------------------	-----	-----	-----	------------------

Composição de Nutrientes

Analisada, %

Amido	51,40	52,23	51,82	51,40
CP	12,96	13,41	13,18	12,96
Gordura	3,44	3,89	3,67	3,44
NDF	15,46	15,66	15,56	15,46
S	0,15	0,15	0,15	0,15
P	0,34	0,31	0,32	0,34
K	0,54	0,52	0,53	0,54
Mg	0,15	0,15	0,15	0,15

²O suplemento líquido continha; ureia a 0,6%, Ca a 1,6%, S a 0,3%, cloreto de potássio a 0,02%,

vitaminas e minerais vestigiais.

³Rumensin® (30 g/ton) e Tylan® (9 g/ton) foram adicionados através de micromáquina.

⁴Enzima adicionada através de micromáquina à taxa de 5 g/novilho diariamente

Tabela 3. Efeito de híbrido de milho no desempenho de novilhos em acabamento e características das carcaças sem Sweet Bran (Exp. 1)

Item	Tratamentos de Regime Alimentar ¹		
	CON	SYN	COMBINAÇÃO
<i>Desempenho dos Animais</i>			
BW inicial, lbs	672	673	673
DMI, lbs	23,0	22,4	23,0
BW final, lbs ⁴	1296	1291	1304

ADG, lbs ⁴	3,61	3,57	3,64
G:F, lb/lb ⁴	0,159	0,161	0,159
F:G, lb/lb ^{4,5}	6,44	6,31	6,34
<i>Características das</i>			
<i>Carcaças</i>			
HCW, lbs	816	814	821
Carcaça %	62,7	62,8	62,9
Pontuação	de		
Marmorização ⁶	461	489	511
Profundidade	de		
Gordura, in	0,48 ^a	0,55 ^b	0,57 ^b
Área de LM, in ²	12,9	12,5	12,3
Grau de Rendimento			
Calculado ⁷	3,68 ^a	3,99 ^b	4,10 ^b
Abcessos do Fígado, %	8,33	5,00	5,37

¹CON = híbrido de milho comercial de controle, SYN = híbrido de milho de teste da Syngenta, COMBINAÇÃO = combinação 50:50 de CON e SYN em uma base de DM.

⁴Calculada a partir de HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

⁵Analisada como G:F, o recíproco de F:G.

⁶Pontuação de Marmorização: 300 = Ligeira⁰⁰, 400 = Pequena⁰⁰.

⁷Calculado como $2,5 + (2,5 \times \text{gordura da } 12^{\text{a}} \text{ costela}) + (0,2 \times 2,5 [\text{KPH}]) + (0,0038 \times \text{HCW}) - (0,32 \times \text{área de LM})$.

^{a,b} As médias dentro de uma linha com expoentes diferentes diferem ($P < 0,05$).

Tabela 4. Efeito de híbrido de milho e inclusão de Sweet Bran no desempenho de novilhos em acabamento e características das carcaças (Exp 1)

	Tratamentos de Regime Alimentar ¹			
	SB a 0%		SB a 25%	
	CON	SYN	CON	SYN
<i>Desempenho dos Animais</i>				
BW inicial, lbs	671	673	673	674
DMI, lbs	23,0	22,4	23,3	22,7
BW final, lbs ³	1295	1290	1278	1317
ADG, lbs ³	3,60 ^{ab}	3,57 ^{ab}	3,49 ^b	3,72 ^a
G:F ³	0,159 ^{bc}	0,160 ^{ab}	0,151 ^c	0,164 ^a
F:G, lb/lb ^{3,4}	6,44	6,31	6,71	6,13
<i>Características das Carcaças</i>				
HCW, lbs	816	813	805	829
Carcaça %	62,7	62,8	62,8	63,1
Pontuação de Marmorização ⁵	456	484	443	488
Profundidade de Gordura, in	0,48	0,56	0,48	0,53
Área de Bife, in ²	12,9	12,5	12,8	13,0

Grau de				
Rendimento				
Calculado ⁶	3,67	3,98	3,67	3,83
Abcessos do				
Fígado, %	8,96	5,63	11,12	5,63

¹ SB a 0% = regimes alimentares sem Sweet Bran, SB a 25% = regimes alimentares contendo Sweet Bran a 25%, CON = híbrido de milho comercial, SYN = milho de teste da Syngenta.

³Calculada a partir de HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

⁴Analisada como G:F, o recíproco de F:G.

⁵Pontuação de Marmorização: 300 = Ligeira⁰⁰, 400 = Pequena⁰⁰.

⁶ Calculado como $2,5 + (2,5 \times \text{gordura da } 12^{\text{a}} \text{ costela}) + (0,2 \times 2,5 \text{ [KPH]}) + (0,0038 \times \text{HCW}) - (0,32 \times \text{área de LM})$.

^{a,b,c} As médias dentro de uma linha com expoentes diferentes diferem ($P < 0,05$).

Tabela 5. Efeito de híbrido de milho e inclusão de uma enzima alfa-amilase no desempenho de novilhos em acabamento e características das carcaças (Exp 2)

Item	Tratamento de Regime Alimentar ¹			
	CON	SYN	COMBINAÇÃO	NZ
<i>Desempenho dos Animais</i>				
BW inicial, lbs	646	649	647	647
DMI, lbs	23,6	23,8	23,5	23,4
BW final, lbs ³	1257 ^a	1301 ^b	1299 ^b	1299 ^b
ADG, lbs ³	3,71 ^a	3,94 ^b	3,93 ^b	3,93 ^b

G:F ³	0,158	0,165	0,166	0,167
F:G, lb/lb ^{3,4}	6,53	6,18	6,07	6,07
<i>Características das Carcaças</i>				
HCW, lbs	792 ^a	820 ^b	818 ^b	818 ^b
Carcaça %	62,7	63,2	63,3	63,2
Pontuação de Marmorização ⁵	451 ^a	468 ^{ab}	481 ^b	468 ^{ab}
Profundidade de Gordura, in	0,57 ^a	0,60 ^{ab}	0,61 ^b	0,60 ^{ab}
Área de Bife, in ²	12,1 ^a	12,1 ^a	12,4 ^b	12,4 ^b
Grau de Rendimento Calculado ⁶	3,47	3,64	3,55	3,55
Abcessos do Fígado, %	3,33	5,00	0	5,33

¹CON = híbrido de milho comercial, SYN = milho de teste da Syngenta, COMBINAÇÃO = combinação 50:50 de CON e SYN em uma base de DM, NZ = inclusão de uma enzima alfa-amilase comercialmente disponível em regimes alimentares baseados em CON.

²³Calculada a partir de HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

⁴Analisada como G:F, o recíproco de F:G.

⁵Pontuação de Marmorização: 300 = Ligeira⁰⁰, 400 = Pequena⁰⁰.

⁶Calculado como $2,5 + (2,5 \times \text{gordura da } 12^{\text{a}} \text{ costela}) + (0,2 \times 2,5 \text{ [KPH]}) + (0,0038 \times \text{HCW}) - (0,32 \times \text{área de LM})$.

^{a,b} As médias dentro de uma linha com expoentes diferentes diferem ($P < 0,05$).

EXPERIÊNCIA 3

[0132] Foi conduzido um ensaio de acabamento de 173 d utilizando um número de novilhos mestiços (BW (Peso Corporal) inicial) = 685 ± 46 lbs) em um desenho em blocos randomizado. Os novilhos foram alimentados até ao limite com um regime alimentar a BW a 2% consistindo em feno de alfafa a 47,5%, ração de glúten de milho úmida a 47,5%, e suplemento a 5% (base de DM (Matéria Seca)) durante cinco d antes do início da experiência. Os pesos iniciais de dois dias foram registrados aos dias 0 a 1 e a sua média foi calculada para se determinar o BW inicial. Em conjunto com medição do BW inicial ao d 1, os novilhos foram implantados com Revalor®-XS. Os novilhos foram bloqueados por BW em blocos de BW leves e pesados estratificados por BW e atribuídos aleatoriamente à cela. As celas foram depois atribuídas aleatoriamente a um tratamento de regime alimentar com 8 cabeças/cela e 6 replicações/tratamento.

[0133] Os tratamentos de regime alimentar (Tabela 6) foram arrançados com fatores incluindo milho de teste ou controle (Enogen® ou Não Enogen®), e tipo de subproduto (MDGS (Grãos Destilados Modificados com Solúveis) ou Sweet Bran). Os subprodutos utilizados em este ensaio foram proporcionados como uma fonte de proteína (MDGS a 18%) ou como um meio de controle da acidose (SB (Sweet Bran® (Cargill)) a 35%). Os novilhos foram adaptados aos regimes alimentares de acabamento ao longo de um período de 21 d com milho substituindo feno de alfalfa, enquanto a inclusão de silagem de sorgo, Sweet Bran ou MDGS, e suplemento permaneceu a mesma em todos os regimes alimentares. Os regimes

alimentares foram formulados para cumprirem ou excederem os requisitos de NRC para proteína e minerais. Os regimes alimentares de acabamento finais proporcionaram 330 mg/novilho diariamente de Rumensin® (30 g/ton de DM), e 90 mg/novilho diariamente de Tylan® (8,18 g/ton de DM).

[0134] Todos os novilhos foram coletados ao dia 174 em um matadouro comercial (Greater Omaha Pack, Omaha, NE). A ração oferecida ao dia 173 foi 50% da DMI do dia prévio e pesada às 4 h da tarde. Os novilhos foram depois enviados para o matadouro comercial e mantidos até ao dia seguinte para abate. Os pesos de carcaças quentes e pontuações de fígados foram registrados ao dia de abate com as características das carcaças tais como espessura de gordura da 12^a costela, área de LM, e pontuação de marmorização USDA sendo registradas após um resfriamento de 48 h. O grau de rendimento foi calculado usando a equação USDA YG [$YG = 2,5 + 2,5$ (espessura de gordura, in) - $0,32$ (área de LM, in²) + $0,2$ (gordura de KPH, %) + $0,0038$ (HCW, lb)]. O BW final, ADG (Ganho Diário Médio), e G:F (razão de Ganho em relação à Ração) foram calculados usando HCW (Peso de Carcaça Quente) ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

Tabela 6: Composição do Regime Alimentar em uma base de DM alimentada a novilhos em acabamento

Ingrediente, % DM	Milho de Teste				Controle			
	MDGS ¹		Sweet Bran		MDGS ¹		Sweet Bran	
Milho de Teste	69,5	-	52,5	-	-	-	-	-
DRC ²								
Controle	-	-	-	-	69,5	-	52,5	-
DRC ²								
Sweet Bran	-	-	35,0	35,0	-	-	35,0	35,0
Grãos destilados modificados mais solúveis	18,0	18,0	-	-	18,0	18,0	-	-
Silagem de Sorgo	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Suplemento de Farinha ⁴	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Milho triturado fino	2,22	2,22	2,80	2,80	2,22	2,22	2,80	2,80
Calcário	1,71	1,71	1,68	1,68	1,71	1,71	1,68	1,68
Ureia	0,55	0,55	-	-	0,55	0,55	-	-
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Sebo	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
	5	5	5	5	5	5	5	5
Pré- mistura de minerais vestigiai s	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Rumensin- 90	0,01 65							
Pré- mistura de Vitamina ADE	0,01 5							
Tylan-40	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Composiçã o de Nutriente s Analisada , %	47,5	49,0	39,0	40,2	47,1	48,7	38,7	39,9
Amido	6	8	6	1	4	4	4	5
CP	12,1	12,0	13,5	13,4	12,2	12,0	13,6	13,4
Gordura	4,35	4,98	3,19	3,66	4,35	5,19	3,19	3,82
NDF	15,5	14,9	20,0	19,5	16,2	15,4	20,5	19,9
S	0,22	0,22	0,21	0,16	0,22	0,21	0,21	0,21
P	0,38	0,39	0,53	0,53	0,34	0,35	0,50	0,51
K	0,47	0,48	0,68	0,68	0,45	0,45	0,66	0,66

Mg 0,17 0,17 0,24 0,24 0,16 0,16 0,23 0,23

¹MDGS = Grãos destilados modificados mais solúveis

²DRC = Milho laminado a seco

⁴O suplemento incluiu 30 g/ton de Rumensin® e 9 g/ton de Tylan®

Tabela 7: Efeitos de milho de teste no desempenho de novilhos em acabamento

	DRC ¹	
	Milho de Teste	Controle
<u>Desempenho</u>		
BW inicial, lb	700	699
BW final, lb ⁵	1451^b	1433^a
DMI, lb/d	23,7	23,8
ADG, lb ⁵	4,36^b	4,25^{ab}
G:F ⁵	0,184	0,178
<u>Características das Carcaças</u>		
HCW, lb	912	904
Marmorização ⁶	505	492
Área de LM, in ²	14,3	14,0
Profundidade de Gordura, in	0,55	0,59
YG cal. ⁷	3,24	3,41

¹DRC = Milho laminado a seco;

⁵Calculada a partir de HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

⁶Pontuação de Marmorização: 400 = Pequena⁰⁰; 500 = Modesta⁰⁰

⁷Calculado como $2,5 + (2,5 \times \text{gordura da 12}^{\text{a}} \text{ costela}) + (0,2 \times 2,5 [\text{KPH}]) + (0,0038 \times \text{HCW}) - (0,32 \times \text{área de LM})$

^{a,b} As médias dentro de uma linha com expoentes diferentes diferem ($P < 0,10$).

Tabela 8: Efeitos de milho de teste e tipo de subproduto no desempenho de novilhos em acabamento

	MDGS ¹		Sweet Bran	
	Milho de Teste	Controle	Milho de Teste	Controle
<u>Desempenho</u>				
BW inicial, lb	700	698	699	700
BW final, lb ⁵	1434	1427	1447	1453
DMI, lb/d	22,5	22,9	23,3	23,4
ADG, lb ⁵	4,25	4,21	4,34	4,36
G:F ⁵	0,190	0,184	0,186	0,187
<u>Características das Carcaças</u>				
HCW, lb	903	899	913	916
Marmorização ⁶	488	494	510	506
Área de LM, in ²	14,4	14,0	14,1	14,1
Profundidade de Gordura, in				
YG cal. ⁷	3,21	3,43	3,42	3,40

¹MDGS = Grãos destilados modificados mais solúveis

⁵Calculada a partir de HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%

⁶Pontuação de Marmorização: 400 = Pequena⁰⁰; 500 = Modesta⁰⁰

⁷Calculado como $2,5 + (2,5 \times \text{gordura da 12}^{\text{a}} \text{ costela}) + (0,2 \times 2,5 \text{ [KPH]}) + (0,0038 \times \text{HCW}) - (0,32 \times \text{área de LM})$

EXEMPLO 2

Estudos de acabamento adicionais com milho de ração Enogen®

[0135] Dois experimentos de acabamento foram conduzidos para avaliar milho de ração Enogen® (EFC) que contém um traço da enzima alfa-amilase em comparação com o milho de controle com isolina quase negativa em dois locais no desempenho do gado e nas características da carcaça.

Experimento:

[0136] Trezentos novilhos híbridos (peso corporal inicial [BW] = 703 lb, ± 43) foram utilizados em um ensaio de acabamento no parque de engorda do Eastern Nebraska Research and Extension Center (ENREC) da Universidade de Nebraska-Lincoln (UNL) próximo a Mead, NE. Todo o milho (EFC e semente de milho de controle progenitor com isolina quase negativa [NEG] da Syngenta Seeds, LLC) foi cultivado durante o verão no ENREC, coletado em novembro e processado como milho laminado a seco (DRC) no momento da alimentação. O gado foi alimentado com uma dieta limitada a 2% de BW por 5 dias antes do início do experimento. Os pesos iniciais de dois dias foram registrados aos dias 0 a 1 cuja média foi calculada e que foram usados como o BW inicial. Os novilhos foram colocados em blocos por BW em dois blocos de peso,

leve e pesado, (n = 10 e 5 replicados de cela, respectivamente) com base no dia 0 de BW, estratificados por BW no bloco e atribuídos aleatoriamente a 1 de 30 celas. A cela foi atribuída aleatoriamente para tratamento. Havia 10 novilhos/cela e 15 replicações/tratamento.

[0137] Os tratamentos de regime alimentar incluíram 1) EFC e 2) controle progenitor com isolina quase negativa (NEG; Tabela 9). Os novilhos foram adaptados aos regimes alimentares de acabamento ao longo de um período de 21 dias com milho substituindo feno de alfalfa, enquanto a inclusão de silagem de milho, grão destilado modificado mais solúveis (WDGS) e suplemento permaneceu a mesma em todos os regimes alimentares. Os regimes alimentares foram formulados para cumprirem ou excederem os requisitos de NRC para proteína e minerais. Os regimes alimentares de acabamento finais proporcionaram 330 mg/novilho diariamente de Rumensin® (30 g/ton de matéria seca [DM]; Elanco Animal Health, Greenfield, IN) e 90 mg/novilho diariamente de Tylan® (8,2 g/ton de DM; Elanco Animal Health, Greenfield, IN). Os novilhos foram implantados com Component® IS (Elanco Animal Health, Greenfield, IN) no dia 22 e Component® S (Elanco Animal Health, Greenfield, IN) no dia 92.

[0138] No dia 169, a ração foi oferecida a 50% da ingestão de matéria seca do dia anterior (DMI), e o gado foi pesado em 1.500 h para determinar o BW vivo final. Um encolhimento a 4% foi aplicado ao BW vivo final para calcular um rendimento de carcaça. Todos os novilhos foram coletados em um abatedouro comercial (Greater Omaha, Omaha, NE) no dia 170 e pesos de carcaças quentes (HCW) e pontuações de fígado foram registrados no dia de abate. A espessura de gordura,

a área de músculo longissimus (LM) e a pontuação de marmorização USDA foram registradas após um período de resfriamento de 48 horas. O grau de rendimento (YG) foi calculado usando a equação USDA YG [YG = 2,5 + 2,5 (espessura de gordura, in) - 0,32 (área de LM, in²) + 0,2 (gordura renal, pélvica e cardíaca [KPH], %) + 0,0038 (HCW, lb)]. O BW final, o ganho diário médio (ADG) e a razão:ganho (F:G) foram calculados usando HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

[0139] Em um segundo estudo, trezentos novilhos híbridos (BW inicial = 624 lb, ± 34) foram utilizados em um ensaio de acabamento no parque de engorda de UNL Panhandle Research and Extension Center (PREC) próximo a Scottsbluff, NE. Todo o milho utilizado foi cultivado no ENREC e enviado para o PREC durante o ensaio. Protocolos de BW inicial, bloqueio de BW, atribuição de tratamento, número de novilhos por cela e replicações por tratamento foram os mesmos, conforme descrito acima em ENREC. Os novilhos foram adaptados aos regimes alimentares de acabamento ao longo de um período de 21 dias com milho substituindo feno de alfalfa, enquanto a inclusão de silagem de milho, grão destilado úmido mais solúveis (WDGS) e suplemento permaneceu a mesma em todos os regimes alimentares. Os tratamentos de regime alimentar foram os mesmos que ENREC, com a exceção de WDGS no lugar de MDGS e a inclusão de suplemento a 6% em vez de 4% da DM de regime alimentar. Os novilhos foram implantados com Component® IS (Elanco Animal Health, Greenfield, IN) no dia 1 e Component® S (Elanco Animal Health, Greenfield, IN) no dia 91. Os novilhos foram coletados em um abatedouro comercial (Cargill Meat Solutions, Fort Morgan, CO) no dia

181. Procedimentos de coleta de dados de carcaça e cálculos foram os mesmos, conforme descrito acima.

[0140] De modo geral, 600 novilhos foram utilizados entre os dois locais para fornecer um total de 30 replicações por tratamento. Os dados de desempenho e característica de carcaça foram analisados com o uso do procedimento MIXED do SAS (Cary, NC) como um projeto de blocos randomizado generalizado com a cela como a unidade experimental. Os dados de incidência de abscessos no fígado foram analisados com o uso do procedimento GLIMMIX do SAS (Cary, NC) com o número de animais afetados por abscessos no fígado dividido pelo número total de animais na cela como variáveis binomiais. O efeito do local, o tratamento e local \times tratamento foram todos incluídos no modelo com bloco de BW como uma variável fixa. Se a interação local \times tratamento não foi significativa ($P \geq 0,05$), os efeitos principais foram discutidos e o termo de interação foi removido do modelo.

Resultados:

[0141] Não houve tratamento por interações locais ($P \geq 0,30$) observadas para BW inicial, BW final, DMI, ADG, F:G e percentual de abscessos no fígado (dados não mostrados). Nenhuma diferença significativa no BW final, DMI, ADG, F:G ou percentual de abscessos no fígado foi observada para novilhos alimentados com EFC em comparação com NEG ($P \geq 0,17$; Tabela 10). Uma pequena diminuição numérica (2% devido ao grão) ($P = 0,17$) em F:G foi observada para novilhos alimentados com EFC em comparação com NEG. Um efeito local ($P \leq 0,03$) foi observado para BW final, DMI, ADG e F:G com novilhos alimentados em PREC que têm maior BW

final, DMI, ADG e menor F:G em comparação com ENREC (dados não mostrados). Pesquisa anterior mostrou resultados positivos no desempenho do gado com novilhos alimentados com EFC processado como DRC. De modo geral, maior ADG e melhorias em F:G foram relatados em novilhos alimentados com EFC em comparação com milho comercial ou NEG (*2016 Nebraska Beef Report* página 135; *2016 Nebraska Beef Report* página 143).

[0142] A profundidade de gordura e o YG calculado foram maiores ($P < 0,01$ e $P = 0,02$, respectivamente) para novilhos alimentados com EFC em comparação com NEG; no entanto, a área de LM foi ligeiramente maior ($P = 0,02$) para NEG. Pesquisa anterior relatou um aumento na profundidade de gordura ($P \leq 0,03$) e no YG calculado ($P \leq 0,03$; *2016 Nebraska Beef Report* página 135) ou nenhuma diferença ($P \leq 0,22$ e $P \leq 0,17$, respectivamente; *2016 Nebraska Beef Report* página 135; *2016 Nebraska Beef Report* página 143) quando novilhos foram alimentados com EFC. Nenhum a diferença significativa por tratamento foi observada para HCW ou pontuação de marmorização ($P \geq 0,33$). Pesquisa anterior relatou resultados mistos para pontuação de marmorização de novilhos alimentados com SYT-EFC em comparação com milho comercial ou NEG, observando um aumento (*2016 Nebraska Beef Report* página 135) ou nenhuma diferença (*2016 Nebraska Beef Report* página 143).

[0143] Diferenças na resposta do gado entre ensaios anteriores e este ensaio atual poderiam ser atribuídas às condições de cultivo do milho, resultando em um efeito anual.

[0144] Em conclusão, ensaios de acabamento anteriores observaram uma diminuição na F:G quando EFC foi

alimentado como a fonte principal de grão de milho de regime alimentar. Entretanto, os resultados desse ensaio sugerem que não há mudança significativa na F:G alimentando-se o híbrido de milho de ração Syngenta Enogen contendo um traço da enzima alfa-amilase, visto que a resposta foi muito pequena para detecção. A mudança na F:G foi de apenas 1% devido ao regime alimentar, que se supões ser apenas 1,6% devido ao grão de milho (65% do regime alimentar, média entre ENREC e PREC).

Tabela 9. Tratamentos de regime alimentar que avaliam milho de ração Enogen® e milho de controle progenitor com isolina quase negativa

Ingrediente, % DM	NEG ¹	SYT-EFC ²
NEG ¹	66,0	-
SYT-EFC ²	-	66,0
DGS ³	18,0	18,0
Silagem de milho	12,0	12,0
Suplemento de farinha (ENREC) ⁴	4,0	4,0
Milho triturado fino	1,2362	1,2362
Calcário	1,689	1,689
Ureia	0,5	0,5
Sal	0,3	0,3
Sebo	0,10	0,10
Pré-mistura de minerais vestigiais	0,05	0,05
Cloreto de potássio	0,083	0,083
Rumensin-90	0,0165	0,0165
Pré-mistura de Vitamina ADE	0,015	0,015
Tylan-40	0,0102	0,0102
Suplemento líquido (PHREC) ^{5,6}	6,0	6,0

¹NEG: Milho de controle progenitor com isolina quase negativa

²SYT-EFC: Milho de ração Syngenta Enogen contendo a enzima α -amilase

³DGS: Grãos destilados mais solúveis

⁴Suplemento de farinha alimentado no Eastern Nebraska Research and Extension Center

⁵Suplemento líquido alimentado no Panhandle Research and Extension Center

⁶Suplemento formulado para fornecer uma inclusão de DM de regime alimentar de 1,34% de calcário, 0,5% de ureia, 0,3% de sal, 0,2% de cloreto de potássio, 30 mg/kg de Zn, 50 mg/kg de Fe, 10 mg/kg de Cu, 20 mg/kg de Mn, 0,1 mg/kg de Co, 0,5 mg/kg de I, 0,1 mg/kg de Se, 1.000 IU de vitamina A, 125 IU de vitamina D, 1,5 IU de vitamina E.

Tabela 10. Efeito de híbrido de milho no desempenho de acabamento e características da carcaça

Item	Tratamentos de Regime Alimentar ¹			Valores <i>P</i>	
	NEG	SYT-EFC	SEM	Trt	Local
<i>Desempenho dos Animais</i>					
BW inicial, lb	669	668	0,5	0,13	< 0,01
BW final, lb ²	1351	1350	4,9	0,88	0,03
DMI, lb/d	22,8	22,6	0,13	0,19	< 0,01
ADG, lb ²	3,90	3,90	0,03	0,99	< 0,01
F:G ^{2,3}	5,85	5,79	-	0,17	< 0,01
<i>Características das Carcaças</i>					
HCW, lbs	852	852	3,1	0,88	0,03
Pontuação de Marmorização ⁴	470	486	12	0,33	0,34
Profundidade de Gordura, in	0,53	0,56	0,01	< 0,01	0,79
Área de LM, in ²	13,2	13,0	0,07	0,02	0,44
Grau de Rendimento Calculado ⁵	3,24	3,49	0,08	0,02	0,23

Abcesso	no					
fígado, %	8,60	6,03	2,33	0,25	0,81	

¹Tratamentos de regime alimentar: NEG = milho de controle progenitor com isolina quase negativa; SYT-EFC = milho de ração Syngenta Enogen

contendo a enzima alfa-amilase

²Calculada a partir de HCW ajustado até um rendimento de carcaça comum de 63%.

³Analisada como G:F, o recíproco de F:G.

⁴Pontuação de Marmorização: 300 = Ligeira⁰⁰, 400 = Pequena⁰⁰.

⁵Calculada como $2,5 + (2,5 \times 12^{\text{a}} \text{ de costela}) + (0,2 \times 2,0 \text{ [KPH]}) + (0,0038 \times \text{HCW}) - (0,32 \times \text{área de LM})$.

EXEMPLO 3

Estudo de acabamento de gado de corte com milho com alta umidificação e laminado a seco de ração Enogen®

Antecedentes do gado

[0145] Todos os novilhos são recebidos como bezerros desmamados na Universidade de Nebraska, Eastern Nebraska Research and Extension Center próximo a Mead, NE. Os bezerros são recebidos por 3 a 4 semanas e pastam com resíduo de milho e são submetidos a antecedentes antes do experimento para assegurar que todos os bezerros são saudáveis. O manuseio do animal e o espaço para esse experimento estão de acordo com o Guia para o cuidado e uso de animais agrícolas em Pesquisa e Ensino Agrícola (FASS, Primeira Edição Revisada, janeiro de 1999). Todos os procedimentos delineados como parte deste estudo estão de

acordo com os protocolos de cuidado de animais da Universidade de Nebraska.

Projeto e Alocação

[0146] Os novilhos são alimentados com um limite estimado de 2% de peso corporal (BW), um regime alimentar de 50% de alfalfa, 50% de ração de glúten de milho úmida (WCGF) por 5 dias antes da pesagem. Os pesos são coletados em indivíduos por dois dias consecutivos para minimizar os efeitos de preenchimento intestinal e obter um peso corporal inicial preciso.

[0147] Esse estudo utiliza 336 novilhos (8 novilhos/cela). Os novilhos são atribuídos aleatoriamente a celas com base no peso do primeiro dia. Critérios de bloqueio podem ser usados, dependendo da faixa no peso corporal. As celas são atribuídas aleatoriamente a um dos 7 tratamentos descritos abaixo. Esse estudo é projetado como um projeto completamente randomizado (ou projeto de blocos randomizados, se os critérios de bloqueio forem necessários) com 7 tratamentos dispostos como uma disposição fatorial de $2 \times 3 + 1$ de tratamentos. A cela é a unidade experimental, e há 6 replicações por tratamento de efeito simples, ou um total de 42 celas com 7 tratamentos.

Regimes alimentares e alimentação

[0148] A composição do regime alimentar de tratamento é descrita na Tabela 11. A estrutura de tratamento é organizada como um fatorial de 2×3 juntamente com 1 tratamento de comparação adicional. Na disposição fatorial, os fatores incluem grão com ou sem o traço de expressão de

alfa-amilase e alimentado como uma ração entre milho com alta umidificação e milho laminado a seco. Um tratamento adicional permite a avaliação de milho de ração Enogen® (EFC) alimentado como milho laminado a seco (DRC) com milho com alta umidificação de controle (HMC).

[0149] Todos os regimes alimentares contêm 20% de grãos destilados para fornecer proteína não degradável no rúmen de regime alimentar suficiente (RUP) para atender os requisitos de proteína e alinhar-se com a típica inclusão de subproduto pela indústria de pátio de alimentação. Um suplemento de farinha seco a 5% é alimentado com os componentes primários como cálcio, ureia para proteína degradável no rúmen, pré-mistura de oligoelemento, pré mistura de vitamina ADE, and Rumensin®/Tylan® em níveis alvejados. O carreador para o suplemento de farinha é milho finamente triturado. Regimes alimentares são formulados para fornecer Ca similar e rações Ca:P adequadas. Os regimes alimentares finais fornecem 30 g/ton de Monensina e 8,8 g/ton de Tylan® (base em matéria seca [DM]). Os novilhos são alimentados uma vez ao dia e os regimes alimentares misturados com o uso de caminhões de ração Roto-mix.

o-							
EFC							
Alt							
a							
umi			70	-	35	-	35
dad	-	-					
e-							
CON							
Alt							
a							
umi			-	70	-	35	-
dad	-	-					
e-							
EFC							
Cau							
les							
de							
mil							
ho	5	5	5	5	5	5	5
(ou							
equ							
iva							
len							
te)							
Grã							
os							
des	20	20	20	20	20	20	20
til							
ado							
s							

úmi								
dos								
Sup								
lem								
ent	5	5	5	5	5	5	5	5
o ²								

¹ CON, convencional sem traço de alfa-amilase Enogen®

²Suplemento para fornecer Rumensin®, Tylan® e minerais e ureia para assegurar que os requisitos de proteína, mineral e vitamina sejam atendidos.

Dados de saúde

[0150] Qualquer gado observado com sintomas de enfermidades ou distúrbios comuns é tratado de acordo com os procedimentos de operação padrão estabelecidos pela Universidade de Nebraska. O veterinário consultor é consultado quanto às condições observados que não são cobertas pelos procedimentos de operação padrão para cuidados com a saúde do animal. Observações da saúde do animal são sumarizadas no relatório final.

Medições

[0151] O gado é pesado dois dias consecutivos no começo do ensaio para estabelecer o peso corporal inicial. Os novilhos são implantados com programa de implante convencional, por seu tamanho e duração de alimentação. Os novilhos são alimentados por aproximadamente 145 a 160 dias.

[0152] Os traços de desempenho incluem ingestão de matéria seca, ganho diário médio (usando peso inicial com limite de alimentação e peso final ajustado à carcaça),

medições de peso corporal, incluindo peso corporal final vivo e traços de carcaça. Os traços de carcaça que são importantes para a coleta no dia de abate são peso de carcaça quente, pontuações de fígado para abscessos e ordem de extermínio. Após um resfriamento de 48 horas, a espessura de gordura, a área de músculo longissimus (LM), a pontuação de marmorização e o chamado grau de rendimento são medidos. Uma medição calculada de grau de rendimento é determinada assumindo-se uma gordura renal, pélvica, cardíaca (KPH) de 2%.

EXEMPLO 4

Desempenho de características de carcaça de gado alimentado com regimes alimentares de acabamento contendo ração Enogen® como grão de milho e/ou silagem de milho

[0153] É conduzido um estudo no centro de pesquisa de gado de corte da Kansas State University com os seguintes objetivos:

[0154] 1. Avaliar o desempenho de crescimento (ganho diário, ingestão de matéria seca e eficácia de ração) de gado de acabamento alimentado com regimes alimentares contendo combinações de material de forragem ensilado e grãos em flocos preparados a partir de híbridos de milho com ou sem alta expressão de amilase.

[0155] 2. Avaliar características da carcaça e taxas de abscessos no fígado em gado alimentado com regimes alimentares contendo combinações de material de forragem ensilado e grãos em flocos preparados a partir de híbridos de milho com ou sem alta expressão de amilase.

Projeto Experimental:

[0156] Um projeto de blocos completos randomizados com 4 tratamentos e 12 replicados em uma disposição fatorial 2x2, da seguinte forma:

[0157] Fator 1: Grão de milho floculado a vapor preparado a partir de híbridos com e sem alta expressão de amilase

[0158] Fator 2: Silagem de milho preparada a partir de híbridos de milho com e sem milho com alto teor de amilase.

[0159] A cela é a unidade experimental.

Procedimento de estudo:

[0160] Animais de teste: Gado de corte híbrido com média entre 750 e 900 lb de peso corporal inicial. Um grupo de 960 animais de estudo é selecionado a partir de uma população de aproximadamente 1.000 gados.

[0161] Procedimentos de processamento pré-ensaio: Os procedimentos de processamento pré-estudo empregues são típicos daqueles usados no sítio de estudo, mas geralmente consistem em determinação de peso corporal, identificação com etiquetas auriculares com numeração exclusiva, administração de vacinas e bacterinas, administração de parasiticidas para controle de parasitas internos e externos e administração de um implante esteroidal. A profilaxia com um antibiótico injetável pode ser usada a critério do investigador clínico.

[0162] Alimentação e hidratação: Os animais normalmente têm acesso *ad libitum* à ração e são alimentados uma vez ao dia ao longo do estudo. Manjedouras são

monitoradas diariamente para facilitar o gerenciamento de ração de modo que o gado tenha acesso permitido *ad libitum* a regimes alimentares, mas com um mínimo de ração não consumida restante nas manjedouras no dia seguinte. A água municipal está disponível durante o estudo de bebedouros automáticos na cela que são compartilhados entre celas adjacentes.

[0163] Composição de regime alimentar: Regimes alimentares de base pré-ensaios consistem em uma mistura de feno, silagem de milho, milho floculado a vapor e suplemento para fornecer proporções aproximadamente iguais de concentrado e fibra alimentar. A silagem de milho consiste em material de forragem de milho de ração não Enogen® (EFC).

[0164] Durante a fase de ensaio, o componente de forragem do regime alimentar consiste inteiramente em silagem de milho. Começando no dia 1 do experimento, o gado é alimentado com regimes alimentares com 50% de concentrado e 50% de fibra alimentar (Etapas 1), que é alimentado por um período de 5 dias. A proporção de concentrado é aumentada em um modo em etapas, de modo que regimes alimentares sequenciais sejam, cada um, alimentados por 5 dias (Etapas 2, 3 e 4). O regime alimentar de acabamento final consiste em 10% de silagem de milho como a fonte de fibra alimentar, aproximadamente 6 a 8% de suplemento e o saldo em milho floculado, e é alimentado no dia 21 e até que o ensaio seja concluído após 120 a 150 dias em alimentação. Os regimes alimentares são formulados para conter 33 gramas/ton de monensina e, durante os 28 a 42 dias finais em alimentação, conter 25 g/ton de ractopamina. O milho flocado a vapor é processado diariamente. Os regimes alimentares são

preparados frescos diariamente e distribuídos cada manhã para alimentar as manjedouras. Grãos (de *commodity* e EFC) e forragens (híbridas comerciais convencionais ou EFC) são incorporados diretamente no total de rações mistas em uma base diária e completamente mesclados.

Métodos de coleta de dados e variáveis:

[0165] Pesos corporais: Pesos corporais totais de pré-tratamento de animais individuais são determinados no dia 1. Os pesos corporais intermediários (aproximadamente dias 28, 56, 84 e 112) e o peso corporal final são obtidos para celas de animais.

[0166] Consumo de ração: Regimes alimentares experimentais são alimentados iniciando no dia 1 do estudo e continuam até o estudo ser concluído. A quantidade de ração distribuída para cada cela é registrada diariamente. O excesso de ração residual é removido nos dias de pesagem e conforme necessário de modo a assegurar que ração fresca seja mantida nas manjedouras. As quantidades da forragem a ser distribuída para cada cela são pesadas.

[0167] Os pesos da ração não consumida restante nas manjedouras de alimentação são medidos conforme necessário, mas minimamente nos dias de pesagem intermediária e no dia final do estudo. As recusas de ração também podem ser medidas em outros momentos a critério do investigador clínico (por exemplo, contaminação fecal, deterioração, etc.). Determinações de matéria seca são realizadas nas amostras compósitas de ração não consumida em intervalos. As quantidades totais de ração distribuída (com base na alimentação) para cada cela durante um intervalo de tempo específico são computadas.

[0168] Desempenho de crescimento: O ganho diário médio é computado para cada cela de gado. A ingestão total de matéria seca para cada cela é registrada, e a eficácia de ganho é computadas como ADG dividido pela ingestão diária por animal de matéria seca de ração. Ingestões de matéria seca, taxas de ganho e eficácias de ração para cada cela são computadas em aproximadamente intervalos de 28 dias e ao longo do estudo.

[0169] Características de carcaça: No dia de coleta, os animais são removidos de suas celas como um grupo, pesados com o uso de uma escala de grupo e carregados em caminhões para transporte para um abatedouro comercial. As carcaças são identificadas por ordem de coleta no abatedouro. O peso de carcaça quente e a incidência e gravidade de abscessos no fígado são registrados no dia de coleta. Após 24 a 48 horas de refrigeração, a pontuação de marmorização, a área de músculo longissimus, espessura de gordura subcutânea (12ª costela), incidência de carne de corte escura, grau de rendimento USDA e grau de qualidade USDA são registrados para cada carcaça.

EXEMPLO 5

Sítio e extensão de digestão de regimes alimentares contendo grão de milho ou milho derivado de um híbrido de milho de ração Enogen®

Objetivos:

[0170] 1) Comparar o sítio e extensão de digestão de matéria seca, matéria orgânica, amido, fibra de detergente neutro (NDF), fibra de detergente ácido (ADF),

nitrogênio e lipídio nos regimes alimentares de acabamento compreendidos de milho e silagem de milho; e

[0171] 2) Medir taxas de diluição de líquido e síntese de proteína microbiana no gado alimentado com regimes alimentares que consistem em combinações de grão de milho e silagem de milho.

Métodos de estudo:

[0172] Animais de estudo. O estudo utiliza 12 novilhos multicanulados (ruminais, duodenais, ileais) com peso corporal médio de aproximadamente 500 lb. Os novilhos são equipados com cânulas ruminal, duodenal (duplo L; 6 cm posterior ao esfíncter pilórico) e ileal (duplo L; 10 cm anterior à junção ileocecal). Os novilhos são alojados em baias equipadas com manjedouras de alimentação e bebedouros individuais.

[0173] Projeto de estudo. O experimento consiste em um projeto de quadrado latino 4 x 4 replicado com uma disposição fatorial 2 x 2 de tratamentos. Os fatores consistem em 1) fonte de grãos (moagem ou milho de ração Enogen® (EFC)) e 2) fonte de forragem (híbrido comercial comumente usados para produção de silagem de milho ou híbrido de silagem de EFC). O experimento consiste em quatro períodos de 15 dias, cada um incluindo um período de adaptação de 10 dias e um período de amostragem de 5 dias.

[0174] *Regimes alimentares experimentais.* Os regimes alimentares são mosturados diariamente e oferecidos aos novilhos *ad libitum* aproximadamente as 8:00 da manhã. Os regimes alimentares contêm (com base na matéria seca) aproximadamente 10% de silagem de milho, 84% de milho e 6% de suplemento.

Coleta, processamento e análise de regimes alimentares, orts, regurgitação e fezes.

[0175] Óxido crômico (10 g) é misturado diariamente em regimes alimentares individuais nos dias 4 a 13 como um marcador para determinar a digestibilidade do regime alimentar. No dia 15, uma solução de 200 ml contendo 3 g de Co-EDTA é dosada por pulso através da cânula ruminal as 8:00 da manhã para estimar a taxa de passagem do líquido. Nos dias 11 a 14, uma porcentagem fixa de orts diárias é subamostrada e composta por período. As amostras de regime alimentar são coletadas após a mistura nos dias 10 a 13 e compostas por período em uma base de peso igual. O 15º dia de cada período é usado para coletar fluido ruminal para medição de pH, ácidos graxos voláteis (VFA) e taxa de passagem. As amostras de quimo duodenal (~ 300 ml) e ileal (~ 200 ml) e captura fecal (~ 300 g em base úmida) são coletadas três vezes ao dia nos dias 11 a 14. As amostras são coletadas em intervalos de 8 horas, com tempos de coletas avançados 2 horas por dia para obter um perfil que represente um ciclo de 24 horas após a alimentação. Amostras duodenal, ileal e fecal são congeladas imediatamente a 4 °C. As amostras de regurgitação e fezes são compostas para cada novilho no final de cada período de coleta. As amostras de regime alimentar, orts e fecal são secas por 4 dias a 55 °C, equilibradas com ar e, então, moídas com o uso de uma peneira de 1 mm (moinho Wiley nº 2, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA). As amostras de regurgitação são liofilizadas (Virtis Genesis modelo 35EL) antes de serem moídas através de uma peneira de 1 mm em um moinho Wiley. O regime alimentar, orts, regurgitação e fezes são analisados

quanto à matéria seca (24 horas a 105 °C), matéria orgânica (600 °C por 2 horas), nitrogênio (analisador de nitrogênio, LECO FP-2000; St. Joseph, MI), amido, glicose livre (com o uso de um autoanalisador Technicon III) e quanto ao cromo. Aproximadamente 500 ml de fluido ruminal são coletados uma vez ao dia nos dias 11 a 14 para estimar a síntese de proteína microbiana ruminal. As amostras são mescladas para remover bactérias associadas a partículas e peneiradas através de 8 camadas de gaze antes de serem congeladas a 4 °C. Os tempos de coleta são avançados 6 horas por dia para obter uma amostra em cada intervalo de 6 horas em um ciclo de 24 h. Células microbianas ruminais são isoladas do conteúdo ruminal por centrifugação diferencial, liofilizadas e analisadas quanto à matéria seca, matéria orgânica e nitrogênio. As concentrações de citosina de amostras de células microbianas e duodenais são medidas. A proporção de regurgitação duodenal de origem microbiana é determinada dividindo-se o fluxo de citosina duodenal pela razão de citosina microbiana:nitrogênio. O fluxo de nitrogênio de alimentação é calculado subtraindo-se o fluxo de nitrogênio total do fluxo de nitrogênio microbiano, incluindo, assim, contribuições endógenas de nitrogênio. A verdadeira matéria orgânica fermentada no rúmen é calculada como a ingestão de matéria orgânica menos a matéria orgânica total que alcança o duodeno, corrigindo a matéria orgânica microbiana que alcança o duodeno. Amostras de fluido ruminal são coletadas às 08:00 no dia 15 e subsequentemente as 2, 4, 6, 8, 12, 18 e 24 h após a alimentação. O fluido ruminal é peneirado através de quatro camadas de gaze e analisado quanto ao pH no momento da amostragem com o uso de um medido de pH

portátil. O fluido ruminal (8 ml) é adicionado a 2 ml de ácido metafosfórico a 25% (peso/vol) e congelado para análise posterior de VFA e amônia. Aproximadamente 20 ml de fluido ruminal peneirado são colocados em frascos de cintilação e congelados para análise posterior de cobalto. O cobalto é medido no fluido ruminal após ser descongelado e centrifugado a $30.000 \times g$ por 20 minutos com o uso de espectrofotometria de adsorção atômica. As amostras de fluido ruminal acidificado são descongeladas, centrifugadas a $30.000 \times g$ por 20 min e analisadas quanto a VFA por cromatografia em fase gasosa (cromatógrafo a gás Agilent 7890a equipado com coluna Nukol de 15 m) e quanto a NH_3 com o uso de um autoanalisador Technicon III (Bran and Luebbe, Elmsford, NY).

Análises estatísticas

[0176] Dados de ingestão, fluxo e digestão são analisados com o uso de animal individual como a unidade experimental com PROC MIXED do SAS. O modelo inclui efeitos de fonte de grãos floculados, fonte de silagem e a interação entre a fonte de grãos e a fonte de silagem. Efeitos aleatórios incluem orientação e período. Dados de ácidos graxos voláteis, NH_3 , e pH são analisados como medidas repetidas com o uso da estrutura de covariância de simetria composta de PROC MIXED do SAS. A indicação de modelo inclui efeitos de fonte de grãos floculados, fonte de silagem, hora e todas as interações. A indicação aleatória inclui efeitos de orientação e período e orientação \times período \times fonte de grãos \times fonte de silagem. A medida repetida é definida como a hora dentro de período \times orientação \times fonte de grãos \times fonte de silagem. Para determinar as taxas de passagem de

líquido, concentrações de cobalto as 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18 e 24 h são transformadas em logaritmos naturais e regredidas no

tempo para novilhos individuais com o uso do procedimento REG do SAS. As inclinações (estimativas de taxas de passagem) são analisadas com o uso do procedimento MIXED do SAS conforme descrito anteriormente

EXEMPLO 6

Estudo de gado de corte de recria com milho de ração Enogen®

[0177] Gado de recria (algumas vezes chamados de gados de cria) são animais em um estágio intermediário entre amamentação (que ocorre tipicamente entre 400 e 550 libras) e acabamento no parque de engorda. Esses animais são tradicionalmente alimentados com um regime alimentar rica em forragem, tal como pastagens, embora suplementações sejam, algumas vezes, usadas também.

Objetivo:

[0178] Determinar a resposta do bezerro em crescimento ao milho de ração Enogen®, contendo um traço da enzima alfa-amilase, quando alimentado como milho descascado inteiro (WC) ou milho laminado a seco (DRC).

Procedimento experimentais:

[0179] Quatrocentos e vinte seis novilhos híbridos (peso médio de 538 libras) foram transportados de Lazbuddie, Texas para a unidade de estoque de carne na Kansas State University (KSU). Um projeto fatorial 2 x 2 foi empregue com dois tipos de milho (Enogen® vs. milho amarelo nº 2) e dos níveis de processamento de milho (WC vs. DRC). Os novilhos foram alimentados com uma ração mista total (TMR)

uma vez ao dia por 76 dias, seguido por um período de preenchimento de intestino de 14 dias (90 dias no total).

[0180] Os quatro regimes alimentares de tratamento foram formulados para fornecer 51 Mcal de NEg (energia líquida para ganho)/100 lbs. Detalhes da TMR estão abaixo na Tabela 12.

Tabela 12: Regimes alimentares experimentais.

Ingrediente	% de DM
Milho (variedade x processamento) ¹	28,57
Suplemento	6,43
Feno de alfafa	17,50
Feno pradaria	17,50
WDGS ²	30,00
100% com base em DM (matéria seca)	
Matéria seca, %	60,30
Proteína, %	16,08
Cálcio, %	0,85
Fósforo, %	0,41
Sal, %	0,32
Potássio, %	1,09
Magnésio, %	0,22
Gordura, %	0,22
ADF, %	20,59

NEm³, Mcal/100 lb 78,81

NEg⁴, Mcal/100 lb 51,13

¹Tipo de milho: Enogen® vs. amarelo negativo nº 2 e alimentado como milho descascado inteiro (WC) ou laminado a seco (DRC)

²Grãos destilados úmidos com solúveis

³Energia líquida para manutenção

⁴Energia líquida para ganho

Resultados:

[0181] Os novilhos foram avaliados quanto ao peso corporal inicial (BW), BW final, ganho diário médio (ADG), ingestão de matéria seca (DMI) e ração:ganho (F:G). Os resultados são mostrados na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13: Desempenho de lote seco.

Item	Enogen®		Amarelo nº 2		SEM	Valor P
	WC	DRC	WC	DRC		
BW inicial (lbs)	539	538	539	537	1,08	0,77
BW final (lbs)	850	851	838	847	4,29	0,10
ADG	3,42	3,43	3,29	3,41	0,04	0,09
DMI	20,4	20,5	21,3	20,8	0,37	0,09
F:G	5,97	5,97	6,49	6,10	0,11	0,01

Sumário:

1. Os pesos corporais finais e ADG tenderam a ser maiores ($p < 0,10$) para bezerros alimentados com milho de ração Enogen®.

2. DMI tender a ser menor ($p < 0,09$) para bezerros alimentados com milho de ração Enogen®.

3. A eficácia de ração (F:G) de bezerros que receberam milho de ração Enogen® foi melhorada em 5,5% ($p < 0,01$).

EXEMPLO 7**Grão de milho de ração Enogen® e regime alimentar de silagem de ração Enogen® combinados em gado de corte de recria**

[0182] O objetivo desse estudo é comparar o milho de ração Enogen® contendo um traço da enzima alfa-amilase (EFC) com um milho progenitor com isolina sem o traço da enzima alfa-amilase (isolina negativa) quando alimentado como silagem de milho e grão de milho em relação à saúde e ao desempenho do gado de corte de recria em crescimento.

[0183] O valor relativo de EFC como uma fonte de energia como uma silagem e/ou grão para gado de corte recém-chegado e em crescimento é desconhecido. Regimes alimentares de gado de corte em crescimento são normalmente compreendidos por maiores quantidades de subprodutos da indústria de processamento de fibras alimentares e grãos com aproximadamente um terço da ingestão de DM consistindo em milho ou outro cereal como uma fonte de energia.

Projeto experimental - Estudo de desempenho:

[0184] O ensaio é iniciado na unidade de estoque de carne da Kansas State University (KSU) (KSBSU) e inclui 32 celas (8 para cada tratamento) compreendidas por 12 a 14 animais cada uma, e dura aproximadamente 76 dias além do período de equalização de preenchimento de intestino de 14 dias (90 dias no total). Os quatro regimes alimentares de tratamento são formulados para fornecer 50 Mcal de NEg/100 lbs. Os regimes alimentares são similarmente projetados seguindo uma disposição fatorial 2 X 2 de tratamentos com fatores de silagem de milho + alfa-amilase/- alfa-amilase e grão de milho + alfa-amilase/- alfa-amilase; Tabela 14). Os

indivíduos são estratificados por peso em seu bloco (cada carga) e aleatoriamente atribuídos às celas. Tratamentos são, então, aleatoriamente atribuídos às celas.

Tabela 14. Dieta

Porcentagem de DMIngrediente

Milho ¹	38,5
Suplemento	7,50
Feno de alfafa	7,00
Feno pradaria	7,00
Silagem de milho	40,00
Total	100

100% com base em DMItem

Matéria seca, %	54,60
Proteína, %	12,86
Cálcio, %	1,05
Fósforo, %	0,32
Sal, %	0,40
Potássio, %	0,94
Magnésio, %	0,19
Gordura, %	3,30
ADF, %	16,66

NEm,	78,04
Mcal/100 lb	
NEg,	50,36
Mcal/100 lb	

¹ Silagem de milho e grão de milho (Enogen) vs silagem de milho e grão de milho com isolina negativa

1) *Descrição de animais:*

[0185] Aproximadamente 400 bezerros de corte híbridos fêmeas pesando aproximadamente 500 lbs. são obtidos e transportados por meio de caminhões comerciais para a unidade de estoque de carne da KSU. Após a chegada, todos os animais são visualmente examinados para avaliar a situação de saúde, incluindo sistemas respiratório, locomotor e digestivo. Quaisquer animais com problemas de saúde são imediatamente removidos do estudo. Todos os animais são testados para situação de BVDV-PI. Se positivo, o animal é removido do estudo.

2) *Requisitos médicos preventivos:*

[0186] Aproximadamente 24 horas após a chegada, o gado é processado com protocolos de saúde padrão que incluem vacina viral viva modificada (rinotraqueíte infecciosa, diarreia viral bovina, para-influenza-3, vírus sincicial respiratório bovino), 7 formas da vacina Clostridia e anti-parasiticida.

3) *Identificação de animal:*

[0187] Após a chegada, todos os animais de estudo são administrados com uma etiqueta auricular suspensa exclusiva com uma etiqueta de botão RFID.

4) *Água*

[0188] O gado tem livre acesso à água potável em todos os momentos.

5) *Rações:*

[0189] Os regimes alimentares são formulados de modo a atender ou exceder as recomendações dessa classe de animal conforme recomendado pelos Requisitos Nutricionais de Gado de Corte do Conselho Nacional de Pesquisa (NRC, 7ª edição, 1996). Os regimes alimentares são ajustados conforme necessário para atender às mudanças nos requisitos de nutrientes ao longo de um período de estudo de 76 dias. A composição dos regimes alimentares e todas as mudanças no regime alimentar são registradas.

6) *Amostragem de ração e manjedoura*

[0190] Amostras de ração e manjedoura são coletadas em uma base semanal e compostas para análise.

7) *Adaptação de alimentação do regime alimentar:*

[0191] Bezerros são alimentados com seus respectivos regimes alimentares de tratamento uma vez ao dia, e as quantidade de ração distribuída em cada alimentação para cada cela são registradas.

8) *Tratamentos de saúde:*

[0192] Funcionários treinados na KSBSU são responsáveis por identificar animais clinicamente doentes, movê-los para a área de tratamento e administrar o tratamento adequado. Cada cela é observada pelo menos duas vezes ao dia para identificar animais clinicamente doentes. Cada animal que é identificado como doente é movido para a área de tratamento. Os animais com uma pontuação de enfermidade clínica maior que 1 e uma temperatura retal maior ou igual a 104 °F e mais de 72 horas após a chegada são tratados. Os

tratamentos se baseiam no protocolo normal de tratamento da K SBSU mostrado abaixo (Tabela 15). Os animais são retornados para sua cela de origem após o tratamento, e qualquer animal tratados três vezes para BRDC é designado como "crônico" e removido do estudo.

Tabela 15.

Pontuação de enfermidade clínica		
Pontuação de enfermidade clínica (CIS)	Definição	Aparência clínica
1	Normal	Normal/saudável
2	Levemente doente	Depressão moderada/esquelético
3	Moderadamente doente	Depressão grave/respiração difícil/secreção ocular ou nasal
4	Gravemente doente	Moribundo/quase morte/pouca resposta à abordagem humana

Protocolo de tratamento por evento					
Evento	Antimicrobiano	Dosagem	Via	Retenção de abate	
1 ^a Retirada	Resflor (florfenicol e flunixinina meglomina)	6 ml/peso de gado	SQ	38 dias	
2 ^a Retirada	Baytril (enrofloxacina)	5 ml	SQ	28 dias	

3 ^a	Biomicina	5 ml	SQ	28 dias
Retirada	(oxitetraciclina)			

9) *Coleta de dados de desempenho e saúde*

[0193] O gado é individualmente pesado na chegada (dia -1), no processamento inicial (dia 0), na revacinação (dia 14), no dia 48 (amostra de captura de amido fecal) e no último dia do ensaio (dia 90). Os pesos de cела são registrados semanalmente onde não há um peso individual programado. O ganho médio diário e a conversão de ração são calculados para cada cела por cinco períodos de tempo: chegada ao 14, ao dia 21, ao dia 34, ao dia 48, ao dia 62 e ao dia 76. As manjedouras de ração são lidas pelos funcionários da KSBSU diariamente, e a quantidade de ração alocada se baseia na pontuação da manjedoura daquele dia, que reflete o consumo de ração desde a alimentação anterior. A quantidade total de ração descarregada em cada cела é registrada em cada alimentação.

[0194] Morbidade, mortalidade, fatalidade do caso, data até a primeira retirada e taxa de sucesso do primeiro tratamento antimicrobiano são calculadas, se necessário. A morbidade é calculada como o número de animais por tratamento que recebem um primeiro tratamento para BRDC dividido pelo número de animais inscritos no tratamento. A mortalidade é calculada como o número de animais que morrem de BRDC por tratamento dividido pelo número total de animais inscritos no tratamento. A fatalidade do caso é calculada para cada tratamento como o número de mortes devido a BRDC dividido pelo número de animais tratados pelo menos uma vez para BRDC. A data para primeira retirada é calculada com o

uso da data em que o animal foi retirado em relação ao dia 0 do ensaio. A taxa de sucesso do primeiro tratamento antimicrobiano é determinada dividindo-se o número de animais tratados apenas uma vez para a enfermidade pelo número total de animais inicialmente tratados para enfermidade.

10) Medições de ambiente físico

[0195] Os dados climáticos, incluindo precipitação, velocidade e direção do vento, umidade relativa e temperatura são coletados por uma estação de monitoramento meteorológico (Estação meteorológica Storm3 Waterlogger Five Parameter, Stevens Water Monitoring Systems, Inc.) ao longo de um período de pesquisa de 56 dias.

11) Análise de dados

[0196] Os dados são analisados para avaliar a diferença nos resultados desempenho e saúde entre os quatro tratamentos de regime alimentar. A proporção de morbidade, mortalidade e fatalidade do caso do nível de tratamento é analisada com o uso de modelos de regressão logística.

Projeto experimental - Estudo de ingestão e digestibilidade:

[0197] O ensaio é conduzido na unidade de estoque de carne da Kansas State University (KSBSU) concomitantemente com o estudo de desempenho descrito acima. Quatro novilhos híbridos de corte pesando 450 a 500 lbs são usados para conduzir o estudo de ingestão e digestibilidade (Wang et al., 2016. *J. Anim. Sci.* 94-1.159 a 1.169). Os novilhos são individualmente alojados em uma instalação externa. Com o uso dos mesmos regimes alimentares de tratamento listados acima, um novilho é aleatoriamente atribuído a cada tratamento para um total de 4 novilhos.

1) *Projeto de quadrado latino*

[0198] Quatro novilhos híbridos de corte são usados para determinar a digestibilidade *in vivo* dos regimes alimentares de teste. O estudo dura 60 dias com quatro períodos de 15 dias para concluir um projeto de quadrado latino. Cada período consiste em um período de adaptação de 10 dias, 4 dias de amostragem fecal e 1 dia de coleta de amostras de regurgitação ruminal.

2) *Amostras de regurgitação ruminal*

[0199] As amostras de regurgitação ruminal são tomadas no final de cada período para determinar a digestibilidade dos regimes alimentares de tratamento. As amostras também são analisadas quanto à proporção de marcador para determinar as taxas de diluição de líquido. As concentrações de acetato, propionato, butirato e lactato são analisadas e calculadas.

3) *Amostras fecais*

[0200] Amostras de captura fecal temporizadas são analisadas para determinar a concentração de marcador presente.

4) *Análise in vitro*

[0201] A fermentação *in vitro* é usada para determinar a digestibilidade da matéria seca *in vitro* (IVDMD), a digestibilidade da matéria orgânica *in vitro* (IVOMD) e a produção de gás associada aos quatro regimes alimentares de tratamento.

EXEMPLO 8

Impacto de milho de ração Enogen® Silagem ou grão no desempenho e na digestão de gado de corte em crescimento

[0202] Objetivo: Avaliar o grão de milho de ração Enogen® (EFC) em regimes alimentares antecedentes contendo 40% de grão de milho e avaliar silagem de milho EFC (com grão equivalente assumindo que a silagem é de 50% de grão com base em uma matéria seca [DM]).

Procedimento experimentais:

[0203] Silagem: Milho irrigado cultivado no centro de pesquisa e extensão do leste de Nebraska é usado para a colheita de silagem e grão seco. A colheita de silagem foi alvejada em 37 a 38% de DM ou aproximadamente 3/4 de linha de leite. Cada carga de silagem foi pesada na entrega e amostrada para teor inicial de DM. Durante a alimentação, a silagem é amostrada na face semanalmente para análise de DM. As amostras são retidas por semana para ter o subsequente de nutrientes, pH e ácido orgânico em compósitos mensais. Todo o material removido para alimentação é pesado como está e as porcentagens de DM semanais usadas para quantidade de DM alimentada. O grão foi produzido sob protocolos preservados por identidade e armazenado como grão integral em caixas separadas. Conforme necessário, o grão é distribuído e processados como milho laminado a seco sob preservação de identidade.

Estudo de crescimento:

[0204] Antecedentes do gado: Todos os novilhos são recebidos como bezerros desmamados na Universidade de Nebraska, Eastern Nebraska Research and Extension Center próximo a Mead, NE. Os bezerros são recebidos por 3 a 4 semanas antes do experimento para assegurar que todos os

bezerros são saudáveis. Os bezerros podem ser cultivados durante o inverno antes do experimento para assegurar a saúde e a prontidão. O manuseio do animal e o espaço para esse experimento estão de acordo com o Guia para o cuidado e uso de animais agrícolas em Pesquisa e Ensino Agrícola (FASS, Primeira Edição Revisada, janeiro de 1999). Todos os procedimentos delineados como parte deste estudo estão em conformidade com o comitê de cuidado de animais da Universidade de Nebraska.

Projeto e Alocação

[0205] Os novilhos são alimentados com um limite estimado de 2% de peso corporal (BW), um regime alimentar de 50% de alfalfa, 50% de ração de glúten de milho úmida (WCGF) por 5 dias antes da pesagem. Os pesos são coletados em indivíduos por dois dias consecutivos para minimizar os efeitos de preenchimento intestinal e obter um peso corporal inicial preciso.

[0206] Esse estudo utiliza 576 novilhos (12 novilhos/cela). Os novilhos são atribuídos aleatoriamente a celas com base no peso do primeiro dia. Critérios de bloqueio podem ser usados, dependendo da faixa no peso corporal. As celas são atribuídas aleatoriamente a um dos 6 tratamentos descritos abaixo. Esse estudo é projetado como um projeto completamente randomizado (ou projeto de blocos randomizados, se os critérios de bloqueio forem necessários) com 6 tratamentos dispostos como uma disposição fatorial de $2 \times 2 + 2$ de tratamentos. A cela é a unidade experimental, e há 8 replicações por tratamento de efeito simples, ou um total de 48 celas com 6 tratamentos.

Regimes alimentares e alimentação

[0207] A composição do regime alimentar de tratamento é descrita na Tabela 16. A estrutura de tratamento é organizada como um fatorial de 2 × 2 juntamente com 2 tratamentos de comparação adicional. Na disposição fatorial, os fatores incluem silagem com ou sem traço de expressão alfa-amilase Enogen® (EFC) e miolo processado (2 mm) ou não. 2 tratamentos adicionais permitem a avaliação do grão de milho usado em regimes alimentares antecedentes com forragem. A inclusão de 40% de grão é idêntica à inclusão de 40% de grão quando 80% de silagem de milho é alimentada, assumindo-se 50% de grão de milho e 50% de forragem na silagem de milho.

[0208] Todos os regimes alimentares contêm 15% de grãos destilados para fornecer proteína não degradável no rúmen de regime alimentar suficiente (RUP) para atender os requisitos de proteína e 5% de suplemento de matéria seca. Os componentes primários no suplemento de farinha são cálcio, ureia para proteína degradável no rúmen, pré-mistura de oligoelemento, pré mistura de vitamina ADE e Rumensin® em níveis alvejados. O carreador para o suplemento de farinha é milho finamente triturado. Regimes alimentares são formulados para fornecer Ca similar e razões Ca:P adequadas. Os regimes alimentares finais fornecem 200 mg/novilho diariamente de Monensina. Os novilhos são alimentados uma vez ao dia e os regimes alimentares misturados com o uso de caminhões de ração Roto-mix.

Tabela 16. Regimes alimentares com os quais bezerros em crescimento foram alimentados por aproximadamente 84 dias para avaliar o uso de silagem EFC e grão de milho.

Traço:	CON ¹	EFC	CON	EFC	CON	EFC
Processamento de miolo:	+KP	+KP	Sem KP	Sem KP		
Silagem ou grão:	Silag em	Silag em	Silag em	Silag em	Grã o	Grã o
Silagem de milho-CON KP	80	-	-	-	-	-
Silagem de milho-EFC KP	-	80	-	-	-	-
Silagem de milho-CON sem KP	-	-	80	-	-	-
Silagem de milho-EFC sem KP	-	-	-	80	-	-
Milho laminado a seco-CON	-	-	-	-	40	-
Milho laminado a seco-EFC	-	-	-	-	-	40
Feno de gramíneas	-	-	-	-	40	40
Grãos destilados úmidos	15	15	15	15	15	15
Suplemento ²	5	5	5	5	5	5

² CON, milho convencional sem traço de alfa-amilase Enogen®

¹ Suplemento para fornecer Rumensina (200 mg/novilho diariamente) e minerais e ureia para assegurar que os requisitos de proteína, mineral e vitamina sejam atendidos.

Medições

[0209] O gado foi pesado dois dias consecutivos no início do ensaio e dois dias consecutivos aproximadamente no dia 84 para o BW vivo final. Os novilhos são alimentados com um limite de 2% de peso corporal com os mesmos regimes alimentares alimentados para coleta de pesos corporais iniciais e finais para equalizar o preenchimento de intestino através de gado de tratamentos.

[0210] Traços de desempenho incluem ingestão de matéria seca, ganho diário médio (usando peso inicial com limite de alimentação e peso corporal final) e eficácia de ração.

EXEMPLO 9

Estudo da qualidade de silagem de ração Enogen®

[0211] Foram realizados estudos para avaliar vários parâmetros de qualidade de silagem em silagem de ração Enogen® em comparação com silagem de milho convencional que não contém um traço de alfa-amilase. A silagem preparada a partir de milho Syngenta Enogen® contendo um traço de alfa-amilase tinha várias propriedades aprimoradas em comparação com a silagem de controle produzida a partir de híbridos Golden Harvest (GH)/ NK (antecedente genético similar) ou híbridos de milho concorrentes. A análise discriminante indicou que as características nutricionais de silagem de ração Enogen® podem ser distinguidas dos controles com base na presença do traço de alfa-amilase, em vez de no antecedente genético (dados não mostrados).

[0212] A silagem foi preparada a partir de plantas de milho inteiras cortadas cerca de 6 polegadas acima do solo; o material foi, então, picado, e amostras em pequena

escala foram coletadas em bolsas e vedadas a vácuo. Permitiu-se que as amostradas fermentassem por 60 a 75 dias antes da análise. Algumas amostras foram excluídas por estarem muito secas na coleta ou por não fermentar de modo eficaz. As contagens finais de amostra incluídas para análise foram: 165 amostras de silagem de ração Enogen®, 160 amostras de GH/NK não Enogen® e 105 amostras de híbrido concorrente sem um traço de alfa-amilase.

[0213] Espectroscopia de refletância no infravermelho proximal (NIR) foi usada para avaliar várias características nutricionais da silagem. Características de amido e açúcar também foram avaliadas com o uso de análise química, e a digestibilidade do amido *in situ* no rúmen foi determinada medindo-se o desaparecimento do amido das amostras de silagem incubadas em uma bolsa porosa no rúmen por 7 horas.

[0214] Conforme determinado por NIR, não houve diferenças significativas nas concentrações de proteína, gordura, lignina, cinzas, ácido láctico ou ácido acético ou no pH da silagem produzida partir de milho de ração Enogen® em comparação com a silagem não Enogen® de GH/NK ou híbridos de milho concorrentes que carecem do traço de alfa-amilase (dados não mostrados).

[0215] Diferenças significativas foram identificadas nas características de amido e açúcar da silagem de ração Enogen® em comparação com a silagem de milho que não contém um traço de alfa-amilase. Dois fatores importantes que influenciam na disponibilidade do amido para o animal são tamanho e digestibilidade de partícula. Conforme mostrado na Figura 1, com o uso de análise química, houve

níveis similares de amido total entre silagem de ração Enogen® e silagem não Enogen®. Entretanto, a silagem de ração Enogen® teve um nível mais alto (199,5% de aumento) de amido de partícula pequena (determinado por difusão através de um poro de 50 µM), que pode estar mais rapidamente disponível no rúmen e, portanto, pode fornecer mais imediatamente a energia disponível. Além disso, um aumento de 14% na digestão de amido no rúmen após 7 horas *in situ* (isSD7) foi observado, sugerindo melhor digestibilidade do amido disponível com a silagem de ração Enogen®.

[0216] Açúcar é uma outra fonte de energia rapidamente disponível para o animal. A silagem tende a ter concentrações naturais relativamente baixas de açúcar, mas conforme mostrado na Figura 2, a silagem de ração Enogen® teve um nível significativamente mais alto (201%) de açúcares totais conforme determinado por métodos de química analítica em comparação com a silagem de milho convencional sem um traço de alfa-amilase, com o potencial para mais energia disponível para o animal e micróbios no rúmen. Tanto carboidratos solúveis em etanol (ESC) como carboidratos solúveis em água (WSC), conforme determinado por NIR, tiveram nível significativamente mais alto de silagem de ração Enogen® em comparação com silagem GH/NK ou silagem de híbrido concorrente que carece de um traço de alfa-amilase. Adicionalmente, açúcares totais (glicose, frutose, sacarose, lactose e manitol) conforme medidos por análise química mostraram o mesmo padrão.

[0217] As características de fibra da silagem também foram determinadas por NIR. A digestibilidade de fibras é positivamente correlacionada com a ingestão de

matéria seca, visto que fibra mais digestível é menos preenchedora para o animal, como um resultado do tempo de trânsito mais rápido através do rúmen. O animal, então, tem a capacidade para consumir mais forragem, o que pode impactar positivamente no desempenho, tal como ADG ou produção de leite. Digestibilidade de fibra de detergente neutro (NDFd) é uma medida de digestibilidade de fibra tomada em vários intervalos de tempo e é frequentemente usada para comparar o valor de alimentação das forragens. Silagem de alta NDFd permite um maior potencial de ingestão de matéria seca e, portanto, o potencial para alimentar o animal com mais silagem.

[0218] Nesse estudo de qualidade de silagem, previu-se, por NIR, que a silagem de ração Enogen® tem uma NDFd mais alta, um indicador importante da digestibilidade de fibra, do que a silagem de milho convencional. Conforme mostrado na Figura 3, a silagem de ração Enogen® aumentou os valores de NDFd conforme determinado em diversos pontos no tempo em comparação com a silagem de milho não Enogen® que não contém um traço de alfa-amilase: um aumento de 8,2% (30 horas), aumento de 12,6% (120 horas) e aumento de 6,2% (240 horas). Os valores foram significativamente diferentes em todos os pontos no tempo. Em contrapartida, previu-se, por NIR, que a silagem de ração Enogen® tem uma diminuição de 18,5% (120 horas) e 17,4% (240 horas) na fibra neutra não digestível (uNDF) em comparação com a silagem de milho convencional (dados não mostrados).

[0219] Ademais, conforme previsto por NIR, houve um aumento de 6,4% na digestibilidade total de fibras de detergente neutro no trato (TTNDFd) de silagem de ração

Enogen® em comparação com a silagem de milho convencional (dados não mostrados). TTDNFD oferece uma vista holística de digestibilidade de fibra avaliando-se a taxa de digestão de fibras, a taxa de passagem de fibras e o teor de fibra indigestível. Um valor mais alto de TTDNFD sugere melhor digestibilidade de fibra e ingestão de matéria seca, o que pode suportar um melhor desempenho do animal.

[0220] Em suma, esse estudo aponta para a silagem de ração Enogen® como tendo um aumento na concentração de amido de partícula pequena, resultando em melhor digestibilidade de amido. Essa característica do amido juntamente com um maior nível de açúcares fornece fontes de energia mais prontamente disponíveis ao animal e micróbios ruminantes, o que pode resultar em melhor desempenho do animal. Adicionalmente, uma melhor digestibilidade de fibra na silagem de ração Enogen® pode resultar em maior ingestão de matéria seca, o que, novamente, suporta um melhor desempenho do animal que, no caso desse estudo, é previsto como cerca de 2 a 5 lbs/cabeça/dia de aumento de produção de leite com base na análise com um pacote de software comercial (NDS Professional, disponível para transferência por download na Internet em rumen.it/en/ndspro) comumente usado por nutricionistas profissionais em animais.

EXEMPLO 10

Avaliação de fermentação, valor nutritivo e estabilidade aeróbica de silagem de milho de ração Enogen® armazenada em temperaturas variáveis ou tratada com inoculantes/estabilizantes químicos diferentes

Objetivos:

[0221] Avaliar a fermentação, a digestibilidade de amido ruminal e a estabilidade aeróbica de silagem de milho de ração Enogen® (EFC) vs. silagem de controle conforme afetada por duração de armazenamento sob 1) regimes de temperatura de armazenamento diferentes ou 2) tratamento pré-armazenamento diferente com inoculante ou estabilizante químico.

Materiais e Métodos:

[0222] Híbridos de milho são fornecidos pela Syngenta e plantados e gerenciados sob práticas agronômicas normais na University of Delaware Farm. As plotagens são aproximadamente 8 a 12 fileiras e têm 400 a 600 ft. de comprimento. Toda a matéria seca (DM) da planta foi coletada com o uso de uma colheitadeira tipo tração (John Deere 3975, Moline, IL) equipada com um processador mecânico (ajuste de vão de rolo de 1,40 mm). Plantas de milho foram picadas com uma meta de 34 a 36% de DM e um comprimento teórico de corte de 19 mm e embaladas em silos de laboratório de 7,5 l a uma densidade de cerca de 230 kg de DM/m³ (cerca de 44 lb como peso úmido ou 15 lb de DM/ft³).

Efeito de temperatura do experimento 1:

[0223] Cinco replicados individualmente preparados dos seguintes tratamentos foram embalados para armazenamento por diferentes durações de tempo e temperaturas (6 trt × 5 reps × 3 pontos no tempo = 90 silos):

- 1) Híbrido de controle armazenado a 22 °C (72 °F)
- 2) Milho de ração Enogen® armazenado a 22 °C

3) Milho de ração Enogen® tratado com LB500* armazenado a 22 °C

4) Híbrido de controle armazenado a 40 °C (104 °F)

5) Milho de ração Enogen® armazenado a 40 °C

6) Milho de ração Enogen® tratado com LB500* armazenado a 40 °C

*LB500 = taxa de aplicação final de 400.000 cfu de *Lactobacillus buchneri* 40.788 + 100.000 cfu de *Pediococcus pentosaceus* 12.455 (Lallemand Animal Nutrition).

[0224] Os silos dos tratamentos 1 a 3 são armazenados à temperatura ambiente do laboratório de cerca de 21 a 22 °C por 30, 120 e 240 dias. Os silos dos tratamentos 4 a 6 são armazenados a uma temperatura elevada de cerca de 40 °C por 0 a 120 dias, mas depois são armazenados a uma temperatura mais baixa (mas ainda elevada) de cerca de 32 °C até a abertura no dia 240.

Experimento 2 Efeito de inoculante/estabilizante:

[0225] Cinco replicados individualmente preparados dos seguintes tratamentos foram embalados para armazenamento por diferentes durações de tempo após o tratamento sem inoculante ou estabilizante químico, todos a 22 °C/72 °F (6 trt × 5 reps × 3 pontos no tempo = 90 silos):

1) Híbrido de controle não tratado

2) Híbrido de controle com estabilizante químico*

3) Híbrido de controle + LB500**

4) Híbrido Enogen® não tratado

5) Híbrido Enogen® com estabilizante químico

6) Híbrido Enogen® + LB500**

*LB500 = taxa de aplicação final de 400.000 cfu de *Lactobacillus buchneri* 40.788 + 100.000 cfu de *Pediococcus pentosaceus* 12.455 (Lallemand Animal Nutrition).

Amostragem e análise:

[0226] Em cada abertura (30, 120 e 240 d) para cada experimento, os pesos de silo são determinados e usados com o teor de DM de silagens para determinar a recuperação de DM. A partir da experiência anterior, o armazenamento a longo prazo de amostras de silagem em silos de laboratório resulta frequentemente em uma carência de leveduras viáveis, visto que os silos são extremamente vedados (mais do que o que ocorre em silos comerciais). Assim, durante o armazenamento, os silos armazenados para aberturas nos dias 120 e 240 são submetidos a um estresse de ar controlado de 4 h/semana durante as 6 semanas finais de armazenamento. Em toda abertura do silo é determinada a estabilidade aeróbica das silagens de milho. Cerca de $3 \pm 0,01$ kg de silagem de milho representativa de cada silo são retornados para o mesmo silo limpo. Um fio termopar é colocado no centro geométrico de cada massa da amostra e temperaturas são registradas a cada 30 min com o uso de um coletor de dados (DataTaker DT85, Thermo Fisher Scientific Australia, Pty). A temperatura ambiente é registrada a partir de um fio termopar em um balde vazio. Os baldes são cobertos com duas camadas de gaze e expostos ao ar no laboratório (22 ± 1 °C). A estabilidade aeróbica é calculada como o número de h antes de a temperatura da massa de silagem subir 3 °C acima da temperatura de linha de base.

[0227] O teor de DM de todas as amostras é determinado secando-se em um forno com circulação forçada de ar a 60 °C por 48 h. Uma porção de cada amostra seca é moída com o uso de um moinho de amostra Udy Cyclone (Udy Corp., Fort Collins, CO) para atravessar uma peneira de 1 mm e analisada quanto à fibra de detergente neutro (NDF). A fibra de detergente ácido (ADF) é quantificada em amostras moídas secas de acordo com os procedimentos conhecidos, com a modificação de que o resíduo de fibra da ADF é recuperado em um filtro Whatman de 7 cm com retenção de partículas de 1,5 µm em um funil California Buchner (934-AH Whatman Inc., Clifton, NJ) em vez de um cadinho Gooch, para permitir uma melhor filtração. N total é determinado por combustão da amostra (analisador LECO CNS 2000, LECO Corporation, St. Joseph, MI) e a proteína bruta (CP) é calculada multiplicando-se o N total resultante por 6,25. Proteína solúvel (% de CP) é determinada. Uma porção separada das amostras secas é moída para passar por uma peneira de 3 mm e analisada quanto ao amido e digestibilidade de amido ruminal *in vitro* por 7 h. As concentrações de cinzas, ADF, NDF, CP, N solúvel, amido e amido-D são analisadas pela Cumberland Valley Analytical Services, Hagerstown, MD.

[0228] Amostras representativas de forragens e silagens úmidas são misturadas com solução de Ringers estéril com força de um quarto (Oxoid BR0052G, Oxoid, Unipath, Ltd., Basingstoke, RU) e homogeneizadas por 1 min em um liquidificador Proctor-Silex 57171 (Hamilton Beach/Proctor-Silex Inc., Washington, NC, EUA). O pH é determinado em extratos de água fresca. Os números de bactérias totais de ácido láctico são determinados por diluições em série de 10

vezes em placas por despejamento em ágar de Man, Rogosa e Sharpe (CM3651, Oxoid, Unipath, Basingstoke, RU). As placas são incubadas anaerobicamente a 32 °C por 48 a 72 h. As leveduras e bolores totais são determinados por diluições em série de 10 vezes em placas por despejamento em ágar de extrato de malte (CM0059, Oxoid, Unipath, Basingstoke, RU). Essas placas são incubadas aerobicamente a 32 °C por 48 a 72 h antes da enumeração. As porções dos extratos de água são congeladas antes das análises. Ácidos láctico e acético, 1-2 propanodiol, (1, 2 PD) e etanol são determinados nos extratos de água por meio de HPLC. Amônia-N é determinada nos extratos de água por um método fenol-hipoclorito. O carboidrato solúvel em água (WSC) é quantificado por um procedimento colorimétrico.

Análises por material vegetal e temporização (Tabela 17):

Tabela 17.

Item	Planta de milho fresca ¹	Aberturas de silo ²
DM	X	X
pH	X	X
N	X	X ³
Sol-N	X	X ³
ADF	X	X ³
NDF (om)	X	X ³

Amido	X	X ³
Amido-D, 7 h <i>in vitro</i>	X	X ³
Cinzas	X	X ³
Ácidos láctico,	NA	X
NH ₃ -N	X	X
WSC	X	X
LAB	X	X
Leveduras & bolores	X	X
Estabilidade aeróbica	NA	X
Recuperação de DM	NA	X

- 1 5 replicados, cada um para isolina e milho de ração
Enogen® = 10 amostras
- 2 6 trt x 5 reps x 3 aberturas = 90 amostras
- 3 Análises concluídas por laboratório qualificado

Estatísticas:

[0229] Os dados de cada abertura de silo são analisados separadamente como um projeto completamente randomizado. O modelo inclui o efeito fixo de tratamento. Os

dados são analisados com o uso do proc glm do software SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC) e as diferenças relatadas como significativas quando $P \leq 0,05$. Quando o valor P total é significativo, as médias são separadas por teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

EXEMPLO 11

Estudo de vacas leiteiras com silagem de ração Enogen®

[0230] Um estudo foi realizado para avaliar o impacto de alimentação de vacas leiteiras com silagem de ração Enogen® na produção de leite, qualidade do leite e pontuações de condição de corpo (BCS).

Experimento:

[0231] Vacas leiteiras foram alojadas em celas com base no estágio/desempenho de lactação e alimentadas na cela com uma ração mista total (TMR) adaptada às necessidades nutricionais das vacas nessa cela. Os animais não foram administrados com somatotropina bovina.

[0232] A silagem foi produzida em fazenda a partir de milho de ração Enogen® ou milho convencional que não contém um traço de alfa-amilase. A silagem foi fermentada por 3 meses antes do uso. Os dados foram coletados de animais alimentados com TMR contendo uma silagem de milho convencional sem um traço de alfa-amilase por 30 dias (período inativo de silagem de ração Enogen®). Posteriormente, os animais foram transicionados da silagem convencional para a silagem de ração Enogen® alimentando-se as duas silagens em uma razão de 50:50 por 12 dias. Os animais foram, então, comutados para a silagem de ração

Enogen® a 100% como o componente de silagem da TMR por 85 dias (período ativo de silagem de ração Enogen®).

[0233] O rendimento de leite foi medido diariamente para cada vaca através de um sistema eletrônico de ordenha de leite. A ingestão de matéria seca (DMI) na cela foi medida diariamente através de um sistema de inventário TMR.

[0234] As pontuações de condição de corpo foram avaliadas mensalmente durante o curso do estudo em 10% das vacas, selecionadas aleatoriamente a partir de todas as celas. A pontuação é feita em uma escala de 1 a 5, com uma pontuação de 1 sendo muito magra, uma pontuação de 5 sendo muito pesada e uma pontuação de 3 sendo o ideal.

[0235] As vacas foram divididas em celas da seguinte forma: lactação precoce (1 cela), lactação tardia (2 celas) e alta produção (2 celas). As rações para cada cela foram formuladas por um nutricionista profissional em animais.

[0236] Para as rações de vaca de alta produção, a composição de forragem da TMR foi da seguinte forma:

Tabela 18. Composição de forragem de ração de vacas de alta produção:

	Silagem convencional (período inativo)	Silagem de ração Enogen® (período ativo)
Silagem de milho, % de DM	44	42
Silagem de alfafa, % de DM	13	16

Silagem de milho, % de forragem	77%	72%
--	-----	-----

[0237] As rações para vacas de lactação precoce e tardia geralmente têm um teor de energia mais baixo em comparação com a ração para vacas de alta produção, refletido por um percentual mais alto da ração estar sob a forma de forragem (silagem) em comparação com as rações mostradas na Tabela 18. O teor e a composição de forragem das vacas nos períodos inativos e ativos foram calculados de modo a serem similares para vacas de lactação precoce e tardia.

[0238] O desempenho de lactação foi avaliado durante os períodos inativos e ativos como médias através de todas as celas (lactação precoce, lactação tardia e alta produção). Conforme pode ser observado na Tabela 19 abaixo, as vacas leiteiras alimentados com silagem de ração Enogen® produziram mais leite por dia, que durante o período inativo com silagem de milho convencional na ração. Ao mesmo tempo, a DMI (ingestão de matéria seca) foi reduzida, resultando em um melhoramento na eficácia de ração (FE). O número total de vacas e os dias de leite para o rebanho não foram significativamente diferentes entre os períodos inativos e ativos e, portanto, não se espera que resulte em diferenças significativas no desempenho, na ingestão ou na eficácia de ração entre os dois períodos.

Tabela 19. Desempenho de lactação.

Média em todas celas	Silagem de ração Enogen® inativa	Silagem de ração Enogen® ativa	Diferença (ativo - inativo)

DMI ¹ , lb/vaca/dia	58,3	55,7	-2,6
Leite, lb/vaca/dia	79,9	83,7	+3,8
FE ² , Leite/DMI	1,37	1,51	+0,14
Dias de leite	170	174	+4
Leite ajustado em 150 dias, lb/vaca/dia	81,2	85,6	+4,4

¹Ingestão de matéria seca

²Eficácia de ração

[0239] Além da quantidade de leite produzido, a qualidade do leite e a condições do corpo do animal são considerações importantes. Uma preocupação com vacas leiteiras de alta produção é que a condição do corpo sofrerá, o que pode resultar em uma perda de produtividade a longo prazo. De modo semelhante, um aumento na produção de leite tem valor limitado se a qualidade do leite for significativamente reduzida. Nesse estudo, a qualidade do leite e pontuações da condição do corpo foram mantidos, mesmo na face de produção de leite mais alta. Não houve diferenças significativas na composição de gordura, proteína e nitrogênio ureico no leite (MUN) do leite produzido durante os períodos inativos e ativos (dados não mostrados). Adicionalmente, não houve mudança em BCS, com pontuações médias de aproximadamente 3 em animais aleatoriamente

selecionado durante os períodos tanto inativo como ativo (com uma pontuação de 1 sendo muito magra, uma pontuação de 5 sendo muito pesada e uma pontuação de 3 sendo ideal).

[0240] Em suma, nesse estudo, vacas leiteiras alimentadas com silagem de ração Enogen® como parte de uma TMR melhoraram a produção de leite, enquanto mantiveram a qualidade do leite e a condição do corpo.

EXEMPLO 12

Efeito de suplementação de milho de ração Enogen® na produção e ingestão de ração em vacas leiteiras de alta produção

Objetivo:

[0241] Determinar os efeitos de alimentação de silagem de milho produzida a partir de um híbrido que expressa um traço de alfa-amilase ("milho de ração Enogen®" ou "EFC") versus silagem de milho padrão na ingestão de ração e produção de leite em vacas leiteiras transicionais de alta produção.

Plantio, colheita e armazenamento:

[0242] Syngenta forneceu semente do milho híbrido EFC (semente EFC) e semente de um milho híbrido com isolina quase negativa (semente de controle) para o estudo em quantidade suficiente para plantar aproximadamente 22 acres por híbrido em uma taxa de semeadura-alvo de 33.000 sementes/acre. A semente foi plantada com o uso de uma plantadeira de 24 fileiras no mesmo campo de 45 acres. A silagem EFC e a silagem de controle foram colhidas entre 62 a 65% de umidificação total da planta e armazenadas em sacos

agro segregados inoculados com o inoculante lácteo comercial LB 500.

Animais e tratamentos:

[0243] Vinte e quatro (24) vacas secas holandesas que entraram na segunda lactação ou mais foram bloqueadas para tratamentos com base em data prevista para o parto, lactação, pontuação de condição do corpo (BCS) e produção de leite anterior (ME 305). Dois tratamentos de regime alimentar foram atribuídos aleatoriamente 1) silagem de controle de milho e 2) silagem EFC. As vacas secas foram alojadas em estações de alimentação individuais de biocontrole a partir de ~3 a 4 semanas após a previsão de parto, e a ração incluiu os tratamentos de silagem atribuídos (Controle vs. EFC) durante esse período pré-parto. Após o parto, os animais foram atribuídos a um dos dois tratamentos de silagem de milho tratamentos na ração de vaca de alta produção. Os animais permaneceram na cela de biocontrole até 90 dias em lactação (DIM). Consultar a Tabela 20 para atribuições de tratamento.

[0244] Todo o experimento foi repetido com um segundo grupo de vinte e quatro (24) vacas assim que possível após as porteiras de biocontrole começarem a ficar disponíveis novamente à medida que o primeiro grupo passava pelos 90 DIM.

Tabela 20. Desenho Experimental

	Componente de silagem de TMR ¹ por período de alimentação
--	--

nº de tratamento e descrição (6 vacas por grupo)	Últimas ~ 4 semanas do período de gestação	Seguido pelo período pós-descanso
1 Controle	Silagem de controle	Silagem de controle
2 Apenas gestação	Silagem EFC	Silagem de controle
3 Apenas lactação	Silagem de controle	Silagem EFC
4 Estudo inteiro	Silagem EFC	Silagem EFC

¹ Ração mista total

Entrega de ração e alimentação:

[0245] As vacas alojadas no celeiro comercial ou nas celas comunais foram alimentadas com uma ração mista total (TMR) duas vezes ao dia, enquanto os animais alojados nas porteiras de biocontrole foram alimentados com uma TMR uma vez ao dia. A ração de base menos a silagem de milho foi preparada para todas as celas em uma carga com o uso de um misturador giratório Roto-Mix. Após a ração de base ter sido misturada, a ração foi descarregada e uma metade foi adicionado ao misturador juntamente com a silagem de controle. A ração foi misturada adicionalmente e entregue às celas de controle ou porteiras de biocontrole. O misturador foi limpo e o metade restante da ração de base que foi descarregada foi recarregada de volta no misturados juntamente com a silagem de milho EFC. Após a mistura, a ração de tratamento silagem de milho EFC foi entregue a suas respectivas celas ou porteiras da biocontrole.

[0246] As manjedouras de alimentação foram lidas antes da alimentação diária e as necessidades de ração foram ajustadas em conformidade com base na ração residual restante na manjedoura. As vacas foram alimentadas para ligeira recusa de ração, uma pontuação de 1 em uma escala de 0 a 4; em que 0 representa nenhuma ração restante e 1 representa 1 a 5% de ração restante. A receita misturada, a ração entregue e a ração residual restante na manjedoura foram registradas eletronicamente com o uso de um rastreador TMR (Digi-Star, Fort Atkinson, WI). Para manter a densidade de nutrientes consistente, a composição de ingredientes da ração foi ajustada em intervalos regulares para levar em consideração as mudanças no teor de matéria seca da silagem de milho e silagem de alfafa ao longo do tempo.

Parâmetros medidos:

[0247] A ingestão de matéria seca (DMI) de vacas secas foi registrada diariamente no nível individual uma vez nas porteiras de biocontrole. Após o descanso, as vacas foram ordenhadas 3x ao dia e o rendimento individual de leite foi registrado e armazenado. Amostras de leite foram coletadas de cada vaca uma vez por semana até 90 DIM em 3 lactações consecutivas e analisadas quanto às porcentagens de gordura, proteína e lactose, contagem de célula somática (SCC) e nitrogênio ureico no leite (MUN) pela AgSource Laboratories (Menomonie, WI). A DMI individual diária foi registrada de 0 a 90 DIM. Pesos corporais individuais da vaca foram tomados semanalmente durante o ensaio. Os eventos de vaca, tal como saúde, respiração, etc. foram registrados em DairyCOMP 305 (DC305; Valley Agricultural Software,

Tulare, CA). A ingestão de matéria seca por cела foi calculada a partir da entrega diária de ração, menos recusas de ração. As medições de BCS foram tomadas antes do ensaio, no parto, 45 DIM e no último dia do ensaio. As pontuações de locomoção foram registradas quando cada vaca foi colocada nas porteiras de biocontrole (~30 dias pré-parto) e em 0, 45 e 90 DIM. TMR e recusas foram coletadas uma vez por semana e congeladas até análise. Nos dias 0, 14, 28 e 42, amostras fecais foram coletadas e analisadas para amido fecal. Após 45 dias, as amostras fecais foram coletadas uma vez por mês até o pico de leite. A temperatura na face (12") e na 36" em cada bolsa de silagem foi registrada 3 vezes por semana, sondando 5 locais através da face da bolsa de silagem para cada profundidade. Estudos em laboratório da estabilidade de silagem foram realizados por quatro semanas consecutivas.

Resultados.

[0248] Os resultados mostraram um aumento na produção de leite e eficácia de ração no leite (lb de leite produzido por lb de ração consumida) da seguinte forma (Tabela 21):

<u>Tratamento</u>		
<u>Média de 90 dias</u>		
<u>Pré-descanso</u>	<u>Pós-descanso</u>	<u>Volume</u>
<u>de leite¹</u>	<u>Ingestão de ração²</u>	<u>Eficácia de ração³</u>
1. Controle	Controle	103,455
62,904	1,6555	
2. Controle	EFC	108,201
65,604	1,6783	

3. EFC	Controle	107,864
60,867	1,6321	
4. EFC	EFC	111,364
59,317	1,7918	

¹ lb/cabeça/dia

² lb DMI/cabeça/dia

³ volume de leite/ingestão de ração

- Pré-descanso de controle/Pós-descanso de controle (tratamento 1) foi aproximadamente 103,5 lb de leite/cabeça/dia vs pré-descanso de EFC/pós-descanso de EFC (tratamento 4) em 111,4 lb/cabeça/dia

- Diferença de média de 7,9 lb/cabeça/dia em 90 dias de lactação quando EFC foi alimentado tanto antes quanto após o descanso

- Os outros 2 tratamentos (EFC durante o período de pré-descanso ou pós-descanso; tratamentos 2 e 3) geraram resultados intermediários

- Eficácia de ração para o tratamento 1 (Pré-descanso de controle/Pós-descanso de controle) foi 1,656 vs 1,792 para o tratamento 4 (pré-descanso de EFC/pós-descanso de EFC).

EXEMPLO 13

Estudo de Desempenho Diário: Alimentação de uma Combinação de Grão e Silagem de Enogen® de Alimentação

[0249] Um estudo de desempenho diário é conduzido no Centro de Pesquisa de Agricultura de Arlington da Universidade de Wisconsin-Madison. As vacas holandesas multíparas no meio da lactação são usadas nesse estudo de

cela. Há 16 celas com 8 vacas em cada cela para um total de 128 vacas.

[0250] O experimento começa com 2 semanas de período covariável quando todas as vacas são alimentadas no mesmo regime alimentar. Pelas 10 semanas subsequentes, as celas são atribuídas aleatoriamente a um dos quatro regimes alimentares contendo níveis diferentes de silagem de milho de ração Enogen® ou grão de milho de ração Enogen®.

Os quatro tratamentos experimentais de regime alimentar são:

- 1) 40% de silagem de milho convencional e 15% de grão de milho convencional (controle negativo)
- 2) 40% de silagem de milho de ração Enogen® e 15% de grão de milho convencional (efeito de silagem de milho)
- 3) 40% de silagem de milho convencional e 15% de grão de milho de ração Enogen® (efeito de grão de milho)
- 4) 40% de silagem de milho de ração Enogen® e 15% de grão de milho de ração Enogen® (controle positivo)

Amostras/Resposta variáveis a ser medida:

[0251] Ingestão de Matéria Seca: As vacas são alimentadas com ração mista total (TMR) uma vez ao dia *ad libitum*, ajustando a quantidade oferecida para ter 5 a 10% de recusas para cada cela. As forragens são secas a 60°C por 48 h para ajustar as misturas de TMR de ingrediente para variação em matéria seca (DM) a cada semana.

[0252] Ingrediente de ração: Os ingredientes de ração individual, TMR, mistura de concentrado e orts são amostrados uma vez a cada semana e mantidos congelados para análise posterior. Cada amostra de ingrediente de ração é composta a cada duas semanas, secas e moída para passar por

uma peneira de 1,0 mm em um moinho de Wiley. As amostras são analisadas em relação à proteína bruta (CP), fibra de detergente neutro (NDF), fibra de detergente ácido (ADF), amido, lignina, extrato de éter (gordura) e cinzas. Além disso, a digestibilidade de NFD ruminal *in vitro* às 30 h, (NDFD30h), a digestibilidade de amido ruminal *in vitro* amido às 7h para as amostras compósitas de forragens, das misturas de concentrado (incluindo silagens e grãos de milho de Ração Enogen®) são determinadas.

[0253] Produção e Composição de Leite: A produtividade de leite é medida diariamente para cada vaca individual durante o curso do experimento. As vacas são ordenhadas duas vezes ao dia de manhã e à noite. As amostras de leite para composição de leite são coletadas por dois dias consecutivos (4 ordenhas) a cada duas semanas. As amostras de leite são analisadas em relação às concentrações de gordura, proteína, lactose, célula somática e nitrogênio e ureia de leite (MUN).

[0254] Amostra de urina no local: As amostras de urina para cada vaca são coletadas em 4 pontos de tempo com intervalo de 6 h para cobrir o relógio de 24 h. As amostras de urina são analisadas em relação à concentração de derivado de purina e creatinina para estimar a síntese de proteína microbiana e o volume de urina.

[0255] Amostra sanguínea: As amostras sanguíneas para cada vaca são coletadas e analisadas em relação ao perfil de aminoácido uma vez no final do teste.

[0256] Peso Corporal (BW) e Pontuação de condição corporal (BCS): O BW e a BCS da vaca são medidos em 2 dias consecutivos no começo do teste, durante a 5ª semana

de regime alimentar experimental e na última semana do experimento.

EXEMPLO 14

Estudo de Produção de Desperdício Diário:

Alimentação de uma Combinação de Grão e Silagem de Enogen® de Alimentação

[0257] Um estudo de desempenho diário, emissão de metano entérico, metabolismo ruminal, utilização de nitrogênio e digestibilidade de nutriente é conduzido na Universidade de Wisconsin, com uso de vacas leiteiras em lactação alimentadas com silagem convencional ou silagem de milho de Ração Enogen® e grão de milho de Ração Enogen®.

Material e Métodos

[0258] O projeto experimental é um Quadrado Latino replicado 4 x 4 (4 vacas por quadrado, 4 períodos), com quatro períodos de 28 dias (14 dias para adaptação e 14 dias para coleta de dados) para um teste de 16 semanas. Vinte vacas em lactação múltiparas no meio da lactação são alojadas em um celeiro de estábulo pequeno. Além dos quatro quadrados de vacas não canuladas, quatro vacas ruminalmente canuladas (RC) estão em um projeto de cruzamento duplo. As vacas são alimentadas uma vez ao dia e ordenhadas duas vezes ao dia. Os quatro tratamentos de regime alimentar para vacas não canuladas são listados abaixo, contendo níveis diferentes de silagem de milho de Ração Enogen® ou grão de milho de Ração Enogen®. As vacas são atribuídas aleatoriamente em quadrados para as 4 sequências de tratamento dietético.

Os quatro tratamentos experimentais de regime alimentar para as vacas não canuladas são:

- 1) 40% de silagem de milho convencional e 15% de grão de milho convencional (controle negativo)
- 2) 40% de silagem de milho de ração Enogen® e 15% de grão de milho convencional (efeito de silagem de milho)
- 3) 40% de silagem de milho convencional e 15% de grão de milho de ração Enogen® (efeito de grão de milho)
- 4) 40% de silagem de milho de ração Enogen® e 15% de grão de milho de ração Enogen® (controle positivo)

[0259] Os regimes alimentares para vacas RC são o regime alimentar 1) (controle negativo) e 4) (controle positivo) (por exemplo, sequência de regime alimentar como 1) → 4) → 1) → 4) para cruzamento duplo).

Amostras/Resposta variáveis a ser medida:

[0260] **Ingestão de Matéria Seca:** As vacas são alimentadas com uma ração mista total (TMR) uma vez ao dia *ad libitum*, exceto para as vacas RC durante o período de amostragem quando os regimes alimentares são oferecidos duas vezes ao dia às 8 h da manhã e às 8 h da tarde, ajustando a quantidade oferecida para ter 5 a 10% de recusas para cada vaca. As forragens são secas a 60°C por 48 h para ajustar as misturas de TMR de ingrediente para variação em matéria seca (DM) a cada semana.

[0261] **Ingrediente de ração:** Os ingredientes de ração individual, TMR, mistura de concentrado e orts são amostrados uma vez a cada semana e mantidos congelados para análise posterior. Cada amostra de ingrediente de ração é composta nas últimas duas semanas para cada período, seca e moída para passar por uma peneira de 1,0 mm em um moinho de Wiley. As amostras são analisadas em relação à energia de

crescimento, proteína bruta (CP), fibra de detergente neutro (NDF), fibra de detergente neutro indigerível (uNDF), fibra de detergente ácido (ADF), amido, carboidratos solúveis em água, lignina, extrato de éter e cinzas. As amostras de orts são analisadas em relação ao amido, cinzas, CP e NDF e uNDF. Além disso, a digestibilidade de NFD ruminal *in vitro* às 30 h, (NDFD30h), a digestibilidade de amido ruminal *in vitro* amido às 7h para as amostras compósitas de forragens, das misturas de concentrado (incluindo silagens e grãos de milho de Ração Enogen®) são determinadas.

[0262] Produção e Composição de Leite: A produtividade de leite é medida diariamente para cada vaca individual durante o curso do experimento. As vacas são ordenhadas duas vezes ao dia de manhã e à noite. As amostras de leite para composição de leite são coletadas por dois dias consecutivos (4 ordenhas) durante as últimas duas semanas de cada período. As amostras de leite são analisadas em relação às concentrações de gordura, proteína, lactose, célula somática e MUN.

[0263] Peso Corporal (BW) e Pontuação de condição corporal (BCS): O BW e BCS da vaca são medidos em 2 consecutivos no começo do teste e durante a quarta semana de cada período.

[0264] Emissão de metano entérico (CH₄): CH₄ é medido para cada vaca durante a terceira semana de cada período. A medição de metano é conduzida múltiplas vezes diariamente com uma frequência máxima de a quatro horas com o sistema GreenFeed (C-Lock Inc., Rapid City, Dakota do sul). Antes das vacas serem atribuídas a diferentes tratamentos de regime alimentar, duas semanas de adaptação e seleção para

o sistema GreenFeed são conduzidas com 20 vacas não canuladas alimentadas com o mesmo regime alimentar de rebanho. Durante as duas semanas, o sistema GreenFeed é colocado na frente das vacas múltiplas vezes para treinar as vacas a se acostumarem com o equipamento de medição de CH₄. No final da semana de seleção, as vacas que não se adaptam ao GreenFeed e quaisquer vacas adicionais do protocolo são retornadas para o rebanho de lactação, apenas 16 vacas (além de 4 vacas RC) são usadas na avaliação do efeito do tratamento de regime alimentar.

[0265] Amostragem de fluido ruminal: O fluido ruminal das 4 vacas RC uma vez às 2 h e 4 h após a alimentação em cada período para análise de VFA, amônia e perfis de pH.

[0266] Tamanho de agrupamento de rúmen e nutriente de regurgitação ruminal: o teor ruminal é evacuado manualmente através da cânula ruminal ao meio dia (4h após a alimentação) e às 7 da manhã (1h antes da alimentação) no dia 21 (em períodos de 3 semanas) para cada uma das 4 vacas RC em cada período. A massa e o volume do teor ruminal total são determinados e 1 kg de subamostras de regurgitação ruminal é coletado para análise de matéria orgânica (OM), fibra de detergente neutro (NDF), fibra de detergente neutro não digestível (uNDF) e amido, e a regurgitação evacuada é colocada de volta no rúmen. Os tamanhos de agrupamento ruminal de OM, NDF, uNDF e amido são determinados multiplicando-se a concentração de cada componente pela DM de regurgitação ruminal.

[0267] Amostragem de regurgitação omasal: Durante a última semana de cada período, o fluxo de regurgitação do rúmen para o omaso de vacas RC é quantificado

com o uso da técnica de amostragem omasal desenvolvida por Huhtanen et al. (1997. *J Anim Sci.*75:1.380 a 1.392) e modificada por Ahvenjarvi et al. (2000, *Br. J. Nutr.* 83: 67 a 77) e Lopes et al., (2015 *J. Dairy Sci.* 98:574 a 585). NDF indigestível, CoEDTA ("Co") e Lantanum ("La") são usados como marcadores de fluxo de regurgitação para fase de partículas grandes, fase fluida e fase de partículas pequenas, respectivamente. Cápsulas de gelatina contendo 1 g de La e 0,75 g de Co são dosadas através da cânula ruminal as 06:00, 12:00, 18:00 e 00:00 h (total de 4 g de La e 3 g de Co por dia) por 7 dias começando no dia 20 de cada período, com dosagem 3x no dia 20. Do dia 23 ao dia 25, amostras omasais são tomadas 4 vezes por dia em intervalos de 2 h para representar as 24 h. As amostras omasais compósitas são separadas em 3 fases omasais e analisadas quanto à concentração de marcadores. Como resultado, a regurgitação omasal aparente que flui para fora do rúmen é reconstituída. As concentrações de OM, NDF, amido, N não amônia e N microbiano na regurgitação omasal são determinadas. A digestibilidade de nutrientes ruminais e a taxa de fluxo também são determinadas.

[0268] Digestibilidade de NDF *in vitro*: A silagem de milho convencional e de ração Enogen® e grão de milho são secos e moídos. Amostras em triplicado são colocadas em bolsas ANKOM e incubadas em fluido ruminal tamponado com um banho de água a 39 °C por 0, 24, 30, 48 h (4 fontes de amostra x 4 pontos no tempo x triplicados = 48 bolsas ANKOM para amostras). As bolsas são então analisadas quanto a NDF com analisador de fibras ANKOM200 (Ankom Technology, Fairport, NY) com α -amilase e sulfeto de sódio

para determinar o resíduo de NDF. Então, a cinética de digestão de fibras dos produtos de milho pode ser calculada.

[0269] Amostra pontual de urina: Amostras pontuais de urina são coletadas em quatro pontos no tempo durante a quarta semana de cada período para cobrir 24 h. As amostras de urina são acidificadas com 0,072 M de ácido sulfúrico com razão de 4:1 entre ácido e urina em volume. As amostras de urina são congeladas a -20 °C até a análise. As amostras de urina são compostas em uma amostra por vaca por período e analisadas quanto a N total, creatinina na urina e ureia na urina. O volume diário de urina para cada vaca é estimado com a creatinina na urina como um marcador interno. Além disso, as amostras de urina compostas por regimes alimentares são analisadas quanto à energia bruta em cada período.

[0270] Amostra de captura fecal: Amostras fecais são tomadas do reto de cada vaca no mesmo momento da amostragem de urina (4 vezes com 6 h de intervalos para cobrir 24 h). As amostras de fezes para cada vaca são compostas em peso e secas, moídas e analisadas quanto a uNDF, NDF, matéria orgânica, nitrogênio total e amido para digestibilidade de total de nutrientes no trato. A saída diária de DM nas fezes é estimada com uNDF como um marcador interno. Além disso, as amostras de fezes compostas por regimes alimentares são analisadas quanto à energia bruta a cada período. Com a energia bruta da ingestão e das fezes e urina, o equilíbrio de energia, incluindo energia digestível e energia metabolizável dos regimes alimentares, pode ser determinado.

[0271] **Amostra sanguínea:** A coleta de sangue é realizada na veia da cauda até três vezes, uma vez por período para nitrogênio ureico no sangue.

EXEMPLO 15

Estudo lácteo com milho de ração Enogen® como grão

[0272] Múltiplos estudos em fazenda indicam um benefício de incluir grão de milho de ração Enogen® em rações com as quais vacas leiteiras em lactação são alimentadas. Em um estudo em fazenda inicial, o uso de 6,5 lb/cabeça/dia de grão de milho de ração Enogen® para substituir diretamente a mesma quantidade de grão de milho amarelo nº 2 convencional como parte de uma ração equilibrada foi mostrado para proteger a produção de leite de uma diminuição na produção relacionada ao calor normalmente esperada no verão. Cada um dentre o milho convencional e o milho de ração Enogen® foi moído em um tamanho de partícula de 450 µM, e nenhuma outra mudança foi feita na composição de ração. Embora os laticínios tenham experimentado rotineiramente uma queda de 3 a 5 lb/cabeça/dia na produção de leite nos anos anteriores, durante o clima mais quente do final da primavera e no verão, não foi observada diminuição na quantidade ou qualidade da produção de leite quando o grão de milho de ração Enogen® foi incluído nas rações no começo do fim da primavera (período ativo de milho de ração Enogen®) versus os trinta dias anteriores (período inativo de milho de ração Enogen®) (Tabela 22). A análise de amostra fecal para o período ativo mostrou uma redução de 43% no amido fecal vs. o período inativo, e uma melhora na digestibilidade total aparente de amido no trato (ATTSD) de 95,42% de DM a 98,07% de DM.

Tabela 22. Desempenho de lactação, amido fecal e digestibilidade total de amido no trato

Medição	Período inativo de grão convencional	Período ativo de grão de ração Enogen®
Tamanho de rebanho	1812	1818
Produção de leite diária média (lb/cabeça/dia)	90,75	90,69
% de gordura	3,8915	3,7856
% de proteína	3,1951	3,2165
Produção corrigida de gordura do leite (lb/cabeça/dia)	96,51	94,89
Produção corrigida de energia do leite (lb/cabeça/dia)	96,29	95,12
% de DM de amido fecal	2,375	1,03
% de DM de ATTSD*	95,42	98,07

* Digestibilidade total aparente de amido no trato

[0273] Em um segundo local de laticínio, a substituição de grão de milho convencional (6,5 lb/cabeça/dia, tamanho de partícula de 450 µM) pela mesma quantidade de grão de milho de ração Enogen® nas rações de vacas em lactação foi julgada pelo nutricionista presente benéfica em manter sobre controle uma epidemia difícil de *Clostridium perfringens* do tipo A. Esse organismo, enquanto parte normal da microflora intestinal em vacas leiteiras, pode, sob certas condições, incluindo estresse, desequilíbrio nutricional ou acidose ruminal, causar doenças graves ou fatais. A epidemia esteve em andamento por 6 meses

com sucesso limitado dos tratamentos padrão com antibióticos e antitoxinas. Uma vez que o rebanho foi comutado para rações contendo grão de milho de ração Enogen®, o sucesso de tratamento melhorou e a epidemia foi rapidamente encerrada. Embora o mecanismo através do qual isso ocorreu não seja totalmente compreendido, a redução na acidose ruminal e a redução de excesso de amido nos intestinos, através do aumento da digestibilidade de amido, podem ser fatores importantes.

[0274] Em um terceiro estudo, dez laticínios, representando aproximadamente doze mil vacas em lactação, em que todas usaram o mesmo nutricionista e em que todas receberam o grão de milho incluído em suas rações de rebanho proveniente de um único moinho de ração, participaram de um estudo de substituição direta substituindo-se o milho convencional em suas rações mistas pelo milho de ração Enogen® (6,5 lb/cabeça/dia, tamanho de partícula de 450 µM) por 60 a 90 dias. Nenhuma outra mudança foi feita nas rações durante esse período. Com esse nível de inclusão, o declínio de produção de leite no verão anteriormente descrito foi evitado. Para o subconjunto desses laticínios que aumentaram gradualmente a inclusão de grão de milho de ração Enogen® nas rações para 13,5 lb/cabeça/dia, um aumento de 2 a 2,5 lb/cabeça/dia na produção de leite foi observado sem declínio nos parâmetros de qualidade do leite.

[0275] O acima mencionado é ilustrativo da presente invenção, e não é para ser interpretado como limitando a mesma. A invenção é definida pelas seguintes reivindicações, com equivalentes das reivindicações a serem incluídos nas mesmas.

[0276] Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências citados aqui são incorporados por referência nas suas totalidades quanto aos ensinamentos relevantes para a frase e/ou parágrafo no qual a referência é apresentada.

Reivindicações

1. Método para aumentar a quantidade de leite produzido por um animal produtor de leite, o método caracterizado pelo fato de que compreende alimentar o animal produtor de leite com uma ração animal que compreende material vegetal de maïs transgênico, em que o material vegetal de maïs transgênico compreende um polinucleotídeo que codifica uma α -amilase recombinante.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade de leite produzido pelo animal produtor de leite é aumentada em pelo menos cerca de 2% em comparação com a quantidade de leite produzido por um animal de controle que não é provido com a ração animal.

3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que a quantidade de leite produzido pelo animal produtor de leite é aumentada em cerca de 2% a cerca de 50% em comparação com a quantidade de leite produzido por um animal de controle que não é alimentado com a ração animal.

4. Método para aumentar a eficácia de utilização de ração para produção de leite por um animal produtor de leite, o método caracterizado pelo fato de que compreende alimentar o animal, em uma quantidade eficaz para aumentar a eficácia de utilização de ração pelo animal produtor de leite, com uma ração animal que compreende material vegetal de maïs transgênico, em que o material vegetal de maïs transgênico compreende um polinucleotídeo que codifica uma α -amilase recombinante.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a eficácia de utilização de ração para produção de leite é aumentada em pelo menos cerca de 0,02.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado pelo fato de que o animal produtor de leite é uma vaca.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado pelo fato de que o animal produtor de leite é uma cabra.

8. Método para aumentar o ganho de peso diário médio de um bezerro de corte em crescimento após o desmame, o método caracterizado pelo fato de que compreende alimentar o animal, em uma quantidade eficaz para aumentar o ganho de peso diário médio do animal, com uma ração animal que compreende material vegetal de maïs transgênico, em que o material vegetal de maïs transgênico compreende um polinucleotídeo que codifica uma α -amilase recombinante.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o ganho de peso diário médio do bezerro de corte é aumentado em cerca de 0,05 lbs/dia a cerca de 10 lbs/dia.

10. Método para aumentar a eficácia de utilização de ração por um bezerro de corte em crescimento, o método caracterizado pelo fato de que compreende alimentar o animal, em uma quantidade eficaz para aumentar a eficácia de utilização de ração pelo bezerro de corte, com uma ração animal que compreende material vegetal de maïs transgênico, em que o material vegetal de maïs transgênico compreende um polinucleotídeo que codifica uma α -amilase recombinante.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a razão entre ração e ganho pelo bezerro de corte é reduzida em pelo menos cerca de 0,005 em comparação com um bezerro de corte de controle que não é alimentado com a ração animal.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de que o bezerro de corte é um bezerro de recria que é criado para ser levado a um parque de engorda.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, caracterizado pelo fato de que a α -amilase recombinante tem pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, caracterizado pelo fato de que a alfa-amilase é uma alfa-amilase termoestável.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, caracterizado pelo fato de que a α -amilase recombinante é α -amilase 797GL3 ou D45.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15 e 16, caracterizado pelo fato de que o material vegetal de maís compreende evento de maís 3272.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17, caracterizado pelo fato de que a α -amilase recombinante é direcionada na direção oposta ao seu substrato.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18, caracterizado pelo fato de que a α -amilase recombinante é direcionada ao cloroplasto, vacúolo, citoplasma, apoplasto ou retículo endoplasmático.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19, caracterizado pelo fato de que a α -amilase recombinante é direcionada ao retículo endoplasmático.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica a α -amilase recombinante é expresso no miolo.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, caracterizado pelo fato de que a ração animal compreende péletes, grão, silagem, miolos laminados a seco, miolos floculados a vapor, miolos inteiros, miolos grosseiramente quebrados, milho de alta umidificação ou qualquer combinação dos mesmos, compreendendo o material vegetal de maís transgênico.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, caracterizado pelo fato de que a ração animal compreende pelo menos cerca de 10% em peso com base na matéria seca do material vegetal de maís transgênico.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23, caracterizado pelo fato de que a ração animal é uma ração mista total que compreende o material vegetal de maís transgênico.

25. Silagem de maís caracterizada pelo fato de que compreende material vegetal de maís transgênico que compreende um polinucleotídeo que codifica uma α -amilase recombinante.

26. Silagem de maís, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a α -amilase recombinante tem pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

27. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 e 26, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:5.

28. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26 e 27, caracterizada pelo fato de que a α -amilase recombinante é α -amilase 797GL3 ou D45.

29. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26, 27 e 28, caracterizada pelo fato

de que a planta de material de maís compreende evento de maís 3272.

30. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26, 27, 28 e 29, caracterizada pelo fato de que a α -amilase recombinante é direcionada na direção oposta ao seu substrato.

31. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26, 27, 28, 29 e 30, caracterizada pelo fato de que a α -amilase recombinante é direcionada ao cloroplasto, vacúolo, citoplasma, apoplasto ou retículo endoplasmático.

32. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31, caracterizada pelo fato de que a α -amilase recombinante é direcionada ao retículo endoplasmático.

33. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica a α -amilase recombinante é expresso no miolo.

34. Silagem de maís, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33, caracterizada pelo fato de que pelo menos cerca de 5% em peso com base na matéria seca da silagem de maís é produzido a partir de plantas de maís transgênicas que compreendem um polinucleotídeo que codifica a α -amilase recombinante.

Figura 1

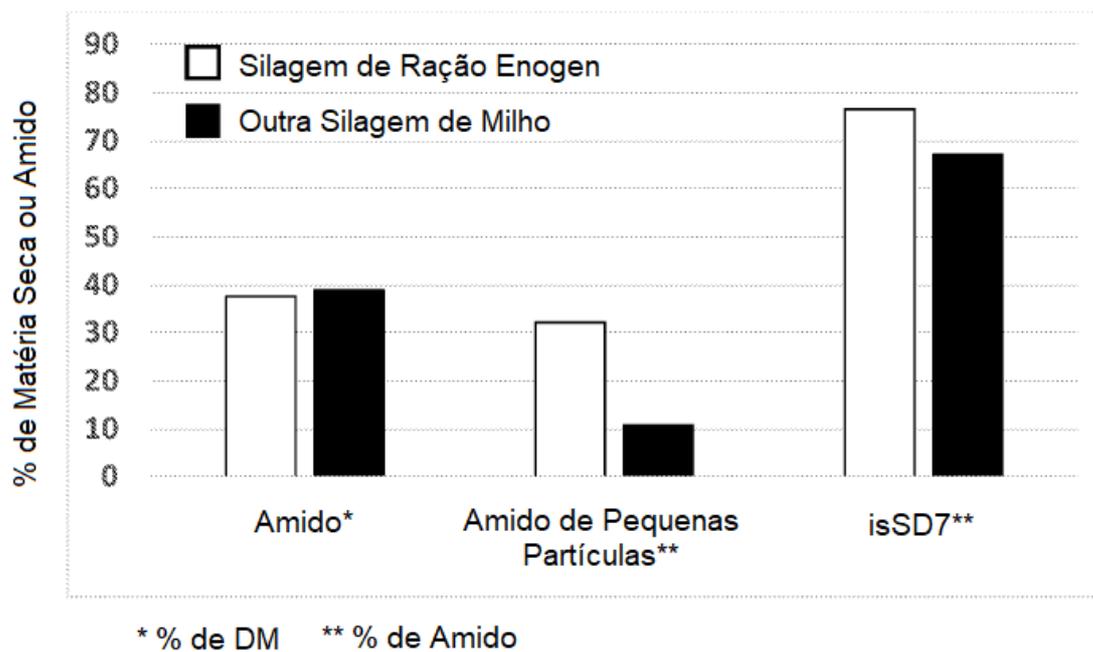
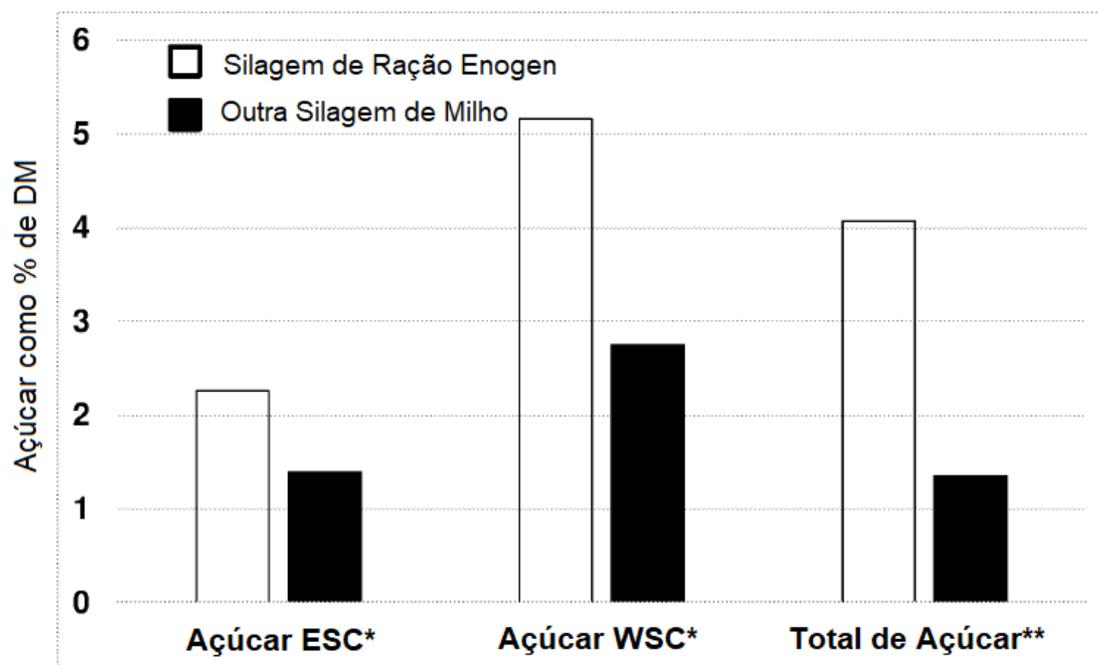
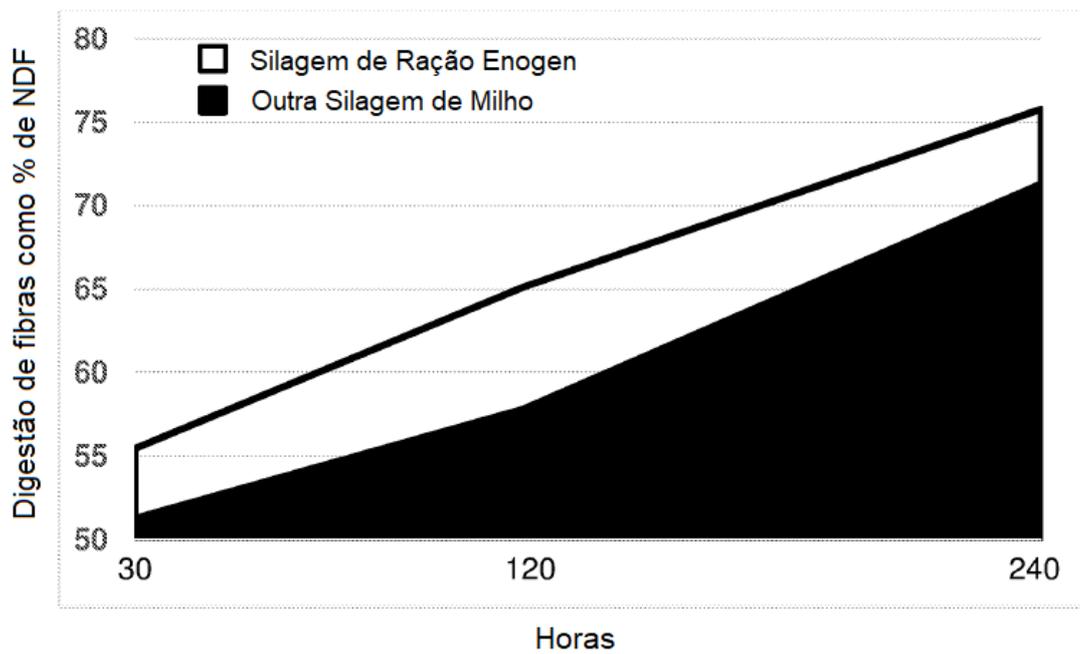


Figura 2



* Dados de NIR ** Dados de química analítica para glicose, frutose, sacarose, lactose e manitol combinados

Figura 3



RESUMO

COMPOSIÇÕES DE RAÇÃO ANIMAL E MÉTODOS DE USO MELHORADOS

A invenção fornece uma composição de ração animal que compreende α -amilase microbiana, por exemplo, uma composição de ração animal que compreende material vegetal transgênico que compreende uma α -amilase microbiana (*por exemplo, uma α -amilase microbiana termoestável*). A invenção fornece, ainda, métodos para aumentar o desempenho do animal e/ou a eficácia de utilização de ração por um animal (*por exemplo, para produção de leite ou carne*) que compreende alimentar o animal com uma composição de ração animal da presente invenção.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202000408 LIS.txt
- Data de Geração do Código: 08/04/2020
- Hora de Geração do Código: 13:26:48
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8B18C2386933D9DA
 - Campo 2: 1AFA177E2ECBB1C9