



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

(11) PI 0313288-9 B1

(22) Data do Depósito: 08/08/2003

(45) Data de Concessão: 11/09/2018



(54) Título: MÉTODOS PARA CRIAR AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE, PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RAÇÃO DE UMA RAÇÃO ANIMAL EM AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE E PARA AUMENTAR A CAPACIDADE DE DIGESTÃO DE UMA RAÇÃO ANIMAL EM AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE, E, RAÇÃO ANIMAL

(51) Int.Cl.: A23K 1/165; A23K 1/18

(30) Prioridade Unionista: 09/08/2002 US 60/402,228

(73) Titular(es): BIORESOURCE INTERNATIONAL, INC.. NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY

(72) Inventor(es): JASON C.H. SHIH

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/02/2005

“MÉTODOS PARA CRIAR AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE, PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RAÇÃO DE UMA RAÇÃO ANIMAL EM AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE E PARA AUMENTAR A CAPACIDADE DE DIGESTÃO DE UMA RAÇÃO ANIMAL EM AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE, E, RAÇÃO ANIMAL”

Referência cruzada aos Pedidos Relacionados

Este pedido reivindica os benefícios do Pedido Provisório U.S. Serial Nº 60/402.228 depositado em 9 de agosto de 2002, a divulgação do qual é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Declaração do Apoio Federal

A pesquisa direcionada a esta invenção é apoiada em parte pela Subvenção do US Department of Agriculture Small Business Innovation Research Nº 2002-33610-11850. O Governo tem certos direitos nesta invenção.

Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito aos métodos de melhorar o desempenho de crescimento de animais imaturos e em desenvolvimento que recebem ração animal e suplementos de ração animal para a obtenção do mesmo.

Fundamentos da Invenção

As dietas iniciadoras do frango a ser grelhado contêm uma quantidade considerável de proteína bruta. A maior parte da proteína bruta é obtida a partir de ingredientes de ração tradicionais tais como farinha de soja. Aproximadamente 90% da proteína bruta presente na farinha de soja (teor de 48% de proteína bruta) é altamente digerível para as aves domésticas (National Research Council (1994). Nutrient requirements of poultry. 9ª Ed. revisada National Academy Press, Washington, DC). Embora as dietas

iniciadoras de frango a ser grelhado de farinha de milho-soja tradicionais sejam consideradas altamente digeríveis, elas frequentemente contêm uma variedade de proteínas complexas que não são facilmente digeridas por um pintainho jovem devido à falta das enzimas inatas necessárias nos estágios iniciais da vida (Uni, *et al.* (1999) *Poultry Sci.* 78: 215 a 222). A inclusão de proteases nas dietas de frango a ser grelhado foi sugerida, mais muito do trabalho inicial com a adição de protease às dietas com base em grão de cereal não resulta em quaisquer melhoras no desempenho da ave (Jensen, *et al.* (1957) *Poultry Sci.* 36: 919 a 921).

10 Mais recentemente, a suplementação enzimática das dietas de aves domésticas com misturas de enzima, incluindo proteases e amilases, tem produzido algumas melhoras no desempenho de crescimento (Greenwood, *et al.* (2002) *Poultry Sci.* 81 (Suppl. 1): 25; Burrows, *et al.* (2002) *Poultry Sci.* 81 (Suppl. 1): 29; Short, *et al.* (2002) *Poultry Sci.* 81 (Suppl. 1): 136). O
15 suplemento de uma dieta iniciadora de frango a ser grelhado de milho-soja com uma preparação de enzima contendo uma mistura de xilanase, protease e amilase resultou em melhoras no peso corporal a 14 e 42 dias de idade sem nenhum efeito significativo na taxa de conversão da ração (Greenwood, *et al.* (2002) *supra*). Na suplementação das dietas de patos com base em milho-soja
20 com a mesma mistura enzimática, a suplementação enzimática resultou em melhoras no ganho de peso corporal e taxa de conversão da ração (Burrows, *et al.* (2002) *supra*).

A ração de aves domésticas contém ainda alguns compostos antinutricionais e/ou indigeríveis complexos. Alguns destes compostos, tais
25 como os polissacarídeos não amido, absorvem água em uma massa viscosa dentro da quimo da qual os nutrientes não são facilmente absorvidos (Odetallah, 2000; Odetallah, *et al.* (2002) *supra*). Conforme a viscosidade da quimo aumenta, a taxa de difusão de enzimas digestivas e nutrientes diminui, impedindo assim a absorção de nutriente pelo enterócito. A formação de

micela gordurosa e a absorção também diminuem conforme a viscosidade da quimo aumenta, prejudicando assim a absorção de muitos dos compostos solúveis em gordura, incluindo as vitaminas, pigmentos e lipídeos solúveis em gordura (Ferket e Veldkamp (1999) Em, Proceedings of the 1998 World Poultry Science Association, páginas 43 a 52). Portanto, a redução da viscosidade obtida pela atividade da enzima endolítica pode desempenhar um papel na melhora observada em pintainhos jovens alimentados com cereais com alta viscosidade e a eficácia relativa de várias enzimas parece estar relacionada com a sua capacidade de reduzir a viscosidade (Rotter, *et al.* (1990) J Sci. Food Agric. 50: 19 a 27).

A PWD-1 queratinase é uma enzima que foi originalmente purificada a partir do meio de cultivo de *Bacillus licheniformis* PWD-1 (Williams, *et al.* (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56: 1509 a 1515; Lin, *et al.* (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58: 3271 a 3275). A PWD-1 queratinase hidrolisa uma ampla faixa de substratos de proteína incluindo caseína, colágeno, elastina e queratina (Shih (2001) Em: Proceedings International Conference of Agricultural Science and Technology, Beijing, China, páginas 244 a 247). A PWD-1 queratinase foi usada para produzir farinha de penas hidrolisada incubando-se farinha de penas comercial com queratinase isenta de célula durante a noite (Carter (1998) Bacterial Keratinase: Assay development and nutritional application. Ph. D. Thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC). Ver também a Patente U.S. N^{os} 4.908.220, 5.186.961, e 5.063.161 concedida a Sbih *et al.*

A despeito do precedente, permanece uma necessidade quanto a métodos adicionais de realçar o desempenho de crescimento de frangos a serem grelhados e suplementos de ração animal que realizem o mesmo.

Sumário da Invenção

A presente invenção fornece métodos e composições que realçam o desempenho de crescimento de animais imaturos e em

desenvolvimento que recebem a ração animal.

Um aspecto da invenção diz respeito a um método de desenvolver aves domésticas para o abate que compreende alimentar as aves domésticas para o abate com uma ração de farinha de milho-soja como uma
5 dieta de aves domésticas em que a ração ainda compreende queratinase em uma quantidade eficaz para realçar o ganho de peso de aves domésticas para o abate.

Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método de desenvolver aves domésticas para o abate que compreende alimentar as aves
10 domésticas para o abate com uma ração de farinha de milho-soja como uma dieta iniciadora em que a ração ainda compreende queratinase em uma quantidade eficaz para realçar o ganho de peso das aves domésticas para o abate.

Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método de
15 melhorar a eficiência de utilização da ração de uma ração animal em aves domésticas para o abate que compreende alimentar as aves domésticas para o abate com uma ração de farinha de milho-soja como um dieta de aves domésticas em que a ração ainda compreende queratinase em uma quantidade
20 eficaz para melhorar a eficiência de utilização da ração de uma ração animal em aves domésticas para o abate.

Um aspecto adicional da presente invenção diz respeito a um método de aumentar a digeribilidade de uma ração animal em aves domésticas para o abate que compreende alimentar as aves domésticas para o
abate com uma ração de farinha de milho-soja como um dieta de aves
25 domésticas em que a ração ainda compreende queratinase em uma quantidade eficaz para aumentar a digeribilidade de uma ração animal em aves domésticas para o abate.

Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método de reduzir a mortalidade em aves domésticas para o abate que compreende

alimentar as aves domésticas para o abate com uma ração de farinha de milho-soja como uma dieta iniciadora em que a ração ainda compreende queratinase em uma quantidade eficaz para reduzir a mortalidade de aves domésticas para o abate.

5 Um outro aspecto da invenção diz respeito a uma ração animal que consiste essencialmente de queratinase, proteína e carboidrato.

Um aspecto adicional da invenção diz respeito a um método de produzir extrato de enzima queratinase bruta.

10 A presente invenção ainda diz respeito a melhorar a situação nutricional de um animal recentemente chocado e deste modo aumentar a resistência às doenças e a sobrevivência da ave imatura para se obter um nível maior de desempenho de crescimento de aves domésticas para o abate.

Descrição Detalhada da Invenção

15 O precedente e outros aspectos da presente invenção serão agora descritos em mais detalhes com respeito a outras formas de realização aqui descritas. Deve ser avaliado que a invenção pode ser abrangida em formas diferentes e não deve ser interpretada como limitada às formas de realização aqui apresentadas. Ao invés, estas formas de realização são fornecidas de modo que esta divulgação será perfeita e completa e transmitirá
20 completamente o escopo da invenção àqueles habilitados na técnica.

A terminologia usada na descrição da invenção aqui é apenas com o propósito de descrever formas de realização particulares e não é intencionada a ser limitante da invenção. Como usado na descrição da invenção e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e
25 “o”, “a” são intencionadas a incluir também as formas plurais, a menos que o contexto claramente indique de outro modo.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados como habitualmente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual esta

invenção pertence.

Todas as publicações, Pedidos de Patente U.S., Patentes U.S. e outras referências aqui citadas são incorporadas por referência em suas totalidades.

5 Como aqui usado, o termo “aves domésticas para o abate” refere-se a qualquer espécie aviária que seja produzida ou usada para o consumo de carne como entendido por uma pessoa habilitada na técnica. Os exemplos de tal espécie aviária incluem, mas não são limitados a, galinhas, perus, patos, ganso, codorniz, faisão, ratitas e outras.

10 Como aqui usado, o termo “ave imatura” refere-se a um membro da espécie aviária que carece de crescimento, diferenciação ou desenvolvimento completos. Tais membros podem ter a capacidade potencial para atingir uma forma ou estado maduro definitivo. Uma ave imatura pode ser de cerca de 1 a cerca de 50 dias de idade, preferivelmente de cerca de 1 a
15 cerca de 21 dias de idade e mais preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 5 dias de idade ou pode ter um peso corporal comparável à aves dentro destas faixas.

20 Como aqui usado, o termo “ave em desenvolvimento” refere-se a um membro da espécie aviária que é mais velha ou pesa mais do que uma ave imatura.

 Como aqui usado, o termo “ave madura” refere-se a um membro da espécie aviária que é mais velha ou pesa mais do que uma ave em desenvolvimento.

25 Como aqui usado, o termo “frango a ser grelhado” refere-se a qualquer galinha imatura produzida ou eventualmente usada para o consumo de carne.

 Como aqui usado, o termo “dieta de aves domésticas” refere-se a uma dieta que pode ser administrada a um membro da espécie aviária para promover e manter o crescimento da ave. Uma dieta de aves domésticas

pode conter fontes de proteína, vitaminas, minerais, energia tal como gordura, carboidratos e proteína, antibióticos e outras substâncias ou compostos adicionais conhecidos por serem incluídos em rações de animais, em particular, rações de aves domésticas. A dieta de aves domésticas é inclusiva de, mas não limitada a, uma dieta iniciadora, uma dieta do tipo de engorda e uma dieta do tipo finalizadora. Uma “dieta iniciadora” refere-se a uma dieta que pode ser administrada a um animal começando do nascimento ou choco até que uma idade e/ou peso desejados sejam obtidos. Um “dieta do tipo de engorda” refere-se a uma dieta que pode ser administrada a um animal na conclusão da fase iniciadora de crescimento. Uma “dieta do tipo finalizadora” refere-se a uma dieta que pode ser administrada a um animal durante o período de desenvolvimento até o tempo de abate.

Como aqui usado, os termos “crescimento” ou “desempenho de crescimento” referem-se ao aumento em cada um ou em ambos, peso e tamanho (por exemplo, altura, largura, diâmetro, circunferência, etc.) além daquele que de outro modo ocorreria sem a implementação dos métodos e/ou administração das composições da presente invenção. Crescimento pode referir-se a um aumento na massa (por exemplo, peso ou tamanho) do animal inteiro ou de um tecido particular (por exemplo, tecido muscular no geral ou um músculo específico). Alternativamente, o crescimento pode indicar um aumento relativo na massa de um tecido em relação a um outro, em particular, um aumento no tecido muscular em relação a outros tecidos (por exemplo, tecido adiposo). O crescimento ainda diz respeito à situação nutricional e resistência às doenças em que a melhora da situação nutricional e/ou o aumento na resistência às doenças também é indicativo de desempenho de crescimento melhorado.

Em vista do precedente, as formas de realização de acordo com a presente invenção dizem respeito aos métodos de desenvolver aves domésticas para o abate, que compreende alimentar as aves domésticas para o

abate com uma dieta de aves domésticas de ração animal em que a ração ainda compreende queratinase e é adicionada à dieta de aves domésticas em uma quantidade eficaz para realçar o ganho de peso da aves domésticas para o abate. A dieta de aves domésticas pode ser uma ração animal que inclui fontes de proteína, por exemplo, farinha de soja, farinha de peixe, farinha de sangue, sub-produto de aves domésticas (partes não aproveitadas de aves domésticas moídas), farinha de carne, farinha de trigo, semente de colza, canola e combinações dos mesmos. A ração animal ainda inclui carboidratos, por exemplo, milho, aveia, cevada, sorgo ou combinações dos mesmos que podem ser moídos em uma farinha para o uso na ração animal. Adicionalmente, a ração animal pode incluir vitaminas, minerais, gordura, antibióticos e outras substâncias ou compostos como necessário ou desejado. Os exemplos não limitantes de dietas de aves domésticas de ração animal incluem rações com base em cereal incluindo cereais tais como cevada, milho, soja, trigo, triticale e centeio. Milho-soja, trigo-soja e trigo-milho-soja, sorgo-soja e milho-sorgo-soja representa outros exemplos não limitantes de rações animais adequadas de acordo com a presente invenção. Quando a dieta de aves domésticas é uma ração de farinha de milho-soja, a ração de farinha de milho-soja compreende de cerca de 60 a cerca de 70% de milho em peso e de cerca de 20 a cerca de 30% de soja em peso.

A dieta de aves domésticas pode ser ainda categorizada como uma dieta iniciadora, um dieta do tipo de engorda ou uma dieta do tipo finalizadora. A composição precisa e as características físicas da ração animal e assim da dieta de aves domésticas, dependerão da espécie para a qual a ração é pretendida, da idade e/ou peso do animal e da duração da alimentação e pode ser facilmente determinada por aqueles de habilidade na técnica.

De acordo com as formas de realização da presente invenção, os métodos de desenvolver aves domésticas para o abate não requerem fornecer concorrentemente um substrato contendo queratina específico junto

com a queratinase. Por exemplo, nas formas de realização da presente invenção, a queratinase pode suplementar diretamente uma dieta de aves domésticas como um aditivo de ração ao contrário de produzir uma farinha de penas hidrolisada como descrito em Carter, 1998. Assim, a ração animal pode ser essencialmente livre de queratina (por exemplo, não mais do que 1 ou 2% em peso de queratina).

Uma queratinase adequada para praticar a presente invenção é obtida da cepa PWD-1 de *Bacillus licheniformis*, que é descrita nas Patentes U.S. N^{os} 4.908.220 e 4.959.311 (as divulgações de todas as referências de patente aqui citadas devem ser aqui incorporadas por referência). Esta bactéria foi depositada com a American Type Culture Collection (ATCC) em Rockville, MD, USA de acordo com o Tratado de Budapest em 23 de março de 1988 e designado o Acesso ATCC N^o 53757. Outras queratinases que podem ser usada para praticar a presente invenção estão disponíveis de uma variedade de fontes bacterianas, tais como *Streptomyces fradiae*. Ver no geral a Patente U.S. N^o 2.988.487 concedida a Nickerson; Ver também Goktan, D., "Decomposition Rates of Keratinous Material Used by Certain Microorganisms," (Abstract N^o 207369b), *Microbial Biochem.* 101, 333 (1984); Daniels, G., "The Digestion of Human Hair Queratina by *Microsporum Canis*," *J. Gen. Microbiol.* 8, 289 (1953); Koh, W. *et al.*, "Keratinolytic, Enzymes from *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*," *Bacillus. Aust. J. Biol. Sci.* 2774 (1959); Molyneaux, G. S., "The Digestion of Wool by a Keratinolytic *Bacillus*," *Aust J. Biol. Sci.* 274 (1959); Noval, J. e Nickerson, W., "Decomposition of Native Keratin by *Streptomyces Fradiae*," *J. Bacteriol.* 77, 251 (1959); Kapica, L. e Blank F., "Growth of *Candida Parapsilosis* with Keratin as Sole Source of Nitrogen," *Dermatologica.* 117, 433 (1958); Kapica, L. e Blank, F., "Growth of *Albicans*; on Keratin as Sole Source of Nitrogen," *Dermatologica* 115, 81 (1957).

A queratinase para praticar a presente invenção pode ser obtida

desenvolvendo-se uma célula hospedeira que contenha seqüências de ácido nucleico que codificam uma queratinase, sob condições que permitam a expressão da queratinase codificada, filtrando o meio para remover as células e coletar e concentrar o sobrenadante remanescente pela ultrafiltração para se obter a queratinase. Co-fator(es) beneficiários também podem ser obtidos.

Embora as cepas de *B. licheniformis* sejam aqui exemplificadas, é considerado que outros micróbios eucarióticos e procarióticos contendo seqüências de ácido nucleico que codificam uma queratinase também podem ser úteis na produção de um suplemento de ração animal da presente invenção. Os micróbios eucarióticos e procarióticos contendo seqüências de ácido nucleico que codificam uma queratinase podem incluir aquelas que naturalmente produzem a enzima assim como cepas geneticamente modificadas para expressar a queratinase. No geral, a produção recombinante de uma proteína pode requerer a incorporação de seqüências de ácido nucleico que codificam a dita proteína em um vetor de expressão recombinante em uma forma adequada para a expressão da proteína em uma célula hospedeira. Uma forma adequada para a expressão fornece que o vetor de expressão recombinante inclui uma ou mais seqüências reguladoras operavelmente ligadas aos ácidos nucleicos que codificam a proteína de queratinase em uma maneira que permita a transcrição dos ácidos nucleicos em mRNA e a tradução do mRNA na proteína. As seqüências reguladoras podem incluir promotores, realçadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação). Tais seqüências reguladoras são conhecidas por aqueles habilitados na técnica e são descritas em Goeddel D. D., ed., Gene Expression Technology, Academic Press, San Diego, CA (1991). Deve ser entendido que o planejamento do vetor de expressão pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transfectada e/ou o nível de expressão requerida. As seqüências de ácido nucleico ou vetores de expressão que abrigam as seqüências de ácido nucleico

que codificam uma proteína de queratinase podem ser introduzidos em uma célula hospedeira, que pode ser de origem eucariótica ou procariótica, por técnicas padrão para transformar células. Os métodos adequados para transformar células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook, *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000)) e outros manuais de laboratório. O número de células hospedeiras transformadas com uma seqüência de ácido nucleico que codifica uma proteína de queratinase dependerá, pelo menos em parte, do tipo de vetor de expressão recombinante usado e do tipo de técnica de transformação usada. Ácidos nucleicos podem ser introduzidos em uma célula hospedeira transitória, ou mais tipicamente, para a expressão de longa duração de uma proteína de queratinase a seqüência de ácido nucleico é estavelmente integrada no genoma da célula hospedeira ou permanece como um epissoma estável na célula hospedeira. Uma vez produzida, uma proteína de queratinase pode ser recuperada do meio de cultura como um polipeptídeo secretado, embora ela também possa ser recuperada de lisados da célula hospedeira quando diretamente expressada sem um sinal secretor.

Os micróbios eucarióticos tais como as culturas de levedura podem ser transformadas com vetores que carregam seqüências de ácido nucleico que codificam uma queratinase. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.745.057. *Saccharomyces cerevisiae* é o mais comumente usado entre os microorganismos hospedeiros eucarióticos inferiores, embora um número de outras cepas sejam comumente disponíveis. Os vetores de levedura podem conter uma origem de replicação do plasmídeo de levedura de 2 micron ou uma seqüência que replica autonomamente (ARS), um promotor, DNA que codifica uma queratinase tal como aquele fornecido na Patente U.S. Nº 5.712.147, as seqüências para a poliadenilação e terminação de transcrição e um gene de seleção. Um plasmídeo exemplar é YRp7, (Stinchcomb, *et al.* (1979) Nature 182: 39; Kingsman, *et al.* (1979) Gene 7: 141; Tschemper, *et*

al. (1980) *Gene* 10: 157). As seqüências promotoras adequadas em vetores de levedura incluem os promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinase (Hitzeman, *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 2073) ou outras enzimas glicolíticas (Hess, *et al.* (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149; Holland, *et al.* (1978) *Biochemistry* 17: 4900). Os vetores e promotores adequados para o uso na expressão de levedura são ainda descritos na Publicação EPO Nº 73.657. Além disso, as cepas fúngicas tais como de *Trichoderma* (por exemplo, *T longibrachiatum*, *T reesei* ou *T viride*) são particularmente úteis na expressão de enzimas secretadas.

10 As célula hospedeiras procariotas que podem ser usadas para produzir uma queratinase incluem organismos gram negativa ou gram positiva, por exemplo *Escherichia coli* (*E. coli*) ou *Bacilli*. As célula hospedeiras exemplares são *E. coli* W3110 (ATCC 27.325), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), *E. coli* 294 (ATCC 31.446). Uma variedade ampla de vetores procarióticos e microbianos adequados são disponíveis. *E. coli* é tipicamente transformada usando pBR322.

15 Os promotores mais comumente usados nos vetores de expressão microbianos recombinantes incluem a beta-lactamase (penicilinase) e sistemas promotores da lactose (Chang, *et al.* (1978) *Nature* 275: 615; Goeddel, *et al.* (1979) *Nature* 281: 544), um sistema promotor do triptofano (*trp*) (Goeddel, *et al.* (1980) *Nucleic Acids Res.* 8: 4057; Publicação EPO Nº 36, 776) e p promotor *tac* (De Boer, *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21). O promotor e a seqüência de Shine-Delgamo (para a expressão de hospedeiros procarióticos) são operavelmente ligados ao DNA que codifica a queratinase, isto é, eles são posicionados de modo a promover a transcrição do RNA mensageiro da queratinase a partir do DNA. Uma espécie de *Bacillus* é preferivelmente usada na produção de uma queratinase. Os vetores de expressão recombinantes para *Bacillus* são bem conhecidos por aqueles de habilidade na técnica. As cepas de *Bacillus* podem

ser *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. lautus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*. Em uma forma de realização preferida, as cepas de *B. licheniformis* são utilizadas. Em 5 algumas formas de realização, as cepas T399D ou PWD-1 de *B. licheniformis* são utilizadas.

Como aqui fornecido, uma enzima queratinase pode ser produzida cultivando-se uma célula hospedeira como descrito acima sob condições que permitam a expressão da queratinase codificada e coletar a 10 queratinase expressada. A célula hospedeira pode ser cultivada sob condições em que a célula se desenvolve e depois cultivada sob condições que causem a expressão da queratinase codificada ou as células pode ser motivadas a se desenvolver e expressar a queratinase codificada ao mesmo tempo. Tais condições são bem conhecidas por uma pessoa de habilidade na técnica e 15 podem variar com a célula hospedeira e a quantidade de nível de expressão de enzima desejado.

Em algumas formas de realização, o meio usado para cultivar as célula hospedeiras transformadas pode ser qualquer meio adequado para a produção de queratinase. A queratinase é recuperada do meio pelas técnicas 20 convencionais incluindo a separação das células do meio pela centrifugação ou filtração e concentração das proteínas no sobrenadante ou filtrado pela ultrafiltração ou evaporação seguida pela secagem por intermédio de liofilização ou secagem por pulverização.

Alternativamente, o sobrenadante da cultura pode ser secado 25 por pulverização ou Liofilizado depois da separação sem ser concentrado.

A queratinase deve estar presente em uma quantidade pelo menos suficiente para se obter o efeito pretendido, mas o limite superior para a quantidade de queratinase pode ser determinado com base na obtenção do efeito pretendido. Em algumas formas de realização, a ração animal

compreende de cerca de 0,01% a cerca de 20% de queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 em peso. Adicionalmente, as queratinases usadas na prática da presente invenção pode estar na forma bruta ou na forma pura. As queratinases na forma bruta pode ser preparada, por exemplo, pela separação das células bacterianas que produzem a queratinase a partir do seu meio de crescimento líquido, o meio de crescimento líquido compreendendo a queratinase bruta. Alternativamente, as células podem ser lisadas (química ou fisicamente) em um meio de crescimento líquido para produzir um extrato isento de célula bruto. Outros meios de preparar um tal extrato estará evidente às pessoas habilitadas na técnica. A queratinase bruta pode ser incluída na ração em qualquer forma compatível com ela, tal como em uma forma aquosa ou na forma liofilizada. Em algumas formas de realização, a queratinase bruta está na forma liofilizada.

As queratinases puras (ou substancialmente puras) podem ser obtidas pela separação da queratinase bruta descrita acima nos seus constituintes individuais, de acordo com técnicas conhecidas. Ver no geral W. Jakoby, Ed., *Enzyme purification and Related Techniques, Methods in Enzymology*, vol. 22 (1971) e vol. 104, pt C (1984), Academic Press, NY. Numerosos procedimentos de separação adequados, tais como a cromatografia em coluna, são conhecidos pelas pessoas habilitadas na técnica. As proteínas constituintes individuais podem ser triadas quanto a sua capacidade para degradar o material queratináceo e aquele constituinte que melhor degrada o material queratináceo compreende a queratinase. Igual à queratinase bruta, a queratinase pura pode ser utilizada em qualquer forma adequada, incluindo a forma aquosa e a forma liofilizada.

As formas de realização da presente invenção ainda dizem respeito aos métodos de melhorar a eficiência de utilização da ração de uma ração animal em aves domésticas para o abate que compreendem alimentar as aves domésticas para o abate com uma dieta de aves domésticas de ração

animal em que a ração ainda compreende queratinase em uma quantidade eficaz para melhorar a eficiência de utilização da ração de uma ração animal fornecida às aves domésticas para o abate. A ração animal pode incluir as rações de animal como descritas acima e, em formas de realização
5 particulares pode ser farinha de milho-soja. A queratinase pode incluir queratinases como descritas acima incluindo, mas não limitada à queratinase do *Bacillus licheniformis* PWD-1. Como descrito acima, a queratinase pode ser um extrato bruto ou a enzima na forma pura.

10 Melhorar a eficiência de utilização da ração refere-se a uma redução na Taxa de Conversão da Ração (FCR) quando comparada com aquela que de outro modo poderia ocorrer sem a implementação dos métodos e/ou a administração das composições da presente invenção. A FCR é a relação da quantidade de ração consumida relativa ao ganho de peso de um animal. Em uma forma de realização da presente invenção, a eficiência
15 melhorada de utilização da ração pode ocorrer aumentando-se a absorção de nutriente gastrointestinal sem um aumento concomitante no gasto de energia intestinal. Em uma outra forma de realização da presente invenção, a eficiência melhorada de utilização da ração pode ocorrer aumentando-se a digestibilidade da ração animal. Em uma outra forma de realização da presente invenção, a eficiência melhorada de utilização da ração pode ocorrer diminuindo-se a viscosidade da ração animal. Em formas de realização
20 particulares, a presente invenção diz respeito aos métodos de aumentar a digestibilidade de uma ração animal em uma ave doméstica para o abate que compreende alimentar as aves domésticas para o abate com uma dieta de aves domésticas de ração animal em que a ração ainda compreende a queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 em uma quantidade eficaz para aumentar a digestibilidade de uma ração animal em aves domésticas para o abate. A ração animal pode incluir as rações de animal como descrito acima e, em formas de realização particulares, pode ser farinha de milho-soja. A queratinase pode
25

incluir queratinases como descritas acima incluindo, mas não limitadas à queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1. Como descrito acima, a queratinase pode ser um extrato bruto ou a enzima na forma pura. Aumentar a digestibilidade de uma ração animal refere-se a aumentar a disponibilidade de nutrientes absorvidos a partir do intestino do animal sem um aumento concorrente na entrada de ração ou ingestão de nutriente. Em algumas formas de realização da presente invenção, a viscosidade de materiais presentes no intestino do animal ou viscosidade do digerido é reduzida. Em outras formas de realização, o aprisionamento de nutrientes tornando-os nutricionalmente indisponíveis ao animal é reduzido.

Em outras formas de realização, a presente invenção diz respeito aos métodos de reduzir a mortalidade em aves domésticas para o abate que compreende alimentar as aves domésticas para o abate com uma dieta de aves domésticas de ração animal em que a ração ainda compreende uma queratinase em uma quantidade eficaz para reduzir a mortalidade de aves domésticas para o abate, por exemplo aves imaturas e mais especificamente, frangos a serem grelhados. A ração animal pode incluir as rações de animal como descritas acima e, em formas de realização particulares, pode ser farinha de milho-soja. A queratinase pode incluir queratinases como descritas acima incluindo, mas não limitada à queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1. Como descrito acima, a queratinase pode ser um extrato bruto ou enzima na forma pura. Reduzir a mortalidade refere-se a aumentar a sobrevivência ou diminuir a taxa de morte em animais depois do nascimento ou choco quando comparadas com aquela que de outro modo poderia ocorrer na ausência de implementação dos métodos e/ou administração das composições da presente invenção. A mortalidade pode ser de qualquer causa, em particular, estresse, impedimento do crescimento, “starveouts” e doença. Em algumas formas de realização, a presente invenção reduz a mortalidade em aves imaturas. Em outras formas de realização, as aves são de 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, 31, 32, 33, 34 ou 35 dias de idade, preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 21 dias de idade e mais preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 5 dias de idade.

5 Em algumas formas de realização, a presente invenção diz respeito a uma ração animal que compreenda proteína, carboidrato e queratinase como os componentes principais. A queratinase é um componente principal que suplementa a ração animal. A ração animal pode incluir as rações de animal como descritas acima e, em formas de realização
10 particulares, pode ser farinha de milho-soja. A queratinase pode incluir queratinases como descritas acima incluindo, mas não limitada à queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1. Como descrito acima, a queratinase pode ser um extrato bruto ou a enzima na forma pura.

 O suplemento de ração animal fornecido pela presente
15 invenção pode ser misturado diretamente com a ração animal, tal como uma que compreenda cevada, para preparar a ração final. Alternativamente, o suplemento de ração animal pode ser misturado com um ou mais outros suplementos de ração animal tais como um suplemento de ração animal de
20 vitamina, um suplemento de ração animal mineral e um suplemento de ração animal de aminoácido. O suplemento de ração animal resultante incluindo diversos tipos diferentes de componentes pode ser depois misturado em uma quantidade apropriada com a ração animal.

 A ração animal da presente invenção compreende queratinase em uma quantidade pelo menos suficiente para se obter o efeito pretendido,
25 em que o limite superior para a quantidade de queratinase pode ser determinado com base na obtenção do efeito pretendido. Os efeitos pretendidos incluem, mas não são limitados a realçar o desempenho de crescimento do animal, tal como o ganho de peso, melhorar a eficiência de utilização da ração, aumentar a digestibilidade da ração e diminuir a

mortalidade. O suplemento de ração animal adicionado à ração animal pode compreender até 100% de queratinase em peso. A ração animal que compreende o suplemento compreende de cerca de 5% a cerca de 25% de queratinase em peso. Em algumas formas de realização, a queratinase é a queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1.

Qualquer animal é um paciente adequado para a presente invenção, incluindo vacas, ovelhas, porcos, gatos, cães, furões e aviários, entretanto, a presente invenção é preferivelmente utilizada com animais monogástricos. Os pacientes adequados podem ser de qualquer faixa de idade incluindo animais neonatais, animais em desenvolvimento e animais maduros. Em algumas formas de realização, o paciente adequado pode ser um aviário, preferivelmente uma galinha e mais preferivelmente um frango a ser grelhado. Em outras formas de realização o paciente adequado pode ser uma galinha. Ainda em outras formas de realização, o paciente adequado pode ser uma ave imatura, em desenvolvimento ou madura. Em outras formas de realização, o paciente adequado pode ser uma galinha que tenha 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, 18, 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 ou 65 dias de idade ou dentro de qualquer faixa destes números. Assim, a presente invenção fornece uma variedade de rações diferentes, incluindo ração de animal de estimação, ração de aves domésticas e ração de porco.

O suplemento de ração animal da presente invenção também pode permitir que uma ração animal convencional seja modificada pela redução de seu teor de energia, e/ou proteína, e/ou aminoácido enquanto simultaneamente mantém os mesmos níveis nutricionais de energia, proteína e aminoácidos disponíveis para o animal. Conseqüentemente, as quantidades de suplementos de energia e proteína caros tipicamente incluídos em uma ração animal podem ser reduzidas quando comparadas com as rações

convencionais.

Os seguintes Exemplos são fornecidos para ilustrar a presente invenção e não devem ser interpretados como limitantes da mesma.

EXEMPLO 1

5 Produção de Queratinase a Partir da Cepa PWD-1 de *B. licheniformis* Recombinante

Uma estratégia de aumento de fermentação foi planejada para a produção de queratinase, usando a cepa PWD-1 de *B. licheniformis* do tipo selvagem.

10 Cultura em Frasco em Meio LB. A cultura em frasco foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) que foi preparada de acordo com a especificação do fabricante, contendo: 1,0 litro de água destilada, 15 g de ágar BACTO[®], 10 g de NaCl, 10 g de triptona BACTO[®] e 5,0 g de extrato de levedura. A cepa PWD-1 de *B. licheniformis* foi riscada de um estoque em glicerol em uma placa de LB e cultivada a 50° C durante 8 a 12 horas. uma única colônia da cepa PWD-1 de *B. licheniformis* foi depois transferida da placa de LB em um frasco que continha 500 ml de meio LB e cultivada a 50° C durante 6 horas.

20 culturas de Semente. As culturas de semente para a cepa PWD-1 de *B. licheniformis* foram conduzidas em um meio contendo: 0,7 g/litro de KH₂PO₄, 1,4 g/litro de K₂HPO₄, 0,1 g/litro de MgSO₄•7H₂O, 10 g/litro de farinha de soja desengordurada e 0,1 g/litro de agente antiespumante. o pH inicial da cultura de semente foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl ou NaOH 1 M.

25 A cultura em frasco de 500 ml foi transferida em um primeiro estágio de fermentador de semente de cerca de 10 litros a 20 litros que conteve o meio cultura de semente e foi cultivada neste lugar a 50° C durante 8 a 12 horas para atingir 2,5% a 5% do tamanho do inóculo. A cultura de semente do primeiro estágio foi depois transferido para um segundo estágio

de fermentador de semente de 100 litros, 250 litros ou 800 litros e foi cultivado neste lugar a 50°C durante 8 horas e depois mudado para 37° C.

Para a cultura de semente, a densidade de célula atingiu pelo menos 3 X 10⁸ CFU/ml a cerca de 8 ou 10 horas do processo de cultura.

5 Meios de Produção. O meio de cultura de produção usado para a cepa PWD-1 de *B. licheniformis* conteve 0,7 g/litro de KH₂PO₄, 1,4 g/litro de K₂HPO₄, 0,1 g/litro de MgSO₄•7H₂O, 10 g/litro de farinha de soja desengordurada e 0,1 g/litro de agente antiespumante o pH inicial da cultura de produção foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl ou NaOH 1 M.

10 A cultura de semente do segundo estágio foi transferido a um fermentador de produção que conteve o meio de cultura de produção para a cultura de estágio final. A cultura de estágio final foi realizada a 50° C durante 8 horas, atingindo um tempo de cultura total de cerca de 24 a 30 horas antes da colheita.

15 Durante as etapas de cultura acima, o pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 7,0, mas nenhum controle de pH durante o processo de cultura foi fornecido. O nível ótimo de oxigênio dissolvido foi de cerca de 20% para a cepa PWD-1 *B. licheniformis*. O tamanho do inóculo foi de cerca de 2,5 a 5% e a idade do inóculo foi de cerca de 8 a 12 horas.

20 Para a cultura de produção, a densidade de célula de pico atingiu 1,2 X 10⁹ CFU/ml a cerca de 20 ou 24 horas do processo de cultura. A atividade de enzima de pico, como medido pelo ensaio de azocaseína, atingiu 35 a 40 A₄₅₀ por ml a cerca de 24 a 30 horas do processo de cultura. O valor de pH do meio de cultura de produção mudou de 7,0 a 8,3, mas a atividade da

25 enzima e a produtividade permaneceram em níveis altos, o que indicou que nenhum controle de pH foi necessário.

Recuperação e Processamento a Jusante. A atividade enzimática na cultura de produção foi checada antes da colheita. O sobrenadante de cultura foi separado da massa celular por intermédio de

centrífuga e depois concentrado por intermédio de ultrafiltração ou evaporação. a enzima líquida concentrada foi depois secada por pulverização,

Alternativamente, o sobrenadante de cultura foi diretamente secado por pulverização depois da separação da massa celular, sem ser
5 concentrado.

Rendimento Enzimático e Atividade enzimática. Para 100 litros de cultura de produção, a atividade enzimática medida pelo ensaio de azocaseína antes da colheita foi de 3.000 a 3.500 U/ml e o número de célula foi de $1,3 \times 10^9$ CFU/ml. O peso seco total da cultura de produção de 100
10 litros foi de 9,12 g/litro, incluindo 15 g/litro de peso seco insolúvel e 6,88 g/litro peso seco solúvel.

O rendimento da enzima bruta foi de cerca de 1,75 a 2,0 g/litro. a enzima bruta foi preparada pela concentração do sobrenadante de fermentação por intermédio de filtração Pellicon com um corte de peso
15 molecular de 5 kDa e depois seco por congelamento. A atividade enzimática da enzima seca bruta foi de cerca de 1.000.000 a cerca de 1.400.000 U/g, como medido pelo ensaio de azocaseína. O teor de proteína total da enzima seca bruta foi de cerca de 30 a 36%, dos quais aproximadamente 14 a 20% consistiram de queratinase pura.

20

EXEMPLO 2

Produção de Queratinase a Partir da Cepa T399D de *B. licheniformis* Recombinante

Uma estratégia de aumento de fermentação foi planejada para a produção de queratinase, usando uma cepa T399D de *Bacillus licheniformis* recombinante (daqui em diante a “cepa T1 de *Bacillus licheniformis*”).
25

Cultura em Frasco em Meio LB. A cultura em frasco foi realizada em meio LB que foi preparado de acordo com a especificação do fabricante, contendo: 1,0 litro de água destilada, 15 g de ágar BACTO[®], 10 g de NaCl, 10 g de triptona BACTO[®] e 5,0 g de extrato de levedura. A cepa T1

de *Bacillus licheniformis* foi riscada a partir de um estoque em glicerol em placas de LB e cultivada a 37° C durante 18 horas. Uma única colônia da cepa T1 de *Bacillus licheniformis* foi depois transferida da placa de LB em um frasco que conteve 500 ml de meio LB e cultivada a 37° C durante 6 horas. O crescimento celular foi monitorado medindo-se a densidade ótica a 660 nm (Beckman DU Series 660 Spectrophotometer, Fullerton, CA). Depois de 6 horas de crescimento, a OD₆₆₀ foi medida acima de 1,0.

10 Culturas de Semente. As culturas de semente para a cepa T1 de *Bacillus licheniformis* foram cultivadas em um meio contendo: 0,7 g/litro de KH₂PO₄, 1,4 g/litro K₂HPO₄, 0,1 g/litro de MgSO₄•7H₂O, 10 g/litro de farinha de soja desengordurada e 0,1 g/litro de agente antiespumante. O pH inicial da cultura de semente foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl ou NaOH 1 M.

15 A cultura em frasco de 500 ml foi transferida em um primeiro estágio de fermentador de semente de cerca de 10 litros a 20 litros que conteve o meio de cultura de semente e foi cultivada neste lugar a 37° C durante 8 horas para atingir 2,5% a 5% de tamanho de inóculo. A cultura de semente do primeiro estágio foi depois transferida para um segundo estágio de fermentador de semente de 100 litros, 250 litros ou 800 litros e foi cultivada neste lugar a 37° C durante 8 horas.

20 Meio de Produção. O meio de cultura de produção usado para a cepa T1 de *Bacillus licheniformis* conteve 0,7 g/litro de KH₂PO₄, 1,4 g/litro de K₂HPO₄, 0,1 g/litro de MgSO₄.7H₂O, 13 g/litro de farinha de soja desengordurada, 40 g/litro de amido, 13 g/litro de farinha de penas e 0,1 g/litro de agente antiespumante. O pH inicial da cultura de produção foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl ou NaOH 1 M.

A cultura de semente do segundo estágio foi transferida para um fermentador de produção que conteve o meio de cultura de produção para a cultura de estágio final. A cultura de estágio final foi realizada a 37° C

durante 48 horas antes da colheita.

5 Durante as etapas de cultura acima, o pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 7,0, mas nenhum controle de pH foi fornecido. O nível ótimo de oxigênio dissolvido foi de cerca de 30% para a cepa T1 de *Bacillus licheniformis*. O tamanho do inóculo foi de cerca de 2,5 a 5% e a idade do inóculo foi de cerca de 12 horas.

10 Recuperação e Processamento a Jusante. A atividade enzimática na cultura de produção foi checada antes da colheita. O sobrenadante de cultura foi separado da massa celular por intermédio de centrifugação, e depois concentrado por intermédio de ultrafiltração ou evaporação. A enzima líquida concentrada foi depois secada por pulverização.

Alternativamente, o sobrenadante de cultura foi diretamente secado por pulverização depois da separação da massa celular, sem ser concentrado.

15 Rendimento Enzimático e Atividade Enzimática. Para 100 litros de cultura de produção, a atividade enzimática medida pelo ensaio de azocaseína antes da colheita foi de 30.000 a 35.000 U/ml e o número de célula foi 6×10^9 CFU/ml. O peso seco total da cultura de produção de 100 litros foi de 40 g/litro, incluindo 15 g/litro de peso seco insolúvel e 25 g/litro de peso seco solúvel. O rendimento da enzima bruta do sobrenadante de cultura
20 diretamente secado foi de 20 g/litro, enquanto o rendimento da enzima bruta de um concentrado de cultura, como obtido por intermédio de filtração Pellicon com um corte de peso molecular de 10 kDa, foi de 16 g/litro. A atividade enzimática da enzima seca bruta foi maior do que 1.000.000 U/g,
25 como medido pelo ensaio de azocaseína.

EXEMPLO 3

Materiais e Métodos de Suplementação de Ração de Aves Domésticas com Queratinase

Aves e Alojamento. Três experimentos foram conduzidos. Em

cada experimento, frangos a seres grelhados de 192 dias de idade foram pesados e aleatoriamente designados a 24 gaiolas em um planejamento completamente randomizado para dois Alternate Design batteries (Wilveco, Billerica, MA). As aves foram pesadas, unidas pela asa e introduzidas nos tratamentos experimentais a cinco (experimentos um e dois) ou um dia (experimento três) de idade.

Cada tratamento foi repetido cinco vezes com oito aves por gaiola exceto para o tratamento de controle que foi repetido quatro vezes com oito aves por gaiola. As aves foram alojadas em um ambiente com temperatura, ventilação e iluminação controladas (24 horas/dia). Durante o período experimental as aves foram alimentadas *ad libitum* através de alimentadores e água pelos bebedouros de bocal.

A Enzima Queratinase de PWD-1. A enzima, queratinase de PWD-1 foi produzida com um fermentador de 150 litros usando métodos padrão (Wang e Shih (1998) J Indust Microb. Biotech. 22: 608 a 616). Em resumo, PWD-1 de *Bacillus licheniformis* (Williams, *et al.* (1990) supra) foi cultivada no fermentador a 50° C durante 48 horas. Os meios isentos de célula foram concentrados pela ultrafiltração em membrana e secados por um secador por congelamento. Tipicamente, o rendimento da enzima bruta foi de 2,0 g/litro. A queratinase bruta teve uma atividade de 300.000 U/g como medido pela hidrólise de azo-queratina (Lin, *et al.* (1992) supra).

Tratamentos Dietéticos. Todas as dietas foram formuladas usando o software de programação linear de custo mínimo e são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1

Ingrediente	Tratamento Dietético		
	Proteína Alta ¹	Controle ²	Proteína Baixa
Milho	49,60	59,00	49,00
Farinha de soja, 48% CP	41,44	32,00	26,60
Calcário	1,32	1,40	1,32
Fosfato Dical	1,75	1,70	1,82
Gordura de ave	5,34	5,00	4,20
DL-metionina	0,15	0,16	0,13
Sal	0,40	0,50	0,42
Cloreto de colina	0,10	0,10	0,08
Minerais ³ (TM-90)	0,12	0,12	0,10
Vitaminas ⁴ (NCSU-90)	0,07	0,07	0,06
Pré mistura de selênio ⁵	0,07	0,07	0,06
Bicarbonato de sódio	0,10	0,10	0,08
Amido, milho	0	0	16,60
Total (kg)	100,46	100,22	100,47

	Análise ⁶	% de NRC	Análise	% de NRC	Análise	% de NRC
Proteína bruta,%	25,00	108,70	20,23	88,00	16,80	72,90
ME, kcal/kg	3.050	95,31	3.201	100,00	3.257	101,80
Met + Cys,%	0,933	103,67	0,85	99,00	0,70	77,90
Lisina,%	1,437	130,60	1,17	106,30	0,97	88,10
Cálcio,%	1,00	100,00	1,03	103,30	1,01	100,10
Fosfato	0,45	100,00	0,45	100,70	0,45	100,70
Disponível,%						

¹ Fornecido às aves *ad libitum* durante os primeiros 5 dias de idade apenas em três experimentos.

5 ² Fornecido às aves *ad libitum* durante os primeiros 5 dias de idade nos experimentos um e dois. Em todos os experimentos, as aves no tratamento de controle continuaram a receber a mesma dieta depois dos primeiros 5 dias de idade enquanto as outras aves foram submetidas aos tratamentos correspondentes.

10 ³ A pré mistura mineral foi obtida da Eastern Minerals, Inc., Henderson, NC e forneceu o seguinte (por kg de dieta): 120 mg de Zn de ZnSO₄; 120 mg de Mn de MnSO₄; 80 mg de Fe de FeSO₄·5H₂O; 10 mg de Cu de CuSO₄; 2,5 mg de I de CaIO₄; e 1 mg de Co de CoSO₄.

15 ⁴ A pré mistura de vitamina foi obtida da Roche, Nutley, NJ e forneceu o seguinte (por kg de dieta): 13.200 IU de vitamina A; 4.000 ICU de vitamina

D; 66 IU de vitamina E; 39,6 Fg de vitamina B12; 13,2 mg de riboflavina; 110 mg de niacina; 22 mg de d-pantotenato; 0,4 mg de vitamina K; 2,2 mg de ácido fólico; 4,0 mg de tiamina; 7,9 mg piridoxina; 0,253 mg de biotina; 100 mg de etoxiquina.

5 ⁵ A pré mistura de selênio forneceu 0,2 mg de Se/kg de dieta como Na₂SeO₃.

⁶ Análise calculada.

Toda a ração foi alimentada na forma de mingau por todo os experimentos. As aves receberam uma dieta basal no dia um de idade e foram subsequentemente mudadas para as dietas experimentais correspondentes aos cinco dias de idade. No experimento um, a dieta basal alimentada durante os primeiros cinco dias foi de cerca de 93% das recomendações do National Research Council's (NRC) quanto a proteína bruta ((1994) supra) mas fornecidos 100% quanto aos teores essenciais de aminoácidos, energia e cálcio e fósforo. Nos experimentos dois e três, a dieta basal alimentada durante os primeiros 5 dias foi de cerca de 95% das recomendações do NRC ((1994) supra) quanto a energia e 100% do cálcio e fósforo mas fornecidos 105% do teor de proteína bruta. Subsequentemente, uma gaiola de frangos a serem grelhados foi submetida a um dos cinco tratamentos dietéticos até o final de cada experimento (21 dias nos experimentos um e três, 26 dias no experimento dois). Os cinco tratamentos dietéticos no experimento um e dois foram: 1) dieta de controle não suplementada (C, 21,39% de proteína bruta); 2) dieta de proteína baixa (LP, 18% de proteína bruta); 3) dieta de proteína baixa suplementada com 0,05% (p/p) de preparação de enzima (LP + 0,05 E); 4) dieta de proteína baixa suplementada com 0,10% (p/p) de preparação de enzima (LP + 0,10 E); e 5) dieta de proteína baixa suplementada com 0,15% (p/p) de preparação de enzima (LP + 0,15 E). A dieta de controle foi a mesma dieta basal alimentada às aves durante os primeiros cinco dias de idade no experimento um. As aves no tratamento um continuaram a receber a mesma dieta depois de cinco dias de idade, enquanto o resto dos tratamentos foram

mudados para as dietas experimentais em cinco dias de idade. Os tratamentos dietéticos no experimento três foram: 1) controle não suplementado (C, 21,39% de proteína bruta); 2) dieta de controle suplementada com 0,10% (p/p) de preparação de enzima (C + 0,10 E); 3) dieta de proteína baixa (LP, 18% de proteína bruta); 4) dieta de proteína baixa suplementada com 0,10% (p/p) de preparação de enzima (LP + 0,10 E); e 5) o mesmo como o tratamento dois mais a alimentação às aves começando em um dia de idade ao invés de cinco dias de idade.

10 A dosagem de enzima foi dissolvida em solução 0,10 N de carbonato de sódio em uma relação de 1 grama de enzima/10 ml de solução antes da aplicação à ração. Depois disso, a solução de enzima foi pulverizada no topo da ração usando um frasco de pulverização em uma relação de 10 ml de preparação de enzima/kg de dieta e misturado usando um misturador de tigela pequeno (The Hobart Manufacturing Company, Troy, OH).

15 Viscosidade dos Digeridos. No final de cada experimento, todas as aves exceto duas por gaiola foram eutanizadas usando gás CO₂. As duas aves remanescentes por gaiola foram mantidas para o dia seguinte. Cedo no dia seguinte, os alimentadores foram removidos das gaiolas para produzir um período de 2 horas sem nenhum acesso à ração. Depois das 2 horas, às
20 aves foi permitido uma vez mais o acesso à ração *ad libitum*. Uma hora mais tarde, as aves foram removidas, duas por vez e foram subsequentemente eutanizadas usando gás CO₂. A necrópsia foi realizada imediatamente depois da eutanização e os conteúdos jejunal foram esvaziados em tubos Eppendorf de 1 ml. Duas amostras foram obtidas por ave. Os tubos foram imediatamente
25 centrifugados a 12.000 x g durante 5 minutos e imediatamente colocados em gelo até que a viscosidade foi medida usando um viscosímetro tipo comercial (Brookfield Digital Viscometer, Modelo DV-II Versão 2.0, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MA). A leitura da viscosidade foi conduzida sob condições que evitassem qualquer crescimento bacteriano na

solução.

Análise dos Dados. Os pesos corporais e o consumo de ração foram registrados em intervalos de 5 dia começando no primeiro dia de idade e até o final de cada experimento. A taxa de conversão da ração (alimentação para ganho de peso), corrigido quanto a mortalidade e animais inutilizados, foi calculada. A mortalidade foi registrada diariamente. O peso corporal, o consumo de ração, a taxa de conversão da ração e as leituras de viscosidade de cada experimento foram analisadas separadamente usando a análise de via única dos procedimentos de modelo linear geral do software SAS (SAS Institute (1996) SAS/STAT User's Guide: Statistics. Release 6.11. SAS Institute, Inc., Cary, NC). Os dados percentuais foram submetidos ao ANOVA depois da transformação da porcentagem pela raiz quadrada do seno de um arco. Os meios foram separados usando a diferença significativa mínima. As declarações de significância foram fundamentados em $P \leq 0,05$.

EXEMPLO 4

Suplementação de Ração de Aves Domésticas com Queratinase: Experimento 1

O peso corporal final, o consumo de ração acumulativo e as taxas de conversão da ração são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2

Tratamento	Peso Corporal (g)	Consumo de Ração (g)	Taxa de Conversão de Ração
Controle (C)	709 ± 16	901 ^a ± 26	1,56 ± 0,05
Proteína baixa (LP)	668 ± 14	835 ^{ab} ± 23	1,57 ± 0,04
LP + 0,05 E	691 ± 14	860 ^{ab} ± 23	1,56 ± 0,04
LP + 0,10 E	700 ± 14	847 ^{ab} ± 23	1,51 ± 0,04
LP + 0,15 E	677 ± 14	826 ^b ± 23	1,54 ± 0,04

^{a,b} Médias dentro de uma coluna com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) de acordo com a função média de quadrados mínimo do software SAS (SAS Institute (1996) supra).

¹ Os valores representam as médias de quatro a cinco gaiolas de oito frangos a serem grelhados por gaiola. Os valores representam mas

médias \pm erro padrão da média.

²E = enzima.

Os tratamentos de enzima no geral melhoraram o peso corporal com um valor de probabilidade de $P > 0,05$. O tratamento de proteína baixa + 0,10% de enzima teve peso corporal mais alto do que o tratamento de proteína baixo (700 vs. 668 gramas para proteína baixa + 0,10% de enzima vs. proteína baixa, respectivamente, $P = 0,08$). O tratamento com proteína baixa + 0,10% de enzima teve o peso corporal mais alto entre os tratamentos de enzima e não foi diferente do tratamento de controle (700 vs. 709 gramas para a proteína baixa + 0,10% de enzima vs. controle, respectivamente).

Não houve nenhuma diferença significativa entre os tratamentos no consumo exceto entre o tratamento de proteína baixa + 0,15% de enzima e o controle (826 vs. 901 gramas para a proteína baixa + 0,15% de enzima vs. controle, respectivamente, $P < 0,05$). Não houve diferença significativa no consumo de ração entre os grupos de tratamento de enzima.

Houve apenas uma ave morta por todo o experimento inteiro. O peso desta ave morta e dos animais inúteis foi incluído no cálculo da taxa de conversão da ração, que é apresentado na Tabela 2. A suplementação da enzima dietética teve efeitos marginais na taxa de conversão da ração. Em uma base acumulativa, o tratamento de proteína baixa + 0,10% de enzima teve a taxa de conversão da ração mais baixa (1,51 vs. 1,57 para a proteína baixa + 0,10% de enzima vs. proteína baixa, respectivamente, $P > 0,05$).

Os resultados do primeiro experimento revelaram uma tendência na resposta para o tratamento enzimático. Para analisar ainda mais o efeito positivo da enzima por um tempo mais longo, um segundo experimento foi conduzido para desenvolver as aves mais 5 dias (até 26 dias de idade).

EXEMPLO 5

Suplementação de Ração de Aves Domésticas com Queratinase: Experimento 2

Este experimento foi uma repetição do experimento 1 exceto que as aves foram desenvolvidas 5 dias mais (até 26 dias de idade). O peso corporal acumulativo final, consumo de ração e taxa de conversão da ração são apresentados na Tabela 3.

5

TABELA 3

Tratamento	Peso Corporal (g)	Consumo de Ração (g)	Taxa de Conversão de Ração
Controle (C)	1089 ^a ± 15	1717 ^c ± 16	1,83 ^a ± 0,05
Proteína baixa (LP)	964 ^c ± 13	1734 ^b ± 14	2,14 ^c ± 0,04
LP + 0,05 E	1019 ^b ± 13	1796 ^a ± 14	2,08 ^{bc} ± 0,04
LP + 0,10 E	1025 ^b ± 13	1764 ^{ab} ± 14	2,02 ^b ± 0,04
LP + 0,15 E	1032 ^b ± 13	1794 ^a ± 14	2,04 ^{bc} ± 0,04

^{a,b,c} Médias dentro de uma coluna com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) de acordo com a função média de quadrados mínimo do software SAS (SAS Institute (1996) supra).

¹ Os valores representam as médias de quatro a cinco gaiolas de oito frangos a serem grelhados por gaiola. Os valores representam as médias ± erro padrão da média.

² E = enzima.

Houve uma melhora no peso corporal ($P < 0,05$) na suplementação da dieta de proteína baixa com todos os três níveis da enzima nos 26 dias de idade. O tratamento com proteína baixa + 0,10% de enzima e o tratamento com proteína baixa + 0,15% de enzima deu a melhora de peso corporal mais alta (1,032 e 1,025 vs. 964 gramas para a proteína baixa + 0,15% de enzima e proteína baixa + 0,10 vs. proteína baixa, respectivamente, $P < 0,05$). Entretanto, todos os tratamentos enzimáticos tiveram peso corporal mais baixo ($P < 0,05$) do que o tratamento de controle (1,032, 1,025 e 1,016 vs. 1,089 gramas para a proteína baixa + 0,15% de enzima, proteína baixa + 0,10% de enzima e a proteína baixa + 0,05% de enzima vs. controle, respectivamente).

Todas as aves que recebem a dieta de proteína baixa consumiram mais ração do que o grupo de controle ($P < 0,05$). Os grupos de

tratamento enzimático também consumiram mais ração do que a dieta de proteína baixa ($P < 0,05$; Tabela 2). Não houve diferenças significantes no consumo de ração entre os tratamentos enzimáticos. A suplementação enzimática nos níveis de 0,05 e 0,15% resultou em taxas de conversão da ração numericamente melhores do que o tratamento com proteína baixa, enquanto o tratamento com proteína baixa + 0,10% de enzima apresentou significativamente ($P < 0,05$) uma taxa de conversão da ração melhor do que o tratamento de proteína baixa (2,02 vs. 2,14 para a proteína baixa + 0,10% enzima vs. proteína baixa, respectivamente). Neste experimento, a suplementação da dieta de proteína baixa com enzima não melhorou o desempenho dos pintainhos a um nível equivalente àquele da dieta de controle. Entretanto, a suplementação da dieta de proteína baixa com o nível de 0,10% de enzima (p/p) ($P < 0,05$) melhorou o desempenho dos pintainhos em relação àquele da dieta de proteína baixa.

Às aves em ambos os experimentos 1 e 2 foi fornecida a dieta de controle durante os primeiros 5 dias de idade antes de serem submetidas às dietas de tratamento. Embora a dieta de controle fornecesse energia, cálcio e fósforo e aminoácidos essenciais adequados, ela forneceu apenas 93% da recomendação de proteína bruta da NRC ((1994) supra), que a tornou marginalmente adequada e sensível à suplementação com protease.

EXEMPLO 6

Suplementação de Ração de Aves Domésticas com Queratinase: Experimento 3

No experimento 3, às aves foi fornecida uma dieta pré iniciadora de proteína alta fornecendo 105% da recomendação da NRC ((1994) supra) quanto a proteína bruta e levemente mais alto do que as exigências para todos os outros nutrientes exceto quanto a energia (95% das recomendações da NRC; Tabela I). O Experimento 3 foi conduzido para determinar se a enzima continuaria a exercer ou não o seu efeito mesmo

depois que os pintainhos tivessem recebido as exigências de nutriente adequadas.

5 Neste experimento, apenas um nível da enzima foi usado (0,10% p/p). Entretanto, dois novos tratamentos foram introduzidos para
10 testar a capacidade da enzima para exercer um efeito na suplementação para adequar marginalmente as dietas iniciadoras de frango a ser grelhado. Os dois novos tratamentos consistiram de suplementar a mesma dieta de controle (21,39% de proteína bruta) usada nos experimentos 1 e 2 com 0,10% de enzima (p/p) e introduzindo a ração tratada aos pintainhos com cinco dias (tratamento 2) ou um dia (tratamento 5) de idade. Isto forneceu informação se a suplementação enzimática a um dia de idade teria qualquer melhora adicional no desempenho.

O peso corporal final, o consumo de ração acumulativo e a taxa de conversão da ração são apresentados na Tabela 4.

15

TABELA 4

Tratamento	Peso Corporal (g)	Consumo de Ração (g)	Taxa de Conversão de Ração
Controle (C)	695 ^b ± 14	974 ^b ± 18	1,49 ^{ab} ± 0,03
C + 0,10 E	767 ^a ± 13	1046 ^a ± 16	1,45 ^a ± 0,03
Proteína baixa (LP)	651 ^c ± 13	1043 ^a ± 16	1,71 ^c ± 0,03
LP + 0,10 E	679 ^{bc} ± 13	978 ^b ± 16	1,53 ^b ± 0,03
C + 0,10 E	764 ^b ± 13	1022 ^{ab} ± 16	1,42 ^a ± 0,03

^{a,b,c} Médias dentro de uma coluna com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) de acordo com a função média de quadrados mínimo do software SAS (SAS Institute (1996) supra).

¹ Os valores representam as médias de quatro a cinco gaiolas de oito frangos a serem grelhados por gaiola. Os valores representam as médias ± erro padrão da média.

² E = enzima.

³ A enzima foi adicionada em um dia de idade neste tratamento. Todos os outros foram adicionados em cinco dias de idade.

25

Embora os dados na Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4 mostram

apenas os números de peso corporal final das aves nos experimentos diferentes, as aves foram pesadas a cada 5 dias em cada um dos experimentos. Olhando nos números do intervalo de 5 dias para este experimento, foi claro que suplementar a dieta de proteína baixa com a enzima no experimento 3 mostrou efeito similar no ganho de peso corporal àqueles dos experimentos 1 e 2. Suplementar a dieta de proteína baixa com a enzima aumentou o peso corporal da aves no dia 21, mas o efeito não pode ser detectado em $P < 0,05$ (679 vs. 651 gramas para a proteína baixa + 0,10% de enzima vs. proteína baixa, respectivamente, $P > 0,05$). Entretanto, suplementar a dieta de controle com a enzima (controle + 0,10% de preparação de enzima, tratamentos 2 e 5) apresentou peso corporal mais alto do que aquele do tratamento de controle (767 e 764 vs. 695 gramas para os tratamentos 2 e 5 vs. controle, respectivamente, $P < 0,05$). Inesperadamente, a suplementação da dieta de controle com a enzima mostrou melhoras no peso corporal significativamente mais altas do que quando a dieta de proteína baixa foi suplementada com a enzima se a enzima foi suplementada em um ou cinco dias de idade (Tabela 4). Isto pode ter sido devido ao teor de proteína e/ou aminoácidos mais alto da dieta de controle vs. a dieta de proteína baixa. A queratinase é uma enzima de protease de espectro amplo que ataca as proteínas de fontes diferentes e as decompõe em componentes de polipeptídeo menor. Estes polipeptídeos tornam-se mais fácil de degradar pelas enzimas digestivas no lúmen dos intestinos. O teor de proteína bruta e/ou aminoácidos mais alto da dieta (neste caso a dieta de controle) significa teor de substrato mais alto para a enzima trabalhar na liberação de mais componentes de proteína e torná-la mais disponível ao pintainho jovem que, por sua vez, será refletido em ganho de peso corporal mais alto.

EXEMPLO 7

Suplementação de Ração de Aves Domésticas com Queratinase: Viscosidade dos Digeridos

As leituras de viscosidade (mPas) dos conteúdos jejunais de frangos a serem grelhados de 22 dias de idade (experimentos 1 e 2) e 27 dias de idade (experimento 3) de todos os três experimentos são apresentados na Tabela 5.

5

TABELA 5

Tratamento	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Controle (C)	3,65 ^b ± 0,42	2,31 ^b ± 0,015	2,25 ^{ab} ± 0,17
C + 0,10 E	----	----	2,18 ^b ± 0,15
C + 0,10 E ³	----	----	1,99 ^b ± 0,15
Proteína baixa (LP)	3,59 ^b ± 0,38	2,36 ^{ab} ± 0,14	2,97 ^a ± 0,15
LP + 0,05 E	2,98 ^{ab} ± 0,38	2,78 ^a ± 0,14	----
LP + 0,10 E	2,88 ^{ab} ± 0,38	2,21 ^{bc} ± 0,14	2,20 ^b ± 0,15
LP + 0,15 E	2,27 ^a ± 0,38	1,98 ^c ± 0,14	----

^{a,b,c} Médias dentro de uma coluna com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) de acordo com a função média de quadrados mínimo do software SAS (SAS Institute (1996) supra).

¹ Os valores representam as médias de quatro a cinco gaiolas (números de 16 a 20). Os valores representam as médias ± erro padrão da média.

² E = enzima.

³ A enzima foi adicionada em um dia de idade neste tratamento. Todos os outros foram adicionados em cinco dias de idade.

Suplementar tanto a dieta de proteína baixa quanto a de controle em todos os experimentos com queratinase reduziu a viscosidade dos conteúdos jejunais. A redução foi diretamente proporcional ao nível de suplementação enzimática. Suplementar a dieta de proteína baixa com 0,15% de enzima (proteína baixa + 0,15% de enzima) reduziu a viscosidade dos conteúdos jejunais nos experimentos 1 e 2 (2,27 e 1,98 mPas vs. 3,59 e 2,36 mPas para proteína baixa + 0,15% de enzima vs. proteína baixa no experimentos 1 e 2, respectivamente, $P < 0,05$). O tratamento com proteína baixa + 0,15% de enzima também teve uma viscosidade jejunal mais baixa quando comparado com o tratamento de controle (2,27 e 1,98 mPas vs. 3,65 e 2,31 mPas para a proteína baixa + 0,15% de enzima vs. controle nos

experimentos 1 e 2, respectivamente, $P < 0,05$).

Quando da suplementação da dieta de controle com queratinase nos 5 dias de idade, a viscosidade jejunal também foi reduzida (2,18 mPas vs. 2,55 mPas para o controle + 0,10% de enzima [experimento 3, tratamento 2] vs. controle, respectivamente, $P > 0,05$). Entretanto, a redução foi significativa apenas quando a dieta suplementada com a enzima começou em 1 dia de idade (1,99 mPas vs. 2,55 mPas para o controle + 0,10% de enzima [experimento 3, tratamento 5] vs. controle, respectivamente, $P < 0,05$).

10

EXEMPLO 8

Teste de Alimentação Usando Atividade Enzimática Variável

Um extrato de enzima bruta seca produzida de acordo com os métodos aqui descritos é composto primariamente da enzima queratinase, mas também pode conter outros tipos de compostos, incluindo outras enzimas, carboidratos, peptídeos não enzimáticos, fragmentos de nucleotídeo, etc., que têm um peso molecular de mais do que 5 kDa e são portanto retidos na ultrafiltração.

15

20

Experimentos adicionais foram conduzidos para estudar a correlação entre o desempenho de crescimento dos frangos a serem grelhados e a atividade de queratinase dos extratos de enzima bruta adicionados às suas dietas.

Os extratos de enzima bruta obtidos a partir da produção de fermentação das cepas P1, P2 e T399 de *B. licheniformis* foram usadas nestes estudos e os resultados são fornecidos na Tabela 1.

TABELA 1

Teste #	Tipo de Extrato de Enzima Bruta	Atividade de Enzima	Taxa de Inclusão (%)	Desempenho de Desenvolvimento
MT 301	Cepa P1 (em 0,5% de farinha de soja) ¹	1.000.000	0,05	Nenhum efeito
			0,10	Melhora (0,05 < P < 0,1)
			0,15	Melhora (0,05 < P < 0,1)
MT 401	Cepa P1 (em 0,5% de farinha de soja)	1.000.000	0,05	Melhora significativa em proteína baixa
			0,10	Melhora significativa em proteína baixa
			0,15	Melhora significativa em proteína baixa
MT 501 ¹	Cepa P1 (em 0,5% farinha de soja) ²	1.000.000	0,10	Melhora significativa in proteína baixa e controle
MT 701	Cepa P1 (em 0,5% de farinha de soja) ¹	300.000	0,25	Efeito de negativo
	Cepa P2 (em 0,5% de farinha de soja) ¹	450.000	0,17	Melhora leve
MT 801	cepa P1 (inibido pelo PMSF) ³	300.000	0,25	Nenhum efeito
	Cepa P1 (inativado por calor) ⁴	300.000	0,25	Nenhum efeito
MT 901	Cepa P2 (em 1% de farinha de soja) ¹	450.000	0,10	Melhora significativa
	Cepa P2 (em 2%, 1% farinha de soja) ¹	800.000	0,10	Nenhum efeito
	Cepa T399 (em 2%, 1% farinha de soja) ¹	<5000	0,10	Nenhum efeito
KE 202	Cepa P2 (em 1% de farinha de soja)	600.000	0,10	Melhora em 23% das dietas
	Cepa P2 (in 2% farinha de soja) ¹	600.000	0,10	Melhora em 21 & 23% dietas
KE 302	Cepa P1 ⁵	150.000	0,10	Melhora significativa em todas
Teste Piloto	Cepa P1 ¹	300.000	0,10	Melhora em 21% das dietas
	Cepa P1 ¹	300.000	0,25	Melhora em 21% das dietas

¹ Suplemento enzimático alimentado de 6 a 21 dias de idade.

² Suplemento enzimático alimentado de 6 a 27 dias de idade.

³ >90% de atividade enzimática é inibida.

⁴ >98% de atividade enzimática é inibida.

⁵ Suplemento enzimático alimentado a partir de 1 a 21 dias de idade.

5 Os exemplos precedentes são ilustrativos da presente invenção e não devem ser interpretados como limitantes da mesma. A invenção é descrita pelas seguintes reivindicações, com equivalentes das reivindicações a serem nela incluídos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para criar aves domésticas para abate, caracterizado pelo fato de que compreende alimentar as ditas aves domésticas para abate com uma ração consistindo de:

5 (a) uma farinha de milho-soja como uma dieta de aves domésticas, em que dita dieta de aves compreende não mais que 1% em peso de queratina, e

10 (b) PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis* em uma quantidade eficaz para realçar o ganho de peso das ditas aves domésticas para abate.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ave doméstica para abate é uma ave imatura.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ave doméstica para abate é uma galinha.

15 4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a galinha tem de cerca de 1 dia a 65 dias de idade.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a galinha tem de cerca de 1 dia a 21 dias de idade.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a galinha tem de cerca de 1 dia a 7 dias de idade.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a galinha é um frango a ser grelhado.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dieta de ave doméstica é uma dieta iniciadora.

25 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dieta de ave doméstica é uma dieta do tipo de engorda.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dieta de ave doméstica é uma dieta do tipo finalizadora.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que a ração de farinha de milho-soja compreende de cerca de 60 a cerca de 70% de milho em peso.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ração de farinha de milho-soja compreende de cerca de 20 to cerca de 30% soja em peso.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ração de farinha de milho-soja ainda compreende de cerca de 0,01 to cerca de 0,20% de PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis* em peso.

10 14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis* é um extrato bruto ou enzima pura.

15 15. Método para criar aves domésticas para abate, caracterizado pelo fato de que compreende:

15 alimentar ditas aves domésticas para abate com uma ração de farinha de milho-soja como uma dieta iniciadora, em que dita dieta iniciadora compreende não mais que 1% em peso de queratina,

20 a dita ração ainda compreendendo PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis* em uma quantidade eficaz para realçar o ganho de peso das ditas aves domésticas para abate.

16. Método para melhorar a eficiência da utilização de ração de uma ração animal em aves domésticas para abate, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 alimentar ditas aves domésticas para abate com uma ração de farinha de milho-soja como uma dieta de ave doméstica, em que dita dieta de ave doméstica compreende não mais que 1% em peso de queratina,

a dita ração ainda compreendendo PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis* em uma quantidade eficaz para melhorar a eficiência da utilização de ração de uma ração animal em aves domésticas para abate.

17. Método para aumentar a capacidade de digestão de uma ração animal em aves domésticas para abate, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 alimentar as ditas aves domésticas para abate com uma ração de farinha de milho-soja como uma dieta de ave doméstica, em que dita dieta de ave doméstica compreende não mais que 1% em peso de queratina,

a dita ração ainda compreendendo PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis* em uma quantidade eficaz para aumentar a capacidade de digestão de uma ração animal em ditas aves domésticas para abate.

10 18. Ração animal, caracterizada pelo fato de que consiste de farinha de soja, farinha de milho, e queratinase, em que dita ração animal compreende não mais que 1% em peso de queratina.

15 19. Ração animal de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a ração animal consiste essencialmente de pelo menos cerca de 0,01% de queratinase em peso.

20. Ração animal de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a queratinase é um extrato bruto ou enzima pura.

20 21. Ração animal de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a queratinase é PWD-1 queratinase do *Bacillus licheniformis*.

22. Ração animal de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que ração animal é adicionada à dieta iniciadora.

25 23. Ração animal de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a dieta iniciadora é uma dieta iniciadora de farinha de soja-milho.

24. Ração animal de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que ração animal é uma dieta do tipo de engorda.

25 25. Ração animal de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que ração animal é uma dieta do tipo finalizadora.

RESUMO

“MÉTODOS PARA CRIAR AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE, PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RAÇÃO DE UMA RAÇÃO ANIMAL EM AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE E PARA
5 AUMENTAR A CAPACIDADE DE DIGESTÃO DE UMA RAÇÃO ANIMAL EM AVES DOMÉSTICAS PARA ABATE, E, RAÇÃO ANIMAL”

A presente invenção fornece métodos de melhorar o desempenho de crescimento, melhorar a eficiência de utilização da ração, aumentar a capacidade de digestão da ração, e diminuir a mortalidade de
10 animais imaturos e em desenvolvimento que recebem a ração animal. Métodos de produzir um extrato da enzima queratinase bruta e suplementos de ração animal para obter o mesmo também são fornecidos.