ELISSANDRA MAIARA DE CASTRO ZILIO

Enzimas fibrolítica e amilolítica exógenas na alimentação de vacas em lactação

Pirassununga

2018

ELISSANDRA MAIARA DE CASTRO ZILIO

Enzimas fibrolítica e amilolítica exógenas na alimentação de vacas em lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2018

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3616
FMVZ

Zilio, Elissandra Maiara de Castro
Enzimas fibrolítica e amilolítica exógenas na alimentação de vacas em lactação /
Elissandra Maiara de Castro Zilio. – 2018.
76 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

1. Amido. 2. α -amilase. 3. Fibra. 4. Produto enzimático. 5. Xilanase. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Enzima Amilolítica e Fibrolítica na Alimentação de Vacas Leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 2388290517, sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Elissandra Maiara de Castro Zilio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/07/2017.

We certify that the proposal "Enzyme amylolytic and fibrolytic in feeding dairy cows", utilizing 32 Bovines (32 females), protocol number CEUA 2388290517, under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Elissandra Maiara de Castro Zilio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **08/2017**

Área: **Nutrição e Produção Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 8 anos**

N: **32**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **400 a 700 kg**

Resumo: A utilização de aditivos na alimentação de ruminantes têm sido prática comum por melhorar a eficiência e o desempenho animal. Na tentativa de aumentar a digestibilidade das dietas têm sido utilizados suplementos com enzimas exógenas. As enzimas são classificadas de acordo com os substratos de atuação, em enzimas que atuam sobre fibra (xilanas e celulases), proteína (proteases), amido (amilases) e fitato (fitases). Quimicamente, as enzimas são proteínas com uma estrutura molecular tridimensional complexa que tem importante implicação para sua estabilidade quando exposta a altas temperaturas ou durante o trânsito no trato digestório. Atualmente, os estudos com enzimas exógenas em ruminantes têm focado na utilização de enzimas que degradam amido e fibra, elevando assim o consumo de energia digestível. Alguns benefícios têm sido observados com a suplementação de enzimas exógenas, dentre eles: degradação de fatores antinutricionais, aumento da eficiência de produção, redução de custos e complemento a atividade das enzimas endógenas. O mecanismo de ação das enzimas exógenas adicionadas às dietas de ruminantes não é totalmente conhecido, e as pesquisas tem focado na avaliação de cada classe de enzimas individualmente. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a associação de enzimas fibrolíticas e enzimas amilolíticas no desempenho e metabolismo de vacas leiteiras. Serão utilizadas 32 vacas em um delineamento de quadrado latino 4x4, onde será mensurado variáveis de consumo, produção e composição do leite, digestibilidade dos nutrientes, parâmetros sanguíneos e fermentação ruminal.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite

São Paulo, 26 de setembro de 2017

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Zilio, Elissandra Maiara de Castro

Título: **Enzimas fibrolítica e amilolítica exógenas na alimentação de vacas em lactação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico a realização desse trabalho à minha mãe Alice Souza de Castro Zilio, e aos meus irmãos Raquel e Bruno, que são os amores da minha vida. As amigas que guardo no coração (Kárita, Karine e Alyne) amizade de vocês é fundamental.

“Bendito seja o SENHOR, minha rocha, que ensina as minhas mãos para a guerra e os meus dedos para a batalha.” (Salmos 144:1)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo de maravilhoso que tem feito na minha vida. A minha mãe, Alice Souza de Castro Zilio, que todos os dias ora por mim e apoia todos os meus sonhos. Nos dias mais difíceis, em que chorava, me sentia cansada, ela estava comigo para me ouvir e me acalmar. Obrigada por tudo, você é minha inspiração para lutar e conquistar minhas coisas.

Aos meus irmãos, Bruno e Raquel, agradeço de coração por todo o apoio, e toda a ajuda. A minha família, que é a base para minha inspiração, para que eu alcance meus objetivos.

Agradeço as minhas amigas Kárita, Alyne e Karine, por estarem comigo por tantos anos, pelos conselhos, conversas e risadas. Amo muito vocês.

Meu parceiro, colega e namorado Tiago Antônio Del Valle, você foi fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada por me ensinar tanto, você é uma pessoa maravilhosa, um ótimo profissional. Tenho muita sorte em ter você ao meu lado, você me faz muito feliz.

Ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, que têm sido a minha casa durante esses anos. As experiências e pessoas que conheci aqui, fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal. Professor Francisco Palma Rennó, pela oportunidade e auxílio no que foi necessário. Não poderia deixar de reconhecer todo o ensinamento que as vacas me proporcionaram, principalmente pela inteligência desses animais, que são fundamentais para a realização de nossos trabalhos.

Agradeço a FAPESP, processo nº 2016/15711-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio ao projeto. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o primeiro ano de mestrado.

Aos companheiros de laboratório: Lucas Ghizzi, Caio Takiya, Roberto Cantoia, Mauro Sérgio, Alanne Tenório, Nathália Scognamiglio, Larissa Gheller, Tássia Barreira, Júlia Marques e Johnny Maciel, agradeço pela ajuda de cada um, vocês foram minha segunda família por tanto tempo. Aos estagiários que conheci durante esses anos (foram tantos), principalmente a Taiane Souza, os colombianos Huan Camillo e Mateo Lopera, e ao Lucas Sakamoto, obrigada por tudo.

Aos amigos que fiz em Pirassununga, foram tantos que me acolheram desde que cheguei aqui, Filipe Zanferari, Camylla Pedrosa, Vicente Buarque, Rafael Teixeira, Rejane Souza, Juliana Santos, Mariana Fragoso, Katiéli Welter, Marisa França, Cristian Martins e Bruna Gomes.

Agradeço mais uma vez a Deus, por me proporcionar tantos momentos felizes em Pirassununga, por colocar pessoas boas no meu caminho para que a realização dos meus objetivos fosse da melhor forma possível.

RESUMO

Zilio, E. M. C. **Enzimas fibrolítica e amilolítica exógenas na alimentação de vacas em lactação.** [Exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes at feeding dairy cows]. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

As dietas de vacas em lactação são compostas principalmente por carboidratos que não estão totalmente disponíveis para fermentação microbiana no rúmen, o que pode ser um fator crítico para a obtenção de energia em ruminantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de enzima fibrolítica (Fibrozyme®, Alltech Inc., Springfield, KY) e amilolítica (Amaize™, Alltech Inc., Springfield, KY) nas dietas sobre o consumo de nutrientes, índice de seleção de partículas, digestibilidade aparente total, fermentação ruminal, metabolismo de nutrientes, produção e composição do leite de vacas em lactação. Para o experimento, 32 vacas multíparas da raça Holandesa com 181.3 ± 35.3 (média $\pm$ SD) dias em lactação (DEL), 571 ± 72.7 kg de peso vivo (PV) e 29.6 ± 5.24 kg/d de produção de leite (PL), foram distribuídas em 8 quadrados Latinos 4×4 . Os tratamentos foram obtidos por esquema fatorial 2×2 pela combinação de enzima fibrolítica e amilolítica, como segue: 1) Controle (CONT): dieta basal sem adição de enzimas exógenas; 2) Enzima fibrolítica (FIB): dieta basal com adição de 1 g/kg de Fibrozyme® no concentrado da dieta (51 UI de atividade xilanase/kg de matéria seca (MS) da dieta; Alltech, Nicholasville, KY, USA; batch#: 417990-2); 3) Enzima amilolítica (AMI): dieta basal com adição de 0,66 g/kg de Amaize™ no concentrado da dieta (203 FAU/kg MS da dieta; Alltech Nicholasville, KY, USA; batch: 432715-1); e 4) FIB+AMI: adição de 1 e 0,66 g/kg de Fibrozyme® e Amaize™, respectivamente. As enzimas foram aplicadas para atender um consumo de 12 g/dia de Fibrozyme® e 8 g/dia de Amaize™, de acordo com as recomendações do fabricante. A enzima foi adicionada ao concentrado durante a preparação na fábrica de ração (toda semana). Não foram observados efeitos das enzimas sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes. Contudo, houve efeito de interação entre FIB e AMI para o consumo de partículas entre 19 e 8 mm. A enzima amilolítica aumentou o consumo de partículas entre 19 e 8 mm nos animais que não recebiam FIB. Além disso, AMI reduziu o consumo de partículas maiores que 19 mm. Outro efeito observado foi a interação entre FIB e AMI sobre a concentração de butirato ruminal. A enzima amilolítica aumentou a concentração de butirato apenas nos animais tratados com FIB. Houve tendência

de interação entre enzimas sobre a excreção de nitrogênio (N) no leite, em que FIB reduziu a excreção de N no leite apenas nos animais não tratados com AMI. Ainda, AMI reduziu a excreção de N na urina. Ainda, houve interação entre os efeitos de enzima fibrolítica e amilolítica sobre a concentração de colesterol e a atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT). A enzima fibrolítica reduziu a concentração de colesterol e aumentou a atividade da enzima GGT nos animais não tratados com enzima amilolítica. No entanto, a enzima amilolítica aumentou a concentração de colesterol e a atividade da AST nos animais alimentados com enzima fibrolítica. Houve interação entre enzimas exógenas sobre a produção de proteína e lactose no leite. A enzima fibrolítica reduziu a produção de proteína e lactose nos animais não alimentados com AMI. Não houve mudanças na produção de leite com a suplementação de enzimas exógenas. Em nosso estudo foram encontrados efeitos no consumo de partículas, fermentação ruminal, excreção de N e mudanças na composição do leite, contudo não foram observadas alterações no desempenho produtivo dos animais.

Palavras-chaves: amido, α -amilase, fibra, produto enzimático, xilanase.

ABSTRACT

Zilio, E. M. C. **Exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes at feeding dairy cows.** [Enzima fibrolítica e amilolítica na alimentação de vacas em lactação]. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Lactating cows diets are comprised mostly of carbohydrates which are not fully available for microbial fermentation in the rumen, critical factor for to obtain energy in ruminants. The aimed of this study was to evaluate the effect of fibrolytic enzyme (Fibrozyme®, Alltech Inc., Springfield, KY) on nutrient intake, sorting index, total tract digestion, ruminal fermentation, nitrogen utilization, metabolic profile, milk yield and composition in diets with or without amylolytic enzyme (Amaize™, Alltech Inc., Springfield, KY) of mid-lactating dairy cows. Thirty-two multiparous Hostein cows with 181.3 ± 35.3 (mean $\pm$ SD) days in milk (DIM), 571 ± 72.7 kg of body weight (BW) and 29.6 ± 5.24 kg/d of milk yield, were blocked and randomly allocated to a sequence of treatments in a 4×4 Latin square experimental design. Treatments were obtained in a 2×2 factorial arrangement, as follows: 1) Control (CONT), basal diet without exogenous enzymes; 2) Fibrolytic enzyme (FIB), provision of Fibrozyme® (batch#: 417990-2; Alltech, Nichollasvile, KY) at 1 g/kg of concentrate (51 IU of xylanase activity/kg diet DM); 3) Amylolytic enzyme (AMY), provision of Amaize™ (batch#: 432715-1; Alltech) at 0.66 g/kg of concentrate (203 FAU/kg diet DM); and 4) Fibrolytic enzyme plus amylolytic enzyme (FIB+AMY), enzymes added at the same rate in FIB and AMY treatments. The enzymes were applied to meet the intake of 12 and 8 g/cow/day of Fibrozyme® and Amaize™, respectively. Enzymes products were added to concentrate during its preparation (once a week). Enzymes no effects on intake and digestibility of nutrients. However, there was FIB and AMY interaction effect on selection index of particle size between 19 and 8 mm. Amylolytic enzyme increase selection index of particles with 19 and 8 mm, only treatments without FIB. Furthermore, AMY decreased the sorting for feed with particle size greater than 19 mm. There was FIB and AMY interaction effect on butyric acid concentration. Amylolytic enzyme increased on butyrate concentrations in cows treated with fibrolytic enzyme. Fibrolytic and amylolytic enzyme interaction effect tended on N excreted in milk, in which FIB decrease N excreted in milk only on animals non-treated with AMY. Whereas AMY reduced urinary N excretion. There was interaction effects of fibrolytic and amylolytic enzymes on cholesterol concentration and the enzymatic activity of AST and

GGT. The fibrolytic enzyme reduced cholesterol concentration and increased GGT enzyme activity in animals not treated with amylolytic enzyme. There was FIB and AMY interaction effect on lactose and protein production. Fibrolytic enzyme decreased lactose and protein production, only on animals non-treated with AMY. Exogenous enzymes had no impact on milk production of dairy cows. Enzymes exogenous affected on particle size greater, ruminal fermentation and milk composition. This study did not show evidences that fibrolytic and amylolytic enzymes can alter total tract nutrient digestibility and performance of mid-lactating cows.

Key-words: alpha-amylase, enzymatic product, fiber, starch, xylanase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual e bromatológica das dietas experimentais.	40
Tabela 2– Composição química dos ingredientes da dieta basal utilizada no experimento (g/kg da MS).	41
Tabela 3– Consumo de nutrientes e índice de seleção de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	50
Tabela 4 – Digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	50
Tabela 5 – Fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	52
Tabela 6 – Excreção urinária e síntese de proteína microbiana de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	56
Tabela 7 – Consumo e balanço de nitrogênio de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	58
Tabela 8 – Balanço de energia de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	58
Tabela 9 – Metabólitos sanguíneos de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	59
Tabela 10 – Produção e composição do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Estrutura dos carboidratos presentes na célula vegetal e o conceito de fibra.	23
Figura 2 - pH ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.....	53
Figura 3 - Concentração ruminal de N amoniacal (N-NH ₃) de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	53
Figura 4 - Concentração ruminal de acetato de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	54
Figura 5 - Concentração ruminal de propionato de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	54
Figura 6 - Concentração ruminal de butirato de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	55
Figura 7 - Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta total de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	55
Figura 8 - Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia ramificada de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AST	Aspartato aminotransferase
CCNF	Consumo de carboidratos não fibrosos
CEB	Consumo de energia bruta
CED	Consumo de energia digestível
CEE	Consumo de extrato etéreo
CFDN	Consumo de FDN
CNF	Carboidratos não fibrosos
CPB	Consumo de proteína bruta
DAMIDO	Digestibilidade do amido
DAT	Digestibilidade aparente total
DEE	Digestibilidade do extrato etéreo
DEL	Dias em lactação
DFDN	Digestibilidade da FDN
DPB	Digestibilidade da proteína bruta
DP	Derivados de purinas
EE	Extrato etéreo
EF	Excreção fecal
EL _{3x}	Energia líquida
ELI	Energia líquida de lactação
ELm	Energia líquida de manutenção
ELp	Energia líquida de produção
EM	Energia metabolizável
FB	Fibra bruta
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FDNe	Fibra em detergente neutro efetiva
FDN _{fe}	Fibra em detergente neutro fisicamente efetiva
FDNi	Fibra em detergente neutro indigestível
GGT	Gama glutamil transferase

GMD	Ganho médio diário
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
Nmicro	Nitrogênio microbiano
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal
Pabs	Purinas absorvidas
PB	Proteína bruta
PL	Produção de leite
PLC	Produção de leite corrigida
PC	Peso corporal
TMR	Dieta Total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESE	20
3	OBJETIVO	20
4	REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E O CONCEITO DE FIBRA	21
4.1.1	Fibra na nutrição de vacas leiteiras.....	24
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS NÃO FIBROSOS.....	26
4.2.1	Amido na nutrição de vacas leiteiras.....	28
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL	29
4.3.1	Enzimas fibrolíticas.....	34
4.3.2	Enzimas amilolíticas	35
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1	LOCAL E ANIMAIS	38
5.2	DELINEAMENTO E DIETA EXPERIMENTAL	38
5.3	CONSUMO, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL ...	41
5.4	FERMENTAÇÃO RUMINAL	43
5.5	SÍNTESE DE NITROGÊNIO MICROBIANO E UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO ...	44
5.6	BALANÇO DE ENERGIA.....	46
5.7	METABÓLITOS SANGUÍNEOS	47
5.8	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	48
5.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	CONSUMO, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL ...	49
6.2	FERMENTAÇÃO RUMINAL	51
6.3	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA E BALANÇO DE NITROGÊNIO	56
6.4	BALANÇO DE ENERGIA.....	58
6.5	METABÓLITOS SANGUÍNEOS	59
6.6	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	59
7	DISCUSSÃO.....	60

8 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes utilizam carboidratos advindos da parede e conteúdo celular vegetal para produção de carne e leite. Métodos químicos, físicos e biológicos são utilizados para melhorar a qualidade do alimento, reverter os fatores antinutricionais e aumentar a digestibilidade dos nutrientes (SUJANI; SERESINHE, 2015). Em se tratando do método biológico, o uso de enzimas exógenas está sendo cada vez mais discutido por pesquisadores.

As enzimas exógenas são usadas para melhorar a utilização dos nutrientes e digestão dos alimentos. Na literatura são relatados experimentos com uso de enzimas em ruminantes desde 1960 (BURROUGHS et al., 1960), entretanto, o uso de enzimas se tornou viável neste século, devido à redução dos custos com a produção e adoção de novas tecnologias para produzir preparações enzimáticas purificadas e definidas. Bons resultados na indústria de monogástricos também impulsionaram o interesse para o uso de enzimas em ruminantes. Na avicultura, a natureza de integração desse setor fez com que essa tecnologia fosse rapidamente adotada, e as enzimas são aceitas como classe de aditivo que melhora a digestibilidade e a eficiência de utilização dos nutrientes (RAVINDRAN; SON, 2011).

Nas últimas décadas, vários experimentos foram realizados com o intuito de avaliar a adição de enzimas fibrolíticas (BEAUCHEMIN; RODE, 1996; BEAUCHEMIN et al., 2003; ARRIOLA et al., 2017) e amilolíticas (CHEN et al., 1995; DILORENZO et al., 2011; MCCARTHY et al., 2013) na dieta de ruminantes.

Xilanases e celulasas são comumente usadas como enzimas fibrolíticas, pois aumentam a digestibilidade da MS e da fibra em detergente neutro (FDN) em vacas leiteiras (ARRIOLA et al., 2017). Melhorias na digestibilidade da fibra indicam que há limitação na secreção de enzimas endógenas ou ineficiência dessas em digerir a fração indigestível da fibra (BEAUCHEMIN et al., 2003). Em recente estudo meta-analítico, Arriola et al. (2017) reportaram efeito positivo na produção de leite (PL) com uso de enzima fibrolítica. Contudo, muitas variações nos resultados são relacionadas aos diferentes tipos de enzimas e atividade enzimática de cada produto.

A inclusão de enzima amilolítica, principalmente com atividade α -amilase, tem sido realizada com intuito de melhorar a digestibilidade do amido no rúmen (NOZIÈRE et al., 2014) e aumentar o desempenho dos animais (TRICARICO et al., 2005). Efeitos positivos foram encontrados com uso da enzima amilolítica, como aumento da digestibilidade da FDN e proteína bruta (PB) em vacas leiteiras (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al.,

2010; WEISS et al., 2011) e melhorias no balanço de energia em vacas de transição (DEFRAIN et al., 2005).

No entanto, a combinação de enzimas fibrolítica e amilolítica tem sido pouco explorada. No estudo de Hristov et al. (2008) forneceram um complexo enzimático contendo xilanase e α -amilase para vacas em lactação. Neste estudo não são relatadas diferenças nos parâmetros de fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e digestibilidade dos nutrientes. No entanto, a literatura ainda não possuiu dados sobre o efeito da associação dessas enzimas no desempenho produtivo de vacas leiteiras. Enzimas fibrolítica e amilolítica exógenas podem melhorar a digestibilidade da fibra e consequentemente a eficiência de utilização do alimento e o aproveitamento do amido de vacas em lactação.

2 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a adição de enzima fibrolítica aumenta a digestão da fibra e melhora a resposta dos animais à adição de enzima amilolítica, aumentando a digestibilidade dos nutrientes e o desempenho produtivo de vacas em lactação.

3 OBJETIVO

Objetivou-se avaliar os efeitos da associação de enzima fibrolítica (Fibrozyme®, Alltech Inc., Springfield, KY) e enzima amilolítica (Amaize™, Alltech Inc., Springfield, KY) sobre o consumo de nutrientes, índice de seleção, digestibilidade aparente total, parâmetros fermentativos ruminais, balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana, balanço de energia, perfil metabólico sanguíneo, e desempenho produtivo de vacas em lactação.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E O CONCEITO DE FIBRA

Os carboidratos são açúcares, compostos por átomos de carbono, classificados de acordo com os tipos de ligações que apresentam. Estão presentes nos alimentos e são os principais responsáveis pelo atendimento às demandas energéticas dos animais. Em se tratando de forragens, agronomicamente, eles são classificados em carboidratos estruturais e não estruturais, em função da sua localização na célula vegetal. Os carboidratos estruturais encontram-se na parede da célula vegetal e possuem a função de dar estrutura e sustentação a célula (MERTENS, 1996), enquanto que os carboidratos não estruturais compõem o conteúdo celular vegetal. Os carboidratos não estruturais são encontrados em maior concentração nas sementes, folhas e hastes e representam as reservas de energia usadas para crescimento, reprodução e sobrevivência da planta durante os períodos de estresse (MERTENS, 1996).

Em relação a nutrição de ruminantes, os carboidratos estruturais são responsáveis por promoverem a atividade física motora do rúmen, são formadores do “mat” ruminal devido às suas partículas longas. A parede celular vegetal é composta por pectina, hemicelulose, celulose, lignina, proteínas estruturais e, em menores proporções, sílica, cutinas e taninos, associados ou não a polissacarídeos estruturais e/ou lignina (VAN SOEST, 1994; MERTENS, 1996).

Apresentando a definição de carboidratos fibrosos e não fibrosos, sob a ótica da nutrição de ruminantes; a “fibra insolúvel” ou simplesmente fibra é o resíduo insolúvel em solução detergente neutro, preparado de forma a eliminar a material mineral e os compostos nitrogenados nele contidos, contêm os carboidratos de natureza fibrosa, pertencentes à matriz lignificada insolúvel dos alimentos (VAN SOEST, 1994). Os carboidratos não fibrosos (CNF) são todos os demais carboidratos solúveis em solução detergente neutro, cuja característica nutricional comum é de serem potencialmente digeríveis pelos microrganismos do rúmen. Portanto o termo CNF é melhor empregado que o termo carboidrato não estrutural, por englobar carboidratos que mesmo pertencentes a parede celular vegetal, não se enquadram na definição formal de fibra para ruminantes (MERTENS, 1996).

O conceito fibra é uma entidade meramente nutricional e a sua definição está vinculada ao método analítico empregado na sua determinação (MERTENS, 1996). Quimicamente, a fibra é um agregado de compostos e não uma entidade química distinta, é a

fração dos carboidratos de digestão lenta ou indigestível que permite a atividade mastigatória e a motilidade do rúmen (NUSSIO et al., 2011). O primeiro método de quantificação da fibra foi proposto por Henneberge e Stohmann em 1860, o sistema Weende. A amostra de alimento sofria uma digestão ácida para solubilização do amido, parte da pectina e hemicelulose. Logo após, era feita uma digestão alcalina para solubilização de proteínas, pectinas e hemicelulose remanescentes e parte da lignina. A fibra bruta (FB) era o resíduo final, composta por celulose e pequenas partes de lignina e hemicelulose (VAN SOEST, 1963). Para evitar a solubilização da lignina que ocorre pelo método da FB, Van Soest (1963) desenvolveu o método que não utiliza alcalinidade para isolar a fibra: o método da fibra em detergente ácido (FDA). Este método utiliza ácido sulfúrico para solubilizar os açúcares, hemicelulose, pectinas e proteínas. O resíduo final é composto por celulose e lignina, com alguma contaminação por pectina, minerais (cinzas) e compostos nitrogenados (VAN SOEST, 1963; VAN SOEST et al., 1991). A desvantagem nesse método é que ocorre solubilização das frações digestíveis ou lentamente digestível. Outro protocolo para extração da fibra é a determinação da FDN, que não dissolve as frações digestíveis ou lentamente digestíveis dos alimentos, recuperando a celulose, hemicelulose e lignina com alguma contaminação por pectina, amido, minerais e proteínas. Este método é mais preciso para quantificar a fibra dos alimentos, sendo empregado na formulação de dietas em ruminantes. Para que não ocorra contaminação de amido em amostras que contém concentrado, é necessária a inclusão de α -amilase ou digestão em solução de ureia para solubilização do amido. Embora a pectina esteja contida na parede celular, seu comportamento ruminal não é semelhante ao das fibras, ou seja, ela é rapidamente degradada no rúmen, não sendo recuperada pelo sistema FDN de Van Soest (GOES et al., 2004).

A FDN pode ser considerada a entidade nutricional, onde consegue-se caracterizar a celulose, hemicelulose e lignina, e a fração que é solúvel em detergente neutro apresenta um comportamento nutricional uniforme, diferente do que acontecia com a fibra bruta (RODRIGUES; VIEIRA, 2011). Na figura 1 é apresentado um esquema do que foi relatado até aqui, dos carboidratos quando a planta é considerada, e sob a visão de nutrição de ruminantes.

Figura 1– Estrutura dos carboidratos presentes na célula vegetal e o conceito de fibra.

Fonte: Hall et al. (1999)

FDA: fibra em detergente ácido; FDN: fibra em detergente neutro; CSDN: carboidratos solúveis em detergente neutro; FSDN: fibra solúvel em detergente neutro

A digestão dos polissacarídeos da parede celular ocorre de forma que haja um sinergismo entre celulasas e hemicelulasas. A parede celular é classificada em dois tipos: a parede celular mais externa (parede celular primária), sendo a primeira a ser formada; a partir do momento em que a planta atinge seu maior raio e diâmetro, ela começa a formar a parede celular secundária, que é dividida em três subcamadas – S1, S2 e S3 (GUERREIRO et al., 2015). Na fase inicial da célula, em que ocorre apenas a parede celular primária, esta é composta por celulose, hemicelulose e pectina. A partir da deposição da parede celular secundária, surge uma nova substância, a lignina (GUERREIRO et al., 2015). Quando a lignina se aproxima da camada S3, mais difícil será a degradação da parede celular, diminuindo a qualidade da planta. A concentração de lignina diminui da camada S1 para S3, mas está acabando se tornando de mais difícil degradação.

As bactérias iniciam o processo de colonização a partir da parede secundária (S3) onde ocorre menor concentração de lignina, mais indigestível, para a parede primária (mais externa), onde há mais celulose e hemicelulose que será aproveitada pelo animal. A hemicelulose é mais concentrada na superfície externa da parede celular vegetal, mas também difunde entre fibrilas de celulose, agindo como barreira física, limitando as celulasas agirem sobre a celulose. As xilanases aliviam esse problema deixando a celulose mais acessível as enzimas (FU et al., 2011).

4.1.1 Fibra na nutrição de vacas leiteiras

Na dieta de ruminantes os carboidratos compreendem entre 70 e 80% da dieta e são essenciais para o atendimento de energia, síntese microbiana, componentes do leite e saúde ruminal (NUSSIO et al., 2011). As forragens são fontes baratas e podem contribuir para o atendimento das exigências de vacas leiteiras, podendo participar de 40 a 90% das dietas desses animais (MARTINS et al., 2006).

A fibra representa a fração de carboidratos de digestão lenta ou indigestível e, dependendo de sua concentração e digestibilidade, impõe limitações físicas sobre o consumo de MS (NUSSIO et al., 2011). Quantidade e forma física da forragem são importantes para suportar a função normal do rúmen, pois estimulam a mastigação e produção de saliva, o que contribui para o tamponamento do rúmen e evita a redução do pH em dietas com alta densidade energética (ALLEN, 1997). Ademais, devido à expressiva proporção nos alimentos volumosos, invariavelmente as dietas ricas em forrageiras tropicais apresentam elevados teores de FDN. Desta forma, maximizar a digestibilidade da FDN da dieta de vacas leiteiras se torna um desafio, não apenas para aumentar o aporte energético, como também reduzir os custos associados ao fornecimento de concentrados (NUSSIO et al., 2011).

O desaparecimento da fibra do rúmen é resultado do processo competitivo entre digestão e passagem. A digestibilidade da FDN é um parâmetro importante para a qualidade da forragem, Lopes et al. (2015) observaram valores de digestibilidade no trato total de 49,5% em experimento com vacas leiteiras utilizando silagem de milho. Nas condições do nosso país, em se tratando de forragens, a qualidade é inferior ao que é utilizado no trabalho apresentando, com digestibilidade da FDN em torno de 40%. A digestão da FDN das forragens não é constante para todos os animais, sendo que o principal fator de variação decorre das diferenças na sua estrutura, composição química e estágio de maturidade da planta (HUHTANEN; KHALILI, 1991).

Nos modernos sistemas de formulação de dietas, as proporções de proteína insolúveis em detergente neutro e especialmente de lignina tem sido inversamente relacionados à digestibilidade da fibra (CONRAD et al., 1984). Recentemente, White et al. (2017) propuseram o ajuste à referida equação, indicando a inclusão do consumo de amido como parâmetro. De acordo com estes autores, o consumo de amido tem efeito quadrático sobre a digestibilidade da FDN, sendo que o consumo de dietas com baixas concentrações de amido aumenta tal digestibilidade enquanto que doses elevadas comprometem-na. Vários fatores podem interferir na dinâmica de degradação da FDN, podemos citar: o animal (como um fator

interno (HUHTANEN et al., 2006) e fatores externos, como tamanho das partículas, taxa de redução das partículas, tipo de forragem, estágio de maturidade da planta (LUND, 2002), e população microbiana ruminal (ALLEN; MERTENS, 1988). A FDN limita o consumo de MS devido ao preenchimento físico do rúmen, o que pode comprometer o desempenho animal. Um aumento de 8,4% na digestibilidade da FDN está associada a um aumento no consumo de MS de 1,4 kg, resultando no aumento de 1,9 kg de leite (OBA; ALLEN, 1999).

Os alimentos possuem algumas propriedades físicas: capacidade de hidratação, densidade e tamanho de partícula. O tamanho de partícula é associado à efetividade da FDN (FDNe) e a FDN fisicamente efetiva (FDNfe; MERTENS, 1997). A FDNe está relacionada à capacidade do alimento em manter o teor de gordura no leite, pH ruminal e padrão de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen (MERTENS, 1997). Já a FDNfe envolve a característica física da fibra, ou seja, o tamanho de partícula que é capaz de proporcionar a motilidade ruminal, atividade mastigatória e manutenção da saúde ruminal (ARMENTANO; PEREIRA, 1997). Mertens (1997) propôs o método simples para quantificação da FDNfe, multiplicando o teor de FDN de um alimento pela porcentagem de partículas retidas na peneira de 1.18 mm. Essa teoria baseia-se na passagem das fibras pelo trato digestório, pois as partículas de fibra encontradas nas fezes dos ruminantes são inferiores a 1.2 mm e, portanto, somente as partículas que possuem maior dificuldade em transitar pelo rúmen são as que induzem a atividade mastigatória (MERTENS, 1997). Outro método para determinar a FDNfe foi proposto por Lammers et al. (1996), que desenvolveu o conjunto de peneiras (Penn State Particle Separator) com tamanho de 19 mm e 8 mm de porosidade. Ele utiliza a proporção da MS retida nas peneiras de 19 e 8 mm e multiplica pela porcentagem da fração de FDN do ingrediente retido nessas peneiras. O método da Penn State foi visto como sendo um método rápido, barato e aplicável em condições de campo para avaliação da distribuição do tamanho de partículas dos alimentos.

Em dietas de vacas de alta produção é necessário o balanço de FDN sem que se tenha limitação do consumo pela FDNfe. Zebeli et al. (2012) sugerem que a dieta deve conter 31,2% de FDNfe com partículas acima de 1,18 mm ou 18,5% de partículas acima de 8 mm para que a saúde no rúmen seja mantida. Apesar dos modelos recomendarem quantidades médias de 18,5% de partículas acima de 8 mm, os autores notaram que ter mais que 14,9% de FDNfe de partículas acima de 8 mm pode diminuir o consumo de MS (ZEBELI et al., 2012). Encontrar o equilíbrio ótimo entre a fibra fisicamente efetiva e os carboidratos prontamente degradáveis na dieta é difícil, mas de extrema importância para manter a saúde do rúmen, síntese de proteína microbiana e produção de leite (ZEBELI et al., 2012).

Com o aumento no tamanho de partícula ocorre diminuição na taxa de passagem e redução na degradação da fibra no rúmen, devido à menor disponibilidade de área superficial para ataque microbiano, diminuindo o consumo e absorção de nutrientes (TAF AJ et al., 2007). Zebeli et al. (2008b) propõe redução moderada no tamanho de partícula das forragens de aproximadamente 10 a 15 mm, o que mostrou promover degradação ruminal pelo aumento na área de superfície disponível para a fixação das bactérias fibrolíticas, sem afetar negativamente a atividade das bactérias celulolíticas e os processos de fermentação (ZEBELI et al., 2008b). Em estudo feito por Zebeli et al. (2008a) o aumento no conteúdo de FDNfe de até 32% reduziu o consumo de MS e a PL, contudo houve aumento na produção de leite corrigida e na eficiência de produção. No mesmo estudo, o teor de gordura no leite foi o melhor preditor de saúde ruminal e adequada fibra na dieta de vacas leiteiras. Com um aumento de 29 para 33% de FDNfe na TMR a base de silagem de alfafa, Yang e Beauchemin (2007) reportaram uma redução no consumo e produção de leite, em contraste com aumento de 3.4 para 3.8% da gordura do leite.

Como existe o fator físico limitante do consumo quando há ingestão de rações com alto teor de fibra, também há fatores negativos da baixa inclusão de fibra nas rações os quais podem ocasionar a acidose ruminal, abscesso hepático, depressão da gordura no leite, entre outros problemas (NRC, 2001).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS NÃO FIBROSOS

A maior parte da energia consumida pelos ruminantes é derivada de polissacarídeos presentes na parede das células vegetais, como já visto anteriormente, ou de polissacarídeos de reserva das plantas, os carboidratos não estruturais, classificados por estarem presentes no conteúdo celular vegetal, constituídos por açúcares, frutanas e principalmente pelo amido. São fontes de energia prontamente disponíveis ou de reserva para a planta, e esse grupo (açúcares, frutanas e amido), quando se trata de termos nutricionais, é classificado como carboidratos não fibrosos.

O amido é um polissacarídeo não estrutural, de elevado peso molecular, sintetizado pelas plantas superiores com função de reserva energética nos períodos de dormência, germinação de grãos, crescimento e rebrota (WANG et al., 1998). As plantas armazenam o amido nos caules, raízes, tubérculos e grãos.

Em se tratando da estrutura química do amido, ele é formado por dois polímeros de glicose: amilose e amilopectina. Estes se diferenciam quanto ao tipo de estrutura química,

tamanho de molécula e propriedades químicas. A amilose é uma estrutura não-ramificada de glicoses, sendo um polímero longo e linear, disposto em dupla hélice, onde os polímeros de glicose são unidos por ligações α -1,4. Já a amilopectina é uma molécula maior que a amilose e altamente ramificada, em que as cadeias lineares de glicose são unidas por ligações α -1,4, e nos pontos de ramificação (a cada 20 a 25 resíduos de glicose) as ligações são do tipo α -1,6 (CHESSON; FORSBERG, 1997). A organização das ramificações α -1,6 é responsável pelo empacotamento denso e semi-cristalino dos resíduos de glicose nos grânulos de amido (BALL, 1998). As diferenças na estrutura da amilopectina entre as fontes de amido podem exercer importante papel nas propriedades funcionais do amido, como viscosidade, capacidade de hidratação e susceptibilidade às amilases.

Lipídios, proteínas e minerais são alguns componentes que podem estar associados aos grânulos de amido. Com relação aos lipídios e proteínas, eles são compostos não amiláceos que podem afetar o estado físico e a susceptibilidade da hidrólise do amido em animais de produção (BALDWIN, 2001). Lipídios ligados aos grânulos de amido podem estar localizados tanto na superfície como no interior do grânulo (SOUTH et al., 1991), sendo que os lipídios são ácidos graxos livres, podendo estar ligados em mais de 55% da fração de amilose (BLAZEK, 2008). Esses complexos causam redução do contato entre enzima e substrato, o que limita a digestão do amido.

As proteínas associadas aos grânulos de amido também estão localizadas na superfície e no interior dos grânulos de amido e podem ser divididas em dois tipos: 1) prolaminas, proteínas de armazenamento do endosperma, que estão localizadas na superfície do grânulo de amido; e 2) proteínas associadas ao grânulo de amido, que podem estar no interior ou na superfície do mesmo (LÁSZTITY, 1984). As prolaminas são as principais proteínas de armazenamento do endosperma (SHEWRY; HALFORD, 2002) e têm sido pesquisadas por sua interferência na digestão do amido.

A digestão do amido é o passo inicial para que seja utilizado como fonte de energia pelos microrganismos ruminais e pelo animal. São conhecidos alguns fatores que afetam a digestão do amido: sua composição química e forma física, presença de barreira física nos grãos de cereais, forma física do alimento e os diferentes processamentos aplicados aos alimentos (HALE, 1973). Quanto ao grão de milho, o mais utilizado nos confinamentos brasileiros é principalmente do tipo “Flint” (duro), que apresenta alta vitreosidade, ou seja, maior proporção do endosperma vítreo em relação ao endosperma total. Do ponto de vista nutricional, quanto maior a proporção do endosperma vítreo menor é a digestibilidade do amido presente no grão (Correa et al., 2002, Corona et al., 2006).

As principais bactérias de degradação do amido são: *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*, seguida da *Pretovella ruminicola* (COTTA, 1988). Em estudo *in vitro* conduzido por Cotta (1988) com culturas de seis das principais espécies de bactérias amilolíticas, demonstrou que as espécies *Streptococcus bovis* e *Ruminobacter amylophilus* exibiram maior capacidade de digestão do amido *in vitro* seguidas pela *Pretovella ruminicola* e *Butyrivibrio fibrisolvens*.

A degradação do amido no rúmen tem início com a adesão das bactérias ao grânulo devido a interação iônica hidrofóbica com forças de van der Waals, envolvendo anulação de cargas da membrana celular das bactérias (VAN SOEST, 1994). Esses polissacarídeos são hidrolisados por amilases bacterianas do tipo α e β e também α -glicosídeses (KOZLOSKI, 2011). As α -amilases hidrolisam ligações no interior da cadeia (endoglicosídeses), liberando maltose como produto final. A α -amilase é uma endoglicosídesa, o que significa que ela não precisa de terminais livres da cadeia de amilose para exercer sua função, sendo capaz de hidrolisar cadeias internas com ligações α -1,4. Já as β -amilases atuam no final da cadeia do polímero (exoglicosídeses) liberando glicose. Além disso, as α -glicosídeses hidrolisam as ligações α -1,6 nos pontos de ramificação do polímero, assim como hidrolisam ligações α -1,4 de oligossacarídeos (maltose e maltotriose) (KOZLOSKI, 2011). Os produtos da degradação do amido (oligossacarídeos, dissacarídeos, ou monossacarídeos) são absorvidos pelas bactérias e utilizados para a síntese de proteína microbiana e produção de ácidos graxos de cadeia curta (KOZLOSKI, 2011).

Como já comentado anteriormente, os produtos da digestão do amido pela α -amilase são uma mistura de maltose, maltotriose e diversas dextrinas (HARMON, 1993). Algumas enzimas encontradas no intestino delgado apresentam atividade para degradação de maltose e maltotriose. Maltase e isomaltase apresentam alta atividade no jejuno e íleo em relação ao duodeno. A maltase digere moléculas de maltose proveniente do amido e a isomaltase hidrolisa as ligações α -1,6 encontradas nos pontos de ramificação da amilopectina, liberando moléculas de glicose.

4.2.1 Amido na nutrição de vacas leiteiras

A necessidade de satisfazer as exigências energéticas de vacas em lactação de alto desempenho resulta em uma alimentação com elevada quantidade de amido na dieta. O teor de amido normalmente encontrado nas dietas de vacas leiteiras é em torno de 24 a 26% da MS (STAPLES, 2007). No Brasil o teor de amido das dietas é mais elevado, variando de 25 a

28% na região sul, e de 26 a 30% na região sudeste. Isso ocorre porque as principais fontes de amido é o milho e o farelo de soja, enquanto no país americano é utilizado fontes alternativas de amido na dieta. Além disso, o amido contribui com cerca de 50 e 75% do valor energético da silagem e do grão de milho, respectivamente (NRC, 2001).

Muitos fatores interferem no aproveitamento do amido pelo animal, incluindo tipo de amido, processamento, interação com os componentes da dieta e maturidade do milho, afetando assim a capacidade produtiva de vacas leiteiras (MILLS et al., 2017). O amido pode ser altamente degradado por microrganismos do rúmen, e até 50% pode não ser degradado e escapar para o intestino delgado (MILLS et al., 1999). A digestão do amido no intestino delgado, seguida pela absorção da glicose, pode evitar ineficiências da fermentação no rúmen (REYNOLDS et al., 2014). No entanto, o amido que alcança o intestino delgado é menos digestível do que o amido digerido no rúmen (REYNOLDS et al., 2014).

Há muita discussão na literatura sobre a limitação dos ruminantes em digerir amido no intestino (REYNOLDS, 2006). Owens et al. (1986) analisou dados de vários experimentos, com a tentativa de esclarecer os pontos de controle em que a digestão intestinal do amido é limitada no ruminante. Com base em informações relativas ao desaparecimento total do amido intestinal, esses autores concluíram que a capacidade enzimática não limitava a digestão intestinal. No entanto, o processamento, tamanho de partícula e a estrutura do grânulo de amido indicam barreira física para atividade das carboidrases. Melhorias na utilização do amido resultam na redução da inclusão do amido na dieta e diminuição nos custos, consequentemente aumento no desempenho produtivo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL

Enzimas são proteínas produzidas por um organismo vivo que aceleram reações químicas específicas devido ao seu alto grau de afinidade com o substrato (GURUNG et al., 2013). Elas catalisam diversas reações em cadeia e tornam as macromoléculas em precursores simples. A natureza proteica das enzimas tem importante implicação para sua estabilidade em altas temperaturas ou durante o trânsito no trato digestório. Como proteínas, elas podem ser desnaturadas pelo calor e pH, e ainda podem ser submetidas a proteólises por enzimas digestivas ou bacterianas. Uma característica única das enzimas é a alta afinidade por determinado substrato, sendo que cada enzima degrada substratos em sítios específicos de reação (LEHNINGER, 2005). É necessário o fornecimento ideal de substrato em contato constante e inalterado, e um intervalo específico de pH (4 a 6) para melhor atividade

enzimática. A taxa de conversão das enzimas é reduzida quando o substrato é insuficiente para saturá-la. As enzimas podem ser inibidas ou completamente inativas na presença de produtos químicos (metais pesados) ou inibidores naturais (LEHNINGER, 2005).

A origem das enzimas pode ocorrer por bactérias, fungos ou leveduras. Especificamente, as enzimas fibrolíticas exógenas podem ser classificadas com base em sua atividade específica como celulase, que hidrolisam a fibra da parede celular da planta em glicose, celobiose ou celooligossacarídeos com atividade combinada de três enzimas: endoglucanases, exoglucanases e glucosidases (ZHANG; LYND, 2004). A xilanase catalisa a hidrólise de ligações β -1,4-xilosídicas em xilano, que são constituintes da hemicelulose.

O grupo de enzimas com atividade xilanase inclui endoxilanases que atacam a cadeia principal de xilano e xilosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos em xilose (KAMBLE; JADHAV, 2012). Bactérias, fungos e leveduras têm sido identificados como adequados para produção de xilanases (KAMBLE; JADHAV, 2012). Os mais importantes produtores de xilanases são: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Fibrobacteres*, *Clostridia* e *Bacillus* (CAI et al., 2004). Comercialmente, são utilizadas cepas clássicas ou geneticamente modificadas para produzir as enzimas, sendo que os fungos filamentosos *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus niger* são os mais estudados em sistemas de produção industrial (PALOHEIMO et al., 2011).

Celulases são produzidas a partir de fungos e bactérias, com ênfase na utilização de fungos, devido a sua capacidade em produzir altas quantidades de enzima e por esse processo ser menos complexo do que a extração da celulase de origem bacteriana (SUJANI; SERESINHE, 2015). Com o aumento da tecnologia em microbiologia, o isolamento e a caracterização de novas celulases de origem bacteriana estão se tornando mais populares. Os procedimentos de extração das enzimas a partir de bactérias têm uma taxa de crescimento maior do que os fungos, assim as celulases bacterianas se encontram em complexos enzimáticos que proporcionam maior função e sinergia, ou seja, enzimas com maior capacidade de degradação do substrato (SUJANI; SERESINHE, 2015).

Aspergillus oryzae é o microrganismo mais utilizado na extração de enzima com atividade amilolítica (amilase) (TRICARICO et al., 2008), porém outros microrganismos podem ser utilizados para a produção de amilase, como *Bacillus licheniformis*, *Chromohalobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Haloarcula hispanica* e *Halomonas meridiana* (ROJO et al., 2005; PRAKASH et al., 2009). A amilase é a enzima que catalisa a quebra do amido em açúcares, sendo a primeira enzima descoberta e isolada por Anselme Payene em 1833, e todas as amilases são hidrolases glicosídicas que agem nas ligações α -1,4.

Para a fabricação industrial das enzimas exógenas são utilizados dois processos: fermentação em estado sólido e submersa (MURAD; AZZAZ, 2010). A fermentação em estado sólido é o cultivo de microrganismos em substratos úmidos e sólidos como o farelo de aveia, bagaço, palha e outros subprodutos, enquanto que a fermentação submersa utiliza substratos líquidos como melaço e caldo de carne (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Aproximadamente 90% das enzimas comerciais são produzidas pelo método de fermentação submersa, pois este permite melhor controle das condições durante o processo. Por outro lado, a fermentação em estado sólido cria contato firme com substrato insolúvel, atingindo uma maior concentração de substrato para a fermentação. No entanto, uma vez que a fermentação sólida envolve pouco líquido em comparação com a fermentação submersa, o primeiro método é teoricamente mais simples e menos custoso (SUJANI; SERESINHE, 2015). A fermentação submersa normalmente é a mais utilizada devido a alguns fatores, que incluem: 1) as bactérias apresentam maior taxa de crescimento do que os fungos, permitindo maior produção de enzimas recombinantes; 2) enzimas bacterianas são mais complexas e normalmente possuem maior atividade e sinergismo; e 3) bactérias habitam grande variedade de ambientes com diferentes temperaturas e pH (IMMANUEL et al., 2006). Os produtos enzimáticos são concentrados e purificados para assegurar que nenhuma célula viva, DNA geneticamente modificado ou resíduos indesejáveis da fermentação entrem no produto final (ADEOLA; COWIESON, 2011; MEALE et al., 2014).

Em meados de 1980 iniciou-se a adição de enzimas na alimentação animal, com investimentos nos setores de aves e suínos, sendo que os primeiros produtos enzimáticos eram demasiadamente caros. Com aumento da tecnologia, os complexos enzimáticos passam a ter mais eficiência, mas continua com alto custo de produção. O mercado de enzimas na alimentação animal teve um crescimento de cerca de 13% durante o período de 1998 a 2008. No entanto, a utilização comercial de enzimas na dieta de ruminantes é relativamente baixa, pela variabilidade de respostas observadas nos estudos, quantidade de produtos fornecidos no mercado e o seu modo de inclusão (TMR, concentrado, rúmen ou no processo de ensilagem) (ARRIOLA et al., 2017).

Os principais objetivos da utilização de enzimas exógenas na alimentação animal são incrementar o desempenho produtivo dos animais, aumentar a digestão e ingestão de nutrientes e melhorar a eficiência alimentar. Segundo alguns autores, muitos benefícios estão relacionados ao desempenho animal com a inclusão de enzimas exógenas (SELLE; RAVINDRAN, 2007):

- a) degradação das ligações específicas dos ingredientes que normalmente não são hidrolisadas por enzimas digestivas endógenas;
- b) destruição dos fatores anti-nutricionais que diminuem a digestão dos nutrientes;
- c) rompimento da parede celular e liberação de seus nutrientes;
- d) mudança no sítio de digestão para locais com maior eficiência de absorção de transformação de nutrientes em energia;
- e) redução das secreções endógenas e protéicas no intestino;
- f) alterações no perfil de microrganismos ao longo do intestino. As enzimas influenciam as quantidades e as formas dos substratos presentes no trato digestório, e tem impacto direto na população microbiana.

Segundo Beauchemin et al. (2003) as enzimas são mais efetivas quando aplicadas na forma líquida aos alimentos antes do consumo pelos animais. Os efeitos pré-ingestivos ajudam a remover as barreiras estruturais que limitam a digestão microbiana do alimento no rúmen, e causam liberação dos carboidratos solúveis. Outra justificativa para aplicação no alimento é aumentar sua estabilidade no rúmen, melhorando a ligação da enzima com substrato, o que pode aumentar a sua resistência a proteólise (BEAUCHEMIN et al., 2003).

A adição de enzimas exógenas à dieta aumenta a capacidade hidrolítica do rúmen principalmente devido ao aumento da taxa de fixação bacteriana, estimulação das populações microbianas do rúmen e efeitos sinérgicos com hidrolases de microrganismos ruminais (BEAUCHEMIN et al., 2003). Consequentemente, ocorre um aumento da atividade enzimática no rúmen, o que melhora a digestibilidade da dieta. Dessa forma, a melhoria na digestibilidade não se limita apenas ao nutriente específico em que a enzima exógena é aplicada. Em se tratando de enzimas fibrolíticas, o aumento da capacidade hidrolítica do rúmen também pode levar a um aumento na digestibilidade da fração de CNF, além de aumentar a digestibilidade da fibra.

O sinergismo entre enzimas exógenas e enzimas microbianas pode ser definido como efeito melhorado dessas duas entidades atuando de forma cooperativa (BEAUCHEMIN et al., 2003). O conceito de sinergia implica que a multiplicação de enzimas e a atividade enzimática total no rúmen são reforçadas pela adição de enzimas exógenas. O efeito líquido é o aumento da atividade enzimática que excede os efeitos aditivos de cada componente individualmente. Morgavi et al. (2000) demonstraram sinergismo entre enzimas exógenas e ruminais, onde enzimas *Trichoderma longibrachiatum* foram combinadas com enzimas ruminais extraídas de

bovinos que recebiam dieta com alto teor de fibra ou concentrado. A hidrólise da celulose solúvel e xilano aumentou em 35 e 100%, respectivamente. A quantificação dos monossacarídeos solubilizados individualmente revelou que o efeito sinérgico ocorreu entre atividades enzimáticas atacando o mesmo substrato no mesmo local de hidrólise, ou seja, a xilanase exógena não estimulou a liberação de glicose e a celulase exógena não estimulou a liberação de xilose quando combinada com enzimas endógenas ruminais (MORGAVI et al., 2000).

Hristov et al. (1998) administrou dois produtos enzimáticos (com atividade fibrolítica) através de cânula ruminal em vacas leiteiras, e reportaram um aumento da atividade celulolítica, 169 e 198%, xilanase 49 e 375% e β -glucanase de 61 e 107%, para os dois produtos, respectivamente. Existe uma limitação na capacidade de degradação da fibra pelas populações do rúmen, o que limita a digestibilidade desse nutriente. Em estudo conduzido por Wallace et al. (2001), a atividade da celulase limitou a taxa de fermentação no rúmen da silagem de milho e do capim. No mesmo estudo, houve um aumento da atividade enzimática no fluido ruminal e um aumento na digestão da forragem. É possível que o aumento da atividade enzimática devido ao sinergismo de enzimas exógenas e bacterianas do rúmen melhore a digestão da fibra.

O que tem sido discutido e pesquisado é o modo de aplicação das enzimas, diretamente na TMR, no momento da ensilagem, feno, concentrado ou no premix mineral. Beauchemin et al. (2003) relataram que as enzimas são mais efetivas quando aplicadas em alimentos com maior teor de umidade, como as silagens, em comparação com os alimentos secos. O teor de água na hidrólise de polímeros complexos para açúcares solúveis é um princípio bioquímico fundamental. No entanto, algumas enzimas exógenas são mais eficazes quando aplicadas na forma líquida em forragem seca em comparação com a forragem úmida (REDDY et al., 2016). Feng et al. (1996) não observaram efeitos na digestibilidade *in situ* e *in vitro* quando uma solução enzimática contendo xilanase e celulase foi aplicada diretamente na forragem fresca ou murcha. No entanto houve um aumento no consumo, digestibilidade da MS e da FDN quando a enzima fibrolítica foi aplicada no volumoso seco, antes da alimentação.

Hristov et al. (2008) relataram que a suplementação com complexo de enzimático contendo enzimas fibrolíticas e amilolíticas, na dose de 10 g/d em vacas leiteiras, não resultou em efeito na digestibilidade de nutrientes e nos parâmetros fermentativos. Em contraste, Giraldo et al. (2008) ao utilizar 12 g/dia de enzima fibrolítica aplicada diretamente no rúmen de ovinos, observaram aumento a atividade de endoglucanases e xilases do fluido ruminal.

Em meta-análise conduzida por Arriola et al. (2017), em que foi avaliado a forma (líquida ou sólida) e o método de aplicação (forragem, concentrado e TMR) de enzima fibrolítica na alimentação de vacas leiteiras, observou-se que a aplicação de enzima fibrolítica na TMR melhorou a concentração de proteína no leite sem afetar tais variáveis, quando a enzima foi aplicada exclusivamente no volumoso ou concentrado.

4.3.1 Enzimas fibrolíticas

As enzimas fibrolíticas são utilizadas na nutrição de ruminantes com objetivo de aumentar a degradação da fração indigestível da fibra, com sinergismo as enzimas endógenas do rúmen. Elas são essenciais pois estão envolvidas na hidrólise de alimentos complexos em suas moléculas orgânicas mais simples, como glicose, celobiose, xilose, aminoácidos e ácidos graxos, que então são utilizados pelos microrganismos do rúmen (KOZLOSKI, 2011).

As enzimas possuem função isoladamente, mas há quatro tipos de sinergia quanto às celulasas: 1) endo-exo sinergia entre endoglucanases e exoglucanases; 2) exo-exo sinergia entre exoglucanases; 3) sinergia entre exoglucanases e β -glucosidases, e 4) sinergia intramolecular entre os domínios catalíticos e de adesão à celulose (LYND et al., 2002). Quanto às hemicelulasas, são descritas dois tipos de ações sinérgicas: a homeosinergia e a heterosinergia, em que a primeira ocorre entre enzimas acessórias ou entre enzimas de cadeias principais, enquanto a segunda ocorre entre principais e acessórias (COUGHLAN et al., 1993).

A suposta ineficiência da microbiota ruminal em produzir enzimas para digerir a fração fibrosa das dietas, além de fatores intrínsecos ao alimento são as principais propostas para pesquisadores desenvolverem recursos que melhorem o perfil fermentativo do rúmen (KRAUSE et al., 2003). Estudos relatam melhorias no ganho médio diário (GMD) (MCALLISTER et al., 1999), aumento da digestibilidade da MS e FDN *in vitro* (ELWAKEEL et al., 2007) em resposta ao tratamento com enzimas fibrolíticas. Entretanto, alguns estudos não apresentaram resultados positivos similares com a utilização destas enzimas (KRUEGER; ADESOGAN, 2008).

A utilização de enzimas fibrolíticas na dieta de vacas leiteiras tem sido cada vez mais pesquisada, com melhora no desempenho dos animais e aumento da digestibilidade da fibra (SILVA et al. 2016; ARRIOLA et al., 2017).

Silva et al. (2016) observaram que a utilização de doses crescentes de enzima fibrolítica (0, 8, 16 e 24 g/dia de Fibrozyme™) na dieta de vacas leiteiras no meio de lactação

promoveu um aumento linear no consumo de MS, matéria orgânica e FDN, refletindo em um aumento linear de consumo de energia líquida e balanço de energia líquida, porém a adoção de enzima não afetou a digestibilidade, produção de leite e seus componentes.

Em estudo meta-analítico conduzido por Arriola et al. (2017), foram observadas melhorias na digestibilidade da MS e FDN e aumento na produção de leite, mas com variações em função das diferentes enzimas fibrolíticas utilizadas e da sua atividade enzimática.

Gandra et al. (2017) avaliaram a adição de enzima fibrolítica (Fibrozyme™; 20 g/dia) na dieta de novilhas da raça Jersey, alimentadas com silagem de milho e/ou cana-de-açúcar. A enzima não afetou o consumo de MS e nutrientes. Contudo, houve aumento da digestibilidade da MS com a utilização de enzima. Além disso, houve interação entre os efeitos de forragem e enzima sobre a digestibilidade da FDN, no qual, o efeito da enzima foi maior naquelas novilhas alimentadas com cana-de-açúcar.

Daniel et al. (2016) conduziram estudo utilizando silagem de Tifton 85 (*Cynodon spp*), cortada com quatro ou sete semanas de maturidade, com ou sem adição de enzima fibrolítica (celulase e xilanase; 2;33 g/kg da MS da mistura total (TMR)). Independente da maturidade da forragem, a aplicação da enzima não afetou o consumo de MS, a produção de leite, digestibilidade dos nutrientes e os parâmetros de fermentação ruminal, contudo, houve um aumento na concentração de lactose no leite (4,88 vs 4,81) quando adicionado enzima fibrolítica.

É clara a variabilidade de resultados encontrados na literatura, pois métodos de fornecimento, quantidades fornecidas e diferentes tipos de enzimas podem influenciar os resultados. Bowman et al. (2002) testaram o fornecimento de enzima fibrolítica das seguintes maneiras: 1) dieta controle (sem enzima); 2) enzima aplicada diretamente no concentrado (45% da dieta); 3) enzima aplicada no suplemento mineral (4% da dieta); e 4) enzima aplicada no núcleo mineral (0,2% da dieta). Os resultados mostraram que, quando a enzima foi fornecida no concentrado, a produção de leite aumentou devido ao aumento da digestibilidade da MS, sem afetar o consumo de MS. Todas as dietas com enzima aumentaram a digestibilidade da MO, FDN e FDA, mas, quando a enzima foi aplicada no núcleo mineral e não pelo concentrado (45% da dieta), não foi observado o mesmo aumento quando comparado à dieta controle.

4.3.2 Enzimas amilolíticas

O grau de digestibilidade do amido nos ingredientes pode variar de acordo com os níveis de amido resistente, tamanho do grânulo, composição e encapsulamento. Theurer (1986) afirma que dois dos principais fatores que afetam a degradação ruminal do amido são a fonte de grão de cereal e a forma de processamento. Alternativas são utilizadas para maximizar a digestibilidade da fonte energética. A inclusão de enzima amilolítica na dieta pode amenizar esses fatores, aumentando a digestibilidade ruminal do amido e utilização dos nutrientes pelo animal (BARLETTA, 2011).

A principal enzima amilolítica utilizada na nutrição animal é α -amilase, que hidrolisa rapidamente os polímeros de amido em oligômeros menores. Na hidrólise primária, os produtos acumulados são maltotriose e maltohexose. Além disso, α -amilase possui estabilidade térmica alta, permitindo um alto grau de sobrevivência após a quebra do alimento. Barletta (2011) relata que a inclusão de amilase exógenas na dieta de suínos jovens fornecem benefícios ao complementar o sistema digestivo imaturo, onde a baixa ingestão de alimento pós-desmame está associada a uma maturação lenta da secreção de α -amilase.

Pesquisas reportam melhorias na digestibilidade da dieta e desempenho produtivo em vacas leiteiras recebendo enzima amilolítica exógena. A suplementação de vacas leiteiras com α -amilase (*Aspergillus oryzae*) melhorou o desempenho produtivo (TRICARICO et al., 2005). Essas pesquisas reportaram que para a máxima produção de leite a dose utilizada foi de 240 unidade de dextrina (UD) kg de MS da dieta, com um aumento de 1,5 kg/dia em relação a não-suplementação (TRICARICO et al., 2008). As unidades de dextrina de alfa-amilase (DU) são definidas como gramas de amido solúvel dextrinizado por h.

Gencoglu et al. (2010) avaliaram a adição de enzima amilolítica (Novozyme RumiStar; DSM Nutritional Products, Basal, Suíça; Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) em dietas contendo nível médio (27,1) ou baixo (20,7 % MS) de amido com ou sem enzima, para vacas no início da lactação (51 ± 22 DEL). Na dieta com baixo amido e inclusão de enzima, houve redução no consumo de MS e de amido, sem afetar a produção e a composição do leite. Além disso, a adição de enzima na dieta com baixo amido reduziu a concentração de nitrogênio ureico no leite e aumentou a digestibilidade aparente total da MS, PB, FDN e amido, enquanto a dieta com nível médio de amido teve menor digestibilidade dos nutrientes. Klingerman et al. (2009) adicionaram dois produtos contendo enzima amilolítica em uma dieta contendo concentração média de amido (26% MS), e reportaram aumento no consumo de MS, digestibilidade da MS, MO e PB, e na produção de leite dos animais.

DeFrain et al. (2005) suplementaram vacas no período de transição (-21 a 21 dias em relação ao parto) com α -amilase (0,1 % da MS da dieta de AmaizeTM, Alltech Inc.) e não

observaram diferença na ingestão de MS e na produção e composição do leite dos animais. Foram realizadas coletas de líquido ruminal nos dias 21 e 7 antes do parto e 7 dias após o parto, quatro horas após a alimentação. Os parâmetros de fermentação ruminal não foram afetados com a suplementação de enzima amilolítica exógena, tanto no período pré-parto como no pós-parto.

Takiya et al. (2017) observaram que a utilização de doses crescentes de enzima amilolítica (0, 7,4, 14,45 e 21,95 g/dia de AmaizeTM, Alltech Inc.) na dieta de vacas leiteiras no meio da lactação, aumentou a digestibilidade da proteína bruta (PB) e tendeu a aumentar a digestibilidade da MS, sem afetar o consumo de MS e nutrientes e a produção e composição do leite. Não foi encontrado efeito na digestibilidade do amido e FDN e na concentração sérica de glicose.

Em outro estudo conduzido por Tricarico et al. (2005), os autores também utilizaram doses crescentes de *Aspergillus oryzae* α -amilase, 0, 240, 480, e 720 (UD/kg de MS da dieta), e encontraram aumento na produção de leite, gordura e proteína do leite. Houve efeito quadrático, onde a máxima PL foi obtida com a dose de 240 DU/kg de MS. As unidades de dextrinização de alfa-amilase (DU) são definidas como gramas de amido solúvel dextrinizado por hora.

São reportadas mudanças na concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) com aumento de acetato e butirato e redução da concentração molar de propionato em novilhos e vacas leiteiras (TRICARICO et al., 2008). A suplementação com α -amilase também aumentou a concentração molar de butirato em vacas no período de transição (DEFRAIN et al., 2005). O estudo de Seymour et al. (2005) reportam o aumento na concentração de butirato, seguido de propionato, que possui correlação positiva com o aumento da produção de leite.

Como descrito com as enzimas fibrolíticas, os resultados apresentados com a inclusão de α -amilase também são variáveis, principalmente devido a unidade utilizada do fornecimento da enzima em cada experimento e as diferentes doses testadas. Na maioria dos trabalhos há apenas efeitos isolados de cada enzima, sem inclusão de complexo enzimático com atividade fibrolítica e amilolítica. Em estudo conduzido por Hristov et al. (2008), ao avaliar os efeitos da suplementação de 10 g/d de complexo enzimático, contendo xilanase e α -amilase, para vacas leiteiras, os autores reportaram aumento na digestibilidade de MS, matéria orgânica e N, sem efeitos no consumo de nutrientes e parâmetros fermentativos. Contudo, os autores não avaliaram produção e composição do leite.

A contribuição de complexos com atividade amilolítica em suplementos com enzima fibrolítica ainda é pouco conhecida. O uso de enzima fibrolítica e amilolítica exógena pode melhorar a digestibilidade da fibra e a eficiência de utilização do alimento, assim como aumentar a digestibilidade do amido em vacas leiteiras de alta produção, que necessitam de maior aporte energético e melhor uso dos nutrientes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo seguiram os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, recomendados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), de acordo com o protocolo de nº 2388290517.

5.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 28 de setembro a 20 dezembro de 2016.

A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28'' de latitude sul, 47° 27' 21'' de longitude oeste e altitude de 635, com clima da região classificado como sub tropical (cwa).

Foram utilizadas 32 vacas da raça Holandesa, primíparas e multíparas, com $181,3 \pm 35,3$ (média $\pm$ DP) dias em lactação (DEL), $571 \pm 72,7$ kg de peso corporal (PC) e $29,6 \pm 5,24$ kg/d de produção de leite ao início do experimento. Dentre os 32 animais, oito vacas eram canuladas no rúmen e foram utilizados para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal. Os animais foram alojados em baias individuais de 17,5 m² de área, providas de cama de areia, ventilação forçada, cochos e bebedouros individuais.

5.2 DELINEAMENTO E DIETA EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em oito Quadrados Latinos 4×4, balanceados e contemporâneos, com períodos experimentais de 21 dias, sendo 14 de adaptação às dietas

experimentais e 7 para coletas de amostras e mensuração das variáveis. Os animais foram distribuídos em quadrados (blocos) com base na produção de leite, presença de cânula ruminal, dias em lactação e peso vivo ao início do experimento. Foi realizada a casualização restrita para as vacas canuladas no rúmen, de modo que fossem alocadas em apenas dois quadrados.

A dieta basal utilizada no presente estudo foi formulada, de modo a atender as exigências nutricionais de vacas em lactação com 580 kg de PC, produção média diária de 32,0 kg, com, 3,5% de gordura e 120 de DEL, conforme as recomendações do NRC (2001) (Tabela 1). A composição química dos alimentos utilizados na dieta está descrita na tabela 2.

As dietas experimentais diferiram quanto a inclusão de enzima fibrolítica e enzima amilolítica, configurando um arranjo de tratamentos em esquema fatorial 2×2. Os tratamentos foram obtidos pela combinação desses fatores, como segue: 1) Controle (CONT): dieta basal sem adição de enzimas exógenas; 2) Enzima fibrolítica (FIB): dieta basal com adição de 1 g/kg de Fibrozyme® no concentrado da dieta (51 UI de atividade xilanase/kg MS da dieta; Alltech, Nicholasville, KY, USA; batch#: 417990-2); 3) Enzima amilolítica (AMI): dieta basal com adição de 0,66 g/kg de Amaize™ no concentrado da dieta (203 FAU/kg MS da dieta; Alltech Nicholasville, KY, USA; batch: 432715-1); e 4) FIB+AMI: adição de 1 e 0,66 g/kg de Fibrozyme® e Amaize™. As enzimas foram aplicadas de modo a atenderem um consumo de 12 g/vaca/dia de Fibrozyme e 8 g/vaca/dia de Amaize, de acordo com as recomendações do fabricante.

Primeiramente o experimento *in vitro* foi conduzido pela empresa fornecedora dos produtos que testou diferentes doses de enzima fibrolítica e amilolítica (Fibrozyme® e Amaize™). Foram usados os mesmos alimentos do experimento (silagem de milho, milho moído, farelo de soja, grão de soja e polpa cítrica). As melhores doses foram aplicadas no presente estudo.

O produto Fibrozyme® é o conjunto de extratos isolados da fermentação do *Trichoderma longibarachiatu* (uma mistura de fermento inativo, levedura e extrato de yucca) com atividade xilanase mínima de 100 UI/g do produto. A enzima amilolítica (Amaize™) consiste em extrato fúngico de *Aspergillus oryzae* com atividade amilolítica conhecida (600 FAU/g de produto). Um FAU (*fungus amylase unit* ou unidade de amilase fúngica) é definida como a quantidade de amido solúvel que é dextrinizado na taxa de 1 g/h a 30°C e pH de 4,8 (FOOD CHEMICALS CODEX, 1996).

O volumoso utilizado foi a silagem de milho, que compôs 48% da MS da dieta. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, as 8:00 e as 13:00h, e os animais foram ordenhados as 6:00 e 16:00hs.

Tabela 1 - Composição percentual e bromatológica da dieta experimental.

Item	Dieta
<i>Composição, g/kg MS</i>	
Silagem de milho ¹	480
Milho moído	212
Farelo de soja	149
Polpa cítrica	67,3
Grão de soja cru integral	60,4
Premix mineral ²	12,6
Bicarbonato de sódio	8,55
Ureia	3,68
Calcário	3,09
Sal	3,31
<i>Composição química, g/kg MS</i>	
Matéria seca, g/kg MN	524
Matéria orgânica	928
Carboidratos não fibrosos ³	408
Fibra em detergente neutro	329
Amido	285
Fibra em detergente ácido	235
Proteína bruta	168
FDN ⁴	120
Matéria Mineral	72,3
Extrato etéreo	38,0
Lignina	37,7
PDIN ⁵	19,2
PIDA ⁶	16,0
Nutrientes digestíveis totais 1x ⁷	728
Energia líquida de lactação 3x ⁸	1,67
Separador de partículas (g/kg MN)	
> 19 mm	85,8
19 – 8 mm	366,2
8 – 4 mm	182,3
< 4 mm	334,3

¹Cada kg contém: 205 g de Ca; 60 g de P; 35 g de K; 70 g de Na; 20 g de S; 20 g de Mg; 2500 mg de Zn; 1600 mg de Mn; 700 mg de Cu; 700 mg de Fe; 40 mg de I; 19 mg de Se; 10 mg de Cr; 200000 UI de Vitamina A, 50000 UI de Vitamina D, e 1500 UI de Vitamina E.

²g/kg de matéria natural. Tratamentos: 12 g/dia Fibrozyme® (Alltech Inc., Nicholasville, KY, EUA); 8 g/dia Amaize® (Alltech Inc.).

³Carboidratos não fibrosos = 1000 – [(PB - NIDN) + extrato etéreo + cinzas + FDN], todos os valores expressos em g/kg.

⁴Fibra em detergente neutro indigestível

⁵Proteína indigestível em detergente neutro

⁶Proteína indigestível em detergente ácido

⁷Estimado ao nível da manutenção do consumo, de acordo com NRC (2001).

⁸Estimado em três vezes ao nível da manutenção (Mcal/kg de MS), de acordo com NRC (2001).

Tabela 2– Composição química dos ingredientes da dieta basal utilizada no experimento (g/kg da MS).

Item	Ingredientes				
	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja	Grão de soja	Polpa cítrica
Matéria seca (g/kg matéria natural)	364	871	885	915	890
Matéria orgânica	955	976	933	948	928
Carboidratos não fibrosos ¹	356	725	236	131	597
Amido	216	714	108	97	125
Fibra em detergente neutro	510	120	173	256	260
Fibra em detergente ácido	351	58,8	131	220	307
FDNi ²	227	25,0	17,0	16,0	33,0
Lignina	69,4	9,30	6,40	7,80	14,6
Proteína insolúvel em detergente neutro	13,0	17,6	37,8	34,0	23,0
Proteína insolúvel em detergente ácido	10,1	15,5	33,3	32,2	14,4
Proteína bruta	78,0	104	542	379	75,0
Matéria Mineral	45,3	24,0	66,9	51,4	72,1
Extrato Etéreo	23,1	43,7	19,2	217	18,7
Nutrientes digestíveis totais 1x ³	651	870	794	1003	742
Energia líquida de lactação 3x ⁴	1,48	2,01	1,82	2,41	1,70

¹CNF = 1000 – [(PB - NIDN) + extrato etéreo + cinzas + FDN], todos os valores são expressos em g/kg.

²Fibra em detergente neutro indigestível

³Estimativa de manutenção ao nível de consumo, de acordo com NRC (2001).

⁴Estimado em três vezes ao nível da manutenção (Mcal/kg de MS), de acordo com NRC (2001).

5.3 CONSUMO, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para a determinação do consumo, todos os dias de manhã (6:00) as sobras foram recolhidas e pesadas, e o fornecimento de alimentos foi calculado para prover 105 a 110% do consumido do dia anterior para que não houvesse inibição do consumo. Nos últimos sete dias de cada período experimental, foram coletadas amostras diárias da silagem de milho e das sobras. Ao final de cada período experimental, estas amostras compuseram uma amostra composta de cada animal, que foi congelada para posteriores análises bromatológicas. Alimentos que compunham o concentrado foram coletados na fábrica de ração, ao início do período de coletas.

Amostras de TMR e sobras foram coletadas nos dias 16 e 17 de cada período experimental e foi realizada a análise de distribuição de partículas, usando o sistema de separação de partículas (Penn State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI, USA), composto por quatro peneiras ($P1 \geq 19$, $P2 \geq 8$, $P3 \geq 4$ e $P4 < 4$ mm). O índice de seleção foi calculado como o consumo observado pelos animais correspondentes a cada peneira ($P1$ a $P4$) expresso em porcentagem do consumo esperado, onde o consumo esperado da fração da peneira x foi calculado como o quociente entre a matéria natural ingerida e a proporção da TMR retida na peneira x , de acordo com as seguintes equações:

$$(1) \text{ Consumo esperado } \left(\frac{kg}{d} \right) = \text{ consumo } \left(\frac{kg}{d} \right) \times P_{xTMR} \left(\frac{kg}{kg} \right)$$

$$(2) \text{ Consumo observado } \left(\frac{kg}{d} \right) = \left[\text{ oferta } \left(\frac{kg}{d} \right) \times P_{xTMR} \left(\frac{kg}{kg} \right) \right] - \left[\text{ sobras } \left(\frac{kg}{d} \right) \times P_{xSobras} \left(\frac{kg}{kg} \right) \right]$$

$$(3) \text{ Índice de seleção } = \left(\frac{\text{ consumo observado } \left(\frac{kg}{d} \right)}{\text{ consumo predito } \left(\frac{kg}{d} \right)} \right)$$

Amostras de fezes de cada vaca foram coletadas diretamente do reto à cada 9 horas, à partir das 6:00 do dia 17 até as 21:00 hs do dia 19, representando uma coleta a cada 3 horas em um período de 24 horas. As amostras foram congeladas, e ao final de cada período experimental, homogeneizadas a fim de se obter uma amostra composta por animal em cada período.

Alimentos, sobras e fezes foram pré-secos em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72h e, moídos em moinho de facas com peneiras de 2 e 1 mm (MA340, Marconi, Piracicaba, Brasil). Alimentos, sobras e fezes (processadas a 1 mm) foram analisados quanto ao teor de MS (método 930.15; AOAC, 2000), PB ($N \times 6.25$; Kjeldahl método 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE, método 920.39; AOAC, 2000), FDA e lignina (método 973.18; AOAC, 2000), cinzas (método 942.05; AOAC, 2000) e FDN usando α -amylase (UNDERSANDER et al., 1992) sem adição de sulfito de sódio (TE – 149 analisador de fibra, Equipamento Tecnal Inc., Piracicaba, Brasil). O teor de amido foi determinado por degradação enzimática (Amyloglucosidase® AMG 300L, Novozymes, Basal, Sweden) do amido e a leitura das concentrações de glicose foram realizadas em espectrofotômetro (SBA 200, CELM®) como descrito por Hendrix (1993). Os carboidratos não fibrosos foram calculados como proposto por Hall (2000), em que:

$$CNF \left(\frac{g}{kg} \right) = 100 - [((PB - NIDN) + EE + MM + FDN)]$$

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo Weiss (1999), conforme a metodologia descrita no NRC (2001), onde CNFd, PBd, EEd e FDNd representam o total destes nutrientes digestíveis:

$$NDT = CNFd + PBd + (EEd \times 2,25) + FDNd - 7$$

O teor de energia líquida (EL) ao nível de consumo de 3 mantenças foi estimado através da equação estabelecida pelo NRC (2001), em que:

$$EL_{3x} \left(\frac{Mcal}{kg} \right) = 0,0245 \times NDT(\%) - 0,12$$

Para a quantificação da excreção fecal e determinação da digestibilidade aparente total, foi utilizada a fibra em detergente neutro (FDNi) como indicador interno. Amostras de alimentos, sobras e fezes (processadas a 2 mm) foram pesadas e acondicionadas em sacos de tecido não tecido (TNT) (CASALI et al., 2008) e incubadas no rúmen de duas vacas Holandesas, por 288 h, de acordo com Huhtanen et al. (1994). Após a remoção das amostras, os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento da água. Foi determinado o teor de FDN, conforme descrito anteriormente, para obtenção das concentrações de FDNi. O FDNi foi utilizado para estimar a excreção fecal (EF), conforme a equação:

$$EF \left(\frac{kg}{dia} \right) = \frac{FDN_{i_{ingerido}} \left(\frac{g}{dia} \right)}{FDN_{i_{fezes}} \left(\frac{g}{kg} \right)}$$

A digestibilidade aparente total (DAT g/kg) da MS, MO, PB, EE, FDN e amido foi calculado usando a excreção fecal (EF, kg/d) e a ingestão do nutriente correspondente (IN, kg/d):

$$DAT \left(\frac{g}{kg} \right) = \left(\frac{IN \left(\frac{g}{d} \right) - EF \left(\frac{g}{d} \right)}{IN \left(\frac{kg}{d} \right)} \right)$$

5.4 FERMENTAÇÃO RUMINAL

No 20º dia do período experimental, amostras de digesta ruminal das oito vacas canuladas foram coletadas de diferentes regiões do rúmen (saco cranial, dorsal, ventral, caudodorsal e caudoventral), em intervalos de 2 h, iniciando antes da alimentação da manhã (tempo zero) e se estendendo por dezesseis horas. Imediatamente após a coleta, o líquido ruminal foi obtido por pano dessorador e o pH foi mensurado em pHmetro digital (MB-10®, Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brazil).

Amostras de 50 mL de líquido ruminal foram centrifugadas a $7,000 \times g$ por 15 minutos, e 0,8 mL do sobrenadante foi retirado e homogeneizado a 0,4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1N) para determinação de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$). Outra amostra de 1,6 mL foi misturada a 0,4 mL de ácido fórmico (H_2CO_2 P.A.) para análise de AGCC. Ambas as amostras foram congeladas para posteriores análises.

O nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG, 1980). Foi adicionado aos tubos, contendo amostra de líquido ruminal e ácido sulfúrico, 1 mL de tungstato de sódio 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a $1,200 \times g$ durante 15 minutos. Em seguida foi pipetado 25 μL do sobrenadante em tubo limpo, neste adicionado 5 mL de reagente fenol e 5 mL de hipoclorito. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos, adquirindo coloração azul. Após o resfriamento as amostras foram analisadas em leitor de microplaca (Biochrom Asys UVM 340 Microplate Reader, Biochrom, Cambrigde, Reino Unido).

As concentrações de AGCC no líquido ruminal foram analisadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” da Universidade de São Paulo, usando cromatógrafo a gás (Agilent 7890A) equipado com flame ionization detector (7683B) e uma coluna capilar de sílica (J & W 19091 F-112, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), com 25 m largura e 320 μm de diâmetro interno, contendo 0,20 μM cyanopropyl polysiloxane. As concentrações de AGCC foram calculados utilizando o ChemStation software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

5.5 SÍNTESE DE NITROGÊNIO MICROBIANO E UTILIZAÇÃO DO NITROGÊNIO

As análises para determinação de síntese microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ-USP). A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada a partir dos derivados de purinas (DP) na urina e no leite, de acordo com a metodologia descrita por Chen e Gomes

(1992), considerando-se a absorção de purinas a partir da fórmula sugerida por Verbic et al. (1990).

Amostras *spot* de 100 mL de urina foram coletadas de todas as vacas a cada 9 h, por micção estimulada por massagem de vulva, nos dias 17, 18 e 19 de cada período experimental. Logo após todas as coletas, foi realizado o processamento, em que 20 mL de urina foram diluídas em 80 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,036N), para evitar a destruição bacteriana dos DP e precipitação de ácido úrico. Para determinação do volume urinário, DP e balanço de N, foi analisado o teor creatinina, ácido úrico, alantoína e nitrogênio total.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Bioclin®), utilizando aparelho SBA-200 (CELM®). O volume total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina, calculadas a partir do peso vivo, pelas concentrações de creatinina na urina (OLIVEIRA et al., 2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária de 24,05 mg/kg de PV para vacas leiteiras (CHIZZOTTI, 2008). Dessa forma, com o padrão da excreção diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina foi estimado o volume total diário de urina, em L/vaca/dia. A concentração de ácido úrico na urina foi determinada por kit colorimétrico comercial (ácido úrico: cat. no. K-052, Bioclin) em aparelho espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM). As concentrações de alantoína na urina foi determinada por método colorimétrico, conforme a metodologia de Fujihara et al. (1987) descrita por Chen e Gomes (1992), utilizando um leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH). A excreção de alantoína no leite foi considerada para o cálculo da excreção de DP. No dia 16º de cada período, foram coletadas amostras de leite proporcionais à produção das ordenhas da manhã e tarde, e estas amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético (25%, v:v) filtradas em papel filtro e analisadas quanto às concentrações de alantoína, conforme a metodologia já descrita.

A excreção total dos DP foi calculada pela soma do ácido úrico excretado na urina e com a alantoína excretada na urina e no leite, ambos expressos em mmol/dia. As purinas absorvidas (Pabs; mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de DP (DP, mmol/dia), por meio da equação encontradas por González-Ronquillo et al. (2003):

$$Pabs \left(\frac{\text{mmol}}{\text{d}} \right) = 0,70 \times DP \left(\frac{\text{mmol}}{\text{d}} \right) + 0,512 \times PV(kg)^{0,75}$$

A síntese de nitrogênio microbiano (N_{micro}; g N/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (Pabs; mmol/dia), por meio da equação (CHEN; GOMES, 1992):

$$N_{micro} = (70 \times Pabs) / (0,83 \times 0,116 \times 1,000)$$

em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 o coeficiente de digestibilidade intestinal das purinas microbianas, e 0,116 a relação de N nas purinas do total de N nas bactérias (CHEN; GOMES, 1992).

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de PB multiplicado pelo valor de conversão de nitrogênio de 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de PB nas fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio. O nitrogênio total nas amostras de urina foi determinado de acordo com as metodologias descritas pelo AOAC (2000) ($N \times 6,25$; 984.13) segundo o método semi-micro Kjeldahl, onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras de urina pelo fator de 6,25. Para as amostras de leite, a PB foi obtida por análise do Lactoscan, e dividido pelo fator de 6,38, para determinação do N.

O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo do consumo de nitrogênio (g/d), o nitrogênio excretado na urina e fezes, assim como o secretado no leite. Ainda, Os resultados do consumo e excreção de nitrogênio foram apresentados em g/dia e em proporção (g/g) do nitrogênio total consumido.

5.6 BALANÇO DE ENERGIA

Para obtenção do consumo de energia bruta e balanço de energia, todos os cálculos foram realizados de acordo com as equações do NRC (2001). Para o cálculo do consumo de energia bruta (CEB) foi considerado o consumo de PB (CPB), CNF (CCNF), FDN (CFDN) e EE (CEE), de acordo com a seguinte equação:

$$CEB \left(\frac{Mcal}{dia} \right) = (CPB \times 5,6) + (CCNF + CFDN) \times 4,2 + (CEE \times 9,4)$$

O consumo de energia digestível foi calculado de acordo com a digestibilidade dos nutrientes e o consumo de nutrientes:

$$CED \left(\frac{Mcal}{dia} \right) = ((CPB \times DPB \times 5,6) + (CFDN \times DFND \times 4,2) + (CCNF \times DAMIDO \times 4,2) + (CEE \times DEE \times 9,4))/100$$

A energia metabolizável foi estimada a partir do teor de ED e de EE da dieta consumida:

$$EM \left(\frac{Mcal}{kg} \right) = \left(1,01 \times \left(\frac{CED}{CMS} \right) - 0,45 \right) + 0,0046 \times \left(\frac{CEE}{CMS} - 3 \right)$$

em que : CED = consumo energia digestível (Mcal/dia); CMS = consumo de MS (kg/dia) e CEE = consumo de EE.

Para o cálculo de energia líquida de lactação foram considerado os teores de EM e EE da dieta consumida:

$$ELl \left(\frac{Mcal}{kg} \right) = 0,703 \times EM - 0,19 + \left(0,097 \times EM + \frac{0,19}{97} \right) \times (EE - 3)$$

O consumo de energia líquida foi obtido multiplicando-se a ELl (Mcal/kg) pelo consumo de matéria seca.

A exigência de energia líquida para produção de leite (ELp) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$ELp \left(\frac{Mcal}{dia} \right) = PL \left(\frac{kg}{dia} \right) \times (0,0929 \times G + 0,0547 \times PB + 0,0395 \times L)$$

onde: G é o teor de gordura no leite; PB o teor de proteína no leite e L é o teor de lactose, todos expressos em porcentagem.

A energia líquida de manutenção (ELm) foi estimada de acordo com a seguinte equação:

$$ELm \left(\frac{Mcal}{kg} \right) = 0,08 \times PV^{0,75}$$

em que o PV foi mensurado com balança digital, ao início do período experimental (dias 6 e 7) e no final (dias 21 e 22), e a média obtida foi utilizada para os cálculos.

O balanço de energia foi obtido pela diferença entre o consumo de ELl e a soma entre ELp e ELm.

5.7 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

Foram realizadas coletas de sangue de todos os animais no 16º dia de cada período experimental, 4 horas após a alimentação matinal, por punção da veia/artéria Coccígena. As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (10 mL, Vacutainer®) e imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas a $2,400 \times g$ por 15 minutos. O soro obtido foi transferido para Eppendorf e armazenado a $-20^{\circ}C$ para posterior análise.

Foram analisadas as concentrações sanguíneas de glicose, ureia, colesterol total, enzimas AST e GGT. As análises laboratoriais foram realizadas por meio de kits colorimétricos comerciais (glicose: cat. no. K-082; ureia: cat. no. K-056; colesterol total: cat. n. K-083; AST: cat. n. K-048; e GGT: cat. n. K-080, Bioclin®), utilizando aparelho semiautomático para bioquímica sanguínea (SBA-200). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ-USP).

5.8 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia (6:00 e 16:00), em sistema de ordenha duplo-oito DeLaval® acoplada ao sistema Alpro (DeLaval®). A produção foi mensurada diariamente durante todo o período experimental, no entanto, apenas as produções dos últimos sete dias de cada período experimental foram consideradas nas análises estatísticas. Nos dias 15º, 16º e 17º foram coletadas amostras de leite para análise de composição, compreendendo amostras proporcionais das duas ordenhas (manhã e tarde).

As amostras da ordenha da manhã foram acondicionadas em garrafas plásticas e mantidas entre 2 e 6 °C. Os teores de gordura, proteína e lactose no leite foram determinados por equipamento LACTOSCAN®, logo após a ordenha da tarde. Para determinação do teor de ureia no leite, no dia 16º de cada período experimental, as amostras de leite foram desproteinizadas, como já descrito anteriormente. A análise da concentração de ureia foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ-USP), por meio de kits comerciais (Bioclin® cat. no. K-056) e a leitura foi feita no espectrofotômetro semiautomático (SBA 200).

A produção de leite foi corrigida (PLC) para 3,5% de gordura, de acordo com a equação descrita por Sklan et al. (1992):

$$PLC = (0,432 + 0,163 \times G\%) \times PL$$

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os dados de consumo, digestibilidade, síntese de N microbiano e balanço de N, balanço de energia, metabólicos sanguíneos, produção e composição do leite foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.3) com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + v_{j:i} + P_k + F_l + A_m + F \times A_{lm} + e_{ijklm}$$

em que: Y_{ijklm} = variável dependente em estudo; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quadrado ($i = 1$ à 8); $v_{j:i}$ = efeito aleatório de animal dentro de quadrado ($j = 1$ à 32); P_k = efeito fixo de período ($k = 1$ à 4); F_l = efeito fixo de enzima fibrolítica ($l = 1$ e 2); A_m = efeito fixo de enzima amilolítica ($m = 1$ e 2); $F \times A_{lm}$ = interação entre enzima fibrolítica e amilolítica; e_{ijklm} = erro residual.

Os dados de fermentação ruminal (pH, N-NH₃ e AGCC) foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.3) de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklmn} = \mu + Q_i + v_{j:i} + P_k + F_l + A_m + F \times A_{lm} + \omega_{ijklm} + T_n + T \times F_{nl} + T \times A_{nm} + T \times F \times A_{nlm} + e_{ijklmn}$$

com $v_{j:i} \approx N(0; \sigma_v^2)$, $\omega_{ijklm} \approx N(0; \sigma_\omega^2)$ e $e_{ijklmn} \approx MVN(0; R)$; em que: Y_{ijklmn} = variável dependente em estudo; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quadrado ($i = 1$ à 2); $v_{j:i}$ = efeito aleatório de vaca dentro de quadrado ($j = 1$ à 8); P_k = efeito fixo de período ($k = 1$ à 4); F_l = efeito fixo de enzima fibrolítica ($l = 1$ e 2); A_m = efeito fixo de enzima amilolítica ($m = 1$ e 2); $F \times A_{lm}$ = efeito fixo da interação entre enzima fibrolítica e amilolítica; ω_{ijklm} = erro associado as unidades experimentais (vaca em cada período); T_n = efeito fixo de tempo ($n = 1$ à 19); $T \times F_{nk}$; $T \times A_{nl}$ e $T \times A \times F_{nkl}$ são = efeitos fixos de interação; e_{ijklmn} = erro residual; N indica a distribuição normal Gauseane; σ_v^2 = variância associado ao animal (vaca); σ_ω^2 = variância associado ao efeito unidade experimental (vaca dentro de cada período); MVU = multivariada normal e R é a matriz de covariância do resíduo. Foram testadas nove matrizes de variância e covariância (CS, CSH, AR (1), ARH(1), TOEP, TOEPH, UN, FA(1) e ANTE(1)) o critério de escolha de cada matriz foi definido pelo menor valor de AICC, conforme a metodologia de Akaike. As médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS e quando foi observado efeito de interação entre $F \times A$ o teste de médias de diferença mínima significativa de Fisher foi utilizado para a comparação das médias dos tratamentos. Foi considerado significativo quando $P \leq 0,05$ e diferenças entre 0,05 e 0,10 foram considerados como tendência.

6 RESULTADOS

6.1 CONSUMO, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Adição de enzimas exógenas não afetou ($P \geq 0,111$; Tabela 3) o consumo de MS, MO, PB, EE, CNF, FDN e amido. Também não foram observadas diferenças ($P \geq 0,432$) no consumo de MS e FDN expressos em porcentagem do peso vivo. Apesar de não ocorrer nenhum efeito de enzima sobre o consumo de MS e nutrientes, houve interação ($P \leq 0,024$) entre os efeitos de enzima fibrolítica e amilolítica sobre o consumo de partículas entre 19 e 8 mm. Nas dietas sem inclusão de enzima fibrolítica, o uso da enzima amilolítica aumentou (P

$\leq 0,05$) o consumo de partículas entre 19 e 8 mm. Além disso, adição de enzima amilolítica reduziu ($P = 0,031$) o consumo de partículas longas (≥ 19 mm).

Tabela 3– Consumo de nutrientes e índice de seleção de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

(continua)								
Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Consumo, kg/dia								
Matéria seca	23,8	23,5	23,7	23,7	0,24	0,338	0,786	0,406
(conclusão)								
Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Matéria orgânica	22,5	22,2	22,4	22,4	0,23	0,356	0,754	0,398
CNF ³	10,5	10,3	10,4	10,4	0,11	0,515	0,997	0,111
FDN ⁴	7,39	7,31	7,41	7,31	0,078	0,143	0,849	0,852
Amido	6,95	6,86	6,91	6,96	0,070	0,745	0,633	0,212
Proteína bruta	4,14	4,09	4,12	4,14	0,041	0,604	0,717	0,275
EE ⁵	0,932	0,914	0,925	0,932	0,0093	0,477	0,489	0,131
Consumo, % PV								
Matéria seca	4,09	4,10	4,10	4,10	0,032	0,764	0,790	0,975
FDN ⁴	1,27	1,27	1,28	1,26	0,010	0,832	0,969	0,432
Índice de seleção								
> 19 mm	0,834	0,867	0,825	0,819	0,0095	0,276	0,031	0,137
19 - 8 mm	0,983 ^b	0,986 ^{ab}	0,990 ^a	0,983 ^b	0,0012	0,284	0,367	0,024
8 - 4 mm	1,01	1,01	1,01	1,01	0,001	0,434	0,113	0,959
< 4 mm	1,04	1,04	1,04	1,05	0,0012	0,164	0,557	0,404

^{a-b}Médias na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ($P \leq 0,05$).

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nichollasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0.66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

³CNF: Carboidratos não fibrosos.

⁴FDN: Fibra em detergente neutro.

⁵EE: Extrato etéreo.

Quanto aos resultados de digestibilidade, não foram encontrados efeitos ($P \geq 0,186$) da adição de enzimas exógenas sobre a digestibilidade da MS e nutrientes.

Tabela 4 – Digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	<i>P</i> ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Digestibilidade aparente, g/kg								

Matéria seca	651	654	652	656	3,0	0,519	0,742	0,999
Matéria orgânica	663	668	665	668	3,2	0,533	0,836	0,879
FDN ³	396	394	396	397	4,9	0,936	0,890	0,880
Proteína bruta	689	693	696	699	3,3	0,551	0,294	0,889
EE ⁴	801	797	810	803	5,7	0,609	0,529	0,901
Amido	930	938	931	931	1,6	0,273	0,380	0,186

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nichollasville, KY) 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0.66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

³FDN: Fibra em detergente neutro.

⁴EE: Extrato etéreo.

6.2 FERMENTAÇÃO RUMINAL

A inclusão de enzimas exógenas não afetou ($P \geq 0,112$; tabela 5) o pH ruminal e as concentrações de N-NH₃ acetato, propionato, AGCC total e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR). Houve uma interação ($P = 0,043$) entre enzima fibrolítica e amilolítica sobre a concentração de butirato (Figura 5). A adição de enzima amilolítica aumentou ($P \leq 0,05$) a concentração de butirato nos animais suplementados com enzima fibrolítica. Contudo, não houve efeito ($P > 0,05$) de enzima fibrolítica sobre a concentração de butirato nos animais, independentemente da adição de enzima amilolítica. Não houve efeito ($P \geq 0,155$) das enzimas exógenas sobre a relação acetato:propionato.

Tabela 5 – Fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²			
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A	Tempo
pH	6,06	6,07	6,06	6,02	0,033	0,589	0,488	0,536	<0,001
N-NH ₃ , mg/dL	18,7	19,1	19,7	20,4	0,45	0,112	0,439	0,827	<0,001
Ácidos graxos, mM/100Mm									
Acetato	54,3	53,8	54,5	54,3	0,29	0,409	0,369	0,865	<0,001
Propionato	23,5	23,8	22,7	23,7	0,31	0,260	0,437	0,589	<0,001
Iso-Butirato	1,03	1,03	1,00	1,03	0,014	0,532	0,469	0,480	<0,001
Butirato	16,4 ^b	16,9 ^{ab}	17,6 ^a	16,9 ^{ab}	0,26	0,846	0,094	0,043	0,0003
Iso-Valerato	2,30	2,17	2,27	2,19	0,044	0,919	0,138	0,716	<0,001
Valerato	1,94	1,91	1,94	1,94	0,016	0,361	0,464	0,516	<0,001
Total AGCR ³	5,27	5,1	5,21	5,16	0,049	0,990	0,295	0,584	<0,001
Total AGCC ⁴	94,7	94,9	94,8	94,9	0,05	0,946	0,278	0,744	<0,001
Acetato:Propionato	2,28	2,44	2,29	2,56	0,035	0,404	0,155	0,332	<0,001
Ácidos graxos, mmol/L									
Acetato	51,5	51,7	51,1	51,5	0,26	0,314	0,330	0,751	<0,001
Propionato	22,3	21,5	22,6	22,5	0,30	0,268	0,476	0,605	<0,001
Iso-Butirato	0,973	0,975	0,951	0,976	0,0130	0,522	0,415	0,489	<0,001
Butirato	15,5 ^b	16,7 ^{ab}	16,1 ^a	16,0 ^{ab}	0,24	0,842	0,077	0,038	0,0001
Iso-Valerato	2,17	2,06	2,15	2,07	0,041	0,924	0,139	0,718	<0,001
Valerato	1,83	1,81	1,84	1,84	0,015	0,348	0,522	0,526	<0,001

^{a,b}Médias na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ($P \leq 0,05$).

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nichollasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0.66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo.

³Ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR).

⁴Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Figura 2 - pH ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzima fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

Figura 3 - Concentração ruminal de N amoniacal (N-NH₃) de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzima fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

Figura 4 - Concentração ruminal de acetato de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzimas fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

Figura 5 - Concentração ruminal de propionato de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzima fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

Figura 6 - Concentração ruminal de butirato de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzima fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

Figura 7 - Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta total de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzima fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

Figura 8 - Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia ramificada de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Tratamentos: Controle (—◆—); Enzima fibrolítica (—■—); Enzima amilolítica (—▲—); Enzima fibrolítica e amilolítica (—●—); horário de fornecimento da alimentação (↑). FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação; T: efeito de tempo; FIB×AMI×Tempo: efeito de interação entre enzima fibrolítica, amilolítica e tempo.

6.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA E BALANÇO DE NITROGÊNIO

Na tabela 6 são apresentados os dados de excreção urinária, derivados de purinas e síntese de proteína microbiana. A inclusão de enzimas exógenas não afetou ($P \geq 0,186$) o volume urinário e nem a excreção de alantoína e ácido úrico na urina e no leite. Como não houve efeito ($P \geq 0,166$) na excreção dos derivados purinas, também não houve diferenças ($P \geq 0,530$) na síntese de N e proteína microbiana. A eficiência de síntese de proteína microbiana (PB microbiana (g/kg MOD)) não apresentou diferenças ($P \geq 0,112$) quando os animais foram suplementados com dietas contendo enzima fibrolítica e/ou amilolítica.

Tabela 6 – Excreção urinária e síntese de proteína microbiana de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	(continua) P^2		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Excreção urinária, L/dia	14,9	14,9	14,6	14,5	0,41	0,951	0,568	0,931
Alantoína, mmol/dia								
Urina	206	197	202	190	4,8	0,186	0,481	0,833
Leite	1,63	1,74	1,85	1,88	0,117	0,755	0,422	0,873

Item	Tratamentos ¹				EPM	(conclusão) <i>P</i> ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Ácido úrico, mmol/dia	36,8	34,8	36,8	35,9	1,47	0,583	0,836	0,824
DP ³ , mmol/dia	244	228	237	229	5,2	0,166	0,708	0,643
Relação Ala:DP, %	85,5	85,2	84,7	84,5	0,44	0,679	0,302	0,958
Purinas endogênas, mmol/dia	60,6	60,4	60,6	60,4	0,44	0,111	0,680	0,693
Purinas absorvidas, mmol/dia	263	243	264	240	7,2	0,086	0,939	0,877
N microbiano, g/dia	194	177	192	174	5,2	0,540	0,786	0,974
PB microbiana, kg/dia	1,22	1,10	1,20	1,09	0,032	0,530	0,794	0,984
Relação Ala:Creatinina	22,9	21,9	21,3	20,5	1,01	0,545	0,325	0,939
Efic. microbiana, g/kg MOD ⁴	95,1	89,1	95,0	83,9	2,73	0,112	0,623	0,626

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nichollasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0.66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

³DP: derivados purinas.

⁴Eficiência de síntese de proteína microbiana (PB microbiana (g/kg MOD))

Quanto ao consumo de N não foi observado efeito ($P = 0,275$; Tabela 7) da adição de enzima fibrolítica e/ou amilolítica; também não houve diferença ($P \geq 0,106$) na excreção de N na urina e leite. Houve tendência de interação ($P = 0,082$) entre os efeitos de enzima fibrolítica e amilolítica na excreção de N nas fezes. Para a relação entre a secreção de N no leite e o consumo (g/g do consumo de N), que pode ser considerada a eficiência bruta de utilização do nitrogênio, houve uma tendência de interação ($P = 0,094$) entre as enzimas fibrolítica e amilolítica. A enzima fibrolítica reduziu ($P \leq 0,05$) a excreção de N no leite nos animais não tratados com enzima amilolítica. Independente da inclusão de enzima fibrolítica, a enzima amilolítica reduziu ($P = 0,044$) a excreção de N na urina. Independente da inclusão de enzima fibrolítica, a enzima amilolítica aumentou ($P < 0,05$) a excreção de N nas fezes. A excreção fecal em relação ao consumo de N não foi alterada ($P \geq 0,279$) pela inclusão de enzimas exógenas. Apesar das mudanças na excreção de N na urina e no leite, não foram observados efeitos ($P \geq 0,194$) sobre o balanço de nitrogênio.

Tabela 7 – Balanço de nitrogênio de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
N (g/dia)								
Consumo	661	654	661	661	6,6	0,604	0,717	0,275
Fezes	240 ^{ab}	245 ^{ab}	250 ^a	236 ^b	4,5	0,430	0,945	0,082
Urina	144	138	133	134	2,8	0,653	0,176	0,640
Leite	145	140	141	141	1,6	0,106	0,124	0,117
Balanço N	134	132	139	144	4,1	0,818	0,324	0,701
N (g/g consumo N)								
Fezes	0,369	0,373	0,374	0,361	0,0046	0,584	0,662	0,279
Urina	0,228	0,212	0,203	0,200	0,0045	0,322	0,044	0,431
Leite	0,221 ^a	0,213 ^b	0,214 ^b	0,214 ^b	0,0020	0,046	0,157	0,094
Balanço	0,192	0,201	0,210	0,218	0,0064	0,513	0,194	0,957

^{a,b}Médias na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ($P \leq 0,05$).

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nicholasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0.66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

6.4 BALANÇO DE ENERGIA

A inclusão de enzimas exógenas na dieta não afetou ($P \geq 0,133$) o consumo de energia bruta, digestível, metabolizável e líquida. Além disso, não houve efeito ($P \geq 0,100$) das enzimas sobre a exigência de energia líquida de lactação e de manutenção dos animais. A adição de enzimas fibrolítica e amilolítica não afetou ($P \geq 0,171$) o ganho de peso e a mudança de peso.

Tabela 8 – Balanço de energia de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Consumo de energia, Mcal/dia								
Energia bruta	107	105	107	106	1,1	0,229	0,745	0,388
Energia digestível	68,5	67,9	66,8	68,7	0,72	0,514	0,649	0,174
Energia metabolizável	58,4	57,6	56,5	58,4	0,64	0,504	0,556	0,147
Energia líquida	36,7	36,2	35,3	36,4	0,41	0,498	0,505	0,133
ELI ³ , Mcal/kg	19,5	19,0	18,8	19,0	0,26	0,466	0,160	0,100
Elm ⁴ , Mcal/kg	9,46	9,45	9,45	9,43	0,069	0,343	0,628	0,696
Balanço de energia	7,67	8,17	6,92	7,93	0,329	0,200	0,398	0,664
PV ⁵	582	580	580	579	5,7	0,171	0,377	0,974
Mudança de PV ⁶	0,334	0,517	0,320	0,331	0,0592	0,397	0,382	0,454

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nichollasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0,66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

³Energia líquida de lactação.

⁴Energia líquida de manutenção.

⁵Peso vivo (kg).

⁶Mudança de peso vivo (kg/d).

6.5 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

A adição de enzimas fibrolítica e amilolítica na dieta não afetou ($P \geq 0,218$) as concentrações séricas de glicose e ureia dos animais. No entanto houve interação ($P \leq 0,05$) entre os efeitos de enzima fibrolítica e amilolítica sobre a concentração de colesterol e a atividade enzimática da AST e GGT. A enzima fibrolítica reduziu ($P \leq 0,05$) a concentração de colesterol e aumentou a atividade da enzima GGT nos animais que não recebiam enzima amilolítica. No entanto, associação entre enzima amilolítica e fibrolítica aumentou ($P \leq 0,05$) a concentração de colesterol e a atividade da AST.

Tabela 9 – Metabólitos sanguíneos de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Glicose, mg/dL	64,5	64,7	63,6	66,9	0,81	0,218	0,638	0,257
Ureia, mg/dL	37,3	36,2	36,4	36,5	0,81	0,476	0,633	0,440
Colesterol, mg/dL	186 ^a	170 ^b	175 ^{ab}	184 ^a	3,3	0,535	0,816	0,017
AST ³	73,7 ^{ab}	71,0 ^b	71,8 ^{ab}	74,5 ^a	1,40	0,992	0,572	0,050
GGT ⁴	26,8 ^b	29,7 ^a	27,6 ^b	27,3 ^b	0,57	0,017	0,162	0,003

^{a,b}Médias na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$).

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nichollasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0,66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

³Aspartato aminotransferase.

⁴Gama glutamil transferase.

6.6 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os tratamentos não afetaram ($P \geq 0,184$; Tabela 10) a produção de leite e a produção corrigida para o teor de gordura (3,5%). No entanto, houve interação ($P \leq 0,053$) entre enzimas exógenas sobre a produção de lactose, (kg/dia) e eficiência produtiva, e uma tendência ($P = 0,094$) para produção de proteína (kg/dia) do leite. A suplementação com

enzima fibrolítica diminui ($P \leq 0,05$) a produção de lactose, proteína e eficiência produtiva nos animais não tratados com enzima amilolítica. Além disso, independente da adição de enzima amilolítica, a enzima fibrolítica tendeu a reduzir ($P = 0,099$) a concentração de proteína no leite. A concentração de nitrogênio ureico (mg/dL) no leite não foi alterada ($P \geq 0,480$) pela adição das enzimas à dieta dos animais.

Tabela 10 – Produção e composição do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo enzima fibrolítica e amilolítica.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P ²		
	CONT	FIB	AMI	FIB+AMI		FIB	AMI	F×A
Produção (kg/dia)								
Leite	30,1	29,5	29,5	29,8	0,37	0,595	0,691	0,184
LCG ³	28,6	28,3	28,1	28,4	0,38	0,968	0,624	0,372
Lactose	1,38 ^a	1,35 ^b	1,35 ^b	1,36 ^{ab}	0,016	0,253	0,278	0,017
Gordura	0,980	0,968	0,957	0,967	0,0153	0,953	0,428	0,487
Proteína	0,928 ^a	0,898 ^b	0,898 ^b	0,903 ^b	0,0108	0,046	0,157	0,094
Composição do leite (%)								
Lactose	4,60	4,59	4,59	4,57	0,012	0,112	0,057	0,626
Gordura	3,31	3,29	3,28	3,28	0,044	0,871	0,527	0,855
Proteína	3,06	3,05	3,06	3,04	0,008	0,099	0,558	0,718
NUL (mg/dL)	12,5	12,6	13,1	12,7	0,32	0,741	0,480	0,549
Eficiência (leite/CMS)	1,29 ^a	1,25 ^b	1,25 ^b	1,26 ^b	0,013	0,121	0,048	0,025

^{a,b}Médias na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$).

¹Controle (CONT), sem adição de enzimas exógenas; Enzima fibrolítica (FIB), Fibrozyme® (Alltech, Nicholasville, KY) com 1 g/kg de concentrado (12 g/d); Enzima amilolítica (AMI), Amaize™ com 0,66 g/kg de concentrado (8 g/d); e FIB + AMI.

²Probabilidades: FIB: efeito de enzima fibrolítica; AMI: efeito de enzima amilolítica; F×A: efeito de interação.

³LCG: produção de leite corrigida para gordura 3.5% (Sklan et al., 1992).

7 DISCUSSÃO

A adição de enzimas exógenas não afetou o consumo de MS e nutrientes. Resultado similar foi encontrado por Takiya et al. (2017), avaliando a suplementação de enzima amilolítica e Arriola et al. (2017), que avaliaram a adição de enzima fibrolítica à dieta de vacas em lactação. O consumo médio observado no estudo foi de 23,7 kg/dia, ligeiramente superior ao consumo estimado para a formulação da dieta, 22,5 kg/d, de acordo com NRC (2001).

Pesquisas relatam aumento no consumo de MS em bovinos de corte, com adição de enzimas fibrolíticas à dieta (BEAUCHEMIN et al., 2000; BEAUCHEMIN et al., 2003). Para vacas leiteiras, Silva et al. (2016) encontraram aumento no consumo de FDN e MS, utilizando doses crescentes de enzima fibrolítica (Fibrozyme[®]). Esses autores associaram o aumento do consumo de FDN ao aumento do consumo de partículas grandes (maiores que 19 mm). No presente estudo, a adição de enzima fibrolítica não afetou o índice de seleção de partículas. No entanto, a adição de enzima amilolítica reduziu o consumo de partículas grandes e aumentou o consumo de partículas intermediárias (entre 19 e 8 mm), apenas nos animais que recebiam enzima fibrolítica. Leonardi e Armentano (2003), relataram que vacas leiteiras alimentadas com dieta total (TMR) evitam partículas longas e preferem partículas menores. Esse consumo preferencial de partículas com maior teor de energia é esperado quando a demanda por fibra (partículas longas) é atendida (MILLER-CUSHON; DEVRIES, 2017). DeVries (2008) observaram que vacas em lactação selecionam menos partículas longas e preferem partículas intermediárias em dietas com mais de 60% de forragem, e o contrário acontece em dietas com menos de 50% de forragem. A adição da enzima amilolítica foi capaz de aumentar o consumo de partículas intermediárias, mostrando que os animais não estavam em sobrecarga ruminal (acidose), e que a necessidade por fibra havia sido atendida com uma dieta de 48% de forragem.

Klingerman et al. (2009), reportaram aumento no consumo de MS com o fornecimento de um extrato de *Aspergillus orizae* com atividade de α -amilase para vacas em lactação. De maneira similar, Beauchemin et al. (2000) e Beauchemin et al. (2003) mostraram aumento no consumo de MS em bovinos de corte suplementados com enzima fibrolítica. De acordo com Feng et al. (1996), o efeito positivo da enzima fibrolítica está associado a maior digestibilidade da fibra no rúmen e da taxa de passagem pelo trato digestório, que estimula o consumo de nutrientes. De acordo com Allen (2000) a cada aumento de uma unidade na digestibilidade da FDN tem-se um aumento de 0,17 kg por dia no consumo de MS. No entanto, a adição das enzimas exógenas não afetou os coeficientes de digestibilidade, nem o consumo de nutrientes dos animais.

O aumento na digestibilidade da FDN e nutrientes são relatados por Yang et al. (2000) com adição de enzima fibrolítica. Apesar de não observarem efeitos no consumo, houve aumento na digestibilidade da MS, MO e PB em vacas leiteiras. Da mesma forma, Beauchemin et al. (1995) e Rode et al. (1999) observaram aumento na digestibilidade da MS e FDN, com adição de enzima fibrolítica, e Chen et al. (1995) reportaram aumento na digestibilidade da PB com inclusão de α -amilase à dieta de vacas em lactação. O aumento na

digestibilidade da MS, PB e FDN em dietas com baixo amido e inclusão de enzima amilolítica são descritos por Gencoglu et al. (2010). A ação das enzimas quando aplicada antes da alimentação pode alterar a estrutura dos alimento favorecendo um ataque/degradação enzimática antes do consumo, melhorando a digestão. O aumento da digestibilidade dos nutrientes não amiláceos aumenta a produção de maltodextrinas que podem ser utilizadas por bactérias não-amilolíticas e amilolíticas, o que favorece a digestibilidade dos nutrientes, não apenas ao nutriente específico em que a enzima atua (Tricarico et al., 2008).

Muitos fatores influenciam a resposta animal com à suplementação de enzimas exógenas, dentre os quais destacam-se o modo de preparo, dose, atividade enzimática do produto (Arriola et al., 2017), o método de fornecimento (rúmen, TMR, concentrado e silagem; KUNG et al., 2002), estabilidade da enzima no rúmen (MCALLISTER et al., 2001) e seu mecanismo de ação (BEAUCHEMIN; HOLTSHAUSEN, 2010). No presente estudo, a ausência de efeitos sobre a digestibilidade e consumo indicam que para os animais e dieta utilizada, a dose de enzima fornecida via concentrado, não afetou positivamente as tais variáveis.

A inclusão de enzimas exógenas melhora a atividade enzimática do rúmen e consequentemente, aumenta a degradação ruminal de nutrientes. O aumento da degradação ruminal dos carboidratos está relacionada ao aumento da concentração de carboidratos solúveis, que servem de substrato tanto para as bactérias fibrolíticas quanto para as não-fibrolíticas, afetando os produtos finais da fermentação ruminal (BEUACHEMIN et al., 2003). No presente trabalho, as enzimas exógenas não afetaram a concentração ruminal de AGCC total, da mesma forma como relatado por Hristov et al. (2008), estudando adição de complexos enzimáticos contendo xilanase e α -amilase. De acordo com Bowman et al. (2002) a adição de enzima fibrolítica aumenta a concentração de propionato ruminal e reduz a relação acetato:propionato no rúmen de vacas leiteiras.

A adição de enzima amilolítica aumentou o consumo de partículas intermediárias (que contêm mais amido), o que pode ter favorecido o crescimento de bactérias produtoras de butirato. Além disso, a ingestão de partículas com maior teor de amido resultou em redução do pH ruminal (12 horas após a alimentação) nos animais alimentados com enzima amilolítica. Mudanças nos microrganismos ruminais, e consequentemente nos produtos finais do processo fermentativo ruminal com adição de α -amilase são reportados por Tricarico et al. (2008). Esses autores associaram o aumento na concentração ruminal de butirato em vacas suplementadas com α -amilase (*Aspergillus oryzae*) à modificação na população de microrganismos ruminais. Ainda, o crescimento de bactérias não-amilolíticas, principalmente

Butyrivibrio fibrisolvens D1, *Selenomonas ruminantium* GA192 e *Megasphaera elsdenii* T81 aumenta a concentração de butirato em meios de cultura contendo amido e α -amilase (TRICARICO et al., 2008). As principais bactéria envolvidas nesse processo, tem a função de degradar fibra (*Butyrivibrio fibrisolvens* D13) e apresentam alta atividade proteolítica (*Megasphaera elsdenii* T81), que tem como principal produto final o butirato. Apesar do aumento na concentração de butirato, as enzimas exógenas não afetaram a concentração ruminal de N-NH₃.

Tricarico et al. (2008) sugerem que o modo de ação da enzima amilolítica envolve a produção de oligossacarídeos a partir de amilose a amilopectina que podem ser usados por bactérias amilolíticas e não-amilolíticas. Este apresenta-se como mecanismo de alimentação cruzada e é uma característica do ecossistema microbiano, onde os microrganismos utilizam de produtos da hidrólise de outras espécies, modificando os produtos resultantes da fermentação ruminal.

A síntese de proteína microbiana não foi alterada pela inclusão de enzimas exógenas, o mesmo resultado foi relatado por Takiya et al. (2017) e Nózière et al. (2014) com utilização de enzima amilolítica, e Silva et al. (2016) avaliando a inclusão de enzima fibrolítica à dieta de vacas em lactação. A adição de enzima fibrolítica reduziu a excreção de N no leite, expresso em proporção do nitrogênio consumido. Este resultado aconteceu em decorrência da redução na concentração de proteína no leite dos animais tratados com enzima fibrolítica. Silva et al. (2016) observaram redução na excreção de N no leite com o aumento da dose de enzima fibrolítica, o qual foi particionado para outros tecidos, e não somente a glândula mamária. A enzima amilolítica reduziu a excreção de N na urina, sugerindo um aumento na reciclagem de N, e reaproveitamento do nitrogênio pelos microrganismos ruminais. Na literatura não são reportados efeitos da adição de α -amilase sobre essa variável (NOZIERE et al., 2014; TAKIYA et al., 2017). Apesar dos efeitos encontrados com a excreção de N no leite e na urina, não foi observado mudança no balanço de nitrogênio.

Poucos trabalhos apresentaram o consumo de energia e balanço de energia quando vacas leiteiras foram alimentadas com enzima amilolítica (TAKIYA et al., 2017). Por outro lado, Silva et al. (2016) relatam aumento no consumo de energia líquida e no balanço de energia com aumento da dose de enzima fibrolítica da dieta, associado ao maior consumo de MS, e maior aporte energético mesmo consumindo uma dieta com mais fibra. Neste estudo, como não houve mudanças no consumo e na digestibilidade dos nutrientes, consequentemente nenhum efeito foi encontrado no consumo de energia bruta, metabolizável e líquida, e no balanço de energia.

As concentrações de glicose e ureia sanguínea não foram afetadas com a inclusão de enzimas exógenas. A gliconeogênese hepática é a principal fonte de glicose nos ruminantes, onde os principais precursores são o propionato e aminoácidos glicogênicos (KOZLOSKI et al., 2011), sendo que o acetato e butirato não contribuem para síntese líquida de glicose. Peters et al. (2015) não observaram efeitos na glicose sanguínea com adição de enzima fibrolítica à dieta de vacas em lactação, assim como, Tricarico et al. (2005) não reportaram mudanças na concentração de glicose em vacas leiteiras alimentadas com enzima amilolítica. Como não houve mudanças na concentração de propionato ruminal e digestibilidade da proteína, a concentração sanguínea de glicose não foi alterada.

A adição de enzima fibrolítica aumentou a atividade hepática da GGT e a associação de enzimas exógenas aumentou a atividade enzimática da AST. Apesar desses efeitos, os resultados estão dentro dos valores de referência (30 – 70 U/I) preconizados para perfil metabólico normal em vaca leiteiras, segundo Wittwer (2000). Silva et al. (2016) e Takiya et al. (2017) não demonstram mudanças na atividade enzimática da AST e GGT em vacas leiteiras alimentadas com enzima fibrolítica e amilolítica, respectivamente.

Adição de enzimas exógenas não afetou a produção de leite e produção corrigida no presente trabalho. Independente da origem dos microrganismos (fungos ou bactérias; DEAN et al., 2013; PETERS et al., 2015; SILVA et al., 2016), os produtos enzimáticos não alteram a produção de leite e a composição de vacas no meio de lactação, quando se utiliza enzima fibrolítica, e enzima amilolítica (FERRARETO et al., 2011; NOZIÈRE et al., 2014; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014; TAKIYA et al., 2017). Em recente meta-análise, Arriola et al. (2017) estudaram 15 trabalhos que avaliaram a inclusão de enzima fibrolítica sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação. Estes autores encontraram aumento numérico, mas não significativo na produção de leite, consequência dos diferentes produtos enzimáticos utilizados no mercado. O estágio de lactação e o status energético do animal parecem ser críticos em termos de resposta à tais aditivos enzimáticos (BEAUCHEMIN; HOLSTHAUSEN, 2010).

O modo de ação da enzima fibrolítica quando aplicada antes da alimentação pode alterar a estrutura do alimento, favorecendo a sua digestão. Beauchemin et al. (2003) sugerem uma interação entre enzima e alimento, o que promoveria um ataque/degradação enzimática antes da ingestão do alimento, o que aumentaria a resistência das enzimas à proteólise ruminal, devido a uma formação de um complexo enzimático. Além disso, os autores relataram aumento na digestibilidade e produção de leite quando os animais receberam enzima no concentrado e não na TMR (YANG et al., 2000). No presente estudo, os produtos

enzimáticos foram misturados ao concentrado e armazenados pelos menos durante cinco dias antes de serem oferecidos as vacas, mesmo assim, não encontramos efeitos positivos das enzimas exógenas sobre o desempenho dos animais.

Desta forma, os resultados da suplementação com enzimas exógenas na dieta de vacas leiteiras são inconsistentes. Efeitos positivos com a suplementação enzimática são reportados em casos específicos, com animais ao início de lactação, dieta com baixo teor de amido e forragens de baixa digestibilidade.

8 CONCLUSÃO

Associação de enzimas fibrolítica e amilolítica não foi eficiente em melhorar o desempenho e a digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação. Contudo, a enzima amilolítica aumentou o consumo de partículas intermediárias e consequentemente aumentou a concentração de butirato ruminal, sem efeitos sobre o consumo de nutrientes de produção de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 3189–321, 2011.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D. R. Evaluating contrast of fiber digestion by rumen microbes. **Journal of Nutrition**, v. 188, p. 261 – 270, 1988.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.1447–1462, 1997.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598 – 1624, 2000.
- AOAC. Official methods of analysis, 17th ed. **Association of official analytical chemists**, Arlington, VA, USA. 2000.
- ARMENTANO, L.; PEREIRA, M. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trial. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1416 – 1425, 1997.
- ARRIOLA, K. G.; OLIVEIRA, A. S.; MA, X. Z.; LEAN, I. J.; GIURCANU, M. C.; ADESOGAN, A. T. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-15, 2017.
- BALDWIN, P. M. Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. **Starch/Starke**, v. 53, p. 475 – 503, 2001.
- BALL, S. G. Recent reviews in the biosynthesis of the plant starch granule. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 7, p. 405 – 415, 1998.
- BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2 edition, London, UK, CAB International, 2011.p. 1 – 11.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, p. 641-644, 1995.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: L. M. Rode (Ed). **Animal science research and development—Meeting future challenges**. Minister of Supply and Services Canada, Ottawa. P. 103–130, 1996.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D; KAMPEN, R. Evaluation of a non-starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 543–553, 2000.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 37–47, 2003.

BEAUCHEMIN, K. A.; HOLTSHAUSEN, L. Developments in enzyme usage in ruminants. In: **Enzymes in farm animal nutrition**. CAB Int., 2010.

BLAZEK, J. **Role of amylase in structure-function relationship in starches from Australian wheat varieties**. 2008. 255 p. Thesis (Doctor) – University of Sidney, Sidney, Australian, 2008.

BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3420-3429, 2002.

BRODERICK, G. A.; KANG-MEZNARICH, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino-acids in ruminal fluid and in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 64-75, 1980.

BURROUGHS, W.; WOODS, W.; EWING, S. A.; GREIG, J.; THEURER, B. Enzyme additions to fattening cattle rations. **Journal of Animal Science**, v. 19, p. 458–46, 1960.

CAI, Q.; YUE, X.; NIU, T.; JI, C.; MA, Q. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1561-1566, 2004.

CASALI, A. O.; DETMANN E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335-342, 2008.

CHEN, M. K. H.; HUBER, J. T.; SIMAS, J.; THEURER, C. B.; YU, P.; CHAN, S. C.; SANTOS, F.; WU, Z.; SWINGLE, R. S. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1721–1727, 1995.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivate – an overview of technical details. (Occasional publication) **International Feed Research Unit**, Bucksburnd, Aberdeen: Rowett Research Institute. 21 p. 1992.

CHESSON, A.; FORSBERG, C. Polyssaccharide degradation by rumen microorganisms. IN: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London, UK: Elsevier Science Publishers Ltd., 1997. p. 329 – 381.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v. 113, p. 218–225, 2008.

CONRAD, H. R.; WEISS, W. P.; ODWONGO, W. O.; SHOCKEY, W. L. Estimating net energy lactation from components of cell solubles and cell walls. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 427-43, 1984.

CORONA, L.; OWENS, F. N.; ZINN, R. A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 3020-3031, 2006.

CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3008-3012, 2002.

COTTA, M. Amylolytic of selected species of ruminal bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 772-776, 1988.

COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FILHO, E. X. F.; PULS, J.; CLAYESSENS, M.; VRSANSKÁ, M.; HUGHES, M. M. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: COUGHLAN M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Ed.). **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Press, 1993. p. 53 – 84.

DANIEL, J. L. P.; QUEIROZ, O. C. M.; ARRIOLA, K. G.; STAPLES, C. R.; ROMERO, J. J.; SHIN, J. H.; PASCHOALOTO, J. R.; NUSSIO, L. G.; ADESOGAN, A. T. Effects of maturity at ensiling of *bermudagrass* and fibrolytic enzyme application on the performance of early-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1 – 8, 2016.

DEAN, D. B.; STAPLES, C. R.; LITTELL, R. C.; KIM, S.; ADESOGAN, A. T. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolites. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 13, p. 337–353, 2013.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KASCHEUR, K. F.; TRICARICO, J. M. Effects of dietary α -amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4405–4413, 2005.

DEVRIES, T. J.; DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3958– 3967, 2008.

DILorenzo, N.; SMITH, D. R.; QUINN, M. J.; MAY, M. L.; PONCE, C. H.; STEINBERG, W.; ENGSTRO, M. A.; GALYEAN, M. L. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**, v. 137, p. 178-184, 2011.

ELWAKEEL, E. A.; TITGEMEYER, E. C.; JOHNSON, B. J.; ARMENDARIZ, C. K.; SHIRLEY, J. E. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 90, 5226–5236, 2007.

FENG, P.; HUNT, C. W.; PRITCHARD, G. T.; JULIEN, W. E. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature

cool-season grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1349–1357, 1996.

FERRARETO, L. F.; SHAVER, R. D.; ESPINEIRA, M.; GENCOGLU, H.; BERTIC, S. J. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1490–1499, 2011.

FOOD CHEMICALS CODEX. 4th ed. Washington, DC, USA: **National Academic Press**, 1996.

FU, C.; MIELENZ, J. R.; XIAO, X.; GE, Y.; HAMILTON, C. Y.; RODRIGUEZ, M. J.; CHEN, F.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A.; BOUTON, J.; DIXON, R. A.; WANG, Z-Y. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 108, n. 9, 3803–3808, 2011.

FUJIHARA, T.; ORSKOV, E. R.; REEDS, P. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v. 109, p. 7-12, 1987.

GANDRA, J. R.; MIRANDA, G. A.; GOESA, R. H. T.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; OLIVEIRA, E.R.; FREITAS JUNIOR, J. E.; GANDRA, E. R. S.; ARAKIA, H. M. C.; SANTOS, A. L. A. V. Fibrolytic enzyme supplementation through ruminal bolus on eating behavior, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Jersey heifers fed either corn silage or sugarcane silage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 231, p. 29 – 37, 2017.

GENCOGLU, H.; SHAVER, R. D.; STEINBERG, W.; ENSINK, J.; FERRARETTO, L. F.; BERTICS, S. J.; LOPES, J. C.; AKINS, M. S. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 723–732, 2010.

GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; RANILLA, M. J.; RAMOS, S.; CARRO, M. D. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. **Journal Animal Science**, v. 86, p. 1617 – 1623, 2008.

GOES, R. H. T. B.; MANCIO, A. B.; VALADARES FILHO, S. C.; LANA, R. P. Degradação ruminal da matéria seca e proteína bruta, de alimentos concentrados utilizados como suplementos para novilhos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 167 – 173, 2004.

GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BARCELLS, J.; GUADA, J. A.; VICENTE, F. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1282-1291, 2003.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader review: Microbial enzymes and their relevance in industries medicine, and beyond. **BioMed Research International**, p. 18, 2013.

GUERREIRO, G.; HAUSMAN, J-F; STRAUSS, J.; SIDDIQUI, K. S. Review: Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, p. 1 – 16, 2015.

HALE, W. H. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 37, p. 1075, 1973.

HALL, M. B.; HOOVER, W. H.; JENNINGS, J. P.; WEBSTER, T. K. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 2079 – 2086, 1999.

HALL, M. B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. Gainesville: University of Florida, 2000, p. A-25. (Bulletin, 339)

HARMON, D. L. Nutritional regulation of postruminal digestive enzymes in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2102 – 2111, 1993.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analyses of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, p. 1306-1311, 1993.

HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K-J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76, p. 161 – 168, 1998.

HRISTOV, A. N.; BASEL, C. E.; MELGAR, A.; FOLEY, E.; ROPP, J. K.; HUNT, W.; TRICARICO, J. M. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 182-193, 2008.

HUHTANEN, P.; KHALILI, H. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 2. Digestion of cell wall carbohydrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.33, p.263-273, 1991.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 211-227, 1994.

HUHTANEN, P.; NOUSIAINEN, J.; RINNE, M. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. **Agricultural and Food Science**, v. 15, 293 – 323, 2006.

IMMANUEL, G.; DHANUSHA, R.; PREMA, P.; PALAVESAM, A. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. **International Journal Environmental Science and Technology**, v. 3; p. 25-34, 2006.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi and its production. **African Journal Biotechnology**, v. 11, p. 14175-14181, 2012.

KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; MCDONELL, E. E.; DERBEDROSIAN, M. C.; KUNG, L. Jr. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1050–1059, 2009.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**, 3º ed. Revista Ampliada, editora UFSM, 2011.

KRAUSE, D. O.; DENMANS, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 663 – 693, 2003.

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, 145:84–94, 2008.

KUNG, L. Jr.; COHEN, M. A.; RODE, L. M.; TREACHER, R. J. The effect of fibrolytic EFEs sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2396–2402, 2002.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 922–928, 1996.

LÁSZTITY, R. **The chemistry of cereal proteins**. 2º ed. Roca Raton: CRC Press, Inc, 1984.

LEHNINGER, A. L. **Principles of biochemistry**. New York, NY: Worth Publishers, Inc., 2005. p. 1982 – 1104.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality and particle length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 557–564, 2003.

LOPES, F.; COOK, D. E.; COMBS, D. K. Validation of an in vitro model for predicting rumen and total-tract fiber digestibility in dairy cows fed corn silages with different in vitro neutral detergent fiber digestibilities at 2 levels of dry matter intake. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 574 – 585, 2015.

LUND, P. **The effect of forage type on passage kinetics and digestibility of fiber in dairy cows**. 2002. Thesis (Doctor of Philosophy) – The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 2002.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506 – 577, 2002.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; MOLETTA, J. L. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2118 – 2124, 2006.

MCALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J.; POPP, J. D.; MIRI, Z.; YANKE, L. J.; HRISTOV, A. N.; TREACHER, R. J.; CHENG, K.-J. Effect of exogenous enzymes on digestibility of

barley silage and growth performance of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, 1999.

MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R., PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Oxon, UK: CABI Publishing, 2001. p. 273–298, 2001.

MCCARTHY, M. M.; ENGSTROM, M. A.; AZEM, E.; GRESSLEY, T. F. The effect of an exogenous amylase on performance and total-tract digestibility in lactating dairy cows fed a highbyproduct diet. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3075–3084, 2013.

MEALE, S. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; HRISTOV, A. N.; CHAVES, A. V.; MCALLISTER, T. A. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427 – 42, 2014.

MERTENS, D. R. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations. In: Information Conference with Dairy and Forages Industries. 1996. **Proceedings...**, US Dairy Forage Resource Center, 1996, p. 81-91.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1463–148, 1997.

MILLER-CUSHON, E. K.; DEVRIES, T. J. Feed sorting in dairy cattle: Causes, consequences, and management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 4172 – 4183, 2017.

MILLS, J. A. N.; FRANCE, J.; ELLIS, J. L.; CROMPTON, L. A.; BANNINK, A.; HANIGAN, M. D.; DIJKSTRA, J. A mechanistic model of small intestinal starch digestion and glucose uptake in the cow. **Journal of Dairy Science**, v. 100, 1-21, 2017.

MILLS, J. A. N., FRANCE, J.; DIJKSTRA, J. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposals for a mechanistic model: 1. Dietary starch characterisation and ruminal starch digestion. **Journal of Animal Feed Science**, v. 8; p. 291–340, 1999.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; MCALLISTER, T. A.; WANG, Y. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma Longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1310–1321, 2000.

MURAD, H. A.; AZZAZ, H. H. Cellulase and dairy animal feeding. **Biotechnology**, v. 9, p. 238-256, 2010.

NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERG, M.; MORGAVI, D. P. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2319–2328, 2014.

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC, 2001.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de Carboidratos Estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; VAZ PIRES, A.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 193 – 238.

OBA, M; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 589 – 596, 1999.

OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; RÉNNO, L. N.; QUEIROZ, A. C.; CHIZZOTTI, M. L. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629, 2001.

OWENS, F. N., R. A. ZINN, AND Y. K. KIM. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1634–1648, 1986.

PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHEMAANPERA, J. Xylanases and cellulases as feed additives. In: Bedford, M. R., PARTRIDGE, G. G. (Ed). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd ed, London, UK, CAB Internacional. 2011. p. 12 – 53.

PETERS, A.; ULRICH, M.; DANICKE, S. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on performance and blood profile in early and mid-lactation cows. **Animal Nutrition**, p. 1-10, 2015.

PRAKASH, B., VIDYASAGAR, M.; MADHUKUMAR, M. S.; MURALIKRISHNA, G.; SREERAMULU, K. Production, purification and characterization of two extremely halotolerant, thermostable and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter sp.* TVSP 101. **Process Biochemistry**, 44: 210-215, 2009.

RAVINDRAN, V.; SON, J. Feed enzyme technology: present status and future developments. **Recent Patents Food Nutrition and Agriculture**, v. 3, n. 2, p. 102-109, 2011.

REDDY, P. R. K.; RAJU, J.; REDDY, N. A; RAMADEVI, A.; REDDY P. P. R. Recent Trends in Supplementation of Exogenous Fibrolytic Enzymes in Ruminant Nutrition – A Review. **Indian Journal of Natural Sciences**, v. 7, 2016.

REYNOLDS, C. K. Production and metabolic effects of site of starch digestion in lactating dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, p. 78–94, 2006.

REYNOLDS, C. K., HUMPHRIES, D. J.; VAN VUUREN, A. M.; DIJKSTRA, J.; BANNINK, A. Considerations for feeding starch to high yielding dairy cows. In: P. C. GARNSWORTHY, J. WISEMAN (Ed.). **Recent Advances in Animal Nutrition**. Packington: UK, 2014. p. 27–47.

RIBEIRO, G.O.; GRUNINGER, R. J.; BADHAN, A; MCALLISTER, T. A. Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. **Animal Frontiers**, v. 6, p. 20 – 26, 2016.

RODE, L. M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2121–2126, 1999.

RODRIGUES, M. T.; VIEIRA, R. A. M. Metodologias aplicadas ao fracionamento de alimentos. In: BERCHIELLI, T. T.; VAZ PIRES, A.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 193 – 238.

ROJO, R., MENDOZA, G. D.; GONZALEZ, S. S; LANDOIS, L.; BARCENA, R.; CROSBY, M. M. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 655-665, 2005.

SAS Institute, Inc. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.3. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA, 2012.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 1– 41, 2007.

SEYMOUR, W. M.; CAMPBELL, D. R.; JOHNSON, Z. B. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 155–169, 2005.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 947-958, 2002.

SILVA, T. H.; TAKIYA, C. S.; VENDRAMINI, T. H. A.; FERREIRA DE JESUS, E.; ZANFERARI, F.; RENNO, F. P. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 35-43, 2016.

SKLAN, D. R.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cotton seeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463-2472, 1992.

SOUTH, J. B.; MORRISON, W. R.; NELSON, O. E. A relationship between the amylose and lipids contents of starch from various mutants for amylose content in maize. **Journal of Cereal Science**, v. 14, p. 267 – 278, 1991.

STAPLES, C. R. Feeding dairy cows when corn prices are high. Proc. 44th **Florida Dairy Production Conference**. Gainesville, FL, 2007.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. **International Journal Science and Nature**, v. 3, p. 480-486, 2012.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Science**, v. 93, p. 85-99, 2015.

TAF AJ, M.; ZEBELI, Q.; BAES, C. H., STEINGASS, H.; DROCHNER, W. A meta-analysis examining effects of particle size of total mixed rations on intake, rumen digestion and milk production in highyielding dairy cows in early lactation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, p. 137–161, 2007.

TAKIYA, C. S.; CALOMENI, G. D.; SILVA, T. H.; VENDRAMINI, T. H.; SILVA, G. G.; CONSENTINI, C. E. C.; BERTONI, J. C.; ZILIO, E. M. C.; RENNÓ, F. P. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity on nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 159-167, 2017.

THEURER, C.B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, p. 1649-1662, 1986.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A.; HANSON, K. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 365-374, 2005.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 136–150, 2008.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis**. National Forage Testing Association, USA. Omaha: National Forage Testing Association. p. 139, 1992.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemists**, v.46, p.829-835, 1963.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1994.

VARGAS-RODRIGUEZ, C. F.; ENGSTROM, M.; AZEM, E.; BRADFORD, B. J. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4464-4470, 2014.

VERBIC, J. CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243-248, 1990.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83. p. 2512-2520, 2000.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Chewing and ruminal pH. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2826–2838, 2007.

WALLACE, R. J.; WALLACE, S. J. A.; MCKAIN, N.; NSEREKO, V. L.; HARTNELL, G. F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal Animal Science**, v. 79, p. 1905 – 1916, 2001.

WANG, T. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; HENDLEY C. L. Starch: as simple as A, B, C? **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 481, 1998.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: **Cornell Nutrition Conference for Feed Manufactures**. Ithaca. Proceedings...Ithaca: Cornell University, 1999, p. 176 – 185.

WEISS, W. P.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2492–2499, 2011.

WHITE, R. R.; HALL, M. B.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P. J. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations, II: Development of feeding recommendation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1 – 16, 2017.

WITTEWER, F. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. In: **Perfil metabólico em ruminantes, seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil. UFRGS, p. 63-74, 2000.

ZEBELI, Q.; DIJKSTRA, J.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2046–2066, 2008a.

ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; JUNCK, B.; ÖLSCHLÄGER, V.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Evaluation of the response of ruminal fermentation and activities of nonstarch polysaccharide-degrading enzymes to particle length of corn silage in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2388–2398, 2008b.

ZEBELI, Q.; ASCHENBACH, J. R.; TAJAJ, M.; BOGUHN, J.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1041–1056, 2012.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88: p. 797-824, 2004.