

CAIO SEITI TAKIYA

Enzima amilolítica exógena na alimentação de vacas em lactação

Pirassununga

2016

CAIO SEITI TAKIYA

Enzima amilolítica exógena 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

Pirassununga

2016

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.3329
FMVZ

Takiya, Caio Seiti
Enzima amilolítica exógena na alimentação de vacas em lactação / Caio Seiti Takiya.
-- 2016.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

1. Alfa-amilase. 2. Aditivo. 3. Amido. 4. *Aspergillus oryzae*. 5. Milho. I. Título.



São Paulo, 28 de outubro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Enzimas amilolíticas na alimentação de vacas leiteiras", protocolado sob o CEUA nº 1746040814, utilizando 24 Bovinos (24 fêmeas), sob a responsabilidade de Francisco Palma Rennó, foi aprovado na reunião de 15/10/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Amilolitic enzymes in dairy cows feeding", protocol number CEUA 1746040814, utilizing 24 Bovines (24 females), under the responsibility Francisco Palma Rennó, was approved in the meeting of day 10/15/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TAKIYA, Caio Seiti

Título: Enzima amilolítica exógena 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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a realização desta obra a minha vó Emília (in memoriam) e aos meus pais William Yuithi Takiya e Deana Mary Santana Amado Takiya.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus o qual me deu condições para que eu pudesse chegar até aqui e realizar este trabalho.

Agradeço aos meus pais William e Deana pela vida, pela paciência, pela excelente criação, pela oportunidade de estudar em boas escolas, e por nunca deixarem me faltar nada para seguir meus objetivos.

Agradeço a Thaiane Coelho Kasmanas por me incentivar em tudo que era possível durante minha graduação, pelos ensinamentos e por mudar meu modo de pensar.

Agradeço minha família inteira pela torcida, força e carinho mesmo eu não estando por perto em todas as reuniões, comemorações e momentos difíceis. Agradecimento especial a minha tia-avó Magali Watanabe a quem sempre me cobrou academicamente e sempre ajudou toda a nossa família.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó pelos momentos de companheirismo, amizade, aconselhamentos e orientações que acontecem desde 2010 e sei que vou continuar aprendendo muito mais com ele após o término desta fase, por isso já deixo registrado meu agradecimento. Tudo o que sei até hoje relacionado à produção de leite é de sua responsabilidade.

Agradeço a Adrielle Ferrinho por todos os momentos de alegria, carinho, companheirismo e por me fazer menos cabeça dura.

Agradeço a Universidade de São Paulo (USP) por proporcionar uma estrutura física e de ensino que permite o aluno depender apenas de seu esforço para alcançar seus objetivos. Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP) pela formação técnica e desenvolvimento pessoal. Agradeço a todos os professores da casa, especialmente o Prof. Dr. José Antonio Visintin o qual admiro pela dedicação à FMVZ-USP.

A todos os integrantes do Departamento de Nutrição e Produção Animal, incluindo professores, funcionários e terceirizados meus agradecimentos. Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso pelos conselhos, à Prof. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira pela primeira oportunidade de conviver com a pesquisa, ao Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade por ser um amigo e conselheiro, ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires o qual admiro pelo estilo de didática e pelo conhecimento transmitido. Agradeço especialmente a Alessandra Terassi pela paciência e atenção que teve e têm comigo em todos

os anos desde a graduação. Agradeço os técnicos Ari, Renata, Simi e Lígia por sanarem as dúvidas de análises do experimento.

Agradeço todos os amigos e funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL), por tornarem essa etapa da minha vida muito mais fácil e prazerosa. Agradeço ao Thiago Vendramini pelos anos de amizade, companheirismo e até pela hospedagem durante os primeiros meses de mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço Gustavo Calomeni por fazer com que todos os dias de experimento fossem mais alegres e eficientes.

Agradeço Thiago Henrique da Silva pela troca de experiências, ensinamentos, paciência e ajuda em todos os momentos.

Meus agradecimentos ao Pablo Paiva pelo companheirismo, oportunidades e confiança.

Agradeço ao ICs que me auxiliariam durante o experimento Carlos Consentini e Jéssica Bertoni.

Estendo diversas dessas palavras a outros companheiros do LPBL: Rodrigo Gardinal, Elmeson de Jesus, Gustavo Boi, Tiago Del Valle, Guilherme, Elissandra, Filipe Zanferari, Vitor, Lenita, Nathália Trevisan, Leandro (Levandowisk), Toquinho, Diogo, Lucas, Denis, Rafael Barletta, Dona Malvina, Schmidt, e todos os quais fizeram ou fazem parte deste laboratório.

Agradeço a dois mentores que me fizeram crescer muito cientificamente e que são responsáveis pela escolha de minha vida: Prof. Dr. José Esler de Freitas Júnior e Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra. José Esler, muito obrigado pela confiança, ensinamentos e oportunidades que são transmitidos a mim até hoje. Jefferson, muito obrigado pelas broncas, críticas, por me ensinar como se trabalha em alto nível, pela confiança, oportunidade, amizade, troca de ideias, aconselhamentos, enfim, por tudo, e sei que isso vai ser eterno.

Agradeço as agências de pesquisa CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, número de processos: 2014/13607-3 e 2015/06108-3) pelo suporte financeiro ao estudante e pela oportunidade de realizar atividades científicas no exterior.

Agradeço ao Dr. Barry Bradford e a Kansas State University pela recepção, paciência, oportunidades e ensinamentos, e estendo esses agradecimentos a James Schaffer, Carol, Fabian, Laman, Katie e Abgail.

Agradeço ao Dr. James Drouillard pela hospedagem nos EUA e pela maneira sensacional que convive com nós brasileiros.

Agradeço ao Gabriel Nanico por tornar meus dias longe do país mais fáceis e pela amizade.

Nós somos o que fazemos repetidamente. A excelência, portanto, não é um ato, mas um hábito.

Aristóteles

In God we trust; all others bring data.

William Edwards Deming

RESUMO

TAKIYA, C. S. **Enzima amilolítica exógena na alimentação de vacas em lactação.** [Lactating dairy cows fed an exogenous amylolytic enzyme]. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos de doses dietéticas crescentes de um produto comercial com atividade amilolítica (Amaize™, Alltech Inc., Nicholasville, KY, EUA) na ingestão e digestibilidade aparente total de nutrientes, índice de seleção, fermentação ruminal, produção e composição do leite, perfil metabólico, balanço de energia e nitrogênio em vacas no terço médio de lactação. Foram utilizadas vinte e quatro vacas multíparas da raça Holandesa ($162,29 \pm 107,96$ dias em lactação e $31,60 \pm 6,51$ kg/d de produção de leite, no início do experimento), sendo que 8 delas possuíam cânulas ruminais, distribuídas em seis quadrados Latinos 4×4 contemporâneos e balanceados de acordo com a produção de leite, dias em lactação e o peso corporal dos animais. Os períodos experimentais tiveram duração de 14 dias de adaptação aos tratamentos e 7 dias de amostragem. Os tratamentos foram: dieta basal sem adição de enzima amilolítica ou controle (CON), e dieta basal com adição de 150, 300 ou 450 FAU/kg de MS da dieta (A150, A300 ou A450, respectivamente). Uma FAU (unidade de amilase fúngica) é a quantidade de enzima capaz de dextrinizar amido solúvel na taxa de 1 g/h a 30°C e pH de 4,8. A ingestão média esperada do produto comercial pelos animais foi de 7,37; 14,45; e 21,97 g/d nos tratamentos A150, A300 e A450, respectivamente. Os tratamentos não influenciaram a ingestão de MS e de nutrientes, como também o índice de seleção. Os tratamentos não influenciaram a digestibilidade do amido; porém, a inclusão de enzimas amilolíticas aumentou linearmente a digestibilidade de proteína bruta e tendeu a aumentar linearmente a digestibilidade da MS. Os tratamentos com atividade amilolítica não afetaram o pH e a concentração de amônia no fluido ruminal. A adição de enzimas amilolíticas aumentou linearmente a produção de iso-valerato no rúmen. Além disso, os tratamentos não influenciaram a produção e composição do leite, assim como a eficiência alimentar (kg leite / ingestão de MS) dos animais. A enzima amilolítica aumentou linearmente o peso corporal. Apesar de não alterar a composição do leite, a suplementação com enzima amilolítica diminuiu linearmente a excreção de nitrogênio no leite. As doses crescentes de enzima amilolítica tenderam a diminuir linearmente a eficiência de síntese de proteína microbiana. Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de glicose, ureia, e enzimas que indicam lesões hepáticas. A suplementação com doses crescentes enzima

amilolítica não afetou a eficiência alimentar, produção de propionato e de proteína microbiana no rúmen, e perfil metabólico de vacas em lactação. No entanto, os tratamentos aumentaram linearmente a digestibilidade de proteína bruta e o peso corporal das vacas.

Palavras-chave: Alfa-amilase. Aditivo. Amido. *Aspergillus oryzae*. Milho.

ABSTRACT

TAKIYA, C. S. **Lactating dairy cows fed an exogenous amylolytic enzyme.** [Enzima amilolítica exógena na alimentação de vacas em lactação]. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The objective of the current study was to determine the effects of increasing dietary doses of a commercial product with amylolytic activity (AmaizeTM, Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA) on nutrient intake and total apparent digestibility, sorting index, ruminal fermentation, milk yield and composition, serum metabolic profile, energy and nitrogen utilization of mid-lactating dairy cows. Twenty-four multiparous Holstein cows (162.29 ± 107.96 days in milk and 31.60 ± 6.51 kg/d milk yield, before starting the experiment), in which 8 were ruminally cannulated, were used in a replicated 4×4 Latin experiment design. The squares were contemporaneous and balanced for milk production, days in milk and live weight of cows. The experimental periods consisted of 14 days to treatments adaptation and 7 days for sampling. Treatments were composed of: basal diet with no enzyme or control (CON), and basal diet with addition of 150, 300 or 450 FAU/kg diet DM (A150, A300 or A450, respectively). One FAU (fungal amylase unit) is able to dextrinize soluble starch at rate of 1g/h on 30°C and pH 4.8. The expected average intake of the commercial product for treatments A150, A300 and A450 were 7.37, 14.45 and 21.97 g/d, respectively. Treatments did not influence the DM and nutrient intake, as well as the sorting index. Treatments did not alter starch digestibility; however, they linearly increased the crude protein digestibility and tended to linearly increase the DM digestibility. Treatments with amylolytic activity did not affect the pH and ammonia concentrations of ruminal fluid. The addition of amylolytic enzyme linearly increased the iso-valerate production in the rumen. In addition, treatments did not influence the milk yield and composition, as well as the milk production efficiency (kg of milk / DM intake) of animals. Treatments linearly increased the live weight and maintenance energy utilization of cows. Despite the enzyme supplementation did not alter the milk composition, it linearly decreased the milk nitrogen excretion. Treatments tended to linearly decrease the efficiency of microbial protein synthesis. No differences were observed on serum metabolic profile of animals, including concentrations of glucose, urea and enzymes which indicate hepatic damage. The supplementation with increasing doses of amylolytic enzymes did not affect the milk production efficiency, ruminal propionate production and

microbial protein synthesis, and serum metabolic profile of mid-lactating dairy cows. However, treatments linearly increased the crude protein digestibility and live weight of cows.

Keywords: Alpha-amylase. Additive. *Aspergillus oryzae*. Corn. Starch.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| AGCR | Ácidos Graxos de Cadeia Ramificada |
| AGV | Ácidos Graxos Voláteis |
| AST | Aspartato Amino-transferase |
| CED | Consumo de Energia Digestível |
| CEL | Consumo de Energia Líquida |
| CNF | Carboidratos Não Fibrosos |
| ECC | Escore de Condição Corporal |
| EB | Energia Bruta |
| ED | Energia Digestível |
| EE | Extrato Etéreo |
| EL | Energia Líquida |
| EL _l | Energia Líquida de Lactação |
| EL _m | Energia Líquida de Manutença |
| FAU | <i>Fungal Amylase Unit</i> |
| FDA | Fibra em Detergente Ácido |
| FDAi | Fibra em Detergente Ácido Indigestível |
| FDN | Fibra em Detergente Neutro |
| FDN _N | Fibra em Detergente Neutro Corrigida para Nitrogênio |
| GGT | Gama Glutamiltransferase |
| KNU | <i>Kilo Novo Unit</i> |
| MS | Matéria Seca |
| N | Nitrogênio |
| N _{mic} | Nitrogênio microbiano |
| NDT | Nutrientes Digestíveis Totais |
| N-NH ₃ | Nitrogênio Amoniacal |
| PB | Proteína Bruta |
| PC | Peso Corporal |
| PIDA | Proteína Insolúvel em Detergente Ácido |
| PIDN | Proteína Insolúvel em Detergente Neutro |
| PLCE | Produção de Leite Corrigida para Energia |

PLCG Produção de Leite Corrigida para Gordura
UD Unidade de Dextrinização

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Resumo dos resultados de desempenho produtivo dos ensaios que avaliaram a inclusão de amilase exógena em dietas de vacas em lactação..... | 36 |
| Tabela 2 - | Ingredientes, composição bromatológica e tamanho de partículas da dieta basal..... | 42 |
| Tabela 3 - | Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas leiteiras sobre a ingestão de nutrientes, índice de seleção de partículas e digestibilidade aparente total | 52 |
| Tabela 4 - | Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a fermentação ruminal | 54 |
| Tabela 5 - | Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas sobre a produção e composição do leite | 58 |
| Tabela 6 - | Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a utilização de energia e de nitrogênio..... | 59 |
| Tabela 7 - | Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a síntese de proteína microbiana..... | 60 |
| Tabela 8 - | Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o perfil metabólico sanguíneo..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 - | Molécula de amilose composta por ligações glicídicas alfa-(1,4) | 24 |
| Figura 2 - | Amilopectina, com pontos de ramificação alfa-(1-6)..... | 24 |
| Figura 3 - | Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o pH do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. | 55 |
| Figura 4 - | Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃). 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica..... | 55 |
| Figura 5 - | Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de acetato do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica..... | 56 |
| Figura 6 - | Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de propionato do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica..... | 56 |
| Figura 7 - | Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de butirato do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica..... | 57 |
| Figura 8 - | Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. | 57 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 | HIPÓTESE E OBJETIVOS | 22 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 3.1 | AMIDO | 23 |
| 3.2 | DIGESTÃO DO AMIDO | 26 |
| 3.3 | CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS | 28 |
| 3.3 | ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES | 31 |
| 3.3.1 | Enzimas amilolíticas na alimentação de vacas leiteiras | 33 |
| 3.3.2 | Enzimas amilolíticas na alimentação em ovinos e gado de corte | 36 |
| 3.3.3 | Métodos de utilização de enzimas na alimentação animal | 37 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 | LOCAL, ANIMAIS E TRATAMENTOS | 41 |
| 4.2 | CONSUMO, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DE NUTRIENTES..... | 44 |
| 4.3 | FERMENTAÇÃO RUMINAL..... | 46 |
| 4.4 | PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE..... | 47 |
| 4.5 | UTILIZAÇÃO DE ENERGIA E NITROGÊNIO, PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL..... | 48 |
| 4.6 | SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA | 49 |
| 4.7 | PERFIL METABÓLICO | 50 |
| 4.8 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 51 |
| 5 | RESULTADOS | 52 |
| 5.1 | INGESTÃO DE NUTRIENTES, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL | 52 |
| 5.2 | FERMENTAÇÃO RUMINAL..... | 53 |
| 5.3 | PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE..... | 58 |
| 5.4 | UTILIZAÇÃO DE ENERGIA E NITROGÊNIO | 59 |
| 5.5 | SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA | 60 |
| 5.6 | METABÓLITOS SANGUÍNEOS..... | 60 |
| 5 | DISCUSSÃO | 62 |
| 6 | CONCLUSÃO | 67 |
| | REFERÊNCIAS | 68 |

1 INTRODUÇÃO

A concentração de amido em dietas de vacas leiteiras confinadas varia entre 20,0 e 40,0% da MS da dieta, sendo que a maior porção do amido é fermentada por microrganismos ruminais (70-85%). Porém, uma quantidade substancial de amido pode ser digerida no duodeno ou fermentada no intestino grosso (FOLEY et al., 2006). Apesar de a eficiência energética ser maior quando a glicose é infundida no abomaso ou no duodeno quando comparada a infusão ruminal, devido a menor produção de calor e metano (HUNTINGTON et al., 2006), o destino das cadeias carbônicas da glicose absorvida no intestino vem sendo debatido já que a recuperação de glicose na veia porta nunca é completa.

Há evidências de que a glicose absorvida no intestino aumenta a lipogênese no omento. A infusão de glicose no abomaso de ovelhas e no duodeno de bovinos aumenta a deposição de gordura no omento e não aumenta a produção de lã e o peso de carcaça dos animais (RUST, 1992; MCLEOD; HARMON, 2007). Se a absorção de glicose no intestino aumenta a deposição de gordura ao redor do intestino, a digestão pós-ruminal do amido não seria interessante para a lactação, apesar de limitar perdas de energia por metano e calor associadas à fermentação ruminal.

Além disso, limites da digestão do amido e absorção de glicose no duodeno têm sido identificados (KREIKEMEIER et al., 1991; REYNOLDS et al., 1997). Ainda, a gliconeogênese hepática diminui conforme a absorção de glicose aumenta (FREELY; KLINDT, 1996), devido à secreção de insulina (EISEMANN; HUNTINGTON, 1994).

A eficiência de utilização de amido é maior quando o mesmo é fermentado extensivamente no rúmen (HUNTINGTON, 1997), e diversos estudos encontraram melhoras no desempenho dos ruminantes quando foram fornecidas fontes de amido processado para aumentar a digestibilidade ruminal (OWENS et al., 1986; THEURER et al., 1999). A digestão ruminal de amido é benéfica, pois ela aumenta o fluxo duodenal de proteína microbiana. Por exemplo, o fluxo de proteína microbiana aumentou de 2,2 para 2,8 kg/d quando as vacas foram alimentadas com fontes de amido com baixa e alta taxa de degradação ruminal, respectivamente (POORE et al., 1993).

Todos os animais utilizam enzimas para digerir alimentos, sendo estas produzidas pelo próprio animal, ou por microrganismos que estão presentes no trato digestório. No entanto, o processo de digestão dos animais não é 100% eficiente. A adição de enzimas amilolíticas na

dieta de ruminantes podem aumentar a digestibilidade ruminal de amido e de outros carboidratos (TRICARICO et al., 2008; DILORENZO et al., 2011). Há diversas evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* que a adição de enzimas amilolíticas na dieta pode aumentar o desempenho produtivo dos animais. Amilase proveniente de *Bacillus licheniformis* aumentou a digestibilidade ruminal do amido de sorgo e de milho (ROJO-RUBIO et al., 2001). Tricarico et al. (2005) observaram resposta quadrática na produção de leite quando suplementaram doses crescentes de amilase proveniente de *Aspergillus oryzae* para vacas leiteiras, com aumento na produção de leite de até 1,5 kg/d.

Os preços das forragens e dos cereais têm aumentado durante os últimos anos, e os produtores de leite procuram tecnologias para aumentar a eficiência de conversão alimentar dos animais, com o objetivo de diminuir os custos relacionados à nutrição. Além disso, após a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento pela União Europeia (Regulamento 1831/2003/EC) em 2006, compostos alternativos têm sido desenvolvidos para melhorar o desempenho dos animais. Outros aditivos utilizados são os probióticos (microrganismos adicionados aos alimentos), com um apelo de se usar microrganismos vivos ou não (WIRYAWAN; BROOKER, 1995), e as culturas fúngicas (NRC, 2001) incluindo seus extratos purificados ou de bactérias, as chamadas enzimas exógenas, as quais serão estudadas mais profundamente neste trabalho. Estas são consideradas extratos naturais que possuem o potencial efeito de melhorar a utilização de nutrientes na dieta elevando a eficiência produtiva de vacas leiteiras, além de, não possuírem efeitos nocivos à saúde humana (BEAUCHEMIN et al., 2003).

A produção de ruminantes, no que diz respeito ao fornecimento de alimentos para o crescimento populacional mundial, consiste em encontrar maneiras de aumentar a eficiência de utilização de nutrientes em suas dietas para maximizar o uso de terras agriculturáveis no mundo (KINGSTON-SMITH et al., 2013). Esta preocupação é trivial, considerando que atualmente há 7,5 bilhões de pessoas e em 2050 a população aumentará para 9,6 bilhões (UNITED NATIONS, 2013) e, para suprir esta demanda, a produção de leite terá que aumentar de 580 milhões de toneladas no ano 2000, para 1043 milhões de toneladas em 2050 (FAO, 2006).

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese a ser avaliada neste estudo é de que a inclusão de doses crescentes de enzima amilolítica exógena às dietas melhora o desempenho produtivo dos animais devido a um aumento da produção de propionato e de proteína microbiana no rúmen.

Objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na ingestão e digestibilidade aparente total de nutrientes, índice de seleção, fermentação ruminal, produção e composição do leite, perfil metabólico sanguíneo, e balanço de energia e nitrogênio de vacas no terço médio de lactação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

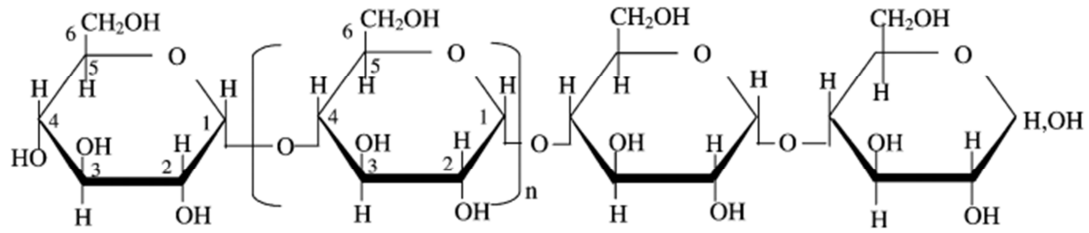
3.1 AMIDO

O amido é um polissacarídeo não estrutural sintetizado pelas plantas a partir da sacarose proveniente da fotossíntese. A sacarose é convertida em resíduos de glicose por uma série de reações envolvendo diversas enzimas e translocadores, que ocorrem tanto no citoplasma celular como no amiloplasto. Os resíduos de glicose são então reunidos pelas amido sintetases formando a molécula de amido (TESTER et al., 2004). Apesar de estar em alta concentração nas sementes como fonte de nutrientes para o desenvolvimento do embrião da planta, o amido é encontrado em outras partes como folhas, raízes e caules com função de reserva energética nos períodos de dormência, crescimento e rebrota (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986).

Alimentos como milho, trigo, cevada, sorgo e arroz são ofertados para animais de produção como fonte primária de energia para aumentar as produções de carne e leite. Os cereais são ricos em amido contendo desde 40% da MS, como no trigo, e até 80% da MS como no arroz, com uma variação do teor de amido dependente do local, condições climáticas e práticas agrônômicas (NOZIÈRE et al., 2010; GIUBERTI et al., 2014). Em alimentos ensilados, como a silagem de grão úmido e a silagem de milho, teores de amido ao redor de 20% até 60% da MS podem ser esperados, sendo estes influenciados pela maturidade da planta a colheita (GIUBERTI et al., 2014).

Independente da origem, os grânulos de amido são formados por dois principais polímeros de glicose que se diferenciam quanto ao tipo de estrutura química, tamanho de molécula e pelas propriedades químicas. A amilose (Figura 1) é um polímero longo e linear, disposto em dupla hélice, composto por polímeros de glicose (324-4920 resíduos de glicose) unidos 99% das vezes por ligações alfa-(1,4) e 1% das vezes por ligações alfa-(1,6). As ligações alfa-(1,6) geram cerca de 9 a 20 pontos de ramificações enquanto que a amilose possui de 3 a 11 cadeias lineares (TESTER et al., 2004).

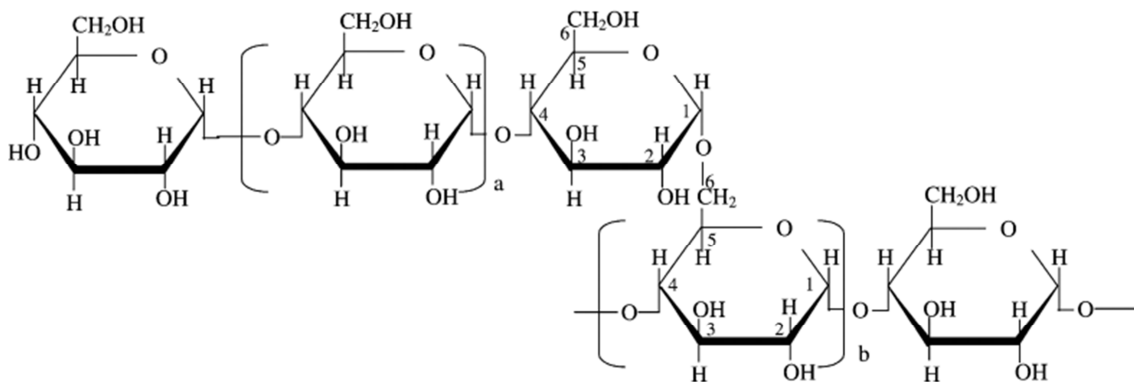
Figura 1- Molécula de amilose composta por ligações glicídicas alfa-(1,4)



Fonte: (TESTER; KARKALAS, 2002).

A amilopectina (Figura 2) é um polímero muito maior em relação à amilose (9.600-15.900 resíduos de glicose), composto por cadeias lineares de glicose unidas por ligações alfa-(1,4) com pontos de ramificações alfa-(1,6) a cada 20-25 resíduos de glicose (CHESSON; FORSBERG, 1997). De acordo com Ball et al. (1998), a organização das ramificações alfa-(1,6) é responsável pelo empacotamento denso e semi-cristalino dos resíduos de glicose nos grânulos de amido.

Figura 2 – Molécula de amilopectina, com pontos de ramificação alfa-(1-6)



Fonte: (TESTER; KARKALAS, 2002).

A amilose e amilopectina encontram-se empacotadas nas plantas na forma de pequenos grânulos, que variam de 1 a 200 μm de diâmetro com formatos redondo, lenticular, oval ou poligonal. (CHESSON; FORSBERG, 1997). Os grânulos íntegros apresentam baixa capacidade de absorção de água por serem estabilizados por grande quantidade de pontes de hidrogênio inter e intramoléculas de amilose e amilopectina, sendo que os diversos tipos de processamento visam romper as pontes de hidrogênio dentro do grânulo de amido para melhorar a capacidade de hidratação e consequentemente aumentar a susceptibilidade à digestão enzimática (FLINT; FORSBERG, 1995).

O amido dos alimentos pode ser classificado como ceroso (*waxy*) quando a percentagem de amilose é baixa (<15%), normal quando a amilose representa 20-35% ou rico em amilose quando esta ultrapassa 40% do conteúdo de amido (TESTER et al., 2004). Nos cereais, outros componentes como lipídios, proteínas e minerais, estão associados a grânulos de amido. Com relação aos lipídios e proteínas, eles são os compostos não-amiláceos que podem afetar o estado físico e a susceptibilidade da hidrólise do amido em animais de produção (CORNELL et al., 1994; BALDWIN, 2001).

Lipídios ligados aos grânulos de amido podem estar localizados na superfície como também no interior do grânulo de amido (SOUTH et al., 1991), sendo que os lipídios são normalmente ácidos graxos livres e fosfolipídios, podendo estar ligados em mais que 55% da fração de amilose nos grânulos de amido em cereais (BLAZEK, 2008). Os complexos amido-lipídicos causam diminuição da digestão do amido por reduzirem o contato entre enzima e substrato. Além disso, a quantidade desses complexos está negativamente associada com a intensidade de turgidez do grânulo, devido ao aumento da hidrofobicidade (VASANTHAN; BHATTY, 1996). Com isso, a digestibilidade do amido pode ser prejudicada diretamente, pois a água é necessária para a degradação enzimática do amido.

As proteínas associadas aos grânulos de amido também estão localizadas na superfície e no interior dos grânulos e podem ser divididas em dois tipos: (1) as 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 grânulo (LÁSZTITY, 1984).

As prolaminas são as principais proteínas de armazenamento do endosperma na maioria dos cereais (SHEWRY; HALFORD, 2002) e têm recebido interesse na nutrição animal devido a possível interferência destas na digestão do amido. No caso do milho as prolaminas são denominadas de zeínas que estão associadas com a vitreosidade e as características do endosperma (LARSON; HOFFMAN, 2008). Os técnicos usam o termo vitreosidade para subclassificar os tipos de endosperma, mensurando a proporção do endosperma vítreo contido no endosperma total (RAMOS et al., 2009). Especialmente, os endospermas do milho farináceo e opaco possuem menor concentração de zeínas quando comparada com os endospermas duro e dentado (HAMAKER et al., 1995; LANDRY et al., 2000). No endosperma farináceo a matriz proteica apenas envolve o grânulo de amido parcialmente e ainda é mais fino que a matriz proteica encontrada no endosperma duro (OPATPATANAKIT et al., 1994; PHILIPPEAU et al., 2000).

3.2 DIGESTÃO DO AMIDO

Nos ruminantes a degradação do amido requer a ação de uma série de enzimas e processos mecânicos, que se inicia com a mastigação e ação da amilase salivar (quantidades insignificantes), ação da microbiota ruminal, hidrólise ácida no abomaso, e ação de enzimas e microrganismos ao longo do lúmen intestinal (SWENSON; REECE, 1986). No rúmen, o amido é degradado e utilizado por bactérias e protozoários (VAN SOEST, 1994). As bactérias com maior capacidade para a digestão de amido no rúmen são *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*, seguidas da *Prevotella ruminicola* e algumas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* (cepas 49 e A38; COTTA, 1988). Porém, outras bactérias são consideradas fermentadoras de amido incluindo: *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Selenomona lactylitica*, *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus bromii*, *Succinimonas amylolytica* e *Lactobacillus spp.* (CHURCH, 1979; KOTARSKI et al., 1992). Os protozoários (principalmente os ciliados) engolfam partículas solúveis do fluido ruminal formando vacúolos de digestão. Os grânulos de amido engolfados são digeridos de maneira lenta quando comparada com a digestão realizada pelas bactérias, limitando a velocidade de queda do pH ruminal (JOUANY, 1996), complementando a ação das bactérias, as quais degradam compostos insolúveis utilizando enzimas extracelulares após a adesão as partículas de alimentos.

A degradação do amido no rúmen tem início com a adesão de bactérias ao grânulo devido a uma interação iônica hidrofóbica que envolve forças de van der Waals, envolvendo a anulação de cargas da membrana celular da bactéria (VAN SOEST, 1994). Após a adesão das bactérias ao grânulo de amido, ocorre a produção de endo- e exo-amilases que clivam aleatoriamente as ligações internas das cadeias glicosídicas liberando oligossacarídeos de baixo peso molecular (maltodextrinas), e a isoamilase que cliva as ligações alfa-1,6 dos pontos de ramificações da amilopectina. A glicoamilase e beta-amilase clivam a glicose e maltose nas terminações não redutoras (TRICARICO et al., 2008). 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 (KOSLOSKY, 2009).

Dependendo do processamento e fonte do amido e da taxa de passagem do alimento, uma quantidade variável do amido ingerido pelo animal pode escapar da fermentação ruminal

e ser digerida até glicose no intestino delgado por enzimas de origem pancreática ou produzidas pela própria mucosa intestinal (maltase e isomaltase). O processo de assimilação intestinal do amido começa no lúmen do intestino delgado, com a secreção e ação a alfa-amilase pancreática (sintetizada nas células acinares do pâncreas). Uma vez sintetizada, a alfa-amilase é empacotada em grânulos zimogênicos e armazenada até um sinal estimulante (colecistoquinina) para a célula iniciar a exocitose, liberando enzimas no duodeno.

Croom et al. (1992) também descreveram que a quantidade de líquido pancreático secretado no duodeno aumentou conforme aumento nas concentrações de AGV com cadeias carbônicas maiores. A alfa-amilase é uma endoglicosidase, 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 alfa-(1,4). A alfa-amilase bovina possui características similares a de não-ruminantes com pH ótimo de 6,9 (CLARY et al., 1968; HARMON, 1993). Os produtos da digestão luminal do amido pela alfa-amilase são uma mistura de maltose, maltotriose e diversas dextrinas (HARMON, 1993).

Maltase e isomaltase são dissacaridasas que apresentam maior atividade no jejuno e íleo em relação ao duodeno. A maltase digere as moléculas de maltose proveniente do amido e a isomaltase hidrolisa as ligações alfa-(1,6) encontradas nos pontos de ramificação da amilopectina secretando moléculas de glicose livres. Há relativamente pouca informação disponível descrevendo a regulação e a composição das dissacaridasas presentes na mucosa intestinal. Existem quatro proteínas que possuem atividade de carboidrase na mucosa do intestino delgado de não-ruminantes. A sucrase-isomaltase contribui com aproximadamente 80% e a maltase-glucoamilase contribui com 20% da atividade de maltase na mucosa intestinal (GALAND, 1989). Apesar de contribuir com atividade de alfa-glicosidase (KREIKEMEIER et al., 1990), a trealase ainda não possui importância nutricional estabelecida. A quarta carboidrase de importância nutricional é a lactase. Os ruminantes possuem um complexo enzimático muito próximo dos não ruminantes, com exceção da sucrase (KREIKEMEIER et al., 1990). Finalmente, o amido que escapa da digestão enzimática no intestino delgado (conhecido como amido resistente) pode ser ainda fermentado no intestino grosso pelos microrganismos anaeróbicos, de forma semelhante à fermentação ruminal ou pode ser eliminado nas fezes.

Há muita discussão na literatura sobre a limitação ou não da capacidade de ruminantes em digerir amido no intestino delgado (MCLEOD et al., 2006). A infusão duodenal de amido em até 1500 g/d resulta em 50% de desaparecimento, enquanto que infusões de glicose

resultam em >70% de desaparecimento, sugerindo que a degradação de amido pode ser um fator limitante em ruminantes (KREIKEMEIER et al., 1991). No entanto, esses resultados devem ser interpretados cuidadosamente. Primeiramente, infusões de um único nutriente em animais consumindo dietas controladas podem levar a respostas que não são totalmente fisiológicas, por exemplo, co-infusões de aminoácidos com amido aumentaram a digestão de amido no intestino delgado (BRAKE et al., 2014). Ainda, resultados de estudos com infusões não consideram que o animal ao consumir fontes de amido, este é afetado previamente por enzimas e pelo ambiente químico ruminal, e por esse motivo tende a ser mais digestível do que o amido integral infundido no duodeno. A digestão de amido no intestino delgado leva a absorção de glicose pelos enterócitos, no entanto, o fluxo portal de glicose para vacas lactantes é negativo (REYNOLDS et al., 1988). Este fluxo negativo reflete a utilização de glicose como fonte de combustível por vísceras drenadas pela veia porta.

Um problema em mudar a digestão do amido para o intestino é que maior quantidade de amido chegará ao intestino grosso, aumentando a fermentação no local. Apesar de dados relevantes serem limitados, a digestão intestinal de carboidratos não- fibrosos tem variado de <1% até 12% do total consumido (GRESSLEY et al., 2011). Mesmo a fermentação no intestino grosso produzir AGV, uma parte dos AGV é perdida nas fezes e pouca proteína microbiana é absorvida. Além disso, altas taxas de fermentação de carboidratos não-fibrosos no intestino grosso resultam em rápida produção de AGV, diminuindo o pH fecal, determinando a acidose intestinal (WHEELER; NOLLER, 1977; GRESSLEY et al., 2011).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas são substâncias biológicas ou macromoléculas produzidas por um organismo vivo que atuam como catalizadores em reações bioquímicas específicas (GURUNG et al., 2013). Quimicamente, as enzimas são proteínas com uma estrutura molecular tridimensional complexa. A natureza proteica das enzimas tem importante implicação para sua estabilidade em altas temperaturas ou durante seu 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 especificidade por um

substrato, sendo que cada enzima degrada substratos em sítios específicos de reação (RAVINDRAN, 2013).

Enzimas necessitam de ambiente adequado para agir, sendo a umidade essencial para sua mobilidade e para a solubilidade do substrato. Normalmente, a atividade enzimática aumenta até 40°C e então, sua atividade diminui bruscamente devido a perda da estrutura por desnaturação. A maioria das enzimas são desnaturadas em ambientes com pH muito baixo ou alto, sendo que o ótimo pH para a maior parte das enzimas está entre de 4 a 6. Em teoria a taxa de reação é diretamente proporcional à concentração da enzima. A taxa de reação aumenta de acordo com o aumento da concentração enzimática; no entanto, na prática, devido a outras limitações no trato digestório dos animais, essa relação linear não ocorre, tornando-se não linear. Finalmente, na presença de concentrações adequadas de enzima, a taxa de reação aumenta conforme a concentração de substrato até o ponto máximo seja atingido, ou seja, quando há mais sítios de ligação no substrato do que enzima para se ligar. Deve-se salientar que as enzimas, dependendo de suas origens (fúngica, bacteriana ou de levedura), necessitam de diferentes condições ambientais para potencializarem suas atividades e com isso elas podem ter diferentes graus de adaptação no trato digestório dos animais e serem efetivas ou não. Para se atingir máximo benefício da utilização de enzimas diversas condições são necessárias, incluindo umidade, temperatura, pH, concentração de enzimas e de substrato (AEHLE, 2004).

Devido à grande variedade de atividades, as enzimas têm sido classificadas de acordo com a reação de catálise de cada uma, utilizando-se um número de Comissão de Enzima (EC, *enzyme commission number*; WEBB, 1992). De acordo com a União Internacional de Bioquímica nomeou as enzimas em 6 classes: oxi-redutase como EC1, transferase como EC2, hidrolase com EC3, liase como EC4, isomerase como EC5 e ligase como EC6. Outra classificação das enzimas é definida de acordo com o substrato a qual atuam. Atualmente, na nutrição animal os tipos de enzimas utilizadas são as que degradam fibra (fibrolítica), proteína (protease), amido (amilase) e fitato (fitase).

Os mecanismos pelos quais as enzimas podem gerar benefícios para a produção animal são (BEDFORD; SCHULZE, 1998):

- 1) Degradação de ligações específicas em ingredientes que não são normalmente hidrolisadas por enzimas digestivas endógenas.
- 2) Degradação de fatores anti-nutricionais que limitam a digestão de nutrientes de maneira direta e aumento da viscosidade intestinal.

- 3) Ruptura da integridade do endosperma e extravasamento de nutrientes que estão ligados ou entremeados na parede celular.
- 4) Redução de secreções endógenas e perdas de proteína pelo intestino, diminuindo a necessidade de nutrientes para a manutenção (COWIESON; RAVINDRAN, 2007).
- 5) Mudança dos locais de digestão para sítios mais eficientes.
- 6) Mudanças na morfologia intestinal.
- 7) Aumento da eficiência de produção e redução dos custos.
- 8) Diminuição de resíduos: ao melhorar a digestão de nutrientes espera-se menor excreção de nitrogênio e fósforo no meio ambiente.
- 9) Manutenção da saúde do intestino: ao aumentar a digestibilidade de nutrientes, menos nutrientes estão disponíveis no intestino do animal para o crescimento de bactérias patogênicas.

A produção em larga escala de enzimas exógenas envolve uma série de disciplinas básicas dentre as quais se destacam a microbiologia, genética, bioquímica e a engenharia, tendo como princípio básico a fermentação (SADHU; MAITI, 2013). Os produtos enzimáticos são produzidos por um processo de fermentação descontínuo, começando por semeadura de um meio de cultura, normalmente contendo nitrogênio, carboidratos, minerais e agentes de superfície ativos (BEAUCHEMIN et al., 2004a).

Os métodos de fermentação são divididos em duas categorias: a fermentação em estado sólido e fermentação submersa (MURAD; AZZAZ, 2010). A fermentação em estado sólido é um processo de cultivo de microrganismos em substratos úmidos e sólidos como 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). A fermentação em estado sólido é uma técnica apropriada para fungos e microrganismos que precisam de menos umidade enquanto que a fermentação submersa é comumente utilizada para bactérias.

Aproximadamente 90% das enzimas comerciais são produzidas pelo método de fermentação submersa, pois este método permite melhor controle das condições durante a fermentação. A fermentação em estado sólido cria um contato firme com substrato insolúvel atingindo uma maior concentração de substrato para a fermentação. 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 por outros fatores que

incluem: 1) 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 uma grande variedade de ambientes com diferentes temperaturas e pH (IMMANUEL et al., 2006).

O processo de fermentação industrial normalmente dura de 3 a 7 dias, dependendo do microrganismo e das condições para o crescimento (COWAN, 1994). Uma vez que a fermentação está concluída, as enzimas são separadas do resíduo de fermentação. Os produtos enzimáticos são relativamente concentrados e purificados, contendo atividade enzimática específica. Portanto, eles não contêm células vivas. Apesar dos inúmeros produtos comercializados para a produção animal, estes derivam principalmente de apenas quatro espécies de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus faecium*, spp.) e de três espécies de fungos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, e *Saccharomyces cerevisiae*; MUIRHEAD, 1996).

3.3 ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

Os processos digestivos são mediados pela ação de enzimas gerando grande interesse dos pesquisadores e nutricionistas em utilizar preparações enzimáticas para aumentar a produtividade dos animais. Desde a década de 80, a utilização de enzimas tem exercido papel essencial em melhorar a eficiência de produção de carne e ovos por mudar o perfil nutricional dos ingredientes. Ao degradarem componentes específicos da dieta, as enzimas permitem maior aproveitamento dos nutrientes dos alimentos aumentando a eficiência alimentar (BARLETTA, 2011).

Enzimas exógenas podem aumentar a atividade enzimática total no rúmen (NOZIÉRE et al., 2014). No entanto, o aumento da capacidade hidrolítica no rúmen irá depender da quantidade de enzima aplicada e da atividade da enzima nas condições ruminais (pH variando entre 5,5 e 6,8 e temperaturas de $39 \pm 1^\circ\text{C}$). Por exemplo, a maioria das enzimas oriundas do *Trichoderma spp.* possuem atividade ótima em temperaturas maiores e pH menores do que encontrados no rúmen. Enquanto alguns produtos podem ter alta atividade enzimática quando avaliados em ótimas condições para a enzima em questão, a sua atividade pode ser muito menor quando a avaliação ocorrer em condições que refletem o ambiente ruminal.

Por exemplo, Vicini et al. (2003) não observaram diferenças na produção de leite quando enzimas foram adicionadas a dieta de vacas leiteiras. A falta de resposta de uma das enzimas foi atribuída ao fato de que 2/3 da atividade enzimática foi reduzida quando avaliada em pH ruminal, e outros 2/3 da atividade enzimática foram reduzidos quando avaliada em temperatura do rúmen. Uma meta-análise (ORTIZ-RODEA et al., 2013) foi realizada para investigar os efeitos de enzimas exógenas na alimentação de ruminantes na produção e composição do leite. A meta-análise incluiu observações de 29 experimentos, com 52 tratamentos, 9 enzimas e 1187 animais e os autores concluíram que a adição de enzimas não afetou a produção e as concentrações de gordura, lactose e proteína do leite.

A especificidade das enzimas representa o principal dilema para a formulação de novos produtos enzimáticos para ruminantes, pois as dietas de ruminantes contêm diversos tipos de forragens e de grãos. Portanto, para se atingir o benefício máximo, um número grande de diferentes enzimas deveria ser utilizado em uma dieta. Uma abordagem mais realista seria utilizar uma enzima que não seja a melhor para um tipo de alimento, mas para a maioria das dietas. No entanto, a maior parte das pesquisas com suplementos enzimáticos para ruminantes focam na preparação de enzimas fibrolíticas, na tentativa de otimizar a utilização de nutrientes provenientes dos ingredientes de relativo baixo custo quando comparado com os cereais (MCALLISTER et al., 2001; BEAUCHEMIN et al., 2003). Os efeitos no rúmen ligados ao modo de ação das enzimas, de forma geral descritos nas duas revisões citadas previamente, incluem hidrólise direta, aumento da ligação de bactérias ao substrato, estimulação da população microbiana, e sinergismo com as enzimas microbianas.

As enzimas amilolíticas quando comparada as enzimas fibrolíticas têm recebido pouca atenção pelos nutricionistas de ruminantes. Uma das hipóteses para esse fato é que a digestão de amido pelos ruminantes é relativamente alta (em alguns casos mais de 90%) e geralmente não limita a produção, o que ocorre quando a digestão da fibra é baixa ou lenta. Além disso, a rápida digestão de quantidades excessivas de amido no rúmen pode causar acidose, o que representa uma preocupação da inclusão de enzimas amilolíticas na dieta de ruminantes (OWENS et al., 1998). A revisão de literatura relacionada aos resultados de desempenho produtivo dos animais será focada na utilização de enzimas amilolíticas. A amilase é uma enzima que catalisa a quebra do amido em açúcares, foi a primeira enzima a ser descoberta e isolada por Anselme Payene em 1833. Todas as amilases são hidrolases glicosídicas que agem nas ligações alfa-(1,4).

3.3.1 Enzimas amilolíticas na alimentação de vacas leiteiras

Chen et al. (1995) avaliaram os efeitos de enzima fúngica (com atividades de amilase e protease) na resposta produtiva de vacas leiteiras recebendo sorgo laminado ou floculado. As vacas estavam no meio de lactação (110 ± 70 dias) e receberam dietas com aproximadamente 30% de amido. Os autores não observaram efeitos da enzima para ingestão de MS, produção (35,65 kg/d) e composição do leite dos animais. Porém, observaram aumento da digestibilidade aparente total da PB ($P = 0,05$) sem afetar a digestibilidade aparente total da MS. Tricarico et al. (2005) avaliaram a inclusão de doses dietéticas crescentes de um extrato de *Aspergillus oryzae* contendo atividade de alfa-amilase (AmaizeTM, Alltech Inc. Nicholasville, KY, EUA) no desempenho produtivo de vacas em meio de lactação (121 ± 74 dias) recebendo dieta com 27,1% de amido. Os autores encontraram efeito quadrático positivo para a produção de leite (sem correção, corrigida para gordura e para energia), sem os tratamentos afetarem a composição do leite e a ingestão de MS. Além disso, a suplementação com enzimas aumentou linearmente a proporção de acetato e diminuíram linearmente a proporção de propionato no rúmen.

DeFrain et al. (2005) suplementaram vacas no período de transição (-21 a 21 d relativos ao dia do parto) com alfa-amilase (AmaizeTM, Alltech Inc.) e não observaram diferenças na ingestão de MS, produção e composição do leite dos animais. Além disso, os autores não observaram diferenças nas concentrações de glicose sanguínea. A fermentação ruminal não foi afetada pela suplementação com enzima exógena tanto no período pré-parto como no pós-parto.

Hristov et al. (2008) avaliaram a inclusão de uma preparação de enzimas com atividades de xilanase e alfa-amilase na fermentação ruminal e digestibilidade de nutrientes de 4 vacas em final de lactação recebendo dietas com 45,7% de carboidratos não-fibrosos. A preparação enzimática não afetou ($P \geq 0,43$) a fermentação ruminal dos animais incluindo valores de pH, concentração de amônia, produção total de AGV, proporções de propionato, acetato, butirato, ácidos graxos de cadeia ramificada e fluxo de nitrogênio microbiano. Ainda, os tratamentos não afetaram a ingestão de MS como também a digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Klingerman et al. (2009) avaliaram os efeitos de duas formulações de enzimas [uma experimental (7B) e uma comercial (AmaizeTM, Alltech Inc.) na fermentação ruminal *in vitro* de milho e no desempenho de vacas em início de lactação (68 ± 31 d) recebendo uma dieta com 25,7% de amido. Os tratamentos não influenciaram a fermentação *in vitro* do milho.

Ambas preparações de enzimas aumentaram a ingestão de MS dos animais (27,0, 29,0 e 28,5 kg/d para os tratamentos controle, 7B e AmaizeTM, respectivamente). Além disso, a enzima experimental 7B em uma dose baixa, aumentou a produção de leite dos animais quando comparado com o controle (43,2 vs. 47,1 kg/d para controle e 7B, respectivamente). Os tratamentos não influenciaram a composição do leite (gordura e proteína) e ganho de peso dos animais. No mesmo trabalho, porém em um ensaio de digestibilidade, os autores observaram que a enzima experimental 7B (em baixa dose) aumentou a digestibilidade aparente total de MS sem alterar a ingestão de MS.

Gencoglu et al. (2010) compararam uma dieta de baixo teor de amido (21,8%) com adição de amilase exógena com uma dieta de baixo teor de amido sem a enzima e com uma dieta de teor normal (27,1%) de amido sem a adição da enzima (Ronozyme RumiStar; DSM Nutritional Products, Basal, Suíça; Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Neste experimento os autores utilizaram vacas no início de lactação (51 ± 22 d) e as dietas experimentais foram fornecidas por 12 semanas. Os animais alimentados com a dieta de baixo teor de amido com a adição de enzima tiveram menor ($P = 0,01$) ingestão de MS e de amido quando comparado com aqueles alimentados com a dieta de baixo teor de amido sem adição de amilase, sem demonstrarem alterações na produção e composição do leite. Além disso, a adição de enzima diminuiu a concentração de nitrogênio ureico no leite. Os tratamentos não influenciaram o peso e o escore de condição corporal dos animais. Finalmente, a adição de enzima aumentou ($P = 0,01$) a digestibilidade aparente total da MS, PB, FDN e amido.

Weiss et al. (2011) avaliaram a adição de amilase exógena (Ronozyme RumiStar, DSM Nutritional Products; Novozymes) em dietas de vacas leiteiras com milho moído grosseiramente em dois experimentos. No primeiro experimento, os autores avaliaram a adição de enzima em dietas com baixo e teor de amido (25,85% e 31,1%, respectivamente) para vacas no terço médio de lactação ($n = 8$, 104 ± 13 dias em lactação) sobre a digestibilidade de nutrientes. Neste estudo, a enzima aumentou a digestibilidade aparente total da FDN ($P < 0,07$) sem alterar a digestibilidade da MS. No segundo experimento os autores avaliaram os mesmos tratamentos em animais em início para o terço médio de produção ($n = 48$, 74 ± 7 dias em lactação) sobre o desempenho produtivo, e não foram observados efeitos da enzima sobre a produção e composição do leite, ingestão de MS, peso e escore de condição corporal.

Ferrareto et al. (2011) tiveram como objetivo avaliar as respostas durante 10 semanas de lactação de vacas leiteiras de alta produção (68 ± 29 dias em lactação no início do experimento; com produção média no experimento de 50,5 kg/d) alimentadas com uma dieta

com baixo teor de amido (22,1%) ou com uma dieta de baixo teor de amido (21,2%) com a adição de alfa-amilase exógena (Ronozyme RumiStar, DSM Nutritional Products; Novozymes). Os autores não encontraram diferenças no consumo de MS (kg/d), porém observaram menor ($P = 0,03$) consumo de amido para os animais suplementados com a enzima. No mesmo trabalho, a produção e composição do leite não foram afetadas pelos tratamentos.

Em um trabalho avaliando a digestão ruminal de vacas primíparas ($n = 4$, 82 ± 3 dias em lactação no início do experimento) alimentadas com dietas com baixo e alto teor de amido (19,8% e 29,9%, respectivamente), com ou sem amilase exógena (Ronozyme RumiStar, DSM Nutritional Products; Novozymes), Nozière et al. (2014) não encontraram efeito ($P \geq 0,22$) da adição de enzima na dieta no peso corporal (PC), ingestão de MS, produção e composição do leite, e utilização de nitrogênio pelos animais. Além disso, os autores não encontraram diferenças na digestão aparente total de MS, FDN e amido, como também na produção de nitrogênio microbiano. Porém, a adição de amilase exógena aumentou a digestibilidade ruminal verdadeira da MS, e a digestibilidade aparente ruminal do amido. Com relação à fermentação ruminal, a adição de alfa-amilase não afetou o pH, a concentração de amônia e a produção total de AGV no rúmen. No entanto, a adição de alfa-amilase às dietas aumentou ($P \leq 0,001$) as proporções de propionato e valerato no rúmen, e diminuiu a proporção de acetato e a relação acetato : propionato no rúmen.

O último trabalho publicado com a suplementação de enzimas amilolíticas para vacas em lactação foi publicado por Vargas-Rodriguez et al. (2014). Os autores avaliaram a adição de enzima amilolítica (Ronozyme RumiStar, DSM Nutritional Products; Novozymes) em dietas com baixo teor de amido (~21,0%) de vacas múltiplas (entre 70 e 130 dias em lactação) no desempenho dos animais. Os autores não observaram efeito da adição de alfa-amilase na ingestão de matéria seca, produção e composição de leite, no peso e escore de condição corporal dos animais.

De maneira geral, o resumo dos resultados (Tabela 1) com a adição de enzimas amilolíticas em dietas de vacas leiteiras, independentemente da fase de lactação, produção de leite, volumoso utilizado, teor de amido da dieta e outros fatores, sugere que as enzimas não melhorem a digestibilidade aparente total da MS e a produção de leite dos animais. Dentre 10 estudos que avaliaram enzimas amilolíticas na alimentação de vacas leiteiras, apenas o de Tricarico et al. (2005) descreveu efeitos positivos na produção de leite dos animais.

3.3.2 Enzimas amilolíticas na alimentação em ovinos e gado de corte

Lee-Rangel et al. (2010) avaliaram os efeitos da inclusão de enzima amilolítica de *Bacillus licheniformis* e de *Aspergillus niger* em dietas com alto concentrado no desempenho de cordeiros. Os autores não encontraram diferenças na ingestão de MS, ganho de peso diário, conversão alimentar, fermentação ruminal e digestibilidade aparente total e no rúmen da MS e do amido. A justificativa para a falta de resposta à suplementação com enzima foi da alta digestibilidade ruminal do amido no rúmen (92,6% para o grupo controle). Tricarico et al. (2014) realizaram três ensaios para examinar os efeitos de um extrato de *Aspergillus oryzae* (AmaizeTM, Alltech Inc.) contendo atividade de alfa-amilase no desempenho de bovinos de corte em terminação.

Tabela 1 - Resumo dos resultados de desempenho produtivo dos ensaios que avaliaram a inclusão de amilase exógena em dietas de vacas em lactação

| Ensaio ¹ | Delineamento ² | (n) | Estágio ³ | Amido (%) | Produto | IMS ⁴ (kg/d) | Dig. MS ⁵ | Dig. FDN ⁶ | PL ⁷ (kg/d) |
|---------------------|----------------------------------|-----|----------------------|------------|-----------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | Blocos casualizados (70 d) | 36 | Meio | 30,4 | Sem dados | NS | NS | NS | NS |
| 2 | QL (21 d) | 24 | Meio | 27,1 | Amaize | NS | Sem dados | Sem dados | + |
| 3 | QL (22 d) | 4 | Final | (NFC) 45,7 | Sem dados | NS | NS | NS | Sem dados |
| 4 | QL (21 d) | 28 | Início | 25,5 | Amaize | + | NS | + | NS |
| 5 | DIC (12 semanas) | 36 | Início | 21,8 | RR ⁸ | - | + | + | NS |
| 6 | QL (24 d) | 8 | Meio | 26 | RR | NS | NS | + | NS |
| 7 | Blocos casualizados (12 semanas) | 48 | Início | 26 | RR | NS | Sem dados | Sem dados | NS |
| 8 | DIC (10 semanas) | 45 | Início | 21,5 | RR | NS | Sem dados | Sem dados | NS |
| 9 | QL (28 d) | 4 | Meio | 29 ou 20 | RR | NS | NS | NS | NS |
| 10 | QL (28 d) | 48 | Meio | 21 | RR | NS | Sem dados | Sem dados | NS |

*NS: não significativo, - : efeito negativo, +: efeito positivo.

¹1: Chen et al., 1995, 2: Tricarico et al., 2005, 3: Hristov et al., 2008, 4: Klingerman et al., 2009, 5: Gengoclu et al., 2010, 6: Weiss et al., 2011, 7: Weiss et al., 2011, 8: Ferrareto et al., 2011, 9: Nozière et al., 2014 e 10: Vargas-Rodriguez et al., 2014.

²DIC: delineamento inteiramente casualizado, QL: quadrado latino.

³Estágio de lactação: início – 0 a 100 dias, meio – 100 a 200, fim > 200 dias em lactação.

⁴Ingestão de matéria seca.

⁵Digestibilidade aparente total da matéria seca.

⁶Digestibilidade aparente total da fibra insolúvel em detergente neutro.

⁷Produção de leite.

⁸RR: Ronozyme RumiStar (DSM Nutritional Products, Basal, Suíça; Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca).

No primeiro ensaio os autores avaliaram a inclusão da enzima em dietas com diferentes ingredientes como fonte de volumoso (feno de alfafa ou casca de caroço de algodão) e não observaram efeito da enzima na ingestão de MS, conversão alimentar e ganho médio diário dos animais, independentemente da fonte de volumoso utilizado.

No segundo ensaio utilizaram novilhas recebendo milho quebrado ou grão úmido e suplementação de amilase em três doses, e também não observaram efeitos no ganho médio diário, ingestão de MS e conversão alimentar com a adição da enzima. No terceiro ensaio os autores avaliaram o efeito da suplementação de amilase no crescimento de novilhos com restrição de ingestão de MS e também não encontraram diferenças no ganho médio diário, ingestão de MS e conversão alimentar.

Metwally e Schwarz (2015) estudaram o efeito de doses crescentes de uma preparação de amilase (Amylase-7B[®], Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) no desempenho e qualidade de carne de bois em terminação recebendo dietas com mais de 36% de amido. Os autores observaram que a amilase não afetou a ingestão de MS e o ganho de peso diário. A suplementação com amilase aumentou a digestibilidade aparente total da FDN, sem afetar a digestibilidade da MS ou do amido. Não foram observadas diferenças na qualidade da carne dos animais.

3.3.3 Métodos de utilização de enzimas na alimentação animal

Há diversos métodos de utilização de enzimas na produção de bovinos, mas ainda não está estabelecido o método mais efetivo. Os métodos variam desde um pré-tratamento do alimento por um período de tempo antes da alimentação (por exemplo, durante o processo de ensilagem, ou durante a colheita da forragem) até aplicação na hora da alimentação (aplicação na mistura total da dieta ou no concentrado, ou até mesmo aplicação direta no rúmen). A adição de enzimas exógenas tem sido realizada na mistura da dieta total (BEAUCHEMIN et al., 1999; PHIPPS et al., 2000a; YANG et al., 2000), na ensilagem de forragem (BEAUCHEMIN et al., 1995; PHIPPS et al., 2000b), no concentrado (RODE et al., 1999), em suplemento (BOWMAN et al., 2002), ou em uma pré-mistura (BOWMAN et al., 2002). Espera-se que enzimas exógenas sejam mais efetivas quando aplicadas em alimentos com alta umidade, como as silagens, do que em alimentos secos. Pois, a necessidade de água para a

hidrólise de polímeros complexos a açúcares solúveis é um princípio bioquímico (LEHNINGER, 1982).

Os produtos com enzimas são relativamente estáveis no ambiente ruminal, especialmente quando administrados com os alimentos (HRISTOV et al., 1998; MORGAVI et al., 2000, 2001). As condições do rúmen após a alimentação, como redução da atividade proteolítica e menor pH, ajudam a aumentar a estabilidade das enzimas (MORGAVI et al., 2001). Yang et al. (2000) observaram que a aplicação de enzimas (em forma líquida) no alimento seco gera um complexo estável entre enzima e alimento aumentando a eficiência da enzima. Esse complexo ocorre rapidamente (algumas horas) e uma vez estabilizado no alimento seco, as enzimas são eficientes durante várias semanas.

Beauchemin et al. (2004b) sugeriu que a associação entre as enzimas e o alimento pode viabilizar um ataque enzimático na pré-ingestão e/ou aumentar a resistência das enzimas a proteólise ruminal devido ao complexo entre enzima e alimento. Sutton et al. (2003) encontraram respostas positivas ao suplementarem vacas com enzimas adicionadas na mistura total dieta devido a um aumento na ingestão de matéria orgânica digestível, sendo que no mesmo estudo os autores não encontraram efeitos significativos quando a enzima foi aplicada no concentrado ou colocada diretamente no rúmen. Outros autores também não encontraram respostas positivas quando as enzimas foram infundidas diretamente no rúmen dos animais (LEWIS et al., 1996; MCALLISTER et al., 1999). A perda de atividade enzimática exógenas no rúmen pode ocorrer devido a degradação por proteases microbianas ou pela passagem do líquido ruminal para o omaso. Treacher et al. (1996) compararam os efeitos de borrifar enzimas na forragem e adicionar a enzima diretamente no rúmen via cânula. A digestibilidade da MS e da fibra foram maiores quando a enzima foi aplicada sobre o alimento. Ainda, a adição direta da enzima no rúmen diminuiu a digestibilidade da MS. Esses resultados implicam que algumas misturas enzimáticas que não foram aplicadas e estabilizadas no alimento, terão pouco ou nenhum efeito benéfico.

No entanto, existem evidências que a degradação das enzimas exógenas no rúmen não seja um problema significativo. Chesson (1993) descreveu que a extensa glicosilação das enzimas fúngicas as protegem do ataque de proteases em animais monogástricos. Além disso, Annison (1992) demonstrou que as atividades de beta-gluconase e xilanase foram detectadas no ílio de galinhas após a suplementação com preparações enzimáticas. Hristov et al. (1996) demonstraram que a atividade de enzimas exógenas foi mantida durante horas no rúmen e no

intestino delgado de vacas leiteiras. Por fim, Nozière et al. (2014) demonstraram que a atividade total de amilase no rúmen aumentou com a suplementação de amilase exógena.

3.3.4 Mecanismo de ação da alfa-amilase oriunda de *Aspergillus oryzae*

O suplemento dietético com atividade de amilase (AmaizeTM, Alltech Inc) que foi avaliado neste trabalho é baseado em um extrato de *Aspergillus oryzae* em pó que contém principalmente atividade de alfa-amilase (EC 3.2.1.1). As atividades de protease, celulase e xilanase são negligenciáveis nesta preparação (TRICARICO et al., 2005).

Tricarico et al. (2008) descreveu a atividade amilolítica das bactérias ruminais que digerem amido e seus produtos, dando uma compreensão dos potenciais modos de ação da suplementação de alfa-amilase no rúmen. As bactérias do rúmen com maior potencial de digestão de amido são *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*, seguidas por *Prevotella ruminicola* e algumas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Todas as amilases dessas bactérias produziram diversos oligossacarídeos após degradarem amido em experimento *in vitro* (COTTA, 1988). *Butyrivibrio fibrisolvens* 49, *Ruminobacter amylophilus* H18, *Streptococcus bovis* JB1 e *Prevotella ruminicola* 23, produziram principalmente maltose a partir de maltohexose, e *Prevotella ruminicola* B14 também produziram maltoheptaose. Além disso, a exposição prolongada da enzima diminuiu a produção de oligossacarídeos grandes, e conseqüentemente aumentou a produção de oligossacarídeos pequenos provenientes da hidrólise da amilose. Portanto, é possível que o amido no rúmen seja hidrolisado a uma diversidade de produtos que vão desde glicose a maltoheptaose que podem ser utilizados como substrato para crescimento de diversos microorganismos (TRICARICO et al., 2008).

Tricarico et al. (2008) sugerem que a suplementação de alfa-amilase proveniente de *Aspergillus oryzae* não aumenta a digestibilidade ruminal do amido, mas altera a fermentação ruminal para uma maior proporção molar de butirato e acetato e diminuição de propionato, presumidamente por alteração do metabolismo microbiano ou alteração da população microbiana no rúmen. Uma série de experimentos foi conduzida pelo mesmo grupo de pesquisa para avaliar os efeitos da suplementação de alfa-amilase no crescimento de cepas bacterianas que estão no ambiente ruminal na degradação do amido. Culturas purificadas de *Butyrivibrio fibrisolvens* (cepa D1, 49 e A38), *Streptococcus bovis* S1, *Megasphaera elsdenii*

T81 e *Selenomonas ruminantium* GA192 cresceram em ambiente anaeróbico a 37°C em meio contendo amido de batata (1,0 g/L) como única fonte de carboidrato. E então, os meios foram tratados com a enzima amilolítica. Como esperado, *Streptococcus bovis* S1 e *Butyrivibrio fibrisolvens* 49 cresceram rapidamente no meio contendo amido e a suplementação com alfa-amilase não teve efeito em seus crescimentos. As bactérias *Butyrivibrio fibrosolvens* D1, *Selenomas ruminantium* GA192 e *Megasphaera elsdenii* T81 são conhecidas por crescerem lentamente ou não crescerem na presença de amido (COTTA, 1988). No entanto, essas espécies de bactérias não-amilolíticas cresceram rapidamente quando a alfa-amilase foi suplementada no meio de cultura contendo amido.

Os efeitos da suplementação com alfa-amilase sobre o crescimento de *Butyrivibrio fibrisolvens* D1 foram examinados utilizando um produto comercial com derivados de maltodextrina com diversos graus de polimerização como fonte de carboidrato. O crescimento de *Butyrivibrio fibrisolvens* D1 foi similar na presença ou ausência de alfa-amilase quando as maltodextrinas foram oferecidas em um baixo grau de polimerização (11.1 ou menos). No entanto, quando foi fornecido uma maltodextrina com maior grau de polimerização (22.1) a alfa-amilase foi capaz de acelerar o crescimento da bactéria em questão. Esses resultados confirmam que a *Butyrivibrio fibrisolvens* D1 pode crescer eficientemente em maltodextrinas com baixo grau de polimerização (TRICARICO et al., 2008).

As maltodextrinas produzidas a partir da hidrólise do amido podem ser utilizadas por diversas bactérias ruminais, incluindo espécies amilolíticas ou não-amilolíticas. Os estudos de Cotta (1992) e de Tricarico et al. (2008) demonstraram que apesar de *Selenomas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* crescerem vagorosamente em meio rico em amido, elas são capazes de crescer rapidamente em meio rico em maltodextrinas. De maneira semelhante, celodextrinas produzidas por bactérias celulolíticas podem ser utilizadas por bactérias não-celulolíticas (RUSSEL, 1985) e xilooligossacarídeos podem ser utilizados por espécies não-xilolíticas (COTTA, 1993). Essas observações sugerem que mecanismos de alimentação cruzada são características do ecossistema ruminal e que os microorganismos que utilizam os produtos da hidrólise gerada por outras espécies irão contribuir para a fermentação ruminal (VAN SOEST, 1982). De fato, uma das mais consistentes respostas a suplementação de amilase exógena em vacas lactantes é o aumento da digestibilidade da FDN (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011).

4 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, de acordo com o protocolo de nº 1746040814.

4.1 LOCAL, ANIMAIS E TRATAMENTOS

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga, no período de 19 de setembro a 11 de dezembro de 2014. A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28'' de latitude Sul, 47° 27' 21'' de longitude Oeste com altitude de 635 metros. A região possui clima subtropical, com temperatura média durante o experimento de 23,82° C, com umidade relativa do ar médio de 68,34% e velocidade média do vento de 1,49 km/h. As análises bromatológicas e de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL. As demais análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP.

Vinte e quatro vacas multíparas da raça Holandesa ($162,29 \pm 107,96$ dias em lactação, $636,25 \pm 62,35$ kg de PC e $31,60 \pm 6,51$ kg/d de produção de leite, no início do experimento) foram utilizadas em um experimento com seis quadrados Latinos 4×4 . Os quadrados eram contemporâneos e foram balanceados de acordo com a produção de leite, dias em lactação e PC dos animais. Quatro quadrados latinos foram compostos de animais sem cânulas ($n = 16$) e dois quadrados latinos foram formados por vacas com cânulas ruminais ($n = 8$). Os dados de todas as vacas foram utilizados para análise estatística das variáveis analisadas neste experimento, com exceção das variáveis de fermentação ruminal, que foram analisados apenas os dados das vacas canuladas no rúmen. Os períodos experimentais tiveram duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação aos tratamentos e 7 dias para coleta de dados e amostragem. Os animais dentro de cada quadrado latino foram distribuídos aleatoriamente aos seguintes tratamentos: sem suplementação de enzima ou controle (CON), e suplementação de

150 (A150), 300 (A300) ou 450 (A450) FAU/kg MS de Amaize™ (Alltech Inc., Nicholasville).

O produto comercial Amaize™ é composto por um extrato fúngico de *Aspergillus oryzae* com atividade amilolítica conhecida (600 FAU/g do produto) e possui característica de pó marrom. Uma 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 4,8 (FOOD CHEMICALS CODEX, 1996). A dieta (Tabela 2) foi formulada de acordo com as recomendações do NRC (2001) fornecida duas vezes ao dia em porções semelhantes (08h00 e 13h00). O suplemento foi pesado diariamente de acordo com o consumo de alimentos do dia anterior e misturado manualmente ao concentrado. As sobras foram restringidas de 5 a 10% (matéria natural) do alimento ofertado no dia anterior. O teor de umidade da silagem de milho foi mensurado semanalmente e ajustes de dieta foram realizados quando necessário. Durante o período experimental as vacas ficaram alojadas em baias individuais (17,5 m² de área) com cama de areia, cocho de alvenaria, bebedouro e ventilação forçada.

Tabela 2 - Ingredientes, composição bromatológica e tamanho de partículas da dieta basal

(contínua)

| Item | Dieta |
|---|-------|
| Ingrediente, %MS | |
| Silagem de milho ¹ | 48,4 |
| Milho moído | 27,8 |
| Farelo de soja | 15,7 |
| Grão de soja cru e integral | 5,01 |
| Ureia | 0,06 |
| Sal | 0,29 |
| Sulfato de amônia | 0,28 |
| Calcário | 0,50 |
| Bicarbonato de sódio | 0,20 |
| Fosfato bicálcico | 0,20 |
| Mistura mineral e vitamínica ² | 1,55 |

Separador de partículas, % da matéria natural

(conclusão)

| Item | Dieta |
|---|-------|
| Peneira 1: >38 mm | 6,11 |
| Peneira 2: 38 - 19 mm | 35,4 |
| Peneira 3: 19 - 8 mm | 24,3 |
| Fundo: <8 mm | 34,2 |
| Composição bromatológica, % MS | |
| Matéria seca, % matéria natural | 61,9 |
| Matéria orgânica | 92,9 |
| Amido | 29,2 |
| Proteína bruta | 17,3 |
| Proteína insolúvel em detergente neutro | 1,98 |
| Proteína insolúvel em detergente ácido | 0,69 |
| Extrato etéreo | 3,77 |
| Carboidrato não-fibroso ³ | 39,5 |
| Fibra em detergente neutro | 34,0 |
| FDN _N ⁴ | 32,0 |
| Fibra em detergente ácido | 18,8 |
| Lignina | 4,76 |
| Cinzas | 7,03 |
| Nutrientes digestíveis totais ⁵ | 72,3 |
| Energia líquida para a lactação ⁶ , Mcal/kg MS | 1,66 |

¹Composição bromatológica média durante o período experimental: 32,34% MS, 23,27% amido, 9,3% PB, 3,96% EE, 55,20% FDN, 33,62% FDA, 26,04% CNF e 66,12% de NDT.

²Continha a cada quilograma de produto: 88,0 g Ca, 42,0 g P, 18,0 g S, 45,0 g Mg, 123,0 g Na, 14,0 mg Co, 500,0 mg Cu, 20,0 mg Cr, 1050,0 mg Fe, 28,0 mg I, 1400,0 mg Mn, 18,0 mg Se, 2800,0 mg Zn, 80,0 mg de biotina, 200.000,00 UI Vit A, 40.000,00 UI Vit D e 1.200,00 UI Vit E.

³CNF = 100 - [(PB - PBureia + ureia)] + FDN + EE + cinzas, de acordo com Hall (2000).

⁴Fibra em detergente neutro corrigida para nitrogênio.

⁵De acordo com o NRC (2001).

⁶De acordo com Weiss et al. (1992).

4.2 CONSUMO, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DE NUTRIENTES

Amostras de silagem de milho (0,3 kg) foram coletadas diariamente durante os períodos de amostragem, formando-se uma amostra composta por período. Amostras (0,5 kg) dos ingredientes do concentrado foram coletadas durante sua preparação (n = 4) na fábrica de ração. Amostras de sobras (10% da sobra diária) de cada animal foram coletadas diariamente durante o período de amostragem e foram obtidas amostras compostas para cada animal dentro de cada período. Após cada coleta, as amostras foram armazenadas à -20°C para análises bromatológicas. As amostras de silagem de milho, ingredientes e sobras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 h, e moídas em moinho de facas ou de grãos para passarem por uma peneira de 2 mm e de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, EUA).

Os teores de MS (método 930.15), matéria orgânica (MS – cinzas), proteína bruta (PB; método 984.13, $N \times 6,25$), extrato etéreo (EE; método 920.39) foram analisados em todas as amostras de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2000). O teor de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método de dissolução em ácido sulfúrico) das amostras foram mensurados de acordo com Van Soest et al. (1991), os resultados obtidos foram expressos com cinzas. As análises de FDN foram realizadas com adição alfa-amilase sem sulfito de sódio (TE-149 Analisador de Fibra, Tecnal Equipamentos para Laboratório Inc., Piracicaba, Brasil). O teor de amido das amostras foi determinado por espectrofotometria após degradação enzimática (Amyloglucosidase AMG 300L, Novozymes) de acordo com Bach Knudsen (1997).

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), a energia líquida de lactação (EL_l) foi calculada de acordo com Weiss et al. (1992) sem correção para o fator de processamento para a correção da estimativa da digestibilidade dos carboidratos não-fibrosos (CNF). Os CNF foram calculados de acordo com Hall (2000): $CNF = 100 - [(PB - PB \text{ da ureia} + ureia)] + FDN + EE + cinzas$, com os valores expressados em porcentagem.

O alimento oferecido e as sobras de cada vaca foram pesados diariamente para determinar a ingestão de nutrientes. A mistura total da dieta e as sobras foram analisadas para a distribuição de tamanho de partículas usando um sistema separador de partículas com

peneiras estratificadoras (Penn State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI, EUA) como descrito por Kononoff et al. (2003). O separador de partículas utilizado apresentava quatro bandejas sobrepostas (P1 a P4) com orifícios: P1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm, P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm, P3 = retenção de partículas entre 8 e 1,18 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 1,18 mm.

O índice de seleção foi calculado como o consumo efetuado pelos animais correspondentes a cada peneira (P1 a P4) expresso pela porcentagem do consumo total predito, onde o consumo predito da fração P_i é igual ao quociente entre a matéria original ingerida e a matéria original da fração da P_i da ração total, de acordo com as equações 1, 2 e 3:

$$(1) \text{ Consumo predito} = \% \text{ retenção de } Y_x \text{ oferecido} \times \text{consumido}$$

$$(2) \text{ Consumo observado} = (\% \text{ retenção de } Y_x \times \text{oferecido}) - (\% \text{ retenção de } Y_x \text{ nas sobras})$$

$$(3) \text{ Índice de Seleção} = (\text{consumo observado} \div \text{consumo predito}) \text{ em que;}$$

Desta forma, valores menores do que 1 indicam rejeição de alimentos, maiores que 1 consumo preferencial, e igual a 1 quando não houve seleção (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Amostras de fezes (0,3 kg) de cada vaca foram coletadas diretamente do reto, a cada 9 horas a partir do dia 16 até o dia 18 de cada período experimental, representando uma coleta a cada 3 horas em um período de 24 horas, para contabilizar a variação da excreção de nutrientes ao longo do dia. Após cada coleta as amostras foram armazenadas à -20°C, e no final de cada período as amostras foram homogeneizadas a fim de se obter uma amostra composta por vaca e período. As amostras foram então pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e moídas em moinho de facas para passarem por peneiras de 2 mm e de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas). Nas amostras moídas em 1 mm foram analisadas a MS, FDN, PB, EE e cinzas conforme descrito previamente.

As amostras de alimentos, sobras e fezes moídas a 2 mm foram colocadas em sacos de tecido não-tecido seguindo a recomendação de 20 mg MS/cm² (NOCEK, 1988) e incubadas no rúmen de duas vacas adaptadas a mesma dieta do experimento por 288 h de acordo com os métodos descritos por Casali et al. (2008). Depois da remoção das amostras do rúmen, os

sacos foram lavados em água corrente, secos em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e, então analisadas para o teor de FDA como previamente descrito para obtenção dos valores de FDA indigestível (FDA_i). O FDA_i foi utilizado para estimar a excreção fecal diária baseado na ingestão de FDA_i e concentração do mesmo nas fezes. A digestibilidade de cada nutriente foi calculada a partir da ingestão do nutriente, excreção fecal e concentração do mesmo nas fezes.

4.3 FERMENTAÇÃO RUMINAL

No vigésimo dia de cada período experimental, amostras de digesta ruminal das vacas canuladas (n = 8) foram coletadas das regiões crânio dorsal, crânio ventral, ventral, caudo-ventral e caudo-dorsal, antes da alimentação matinal (tempo 0) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 h após a alimentação da manhã. Imediatamente após cada coleta, as amostras foram homogeneizadas e espremidas em quatro camadas de pano dessorador (poro de 1 mm) para obtenção do líquido ruminal (250 mL). O pH do líquido ruminal foi mensurado utilizando um potenciômetro (MB-10, Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, Brazil). As amostras de fluido ruminal (50 mL) foram centrifugadas a 7,000 × g por 15 min a temperatura ambiente, e uma subamostra de 2 mL de sobrenadante foi misturado com 0,4 mL de ácido fórmico P.A. e armazenadas à -20° C para análise de AGV. Outros 2 mL de sobrenadante de cada amostra foram retirados e misturados com 1 mL de ácido sulfúrico (1 N) em tubos plásticos que posteriormente foram analisados para determinação de nitrogênio amoniacal.

As concentrações de AGV no líquido ruminal foram mensuradas por cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com coluna capilar (Stabiliwax, Restek, Bellefonte, EUA) de acordo com método descrito por Erwin et al. (1961) e adaptado por Getachew et al. (2002) no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14.500 × g a 4°C por 10 min, e o sobrenadante (1 mL) foi transferido para um frasco seco e limpo contendo 100 µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, West Chester, PA, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão 8,01 mL/min), o ar sintético como comburente (vazão 40 kPa) e o hidrogênio como combustível (vazão 60 kPa). As temperaturas de operação utilizadas do

injetor *split/splitless* e do detector de ionização de chamas foram de 250°C e da coluna de 145°C, respectivamente. O padrão externo foi preparado com os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice). O software GCSolution (Shimadzu) foi utilizado para cálculo das concentrações de AGV.

O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG, 1980). Foram adicionados aos tubos contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 N, 1 mL de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a $1.200 \times g$ durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 25 μ L do sobrenadante a um tubo limpo, e neste adicionado 5 mL do reagente fenol e 5 mL de hipoclorito. Os tubos foram agitados para homogeneização das amostras 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, Cambridge, Reino Unido).

4.4 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente utilizando um sistema de ordenha duplo-oito linha baixa acoplada ao sistema DeLaval Alpro[®] (DeLaval, Tumba, Suíça). Amostras de leite foram coletadas de cada vaca (de acordo com a produção individual em cada ordenha) nos dias 15, 16 e 17 de cada período experimental. Após as coletas do período da manhã as amostras foram refrigeradas e misturadas de maneira proporcional (60:40) com as amostras obtidas no período da tarde. As amostras foram analisadas para teores de gordura, proteína e lactose por metodologia infravermelha (Lactoscan[®], Entelbra, São Paulo, Brasil).

Alíquotas (20 mL) das amostras foram desproteinizadas de acordo com Broderick e Clayton (1997) utilizando ácido tricloroacético (25%), e analisadas quanto aos teores de ureia utilizando kits comerciais (Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil) por método colorimétrico enzimático e a leitura realizada em analisador bioquímico semi-automático (SBA-200, CELM[®], São Caetano do Sul, Brasil). A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLCG) de acordo com a equação proposta por Sklan et al. (1992): $3,5\% \text{ PLCG} = (0,432 + 0,165 \times \% \text{ de gordura no leite}) \times \text{produção de leite (kg/d)}$. A produção de leite também foi corrigida para energia (PLCE) de acordo com Dairy Records Management System (2014)

onde: $PLCE = 0,327 \times \text{produção de leite (kg/d)} + 12,86 \times \text{produção de gordura (kg/d)} + 7,65 \times \text{produção de proteína (kg/d)}$.

4.5 UTILIZAÇÃO DE ENERGIA E NITROGÊNIO, PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

Para obtenção do consumo de energia bruta (EB) e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem e alimentos foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica (IKA Works GmbH & Co., Staufen, Alemanha). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade da MS das dietas experimentais e do consumo de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho. O consumo de energia metabolizável (CEM) foi estimado multiplicando-se o CED pelo fator 0,82 (NRC, 1996). O consumo de energia líquida (CEL) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos e nas sobras, obtidos a partir da equação do NRC (2001) como: EL_1 nos alimentos e sobras (Mcal/kg) = $0,0245 \times \text{NDT (\%)} - 0,12$, diante disso multiplica-se o valor de cada alimento subtraindo o valor contido nas sobras.

A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001): EL_1 (Mcal/dia) = $\text{produção de leite (kg)} \times (0,0929 \times \text{G\%} + 0,0547 \times \text{P\%} + 0,0395 \times \text{L\%})$, onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína bruta do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como EL_m (Mcal) $0,08 \times \text{PC}^{0,75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CEL e $EL_1 + EL_m$. O PC e o escore de condição corporal foram mensurados nos dias 7 e 21 de cada período experimental, no período da manhã, antes do fornecimento da dieta e após a ordenha. O PC foi determinado em balança digital (AWS100, DeLaval, Tumba, Suécia) e o escore de condição corporal foi realizado de acordo com Wildman et al. (1982) e adaptada por Edmonson et al. (1989).

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de PB retirando-se o valor de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de PB das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio (g/kg MS). O nitrogênio total das amostras de urina e leite foi

determinado de acordo com as metodologias descritas pelo AOAC (2000, método 984.13; PB; $N \times 6,25$) segundo o método micro-Kjeldahl, onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

Amostras de 100 mL de urina foram obtidas de todas as vacas a cada 9 horas, durante micção estimulada por massagem na vulva, nos dias 18, 19 e 20 de cada período experimental, totalizando 8 amostras de urinas por vaca/período com o objetivo de formação do *pool* representativo de um período de 24 horas para retirar o efeito da variação diária de excreção de urina. Vinte mL das amostras foram filtradas e diluídas imediatamente em 80 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Então, foram acondicionadas em garrafas plástica de 1 L e armazenadas à -20°C , para posterior análises de nitrogênio total, alantoína, ácido úrico e creatinina.

O volume urinário excretado diariamente foi estimado pela concentração de creatinina na urina. A concentração de creatinina foi determinada utilizando kits comerciais (Bioclin[®]) por reação enzimática colorimétrica e a leitura realizada em um analisador bioquímico (SBA-200, CELM[®]). A constante de excreção de 24,05 mg de creatinina por kg de peso vivo foi utilizada na estimativa do volume urinário, de acordo com a equação proposta por Chizzotti et al. (2008): Excreção urinária (L/d) = $[24,05 \text{ mg} \cdot \text{dia/kg} \times \text{PC (kg)}] \div \text{concentração de creatinina na urina (mg/L)}$.

4.6 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada a partir da quantificação dos derivados de purinas na urina (ácido úrico e alantoína) e no leite (alantoína) proposta por Chen e Gomes (1992). Amostras de leite (300 mL) foram coletadas no 16^o e 17^o dia de cada período experimental, nas ordenhas da manhã e da tarde, para determinação da concentração de alantoína. Alíquotas das amostras (10 mL) foram misturadas com ácido tricloroacético 25% (5 mL) com um período de reação de 5 minutos, depois foram filtradas em papel filtro (poro de 14 μm) para remoção de proteínas e armazenadas à -20°C . As amostras desproteinizadas de leite e urina foram analisadas para a determinação de alantoína utilizando

kits comerciais por método colorimétrico, sendo a leitura realizada em um leitor de microplaca (Biochrom Asys UVM 340 Microplate Reader). A concentração de ácido úrico na urina foi determinada utilizando kit comercial (Bioclin[®]) por método colorimétrico e a leitura realizada em analisador bioquímico (SBA-200, CELM[®]).

A excreção total de derivados de purina (DP, mmol/d) foi calculada como a soma da excreção de alantoína e ácido úrico no leite e urina (ORELLANA BOERO et al., 2001). Os derivados de purina absorvidos (DP_{abs} , mmol/d) foram calculados como: $DP_{abs} = (DP - 0,385 \times PC^{0,75}) \div 0,84$ em que 0,84 representa a recuperação urinária de DP e $0,385 \times PC^{0,75}$ representa a contribuição endógena da excreção de purinas (VERBIC et al., 1990; CHEN; GOMES, 1992). A síntese ruminal de N microbiano (N_{mic} , g/d) foi calculada como: $N_{mic} = (70 \times DP_{abs}) \div (0,83 \times 0,134 \times 1000)$, considerando 70 como a concentração de nitrogênio nos DP (mg/mol), 0,134 a razão de derivados de purina por nitrogênio microbiano, e 0,83 a digestibilidade intestinal de purinas (CHEN; GOMES, 1992; VALADARES et al., 1999).

4.7 PERFIL METABÓLICO

Coletas de sangue (30 mL) foram realizadas no 16^o dia de cada período experimental, por punção da artéria ou veia coccígea, após 4 horas da primeira ordenha do dia. Os tubos utilizados na coleta de sangue não tinham ativador de coágulo (BD Vacutainer[®], Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Os tubos com sangue foram deixados em descanso à temperatura ambiente até a formação de coágulo, e então foram centrifugados $3.000 \times g$ por 15 min (4°C) e o sobrenadante utilizado para análise das concentrações de glicose, ureia e de enzimas hepáticas [aspartato amino-transferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT)] no soro. As análises foram realizadas por meio de kits comerciais (Bioclin[®]) que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final ou cinético. A leitura foi realizada em aparelho para bioquímica sanguínea (SBA-200, CELM[®]).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED do SAS (Statistical Analysis for Windows 9.4 – Institute Inc., Cary, EUA), de acordo com o seguinte modelo linear aditivo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + Q_k + a_l(Q_k) + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} é o valor observado para o animal l pertencente ao quadrado k , no j -ésimo período, no qual recebeu a dose i de enzima; μ = média geral; T_i = efeito fixo de dose de enzima; P_j = efeito fixo de período; Q_k = efeito fixo de quadrado; $a_l(Q_k)$ = efeito aleatório de animal dentro de quadrado e e_{ijklm} = resíduo. As médias foram ajustadas e apresentadas pelo LSMEANS, e as correções dos graus de liberdade foram feitas de acordo com o método de Kenward e Rogers (1997).

As variáveis avaliadas na fermentação ruminal (pH, concentração de N-NH₃ e AGV) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, pelo PROC MIXED do SAS 9.4, considerando no modelo estatístico os efeitos de animal dentro do quadrado, período, quadrado, tratamento (dose de enzima), além dos efeitos de tempo e suas interações com demais fatores. Sendo que o tempo foi considerado como efeito fixo e as interações foram consideradas aleatórias quando estudou a interação do tempo com um fator de variação de efeito aleatório, e as interações foram consideradas como efeito fixo quando as mesmas foram realizadas a partir de dois fatores com efeitos fixos (tratamento*tempo). As estruturas de covariância testadas foram CS, CSH, UNIV, TOEP, TOEPH, AR (1), MARMA (1), ANTE (1), AF (1,1) e ARH (1). Para a escolha da matriz de variância e covariância foi utilizado o critério Akaike, selecionando-se a de menor valor para este parâmetro (AKAIKE, 1974). As respostas, ao nível de inclusão de enzima foram estudadas por regressão polinomial através de contrastes ortogonais para efeitos linear e quadrático. Significância foi considerada quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $0,05 < P \leq 0,10$.

5 RESULTADOS

5.1 INGESTÃO DE NUTRIENTES, ÍNDICE DE SELEÇÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Os tratamentos não influenciaram a ingestão de MS e de nutrientes dos animais (Tabela 3). A estimativa de consumo do produto comercial com atividade de enzima amilolítica foi de 7,40 g/d, 14,45 g/d e 21,97 g/d para as vacas que receberam A150, A300 e A450, respectivamente. A inclusão de enzima amilolítica também não alterou o índice de seleção de partícula dos animais. A adição de enzima amilolítica à dieta dos animais aumentou linearmente ($P = 0,031$) a digestibilidade de PB, e tendeu a aumentar linearmente a digestibilidade da MS ($P = 0,060$) e da matéria orgânica ($P = 0,093$).

Tabela 3 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas leiteiras sobre a ingestão de nutrientes, índice de seleção de partículas e digestibilidade aparente total

| Item | Tratamento ¹ | | | | Média | EPM | <i>p</i> -valor ² | |
|--------------------------------|-------------------------|------|------|------|-------|------|------------------------------|-------|
| | CON | A150 | A300 | A450 | | | L | Q |
| (contínua) | | | | | | | | |
| Ingestão, kg/d | | | | | | | | |
| Matéria seca | 29,3 | 29,5 | 28,9 | 29,3 | 29,1 | 0,45 | 0,570 | 0,502 |
| Matéria orgânica | 27,3 | 27,4 | 26,9 | 27,4 | 27,1 | 0,42 | 0,732 | 0,354 |
| Proteína bruta | 5,02 | 5,07 | 4,97 | 5,02 | 5,00 | 0,08 | 0,679 | 0,957 |
| Fibra detergente neutro | 10,0 | 10,1 | 9,85 | 10,1 | 9,97 | 0,15 | 0,578 | 0,311 |
| Amido | 8,67 | 8,85 | 8,73 | 8,72 | 8,74 | 0,14 | 0,907 | 0,307 |
| Extrato etéreo | 1,06 | 1,06 | 1,05 | 1,06 | 1,05 | 0,02 | 0,863 | 0,853 |
| Carboidrato não-fibroso | 11,6 | 11,7 | 11,6 | 11,6 | 11,6 | 0,20 | 0,961 | 0,678 |
| Nutrientes digestíveis totais | 20,9 | 21,2 | 20,8 | 21,2 | 20,9 | 0,33 | 0,716 | 0,936 |
| Energia líquida, Mcal/d | 47,9 | 48,5 | 47,7 | 48,4 | 47,9 | 0,76 | 0,720 | 0,935 |
| Índice de seleção ³ | | | | | | | | |
| >38 mm | 0,89 | 0,92 | 0,80 | 0,90 | 0,88 | 0,05 | 0,573 | 0,108 |
| 38 - 19 mm | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,01 | 0,952 | 0,450 |
| 19 - 8 mm | 0,99 | 0,99 | 1,00 | 0,99 | 0,99 | 0,01 | 0,703 | 0,612 |
| <8 mm | 1,03 | 1,04 | 1,04 | 1,03 | 1,03 | 0,09 | 0,501 | 0,100 |
| Digestibilidade aparente, g/kg | | | | | | | | |
| Matéria seca | 732 | 733 | 753 | 752 | 742 | 7,11 | 0,060 | 0,947 |
| Matéria orgânica | 754 | 754 | 775 | 772 | 764 | 7,42 | 0,093 | 0,895 |
| Amido | 959 | 958 | 964 | 963 | 961 | 2,03 | 0,163 | 0,971 |

| Item | Tratamento ¹ | | | | Média | EPM | (conclusão) | |
|-------------------------|-------------------------|------|------|------|-------|------|------------------------------|-------|
| | CON | A150 | A300 | A450 | | | <i>p</i> -valor ² | |
| | | | | | | L | Q | |
| Proteína bruta | 697 | 706 | 729 | 731 | 716 | 9,23 | 0,031 | 0,806 |
| Fibra detergente neutro | 641 | 634 | 650 | 662 | 647 | 10,3 | 0,130 | 0,410 |
| Carboidrato não-fibroso | 872 | 871 | 895 | 881 | 880 | 7,96 | 0,141 | 0,403 |

¹0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. Médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS.

²Contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Índice de seleção de partículas de acordo com Leonardi e Armentano (2003). Valores abaixo de 1 indicam rejeição e valores maiores que 1 indicam seleção de tamanho de partícula.

5.2 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Os tratamentos não influenciaram o pH ruminal, sendo que os menores valores foram observados 12 h após o fornecimento do alimento no período da manhã (Tabela 4 e Figura 3). A concentração de N-NH₃ tendeu ($P \leq 0,65$) a apresentar um comportamento quadrático positivo de acordo com a dose de enzima amilolítica. Os tratamentos não influenciaram as concentrações molares de acetato, propionato, iso-butirato, butirato (Figura 7), valerato, ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) totais e AGV totais (Figura 8). Porém, a adição de enzima amilolítica aumentou linearmente ($P = 0,023$) as concentrações de iso-valerato ruminal. Não foram observados efeitos para contrastes linear e quadrático para as proporções de acetato, propionato, butirato e para a relação acetato : propionato.

Não houve efeito de interação (tratamento*tempo) para nenhuma das variáveis analisadas. Todas as variáveis de fermentação ruminal apresentaram efeito de tempo. As maiores concentrações de N-NH₃ foram observadas 2 h após o fornecimento dos alimentos (10h00 e 15h00; Figura 2). As concentrações molares de acetato apresentaram picos ao longo do dia, sendo estes observados nos tempos 2, 8 e 14 h em relação ao primeiro fornecimento de alimentos do dia (Figura 3). As concentrações de propionato e butirato aumentaram 2 horas após o fornecimento da dieta e atingiram o ponto máximo após 12 horas após o fornecimento matinal da dieta (Figura 4 e Figura 5). As concentrações de AGV total aumentaram constantemente ao longo do dia (Figura 6).

Tabela 4 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a fermentação ruminal

| Item | Tratamento ¹ | | | | EPM | <i>p</i> -valor ² | | |
|------------------------------|-------------------------|------|------|------|-------|------------------------------|-------|-------|
| | CON | A150 | A300 | A450 | | Tratamento | L | Q |
| pH | 6,10 | 6,09 | 6,05 | 6,10 | 0,019 | 0,235 | 0,654 | 0,315 |
| N-NH ₃ , mg/dL | 23,9 | 24,4 | 24,8 | 23,5 | 0,398 | 0,001 | 0,621 | 0,065 |
| Acetato, mM | 88,6 | 88,9 | 90,6 | 88,9 | 0,814 | 0,661 | 0,614 | 0,460 |
| Propionato, mM | 31,1 | 31,3 | 31,5 | 31,5 | 0,399 | 0,989 | 0,739 | 0,967 |
| Iso-butirato, mM | 2,06 | 2,08 | 2,09 | 1,99 | 0,023 | 0,268 | 0,279 | 0,112 |
| Butirato, mM | 21,7 | 21,6 | 22,6 | 21,9 | 0,263 | 0,158 | 0,254 | 0,394 |
| Iso-valerato, mM | 2,98 | 3,05 | 3,14 | 3,13 | 0,034 | 0,049 | 0,023 | 0,405 |
| Valerato, mM | 2,66 | 2,71 | 2,71 | 2,67 | 0,033 | 0,824 | 0,901 | 0,349 |
| AGCR total ³ , mM | 7,69 | 7,72 | 7,83 | 7,65 | 0,078 | 0,803 | 0,972 | 0,435 |
| AGV total ⁴ , mM | 148 | 149 | 152 | 150 | 1,423 | 0,640 | 0,386 | 0,599 |
| Acetato : propionato | 2,89 | 2,89 | 2,90 | 2,88 | 0,025 | 0,963 | 0,880 | 0,852 |
| Acetato, mol/100 mol | 59,5 | 59,5 | 59,3 | 59,4 | 0,187 | 0,893 | 0,514 | 0,683 |
| Propionato, mol/100 mol | 20,8 | 20,8 | 20,7 | 20,7 | 0,117 | 0,919 | 0,881 | 0,714 |
| Butirato, mol/100 mol | 14,5 | 14,4 | 14,8 | 14,5 | 0,096 | 0,351 | 0,413 | 0,459 |

¹0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. Médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS.

²Contrastes linear (L) ou quadrático (Q). A probabilidade para ocorrência de interação tratamento*tempo foi testada, porém não foi significativa ($P \geq 0,349$) para todas as variáveis de fermentação ruminal. Todas as variáveis apresentaram efeito de tempo ($P < 0,001$).

³AGCR: ácidos graxos de cadeia ramificada.

⁴AGV: ácidos graxos voláteis.

Figura 3 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o pH do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica

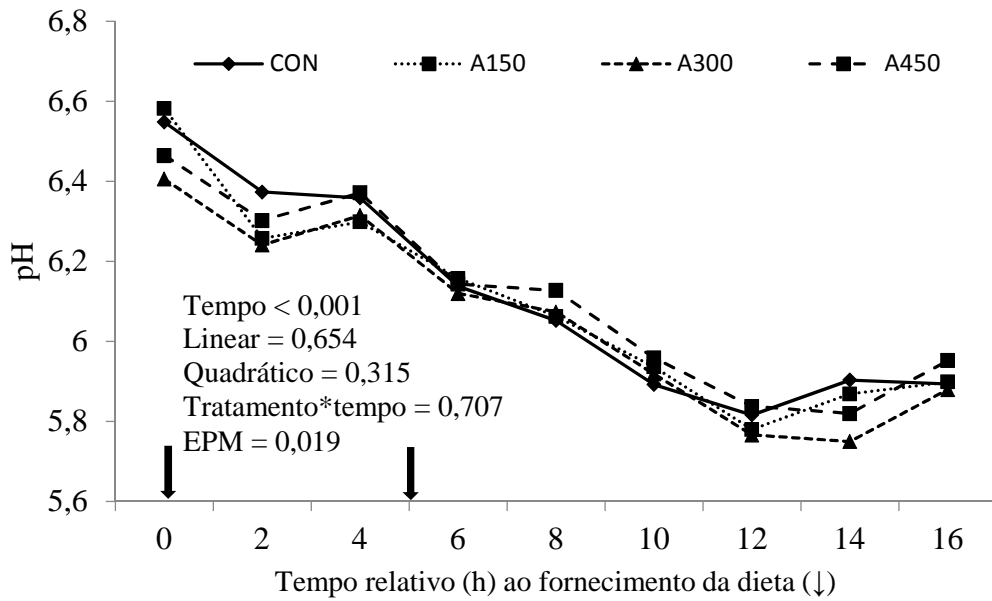


Figura 4 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃). 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica

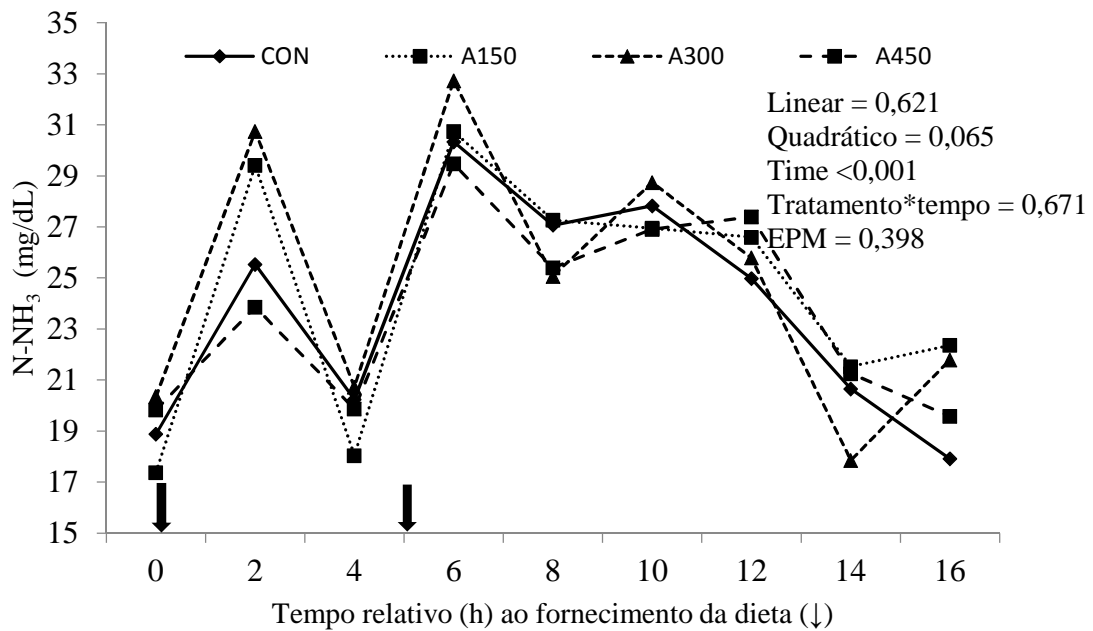


Figura 5 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de acetato do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica

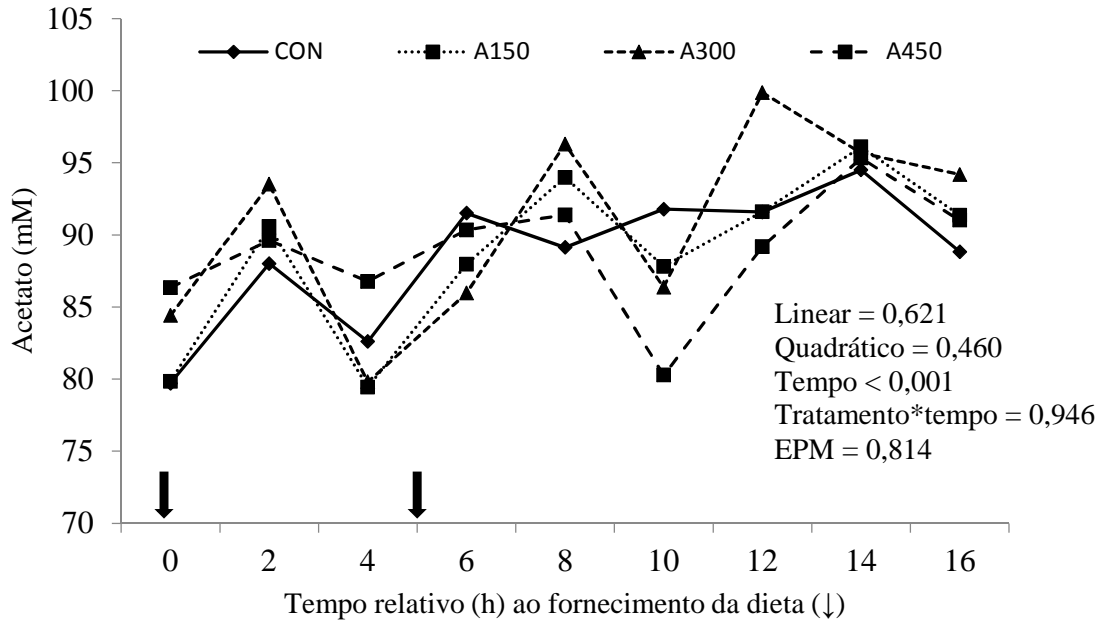


Figura 6 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de propionato do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica

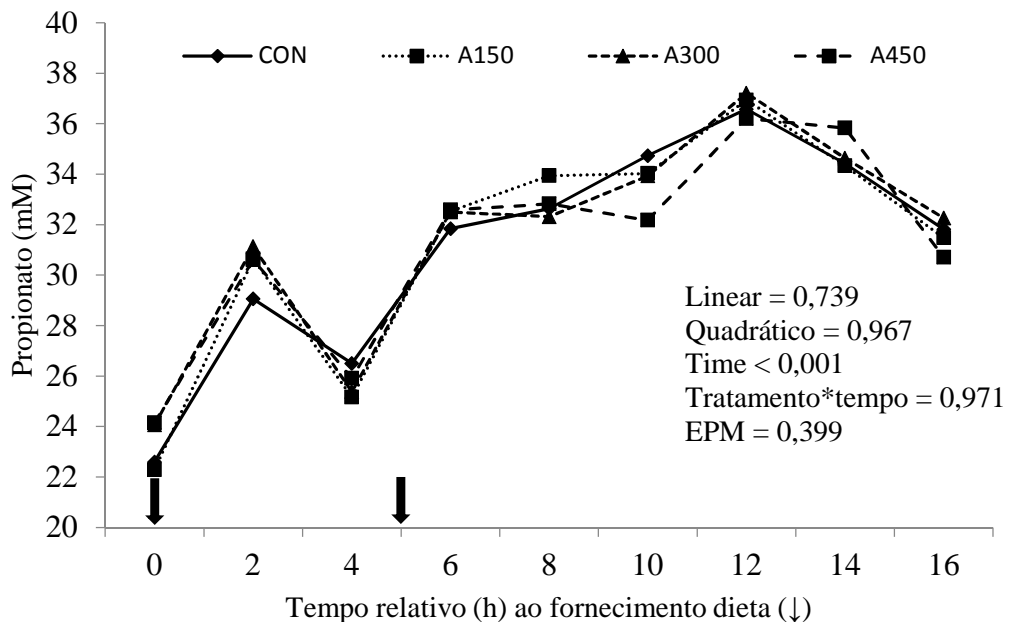


Figura 7 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de butirato do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica

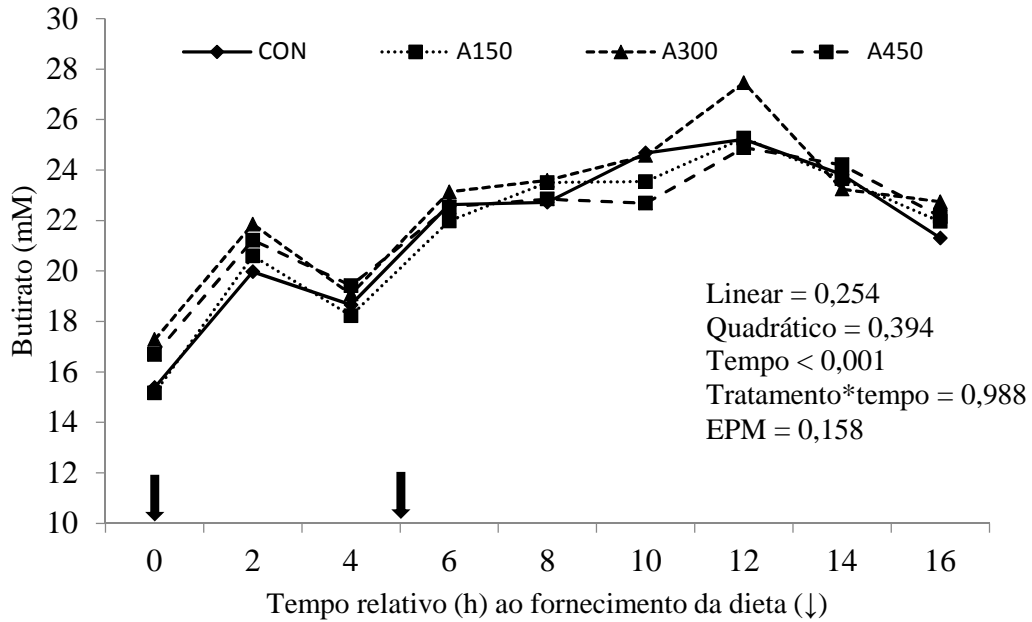
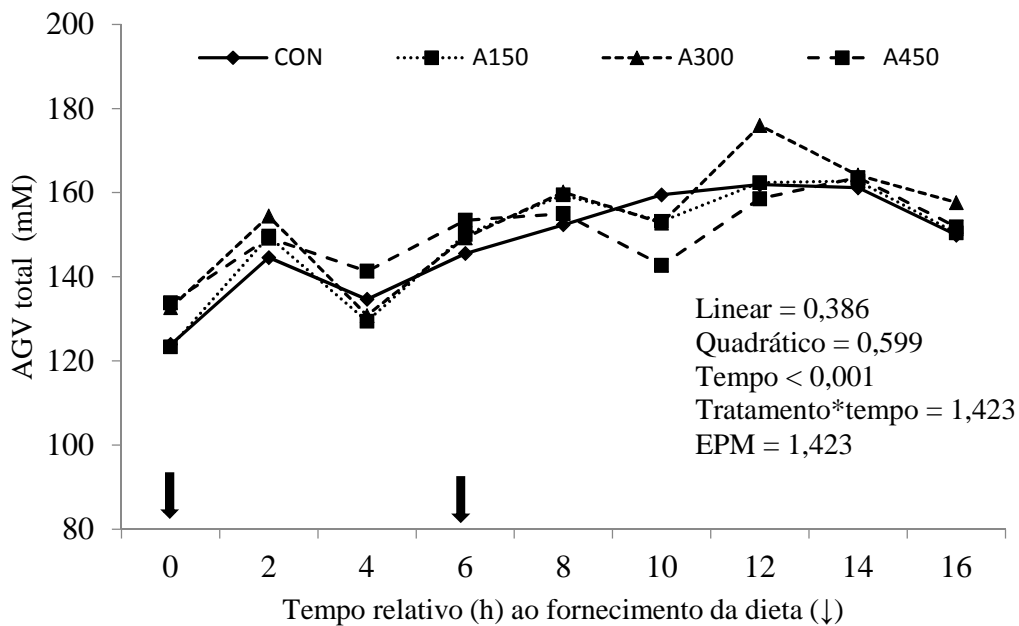


Figura 8 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) do fluido ruminal. 0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica



5.3 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os tratamentos não influenciaram a produção de leite, inclusive quando corrigida para gordura ou energia (Tabela 5). A adição de enzima amilolítica as dietas não alterou a produção e composição de sólidos no leite (gordura, proteína e lactose). Além disso, os tratamentos não influenciaram a concentração de ureia no leite e a eficiência de produção de leite de acordo com a ingestão de MS.

Tabela 5 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas sobre a produção e composição do leite

| Item | Tratamento ¹ | | | | Média | EPM | <i>p</i> -valor ² | |
|-------------------------|-------------------------|------|------|------|-------|------|------------------------------|-------|
| | CON | A150 | A300 | A450 | | | L | Q |
| Produção, kg/d | | | | | | | | |
| Leite | 32,8 | 32,7 | 32,3 | 32,4 | 32,6 | 1,37 | 0,275 | 0,829 |
| PLCG ³ | 34,8 | 34,9 | 34,2 | 34,6 | 34,6 | 1,28 | 0,543 | 0,714 |
| PLCE ⁴ | 34,7 | 34,8 | 34,1 | 34,5 | 34,5 | 0,63 | 0,407 | 0,733 |
| Gordura | 1,26 | 1,28 | 1,24 | 1,26 | 1,26 | 0,05 | 0,594 | 0,917 |
| Proteína | 1,02 | 1,01 | 1,00 | 1,01 | 1,01 | 0,02 | 0,348 | 0,212 |
| Lactose | 1,53 | 1,51 | 1,49 | 1,51 | 1,51 | 0,07 | 0,397 | 0,301 |
| Composição, g/kg | | | | | | | | |
| Gordura | 38,5 | 39,3 | 38,6 | 38,9 | 38,9 | 1,00 | 0,793 | 0,549 |
| Proteína | 30,9 | 30,9 | 30,8 | 30,9 | 30,9 | 0,20 | 0,924 | 0,631 |
| Lactose | 46,2 | 46,4 | 46,2 | 46,3 | 46,3 | 0,30 | 0,731 | 0,952 |
| Ureia, mg/dL | 26,7 | 27,6 | 26,7 | 26,5 | 26,9 | 12,5 | 0,635 | 0,440 |
| Eficiência ⁵ | | | | | | | | |
| PL/IMS | 1,15 | 1,13 | 1,14 | 1,13 | 1,14 | 0,02 | 0,739 | 0,570 |
| PLCE/IMS | 1,21 | 1,19 | 1,19 | 1,21 | 1,20 | 0,02 | 0,889 | 0,294 |

¹0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. Médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS.

²Contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Produção de leite corrigida para gordura: $3,5\% \text{ PLCG} = (0,432 + 0,165 \times \% \text{ de gordura no leite}) \times \text{produção de leite (kg/d)}$.

⁴Produção de leite corrigida para energia: $\text{PLCE} = 0,327 \times \text{produção de leite (kg/d)} + 12,86 \times \text{produção de gordura (kg/d)} + 7,65 \times \text{produção de proteína (kg/d)}$.

⁵PL/IMS: produção de leite (kg/d) / ingestão de matéria seca (kg/d); e PLCE/IMS: produção de leite corrigida para energia (kg/d) / ingestão de matéria seca (kg/d).

5.4 UTILIZAÇÃO DE ENERGIA E NITROGÊNIO

Os tratamentos não influenciaram a ingestão de EB, ED e EM (Tabela 6). Porém, aumentaram linearmente ($P = 0,037$) a utilização de energia para a manutenção sem alterarem a energia utilizada para a produção de leite. A adição de enzima amilolítica aumentou linearmente ($P \leq 0,039$) o peso e o escore de condição corporal dos animais. A excreção de nitrogênio fecal tendeu a diminuir linearmente ($P = 0,061$) com a inclusão de enzima amilolítica. Além disso, os tratamentos reduziram linearmente ($P = 0,023$) a excreção de nitrogênio no leite.

Tabela 6 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a utilização de energia e de nitrogênio

| Item | Tratamento ¹ | | | | Média | EPM | <i>p</i> -valor ² | |
|-------------------------------|-------------------------|------|------|------|-------|------|------------------------------|-------|
| | CON | A150 | A300 | A450 | | | L | Q |
| Ingestão de energia, Mcal/d | | | | | | | | |
| Bruta | 125 | 125 | 123 | 125 | 124 | 1,91 | 0,572 | 0,502 |
| Digestível | 75,1 | 74,6 | 76,8 | 74,9 | 74,9 | 1,43 | 0,814 | 0,668 |
| Metabolizável | 62,4 | 61,9 | 63,8 | 62,2 | 62,2 | 1,19 | 0,814 | 0,668 |
| Líquida | 48,5 | 48,6 | 47,7 | 48,4 | 48,1 | 0,76 | 0,494 | 0,394 |
| Utilização de energia, Mcal/d | | | | | | | | |
| Manutença | 10,4 | 10,4 | 10,4 | 10,5 | 10,4 | 0,08 | 0,037 | 0,142 |
| Lactação | 23,2 | 23,2 | 22,9 | 22,9 | 23,1 | 0,44 | 0,394 | 0,763 |
| Eficiência ³ | 0,38 | 0,39 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,01 | 0,285 | 0,873 |
| Peso corporal, kg | 660 | 657 | 663 | 664 | 661 | 6,89 | 0,039 | 0,169 |
| ECC ⁴ | 2,74 | 2,75 | 2,75 | 2,83 | 2,75 | 0,04 | 0,005 | 0,112 |
| Nitrogênio, g/d | | | | | | | | |
| Ingerido | 803 | 812 | 796 | 809 | 802 | 12,6 | 0,649 | 0,444 |
| Fecal | 237 | 255 | 232 | 222 | 233 | 9,41 | 0,061 | 0,156 |
| Leite | 162 | 161 | 158 | 158 | 160 | 3,22 | 0,023 | 0,740 |
| Urinarío | 225 | 228 | 215 | 221 | 185 | 4,71 | 0,327 | 0,740 |

¹0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. Médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS.

²Contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Eficiência: energia líquida para lactação / ingestão de energia metabolizável.

⁴Escore de condição corporal (1-5).

5.5 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

A adição de enzima amilolítica na dieta dos animais não alterou a excreção de ácido úrico, de alantoína na urina e no leite, e conseqüentemente não alterou a síntese de proteína microbiana (Tabela 7). No entanto, a eficiência de síntese de proteína microbiana tendeu a um decréscimo linear ($P = 0,074$) de acordo com a adição da enzima amilolítica.

Tabela 7 - Efeito de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a síntese de proteína microbiana

| Item | Tratamento ¹ | | | | Média | EPM | <i>p</i> -valor ² | |
|------------------------------------|-------------------------|------|------|------|-------|------|------------------------------|-------|
| | A0 | A150 | A300 | A450 | | | L | Q |
| Excreção, mmol/d | | | | | | | | |
| Ácido úrico | 13,3 | 13,8 | 12,8 | 12,7 | 13,2 | 0,41 | 0,313 | 0,646 |
| Alantoína na urina | 427 | 443 | 413 | 425 | 428 | 10,9 | 0,604 | 0,899 |
| Alantoína no leite | 1,96 | 1,73 | 1,73 | 1,88 | 1,83 | 0,16 | 0,868 | 0,558 |
| Purinas, mmol/d | 432 | 459 | 426 | 440 | 439 | 11,6 | 0,910 | 0,696 |
| Purinas absorvidas, mmol/d | 465 | 484 | 449 | 465 | 464 | 13,7 | 0,659 | 0,920 |
| Alantoína : purinas totais | 0,97 | 0,97 | 0,97 | 0,97 | 0,97 | 0,01 | 0,346 | 0,885 |
| Proteína microbiana, kg/d | 1,88 | 1,91 | 1,77 | 1,83 | 1,84 | 0,05 | 0,340 | 0,810 |
| Eficiência de síntese ³ | 93,8 | 88,2 | 85,1 | 86,1 | 87,9 | 2,15 | 0,074 | 0,309 |

¹0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. Médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS.

²Contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Produção de proteína microbiana (g/d) / ingestão de nutrientes digestíveis totais (g/d).

5.6 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

Os tratamentos não influenciaram as concentrações séricas de glicose, ureia e enzimas marcadoras de lesão hepática (AST e GGT; Tabela 8).

Tabela 8 - Efeitos de doses crescentes de enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o perfil metabólico sanguíneo

| Item | Tratamento ¹ | | | | EPM | <i>p</i> -valor ² | |
|------------------------|-------------------------|------|------|------|------|------------------------------|-------|
| | A0 | A150 | A300 | A450 | | L | Q |
| Glicose, mg/dL | 67,3 | 69,1 | 70,7 | 68,1 | 1,31 | 0,707 | 0,384 |
| Ureia, mg/dL | 43,9 | 44,1 | 43,3 | 45,2 | 0,63 | 0,424 | 0,352 |
| AST ³ , U/L | 63,4 | 63,2 | 58,3 | 63,1 | 1,68 | 0,553 | 0,234 |
| GGT ⁴ , U/L | 24,2 | 22,6 | 24,4 | 23,8 | 0,79 | 0,867 | 0,518 |

¹0, 150, 300, 450 FAU/kg MS da dieta de enzima amilolítica. Médias foram ajustadas pelo procedimento LSMEANS.

²Contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Aspartato-amino transferase.

⁴Gama-glutamil transferase.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo não foram observadas diferenças no consumo de nutrientes. Resultados que contrastam com Klingerman et al. (2009) que encontraram aumento na ingestão de MS quando um extrato de *A. oryzae* com atividade de alfa-amilase entre 94 e 28.000 unidades ceralpha / kg MS ingerida foi oferecida a vacas lactantes. Da mesma forma, Tricarico et al. (2007) observaram aumento da ingestão de MS de novilhas em crescimento alimentadas com o mesmo extrato porém, com uma atividade de 950 UD/ kg de MS ingerida. Porém, diversos estudos com vacas em lactação a ingestão de MS não foi afetada [662 UD/kg MS ingerida (DEFRAIN et al., 2005); 311-332 KNU/kg de MS ingerida (WEISS et al., 2011; VARGAS-RODRIGUES et al., 2014)], ou diminuiu (370 KNU/ kg de MS ingerida; GENCOGLU et al., 2010) quando enzimas amilolíticas foram suplementadas. As diferenças nas unidades da atividade enzimática dos extratos utilizados (KNU, ceralpha e UD) tornam a comparação entre os experimentos complexa, mas mesmo dentre os experimentos com mesma unidade de atividade enzimática as respostas tem sido variáveis.

Apesar de os tratamentos não terem afetado a ingestão de MS e de nutrientes, eles aumentaram a digestibilidade aparente total da PB e tenderam a aumentar a digestibilidade da MS. Este efeito provavelmente está relacionado a mudanças no ambiente ruminal, uma vez que a alfa-amilase é inativada pela degradação gástrica (TRICARICO et al., 2008). Chen et al. (1995) suplementaram vacas em lactação com uma mistura comercial de enzimas contendo amilase e não observaram efeitos na ingestão de MS, porém encontraram aumento da digestibilidade aparente total da PB sem alterar a digestibilidade do amido. Ainda, Gencoglu et al. (2010) encontraram que a suplementação com alfa-amilase aumentou a digestibilidade aparente total da MS, PB, FDN.

O aumento da digestibilidade de nutrientes não amiláceos é suportada pela teoria de Tricarico et al. (2008), a qual sugere que enzimas amilolíticas exógenas (como a proveniente de *Aspergillus oryzae*) modificam o metabolismo microbiano ou a população microbiana no rúmen. A suplementação com alfa-amilase aumenta a produção de maltodextrinas que podem ser utilizadas por uma variedade de bactérias incluindo amilolíticas e não-amilolíticas. Tricarico et al. (2008) ao adicionarem alfa-amilase a um meio de cultura bacteriana rico em amido perceberam o rápido crescimento de bactérias não-amilolíticas como por exemplo *Butyrivibrio fibrisolvens* D1, que além de ser considerada uma bactéria digestora de fibra

(MIRON et al., 2002) demonstrou alta atividade proteolítica (COTTA; RESPELL, 1986). Finalmente, um aumento da atividade enzimática no rúmen pode aumentar a capacidade hidrolítica ruminal, aumentando a digestibilidade de todos os componentes da dieta, ao invés de agir em alvos específicos das enzimas (BEAUCHEMIN et al., 2004).

Há uma série de explicações para a ausência de efeito da alfa-amilase sobre a digestibilidade aparente total do amido: 1) a digestibilidade de amido não foi alterada no rúmen (TRICARICO et al., 2005), 2) a digestibilidade ruminal de amido aumentou (KLINGERMAN et al., 2009), porém uma digestão compensatória ocorreu no trato digestório após o rúmen (TAYLOR; ALLEN, 2005) resultando em uma digestibilidade aparente total semelhante, ou 3) a digestibilidade ruminal do amido aumentou, mas a fermentação no intestino grosso (FIRKINS, 1997) fez com que a digestibilidade aparente total fosse a mesma. No presente estudo, aparentemente a digestibilidade ruminal do amido não foi afetada, uma vez que não foram observadas diferenças no pH e nas concentrações molares de propionato ou de qualquer outro AGV. Além disso, a taxa e a extensão na qual o amido é digerido no rúmen tem um impacto na digestibilidade aparente total e no desempenho do animal (LYKOS et al., 1997).

Na literatura não há trabalhos que estudaram os efeitos de enzimas amilolíticas exógenas no índice de seleção de partículas. De fato, uma das respostas mais consistentes observadas ao suplementar alfa-amilase para ruminantes é o aumento da digestibilidade de FDN (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011). Uma de nossas hipóteses era de que o índice de seleção de partícula poderia ser alterado pela facilidade dos animais em lidar com fibras longas devido ao aumento da digestibilidade do FDN, como observado por Silva (2016), porém os tratamentos não influenciaram a digestibilidade de FDN bem como o índice de seleção de partículas.

Nós esperávamos que a adição de enzima amilolítica na dieta aumentaria a degradação ruminal do amido, elevando a produção de AGV, principalmente de propionato, acarretando em queda de pH. No presente estudo, o pH do fluido ruminal não foi alterado pelos tratamentos e não foram observadas diferenças para concentrações e proporções dos principais AGV do rúmen, com exceção de aumento linear de iso-valerato. Ácidos graxos de cadeia ramificada (como o iso-valerato e iso-butirato) e o valerato são produzidos no rúmen a partir da leucina, valina, isoleucina e prolina (ANDRIES et al., 1987). Esses compostos são capazes de estimular a atividade de bactérias celulolíticas (BUTTERY; FOULDS, 1988), o que poderia explicar o frequente aumento na digestibilidade da FDN quando as vacas são

suplementadas com alfa-amilase. No presente estudo houve um aumento numérico na digestibilidade de FDN ($P = 0,130$). Além disso, a suplementação com ácidos graxos de cadeia ramificada em meio de cultura com bactérias celulolíticas aumenta a síntese de proteína microbiana e a digestibilidade da MS (CUMMINS; PAPAS, 1985; MIR et al., 1986). A concentração ruminal de nitrogênio amoniacal tendeu a um efeito quadrático que pode estar relacionado com as diferenças observadas na digestibilidade de PB.

A ausência de grandes alterações na fermentação ruminal pode estar relacionada com a atividade de alfa-amilase no rúmen. Klingerman et al. (2009) avaliaram a atividade enzimática de três produtos com atividade de alfa-amilase e encontraram que a atividade de amilase de um extrato proveniente de *Aspergillus oryzae* foi de 10 a 25 vezes menor quando comparada com outros produtos, sendo todos testados em um intervalo de pH de 5,1 a 6,3 e temperatura de 40°C, condições que se assemelham ao rúmen de uma vaca em lactação recebendo dieta rica em amido. Ainda no mesmo estudo, os autores encontraram que o pH ótimo para a expressão da atividade de alfa-amilase deste produto foi de 5,4. Porém, deve-se destacar que valores de pH próximos ao 5 ocorrem durante a acidose aguda, e valores de pH menores que 5,5 são observados na acidose sub-clínica (NAGARAJA; TOWN, 1990). Outro fator que pode ter afetado a ação dos tratamentos foi o modo de fornecimento das enzimas, a adição de enzimas a ração parece ser mais efetiva quando aplicadas em forma líquida do que em forma de pó (MORGAVI et al., 2000; WALLACE et al., 2001). Além disso, alguns compostos das silagens podem inibir a ação de enzimas exógenas (NSEREKO et al., 2000).

Poucos trabalhos avaliaram a fermentação ruminal de vacas suplementadas com enzimas amilolíticas. Tricarico et al. (2005) avaliaram a fermentação de 4 vacas em lactação, com quatro tempos de coleta de fluido ruminal, e não encontraram diferenças nas concentrações de amônia. Os mesmos autores ainda observaram aumento linear na proporção de acetato e diminuição linear de propionato, sem alteração da proporção de iso-valerato. No entanto, estes autores não avaliaram a ingestão de MS como também a digestibilidade de nutrientes. Nozière et al. (2014) suplementaram vacas primíparas com 300 KNU/kg MS da dieta e não observaram diferenças no pH e nitrogênio amoniacal, apesar de reportarem aumento da digestibilidade aparente ruminal de amido e de matéria orgânica. Porém, os mesmos autores encontraram redução na relação acetato : propionato no rúmen. DeFrain et al. (2005) suplementaram vacas no período de transição com o mesmo extrato contendo atividade de alfa-amilase do presente estudo (AmaizeTM, Alltech; a 0,1% MS da dieta) e não observaram

diferenças nas proporções molares dos AGV no rúmen tanto no período pré-parto como no período pós-parto.

Os resultados de desempenho produtivo deste estudo estão de acordo com a maior parte dos experimentos encontrados na literatura. Apesar de estudos reportarem aumento da digestibilidade aparente total de nutrientes (GENCOGLU et al., 2010) ou aumento da ingestão de MS (KLINGERMAN et al., 2009), dentre os onze estudos que utilizaram enzimas amilolíticas e avaliaram o desempenho de vacas leiteiras, apenas Tricarico et al. (2005) encontraram aumento na produção de leite, porém sem saber elucidar o motivo. Os mesmos autores ainda observaram aumento na razão acetato propionato no rúmen sem alteração na digestibilidade ruminal de amido.

É importante salientar que todos os estudos utilizaram diferentes fontes de volumosos, fontes de amido, vacas com diferentes estágios produtivos e com diferentes consumos de MS. Para a enzima ser efetiva, uma proporção adequada de enzima e substrato deve estar presente. Ainda, diferenças na solubilidade do amido dos ingredientes utilizados nos diversos estudos podem afetar a resposta à suplementação com enzimas (RAVINDRAN, 2013). De acordo com Beauchemin et al. (2003), a resposta em ruminantes alimentados com enzimas exógenas é máxima durante o tempo de comprometimento de digestão de fibra e de limitação de energia, o que não ocorre em vacas no terço médio para o terço final de lactação, como o observado no presente estudo.

Espera-se que a resposta à suplementação de enzimas exógenas seja maior para vacas em início de lactação do que para aquelas em final de lactação. Schingoethe et al. (1999) observaram aumento de 16 a 23% na PLCE em vacas em início de lactação suplementadas com enzimas exógenas, mas a produção de leite não aumentou nas vacas em meio de lactação. Respostas diferentes a suplementação de enzimas para vacas em início e meio de lactação também foram observadas em outros estudos (ZHENG et al., 2000; KNOWLTON et al., 2002). Nós avaliamos animais após o pico de lactação, período no qual os animais tendem a diminuir a produção de leite e aumentar o PC. Após o pico de lactação, ocorrem mudanças fisiológicas, principalmente relacionadas à diminuição da resistência à insulina pelos tecidos periféricos, que favorecem a deposição de carcaça e aumento do PC (ALLEN; PIANTONI, 2014).

A adição de enzima na dieta diminuiu a excreção de nitrogênio no leite e tendeu a diminuir a excreção de nitrogênio nas fezes, o que aumenta o nitrogênio retido pelo animal influenciando o ganho de PC. A inclusão de enzima a dieta aumentou o PC e o score de

condição corporal dos animais, e conseqüentemente a sua exigência de energia para manutenção. Diversos experimentos avaliando enzimas amilolíticas não encontraram efeitos na excreção de nitrogênio (NOZIÈRE et al., 2014) no PC dos animais (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; NOZIÈRE et al., 2014), no entanto, todos foram realizados em fases produtivas diferentes do presente estudo.

A síntese de proteína microbiana e os metabólitos sanguíneos não foram alterados neste estudo. Apenas Nozière et al. (2014) avaliaram os efeitos da suplementação com enzimas amilolíticas exógenas na síntese de proteína microbiana e não encontraram diferenças. Poucos estudos analisaram metabólitos sanguíneos de ruminantes suplementados com enzimas amilolíticas, e estes estudos também não observaram grande influência nos parâmetros avaliados. Tricarico et al. (2005) não encontraram efeito da suplementação com AmaizeTM nas concentrações sanguíneas de glicose de vacas em lactação e DeFrain et al. (2005) observaram apenas uma tendência a um aumento da concentração sanguínea de glicose de vacas suplementadas com enzima amilolítica no início de lactação. As concentrações das enzimas hepáticas (AST e GGT) são correlacionadas com lesão de hepatócitos associada a toxicidade de alimentos aos animais. Suas concentrações ficaram dentro dos limites fisiológicos (REBHUN, 2008) e não foram alteradas pelos tratamentos, comprovando o efeito atóxico das enzimas amilolíticas aos animais, podendo ser usada com segurança.

6 CONCLUSÃO

A suplementação de doses crescentes de enzima amilolítica não alterou a produção de propionato e de proteína microbiana no rúmen, e a produção e composição do leite de vacas em terço médio e final de lactação. Porém, a adição de enzima amilolítica à dieta de vacas em lactação aumentou a digestibilidade aparente da proteína bruta e o peso corporal dos animais.

REFERÊNCIAS

AEHLE, W. **Enzymes in Industry: production and applications**. 2nd ed. Germany: Wiley-CH Verlag GmbH & Co. LGA, Weinheim, 2004.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. AC - 19, n. 6, p. 716-723, 1974.

ALLEN, M. S.; PIANTONI, P. Carbohydrate nutrition: Managing energy intake and partitioning through lactation. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 30, p. 577–597, 2014.

ANDRIES, J. I.; BUYASSE, F. X.; DE BRABANDER, D. L.; COTTYN, B. G. Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediar metabolismo and possible influences on performances – A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 18, p. 169-180, 1987.

ANNISON, G. Commercial enzyme supplementation of wheat-based diets raises ileal glycanase activities and improves apparent metabolisable energy, starch and pentosane digestibilities in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 38, p. 105-121, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington, DC.,USA, 2000.

BACH KNUDSEN, K. E. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, p. 319-338, 1997.

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.

BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2. ed. London, UK: CAB International, 2011. p. 1-11.

BARTLEY, J. C.; BLACK, A. L. Effects of exogenous glucose on glucose metabolism in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v. 89, p. 317-328, 1966.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 23-36, 2004b.

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. E37–E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 13-22, 2004a.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. 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.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 378-390, 1999.

BEDFORD, M. R.; SCHULZE, H. Exogenous enzymes in pigs and poultry. **Nutritional Research Reviews**, v. 11, p. 91–114, 1998.

BLAZEK, J. **Role of amylose in structure-function relationship in starches from Australian wheat varieties**. 2008. 255 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Sidnei, Sidnei, Austrália. 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.

BRAKE, D. W.; TIGEMEYER, E. C.; ANDERSON, D.E. Duodenal supply of glutamate and casein both improve intestinal starch digestion in cattle but by apparently different mechanisms. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 4057-4067, 2014.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2964-2971, 1997.

BRODERICK, G. A.; KANG, 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.

BUTTERY, P. J.; FOULDS, A. N. Amino acid requirements of ruminants. In: HARESIGN, W.; COLE, D. J. A. (Ed.). **Recent advances in animal nutrition**. (.) London: Butterworths, 1985. p. 257-271.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335-342, 2008.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details**. Aberdeen: Rowett Research Institute: International Feed Research Unit. Bucksburn, 1992. 21 p.

CHEN, M. K. H.; HUBER, J. T.; SIMAS, J.; THEURER, C. B.; YU, P.; CHAN, S. C.; F. SANTOS, 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.

CHESSON, A. Feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, p. 65-79, 1993.

CHESSON, A.; FORSBERG, C. 1997. Polysaccharide 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, S. C.; VALADARES FILHO, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v. 113, n.2-3, p. 218-225, 2008.

CHURCH, D. C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants: digestive physiology**. 2 ed. Corvallis, OR, EUA: [s. n.], 1979.

CLARY, J. J.; MITCHELL JR., G. E.; LITTLE, C. O.; BRADLEY, N. W. Pancreatic amylase activity from ruminants fed different rations. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 47, p. 161-164, 1969.

CORNELL, H. J.; HOVELING, A. W.; CHRYSS, A.; ROGERS, M. Particle size distribution in wheat starch and its importance in processing. **Starch/Starke**, v. 46, p. 203-207, 1994.

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

COTTA, M. A.; HESPELL, R. B. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrosolvens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 51-58, 1986.

COTTA, M. A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 48-54.

COWAN, W. D. Factors affecting the manufacture, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. In: INTERNATIONAL ROUNDTABLE ON ANIMAL FEED BIOTECHNOLOGY, 2., 1994, Ottawa, ON, Canada. **Proceedings...** Ottawa, ON, Canada, 1994. p. 175-184.

COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 745-752, 2007.

CROOM, J. W.; BULL, L. S.; TAYLOR, I. L. Regulation of pancreatic exocrine secretion in ruminants: A review. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 191-202, 1992.

CUMMINS, K. A.; PAPAS, A. H. Effect of isocarbon 4 and isocarbon 5 volatile fatty acids on microbial protein synthesis and dry matter digestibility *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2588-2595, 1985.

DAIRY RECORDS MANAGEMENT SYSTEM (DHI). **Glossary**. 2014. Disponível: <<http://www.drms.org/PDF/materials/glossary.pdf>>. Acesso em: 17 Jun. 2015.

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.

DILORENZO, N.; SMITH, D. R.; QUINN, M. J.; MAY, M. L.; PONCE, C. H.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, 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.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

EISEMANN, J. H.; HUNTINGTON, G. B. Metabolite flux across portal-drained viscera, liver, and hindquarters of hyperinsulinemic, euglycemic beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2919-2929, 1994.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FERRARETO, L. F.; SHAVER, R. D.; ESPINEIRA, M.; GENCOGLU, H.; BERTICS, 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.

FIRKINS, J. L. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1428-1437, 1997.

FLINT, H. J.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation in the rumen: Biochemistry and genetics. In: ENGELHARDT, W. W.; LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G. *descrever os demais autores* (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**. Stuttgart: Enke, 1995. p. 43-70.

FOLEY, A. E.; HRISTOV, A. N.; MELGAR, A.; ROPP, J. K.; ETTER, R. P.; ZAMAN, S.; HUNT, C. W.; HUBER, K.; PRICE, W. J. Effect of barley and its amylopectin content on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4321-4335, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Livestock's long shadow: environmental issues and options**. Rome: FAO, 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0701e/A0701E00.pdf>. Acesso em: 12 Ago. 2015.

FOOD CHEMICALS CODEX, **Food chemicals codex**. 4th ed. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1996.

FREETLY, H. C.; KLINDT, J. Changes in gut liver glucose, lactate, insulin, and oxygen flux in mature ewes during mesenteric or abdominal vena cava glucose infusion. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 924-932.

GALAND, G. Brush border membrane sucrose-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 1-11, 1989.

GENCOGLU, H.; SHAVER, R. D.; STEINBERG, W.; ENSINK, J.; FERRARETO, 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.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Tropical browses: content of phenolic compounds, estimation of energetic value and stoichiometrical relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. **Journal of Agricultural Science**, v. 139, p. 341-352, 2002.

GIUBERTI, G.; MASOERO, F.; FERRARETO, L. F.; HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. **Starch / Starke**, v. 66, p. 72-90, 2014.

GRESSLEY, T.; HALL, M. B.; ARMENTANO, L. E. Productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1120-1130.

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

GUTIÉRREZ, C.; MENDOZA, G. D.; RICALDE, R.; MELGOZA, L. M.; PLATA, F. Effect of exogenous amylase or glucoamylase dose on in situ ruminal digestion of corn and sorghum. **Journal of Applied Animal Research**, v. 27, p. 7-10, 2005.

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).

HAMAKER, B. R.; MOHAMED, A. A.; HABBEN, J. E.; HUANG, C. P.; LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 583-588, 1995.

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

HARMON, D. L.; MCLEOD, K. R. Glucose uptake and regulation by intestinal starch digestion in ruminants: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 309-318, 2004.

HRISTOV, A. N.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; WUERFEL, R. I. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. **Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science**, v. 47, p. 282-284, 1996.

HRISTOV, A. N.; BASEL, C. E.; MELGAR, A.; FOLEY, A. E.; ROPP, J. K.; HUNT, C. W.; TRICARICO, J. M. Effects 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.

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

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 852-867, 1997.

HUNTINGTON, G. B.; HARMON, D. L.; RICHARDS, C. J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. E14-E24, 2006. E-Supplement.

HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, P. J. Net absorption of glucose, L-lactate, volatile fatty acids, and nitrogenous compounds by bovine given abomasal infusions of starch or glucose. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2428-2436, 1986.

IMMANUEL, G.; DHANUSA, 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 of Environmental Science and Technology**, v. 3, p. 25-34, falta data.

JOUANY, J. P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1335S-1346S, falta data.

KENWARD, M.; ROGER, J. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v. 53, p. 983-997, 1997.

KINGSTON-SMITH, A. H.; MARSHALL, A. H.; MOORBY, J. M. Breeding for

genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. **Animal**, v. 7, p. 79-88, 2013.

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

KNOWLTON, K. F.; MCKINNEY, J. M.; COBB, C. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3328-3335, 2002.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J. BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State Particle Separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1858– 1863, 2003.

KOSLOZKY, G. **Bioquímica de ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009. p. 216.

KOTARSKI, S.F.; WANISKA, R.D.; THURN, K.K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, v.122, p.178-190, 1992.

KREIKEMEIER, K. K.; HARMON, D. L.; BRANDT, R. T.; AVERY JR., T. B.; JOHNSON, D. E. Small intestinal starch digestion in steers: effects of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin infusion on small intestinal disappearance and net glucose absorption. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 328-338, 1991.

KREIKEMEIER, K. K.; HARMON, D. L. PETERS, J. P.; GROSS, K. L.; ARMENDARIZ, C. K.; KREHBIEL, C. R. Influence of dietary forage and feed intake on carbohydrase activities and small intestinal morphology of calves. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2916-2929, 1991.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating α -amino nitrogen as non-protein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, v. 77, p. 620-626, 2000.

LARSON, J.; HOFFMAN, P. C. Technical Note: A method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4834-4839, 2008.

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

LEE-RANGEL, H. A.; PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; MENDOZA, G. D.; GONZÁLEZ, S. S.; MONTES, M. A.; TRJO, A. S.; JASSO-PINEDA, Y. Effect of a ruminal buffer and exogenous amylolytic enzymes on growth and digestion in lambs fed high concentrate diets. **Journal of Applied Animal Research**, v. 37, p. 117-120, 2010.

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

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.

LEWIS, G. E.; HUNT, C. W.; SANCHEZ, W. K.; TREACHER, R.; PRITCHARD, G. T.; FENG, P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 3020-3028, falta data.

LYKOS, T.; VARGA, G. A.; CASPER, D. Varying degradation rates of nonstructural carbohydrates: effects on ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production and composition in high producing Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3341-3355, 1997.

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

MCALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J.; POPP, J. D.; MIR, 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**, v. 79, p. 353-360, 1999.

MCLEOD, K. R.; BALDWIN, R. L.; HARMON, D. L.; RICHARDS, C. J.; RUMPLER, W. C. Influence of ruminal and postruminal starch infusion on energy balance in growing steers. In: falta autor do livros. **Energy metabolism of farm animals**. Wageningen, Holanda: Wageningen Pers, 2001. p. 385-388. (EAAP Publication).

MIR, P. S.; MIR, Z.; ROBERTSON, J. A. Effects of branched chain amino acids or fatty acids supplementation on *in vitro* digestibility of barley straw or alfalfa hay. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, p. 151, 1986.

MIRON, J.; YOSEF, E.; BEN-GHEDALIA, D.; CHASE, L. E.; BAUMAN, D. E.; SOLOMON, R. Digestibility by dairy cows of monosaccharide constituents in total mixed rations containing citrus pulp. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 89-94, 2002.

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.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; MCALLISTER, T. A.; IWAASA, A. D.; WANG, Y.; YANG, W. Z. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. **Journal of Animal Science**, v. 79, 1621-1630, 2001.

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

MUIRHEAD. **Direct fed microbial, enzyme and forage additive compendium**. 3. ed. Minnetonka, MN, EUA: The Miller Publishing Company, 1996.

NAGARAJA, T. G.; TOWN, G. Ciliated protozoa in relation to ruminal acidosis and lactic acid metabolism, In: ONEORA, R.; MINATO H. E.; ITABASHI, H. (Ed.). **Rumen ecosystem: microbial metabolism and regulation**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1990. 194 p.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051-2069, 1988.

NOZIÈRE, P.; ORTIGUES-MARTY, I.; LONCKE, C.; SAUVANT, D. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: From feed starch and fibre to nutrients available for tissues. **Animal**, v. 4, p. 1057-1074, 2010.

NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERBERG, 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. 1-10, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements for beef cattle**. 7. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 2001.

NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Inhibition of ruminant feed enzymes polysaccharidase activities by extracts from silages. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 80, p. 523-526, 2000.

ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; LIANG, J. B.; GUADA, J. A. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v. 68, p. 243-250, 2001.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 275-286, 1998.

POORE, M. H.; MOORE, J. A.; ECK, T. P.; SWINGLE, R. S.; THEURER, C. B. Effect of fiber source and ruminal starch degradability on site and extent of digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2244-2253, 1993.

OPATPANATANAKIT, Y.; KELLAWAY, R. C.; LEAN, I. J.; ANNISON, G., KIRBY, A. Microbial fermentation of cereal grains in vitro. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 45, p. 1247-1263, 1994.

ORTIZ-RODEA, A.; NORIEGA-CARRILLO, A.; SALEM, A. Z. M.; CASTELAN ORTEGA, O.; GONZALEZ-RONQUILLO, M. The use of exogenous enzymes in dairy cattle on milk production and their chemical composition: a meta-analysis. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 13, p. 399-409, 2013.

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

PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 80, p. 404-408, 2000.

PHIPPS, R. H.; SUTTON, J. D.; BEEVER, D. E.; BHAT, M. K.; HARTNELL, G. F.; VICINI, J. L.; HARD, D. L. Effects of cell-wall degrading enzymes and method of application on feed intake and milk production of Holstein-Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 23, 2000b. Supplement, 1.

PHIPPS, R. H.; SUTTON, J. D.; BEEVER, D. E.; BHAT, M. K.; HARTNELL, G. F.; VICINI, J. L.; HARD, D. L. Evaluation of feed additives in the diet of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 23, 2000a. Supplement, 1.

RAMOS, B. M. O.; CHAMPION, M.; PONCET, C.; MIZUBUTI, I. Y.; NOZIÉRE, P. Effects of virtuousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal in sacco degradation of dry matter, starch and nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 253-266, 2009.

RAVINDRAM, V. Feed enzymes: the science, practice, and metabolic realities. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 628-636, 2013.

REYNOLDS, C. K.; HUNTINGTON, G. B.; TYRRELL, H. F.; REYNOLDS, P. J. Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1803-1812, 1988.

REYNOLDS, C. K.; SUTTON, J. D.; BEEVER, D. E. Effects of feeding starch to dairy cows on nutrient availability and production. In: UNIVERSITY OF NOTTINGHAM CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 30., 1997, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham, UK: University of Nottingham Press, 1997. 105 p.

REBHUN, W. C. **Diseases of dairy cattle**. In: THOMA, J.; DIVERS, E.; SIMON, F. P. (Ed.). 8th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. chap. 1, p. 14. 2008.

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

ROJO, R.; MENDOZA, G. D.; GONZÁLEZ, S. S.; LANDOIS, L.; BÁRCENA, 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. 123-124, p. 655-665, 2005.

ROJO-RUBIO, R.; MENDOZA-MARTINEZ, G. D.; CROSBY-GALVAN, M. M. Use of thermostable amylase from *Bacillus licheniformis* on *in vitro* starch digestion of sorghum and corn. **Agrociencia**, v. 35, p. 423-427, 2001.

ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. R. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, v. 63, p 1607-1623, 1986.

RUSSEL, J. B. Fermentation of cellodextrins by cellulytic and noncellulolytic rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, 572-576.

RUST, S. **Associative effects in the ruminant animal**. Ph.D. Thesis Dissertation. Stillwater: Oklahoma State Library, 1992.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase production by bactéria: A review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, p. 235-258, 2013.

SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A.; TREACHER, R. J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 996-1003, 1999.

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. Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação. 2016. Falta n. de página. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

SILVEIRA, C.; OBA, M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Selection of barley grain affects ruminal fermentation, starch digestibility, and productivity of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2860-2869, 2007.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds 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 lipid contents of starches from various mutants for amylose content in maize. **Journal of Cereal Science**, v. 14, p. 267-278.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. **International Journal of 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 Sciences**, v. 9, p. 85-99, 2015.

SUTTON, J. D.; PHIPPS, R. H.; BEEVER, D. E.; HUMPHRIES, D. J.; HARTNELL, G. F.; VICINI, J. L.; HARD, D. L. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 546-556, 2003.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. 856 p.

TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1413-1424, 2005.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. Starch. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. (Ed.). **Polysaccharides II**. Wiley – VCH, Weinheim: Polysaccharides from Eukaryotes, 2002. v. 6, p. 381-438.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. QI, X. Starch composition, fine structure and architecture: Review. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

THEURER, C. B.; LOZANO, O.; ALIO, A.; DELGADO-ELORDUY, A.; SADIK, M.; HUBER, J. T.; ZINN, R. A. Steam-processed corn and sorghum grain flaked at different densities alter ruminal, small intestinal, and total tract digestibility of starch by steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2824-2831, 1999.

TRICARICO, J. M.; ABNEY, M. D.; GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D.; HANSON, K. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 802-811, 2014.

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.

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. **Animal Science**, v. 81, p. 365-374, 2005.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World population prospects: the 2012 revision, key findings and advance tables**. 2013. (Working Paper no. ESA/P/WP.227). Disponível em:

<http://esa.un.org/unpd/wpp/Documentation/pdf/WPP2012_%20KEY%20FINDINGS.pdf>. Acesso em: 20 Jun. 2015.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivates. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686-2696, 1999.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, falta data.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, Ithaca, NY, EUA, 1994.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1991.

VASANTHAN, T.; BAHATTY, R. S. Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular and high amylose barleys. **Cereal Chemistry**, v. 73, 199-207, 1996.

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.

VICINI, J. L.; BATEMAN, H. G.; BHAT, M. K.; CLARK, J. H.; ERDMAN, R. A.; PHIPPS, R. H.; VAN AMBURGH, M. E.; HARTNELL, G. F.; HINTZ, R. L.; HARD, D. L. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 576-585, 2003.

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 of Animal Science**, v. 79, p. 1905-1916, 2001.

WEBB, E. C. **Enzyme nomenclature**. San Diego: Academic Press, 1992.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. R. St. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 39, p. 95-110, 1992.

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

WHEELER, W. E.; NOLLER, C. H. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 44, p. 131-135, 1977.

WILDMAN, O. E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WIRYAWAN, K. G.; BROOKER, B. E. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 46, p. 1555–1568, 1995.

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

ZHENG, W.; SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A.; HIPPEN, A. R.; TREACHER, R. J. Determination of when during the lactation cycle to start feeding cellulase and xylanase enzyme mixture to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2319-2325, 2000.