

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos cursos de Pós-graduação

Arturo Sia Andreazzi

Suplementação de amilase para vacas leiteiras em lactação

Belo Horizonte MG
Escola de Veterinária da UFMG
2014

Arturo Sia Andreazzi

Suplementação de amilase para vacas leiteiras em lactação

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Ronaldo Braga Reis

Belo Horizonte MG
Escola de Veterinária da UFMG
2014

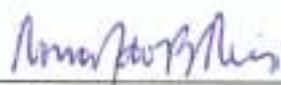
A557s Andreazzi, Arturo Sia, 1984-
Suplementação de amilase para vacas leiteiras em lactação / Arturo Sia Andreazzi. –
2014.
53 p. : il.

Orientador: Ronaldo Braga Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

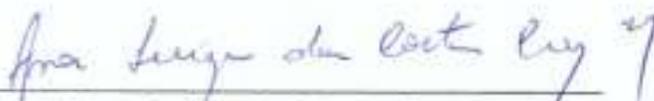
1. Vaca – Alimentação e rações – Teses. 2. Dieta em veterinária – Teses. 3. Enzimas –
Teses. 4. Leite – Produção – Teses. 5. Digestibilidade – Teses. I. Reis, Ronaldo Braga.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 085

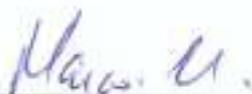
Dissertação defendida e aprovada em 23 de abril de 2014 pela
comissão examinadora constituída por:



Prof. Ronaldo Braga Reis



Prof. Ana Luiza da Costa Cruz Borges



Prof. Marcos Neves Pereira

Sumário

Lista de Tabelas	5
Lista de Figuras	6
Resumo	7
1. Introdução	8
2. Revisão de Literatura	10
2.1. Amido na dieta de ruminantes	10
2.1.1. Fatores que afetam a digestibilidade do amido	12
2.1.2. Matriz proteica associada aos grânulos de amido	12
2.1.3. Processamento de grãos de cereais	13
2.1.4. Degradação do amido no rúmen	15
2.1.5. Digestibilidade intestinal de amido	17
2.2. Enzimas exógenas na dieta de ruminantes	18
2.2.1. Amilases exógenas na dieta dos ruminantes	19
2.2.2. Experimentos <i>in vitro</i> com adição de enzimas exógenas e interação microbiana ruminal	24
2.3. Seletividade de Partículas	25
3. Material e métodos	27
3.1. Local, período e fatores climáticos	27
3.2. Animais e delineamento experimental	27
3.3. Dietas experimentais e Manejo dos animais	28
3.4. Variáveis analisadas	30
3.5. Análise Estatística	32
4. Resultados e Discussão	32
5. Conclusões	43
6. Referências	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das consumidas em nutrientes de vacas suplementadas (Amilase) ou não (Controle).	29
Tabela 2. Desempenho e consumo de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).	34
Tabela 3. Perfil da fermentação, pH ruminal e excreção da alantoína urinária de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).	37
Tabela 4. Nitrogênio uréico no plasma (NUP) e glicose plasmática 12 horas após alimentação de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).	38
Tabela 5. Digestibilidade aparente dos nutrientes no trato digestivo total de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).	40
Tabela 6. Padrão de ingestão, ruminação e seletividade de partículas da dieta das vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).	41

Lista de Figuras

- Figura 1. Índice de temperatura e umidade (ITU) no interior no galpão ao decorrer do dia. 27
- Figura 2. Produção de leite e consumo de matéria seca (CMS) de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle). 35
- Figura 3. Concentração de nitrogênio uréico no plasma (NUP) de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle). 39

Resumo

Estudou-se a suplementação de dietas para vacas leiteiras com amilase exógena com o objetivo de aumentar o valor nutritivo do milho híbrido de endosperma vítreo. Vinte e oito vacas da raça Holandês, 171 ± 80 DEL no início do experimento, foram pareadas em blocos, alocadas ao acaso e submetidas a dietas experimentais por 70 dias, após um período de padronização de duas semanas e alojadas em *tie stall*. A pesquisa consistiu da adição ou não da enzima amilase (DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), ao milho moído na proporção de 0,5g de enzima por quilo de matéria seca (MS) da dieta total (300 KNU/ kg de MS) em dietas com 32,1% de amido na MS. Os dados foram analisados por meio do Proc Mixed do SAS como blocos ao acaso ajustado para covariável com medidas repetidas ao longo do tempo, exceto quando os dados foram obtidos uma vez ao longo do experimento. A amilase aumentou a produção de leite (33,0 vs 32,3 kg/d, $P = 0,02$), reduziu o consumo de matéria seca (CMS) (19,7 vs 20,7 kg /d, $P < 0,01$) e aumentou a eficiência alimentar (1,52 vs 1,63, $P < 0,01$). O peso e a condição corporal não diferiram ($P > 0,44$). A produção de lactose do leite foi maior para os animais que receberam a enzima ($P = 0,01$) e houve tendência de aumento do teor de glicose no plasma ($P = 0,07$). A amilase diminuiu o NUP ao longo do dia (13,6 vs 14,7, $P = 0,05$) e reduziu a duração da primeira refeição, achados sugestivos de aumento da fermentação da matéria orgânica do rúmen. A digestibilidade aparente do trato digestivo total da MS, matéria orgânica, fibra insolúvel em detergente neutro e amido não foram responsivos à enzima ($P > 0,41$). A suplementação de amilase exógena aumentou a eficiência alimentar das vacas. A diminuição do NUP sugere que a enzima aumentou a degradação ruminal de amido, sem afetar a digestibilidade total de nutrientes.

PALAVRAS CHAVE: enzima; amilase; amido; digestibilidade; produção de leite.

1. Introdução

As principais fontes de energia da dieta para bovinos leiteiros são carboidratos fibrosos provenientes de forragem e carboidratos não fibrosos. A maioria dos carboidratos não fibrosos deriva de grãos de cereais, incluindo o milho, sorgo, trigo, cevada e aveia. O grão de milho é a fonte energética mais importante para vacas leiteiras no Brasil, e sua principal fonte de energia é o amido. A digestibilidade total de amido em vacas leiteiras é variável, oscilando de 70 a 100% (Firkins et al., 2001). Vários fatores estão relacionados com sua digestibilidade em vacas leiteiras: tamanho das partículas de grãos; método de processamento; método de colheita e armazenagem; maturidade da planta no momento da colheita; teor de umidade; processamento do grão e características do endosperma (Nocek e Tamminga, 1991; Johnson et al., 1999; Firkins et al., 2001). Assim, a melhoria da utilização do milho pode se tornar interessante pelo potencial de racionalizar o uso de amido e aumentar a eficiência animal, e os aditivos enzimáticos podem ser estratégia usual em conjunto aos fatores relacionados.

Algumas amilases exógenas provavelmente são resistentes à degradação no rúmen e tem o potencial para aumentar a digestibilidade das dietas, e por sua vez, melhorar o desempenho animal (Klingerman et al., 2009). Devido à sua ação hidrolítica, suplementos com α -amilase podem aumentar a disponibilidade de produtos de hidrólise de amido no rúmen e alterar o processo de fermentação ruminal (Tricarico et al., 2008). Em estudo realizado por Klingerman et al. (2009), formulações de α -amilase exógena tiveram relativa estabilidade em fermentação ruminal *in vitro* por 24h, o que sugere que as enzimas não foram sensíveis a extensa degradação pela microbiota ruminal. Hristov et al. (1998), de forma semelhante, observaram liberação de açúcares do amido após adição de enzimas amilolíticas ao fluido ruminal para determinar a sua estabilidade.

O uso de amilase exógena na dieta de bovinos leiteiros tem sido estudado desde 1960. Recentemente, o melhor entendimento da digestão dos carboidratos e do amido, a alta variedade de ingredientes e o alto do preço do milho aumentaram o interesse em maximizar a utilização do amido e da energia dos carboidratos nas dietas de bovinos leiteiros. Apesar da alta digestibilidade do amido, o uso de tecnologias como o processamento e a utilização de enzimas exógenas podem ser aplicadas para alterar o ambiente ruminal e melhorar a eficiência produtiva sem sacrificar a saúde do rúmen ou provocar acidose ruminal. Pesquisas com suplementos de enzimas exógenas para ruminantes, focaram principalmente na atividade fibrolítica, enquanto que a atividade amilolítica permanece pouco explorada. Portanto, há relativa falta de informação nos efeitos dos suplementos baseados em alfa amilase na literatura.

Aspecto importante na aplicabilidade da amilase exógena no Brasil são as variedades de milho cultivadas no país. Nas principais regiões do mundo, a maior parte do milho cultivado é do tipo farináceo. No Brasil, é predominantemente cultivado o milho tipo duro, que apresenta reduzida degradabilidade ruminal quando comparado ao milho farináceo (Correa et al., 2002).

Em estudos preliminares, Klingerman et al. (2009) encontraram diferenças na produção ruminal aparente de ácidos graxos voláteis (AGV) total *in vitro* em diferentes variedades de milho. Quando crescentes doses de amilase foram adicionadas aos diferentes tipos de milho, houve interação da variedade do milho com a enzima para a produção aparente de AGVs. Verificou-se um efeito linear positivo da dose de enzima para produção de AGV nas variedades dentada e duro, mas não para o milho farináceo. O resultado sugere que a variedade do milho pode interferir na eficácia da enzima.

Portanto, o uso de amilase exógena seria uma estratégia plausível para melhorar a disponibilidade de amido fermentável no rúmen. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho dos animais, degestibilidade aparente total e o metabolismo de nitrogênio no rúmen em resposta a suplementação de amilase exógena em dietas com alta inclusão de amido proveniente de milho duro.

2. Revisão de Literatura

2.1. Amido na dieta de ruminantes

O amido é um carboidrato de reserva das plantas, normalmente encontrado em sementes e raízes e em menores concentrações nas folhas e nos colmos. É composto por duas grandes moléculas, amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear de unidades α -1-4-D glicose. A amilopectina é um polímero ramificado com cadeias lineares de um α -1-4-D-glicose que têm ramificações α -1-6 a cada 20 a 25 resíduos de glicose (Lehninger, 1998). As proporções entre estes compostos variam entre tipos de grãos, influenciando a taxa de degradação e a digestibilidade do amido. A amilopectina é o principal constituinte do amido do milho, cerca de 70 a 80% (Rooney e Pflugfelder, 1986). A digestibilidade de amido é inversamente proporcional ao teor de amilose. Desta forma fontes de amido com maiores teores de amilopectina, podem apresentar maior digestibilidade (Jobim et al., 2003). Amido é uma estrutura altamente organizada, as moléculas de amilose e amilopectina são mantidas juntas por ligações de hidrogênio e seus grânulos são insolúveis em água fria. Estruturalmente formam "pseudo cristais" que são resistentes a água.

A necessidade de aumentar a eficiência de produção de ruminantes foi atingida em grande parte com fornecimento de mais alimentos concentrados. O amido é o principal componente dos grãos de cereais que constituem os principais alimentos concentrados, o qual é submetido em primeiro lugar à fermentação microbiana no rúmen com produção de ácidos graxos voláteis e posteriormente à digestão enzimática no intestino delgado onde é absorvido como glicose. A digestão relativa de amido por estas duas vias pode influenciar a eficiência de transformação da energia da alimentação em produto de origem animal, os substratos utilizados por ruminantes para formar glicose, a magnitude da fixação de nitrogênio não-protéico em proteína microbiana, e a distribuição de energia nos produtos gerados (Waldo, 1973).

Vacas leiteiras de alta produção requerem consumo elevado de energia, sem causar perturbações metabólicas que resultam da acidose ruminal e doenças relacionadas com grandes quantidades de concentrado (Nocek, 1997; Owens et al, 1998, Garrett et al, 1999). Portanto, os aspectos negativos e positivos da digestibilidade do grão de cereal precisam ser equilibrados para a ingestão energética ideal. A quantidade ótima de amido dietético é função de vários fatores, como a degradabilidade inerente à fonte de amido, o método de processamento, a quantidade de proteína solúvel, a fibra insolúvel em detergente neutro e o método de alimentação. Para alterar a disponibilidade de amido na dieta são necessárias mudanças nas proporções dos carboidratos, sobretudo amido e FDN. Quando isso não

acontece o aumento efetivo no conteúdo de energia da dieta pode ser menor do que o previsto (Weiss e Shockey, 1991), pois quando o amido substitui fibra dietética de forragem, a digestão de FDN é muitas vezes reduzida (Beckman e Weiss, 2005; Firkins, 2001).

O teor de amido ideal em dietas para vacas leiteiras em lactação não está bem definido, mas 25% de amido (base da MS) tem sido sugerido com base na revisão de (Staples, 2007). As recomendações mais usuais para a quantidade de amido na MS da dieta para vacas em lactação são de 23 a 30% de acordo com Grant (2005). Shaver (2010) relatou em pesquisas com rebanhos leiteiros comerciais de alta produção realizadas em Wisconsin e Michigan, concentrações de amido médio na dieta de 27% e entre 25% a 30% em dietas com 21% de FDN proveniente de forragem (base da MS). O aumento dos preços do milho, no entanto, criou muito interesse em efetivar o uso do amido nas dietas com intuito de melhorar sua digestibilidade e o aproveitamento animal. A melhor eficiência de uso do amido poderia permitir dietas reduzidas em amido sem o comprometimento do desempenho produtivo.

O amido participa de mecanismos importantes no metabolismo dos microrganismos ruminais. A microbiota depende de esqueletos de carbono e da disponibilidade de energia (ATP) para a síntese de proteínas. Vários estudos indicam que o fornecimento de amido e proteínas rapidamente degradáveis estimulam maior síntese ou maior eficiência de síntese de proteína microbiana. Herrera-Saldana et al. (1990) relataram que a passagem de proteína microbiana para o duodeno de vacas em lactação foi maior (3,00 kg / d), quando a degradabilidade de amido e proteína foram de rápidas taxas de degradação (cevada e farelo de algodão). Os fluxos de proteína microbiana foram inferiores quando as fontes primárias de carboidratos e proteínas fermentáveis eram de degradabilidade lenta ou sem sincronia.

O amido corresponde de 50 a 100% do CNF, na maioria dos alimentos (NRC 2001). Além do conteúdo de amido total, a taxa e extensão da digestão no rúmen também podem afetar a quantidade da fonte de amido a ser adicionada com segurança a uma dieta. A taxa de fermentação de amido varia amplamente por tipo de grão e processamento. Alteração do CNF da dieta influencia padrões de fermentação ruminal, digestão total de fibras e percentual de gordura do leite (Sievert e Shaver, 1993; Sutton e Bines, 1987). Batajoo e Shaver (1994) concluíram que, para vacas com produção de mais de 40 kg de leite, a dieta deve conter mais do que 30% de CNF, mas encontraram pouco benefício quando aumentou para 42% de CNF. Nocek e Russell (1988) sugeriram que 40% de CNF foi o mais adequado para vacas em lactação a partir da avaliação de dietas à base de silagem de alfafa e silagem de milho e variação de 30 para 46% de CNF. Hoover e Stokes (1991) analisaram dados de Nocek e Russell (1988) e verificaram que quando o CNF dietético era maior do que 45 a 50% ou menor do que 25 a 30%, a produção de leite foi diminuída. Em outro estudo, a porcentagem e a produção de proteína do leite aumentaram quando CNF na MS da dieta aumentou de 41,7 para 46,5% (Minor et al. 1998).

2.1.1. Fatores que afetam a digestibilidade do amido

A digestão do amido é o passo inicial para que seja utilizado como fonte de energia pelos microrganismos ruminais e pelos ruminantes. São conhecidos muitos fatores que podem afetar a taxa e a extensão da digestão de amido pelo ruminante, interferindo de forma dinâmica na quantidade do amido que será fermentado no rúmen ou que chegará ao intestino delgado. Entre eles estão a composição química e a forma física do amido, presença de barreiras físicas nos grãos dos cereais, fatores antinutricionais, a forma física do alimento fornecido e os diferentes tipos e intensidades de processamentos aplicados aos alimentos. McAllister et al. (1993) e Cheesson e Forsberg (1997) ponderaram que, na prática a extensão da digestão do amido no rúmen parece ser mais determinada pela natureza do material que circunda e protege o grânulo de amido do que propriamente pela composição química do amido. O acesso dos microrganismos ruminais aos grânulos de amido é determinado pelas taxas de degradação da parede celular das células endospermáticas e, principalmente da matriz protéica. A semente de milho é composta de três partes básicas morfológicas: pericarpo ou casca, rico em fibras; gérmen ou embrião, que é parte vegetativa do grão, constituída principalmente por lipídeos e proteínas; e endosperma. O endosperma representa 75-80 % do grão de milho e contém principalmente amido e proteína. O endosperma de milho é praticamente desprovido de fibra (FDA ou FDN), mas contém proteínas abundantes (albuminas, globulinas, prolaminas e glutelina) das quais as prolaminas são as de maior importância na nutrição de ruminantes.

2.1.2. Matriz proteica associada aos grânulos de amido

A matriz proteica é uma estrutura amorfa com função estrutural no grão que encapsula os grânulos de amido. Essa matriz está presente principalmente no endosperma vítreo dos grãos e a sua quebra pode melhorar a velocidade e a extensão da digestão do amido (Mc Allister et al., 1990 e 1993). A sua parte mais importante são as prolaminas, que são proteínas do endosperma com alta concentração de prolina. A prolina é um aminoácido altamente hidrofóbico capaz de dobragens complexas e, portanto, as proteínas com elevado teor de prolina desenvolvem estruturas terciárias que são altamente hidrofóbicas (Momany, et al., 2006). As prolaminas encontradas no grão de milho são chamadas de zeínas, e correspondem de 30 a 60% da proteína total do milho (Hoffman e Shaver, 2011). As prolaminas são proteínas exclusivamente associadas com amido em todos os grãos de cereais. O amido no endosperma vítreo é mais extensivamente encapsulado por prolaminas e é menos degradável no rúmen em comparação com o endosperma farináceo. Os valores mais baixos de prolaminas são observados em grãos fermentados, como milho grão úmido, porque as prolaminas podem ser degradadas no processo de fermentação. A matriz proteica está densamente concentrada no endosperma vítreo dos grãos de cereais, principalmente de milho e de sorgo. A forte interação da matriz

proteica com os grânulos de amido dos grãos de milho e de sorgo e a sua baixa digestibilidade ajudam a explicar porque o amido desses grãos é menos digestível no rúmen que o amido de trigo, aveia e cevada (Hoseney et al., 1974; McAllister et al., 1990).

Philippeau et al. (2000) quantificaram a relação entre vitreosidade e concentração de prolaminas-zeína no milho e concluíram que milhos mais vítreos contêm mais prolaminas-zeína do que milhos menos vítreos. Estes dados definem as diferenças na composição química entre o endosperma vítreo e endosperma farináceo (Hoffman e Shaver, 2011). As prolaminas-zeínas são hidrofóbicas, portanto insolúveis em solventes normais para o ambiente ruminal (Lawton, 2002). Potencialmente, a digestão do amido requer bactérias do rúmen para degradar primeiramente as prolaminas, via proteólise antes da atividade amilolítica (Cotta, 1988). A proteólise das prolaminas é um passo anterior limitante na taxa de digestão de amido. McAllister et al., (1993) estudando a influência da matriz proteica sobre a digestão do amido observaram que o milho tratado com protease *in vitro* teve a digestão de amido dobrada e concluíram que a matriz proteica do milho foi um fator importante na digestão ruminal do amido. Correa et al. (2002) encontraram correlação negativa e alta entre vitreosidade e degradabilidade ruminal, e o comportamento foi bem semelhante ao observado por pesquisadores franceses trabalhando com população diferente de plantas (Philippeau & Michalet-Doureau, 1997). Os autores concluíram que a vitreosidade parece ser um bom parâmetro para selecionar híbridos de milho com alta digestibilidade ruminal do amido.

2.1.3 Processamento de grãos de cereais

De maneira geral, o fundamento do processamento dos grãos é a melhoria da digestibilidade dos alimentos por meio da quebra das barreiras que impedem o acesso dos microrganismos ruminais e das enzimas aos componentes nutricionais, conservação, o isolamento das partes específicas e a melhoria da palatabilidade ou detoxificação dos alimentos (McAllister et al., 1990; Pond et al., 1995). Os diferentes tipos de processamentos atuam aumentando a área de superfície dos grãos, reduzindo a interação da matriz proteica com os grânulos de amido ou aumentando a solubilidade dos grânulos de amido em água. Desta maneira, os processamentos podem aumentar a disponibilidade de amido e da proteína dos grãos no rúmen e no intestino delgado, e mudar as características de fermentação ruminal, da taxa de passagem e do sítio de digestão. Geralmente, a magnitude da alteração promovida pelo processamento é inversamente proporcional à digestibilidade do grão não processado. Assim, o grão que mais responde ao processamento é o sorgo, seguido pelo milho e por outros cereais como aveia e cevada, que tem menor resposta por já ter a degradação alta na forma não processada (Theurer, 1986).

Muitos tipos de processamentos físicos e químicos estão disponíveis para melhorar a digestibilidade dos grãos e o desempenho dos ruminantes. A moagem fina ou grossa, extrusão micronização, tostagem, peletização e laminação são exemplos de processamento

a seco, enquanto a maceração, laminação a vapor, floculação, reconstituição, expansão, cozimento a vapor são processamentos que envolvem adição de água aos grãos, frequentemente na forma de vapor e com pressão (Hale, 1973). Segundo Theurer (1986), a união dos dois processos, redução do tamanho de partícula e aplicação de vapor, melhora ainda mais a eficiência da digestão dos alimentos processados pelos ruminantes. Ladely et al (1995) concluiu que o método de processamento teve um efeito maior sobre o desempenho de bovinos de corte do que os híbridos de milho.

A utilização de silagem de grão úmido ou reidratado consolidou-se como estratégia importante para aumentar a digestibilidade do milho, pois sabe-se que quando o grão de milho é devidamente ensilado, há aumento na digestibilidade do amido do grão devido à fragilização e ao rompimento da matriz proteica que envolve os grânulos de amido no endosperma. O amido pode também sofrer o processo de gelatinização, aumentando a sua susceptibilidade ao ataque enzimático. Pereira, (2012) comparou a digestibilidade da silagem de grãos de milho reidratados, com moagem fina ou grosseira e com crescentes tempos de armazenamento, 0, 14, 28, 56, 112, 168, 224 dias. Foi observado aumento nas degradabilidades efetivas à medida que o tempo de armazenamento aumentou e também para a moagem fina em relação à grosseira.

Ferraretto et al. (2013) realizaram meta análise para determinar a influencia do tipo de grão, maturidade do milho e métodos de processamento no consumo de matéria seca, digestibilidade e performance de vacas em lactação. Os processamentos foram: milho seco moído, milho ensilado (grão úmido) e floculado. A digestibilidade total de amido foi menor e a concentração de gordura no leite maior para o milho moído em relação ao milho grão úmido e floculado. A digestibilidade de amido da dieta foi reduzida para ambos, milho grão úmido e seco moído, quando o tamanho de partícula aumentou. Maiores concentrações de amido na dieta aumentaram a produção de leite e a concentração de proteína do leite, mas diminuíram a digestibilidade de FDN e a concentração de gordura no leite.

Vale ressaltar, que grãos de milho colhidos no estágio maduro de maturação, normalmente utilizados para formular concentrados para vacas leiteiras tanto na fazenda quanto industrialmente, encontram-se no ponto de maturidade fisiológica de máxima vitreosidade e mínima digestibilidade (Pereira et al, 2004), o que faz das medidas capazes de induzir aumento na degradabilidade ruminal ainda mais necessárias.

O aumento da participação ruminal na digestão do amido proporcionada pelos processamentos é benéfico, porque aumenta a disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen, com consequentes aumentos das produções de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais (Noeck Tamminga, 1991). Herrera-saldana et al. (1990) estudaram os efeitos da substituição do sorgo moído pela cevada moída para vacas em lactação sobre ingestão e digestibilidade da matéria seca e orgânica da dieta e sobre a síntese de proteína microbiana. Não foram verificadas diferenças na ingestão de matéria seca entre tratamentos. As dietas que contiveram cevada apresentaram maiores

digestibilidades ruminais das matérias seca e orgânica e do amido que aquelas com sorgo, com maior produção de proteína microbiana. Entretanto, apesar dos menores valores de pH médios (5,65) para dietas a base de cevada em relação às de sorgo (5,95), não houve diferenças nas digestibilidades ruminais da FDN e FDA da dietas, embora tenderam ser maiores nas dietas a base de cevada.

2.1.4. Degradação do amido no rúmen

Durante a fermentação ruminal, a população de microrganismos, principalmente bactérias, fermenta os carboidratos e produz energia, gases (metano e dióxido de carbono), calor e ácidos graxos voláteis. Embora protozoários e fungos participem do processo digestivo ruminal, a maior parte da fermentação é realizada por bactérias. Um passo inicial chave na digestão é o contato bacteriano com o substrato. Aproximadamente três quartos da digestão da fibra, proteína e do amido é realizada por bactérias ligadas a partículas de alimentação (McAllister et al. 1994). Kotarski et al. (1992) identificaram 15 cepas de bactérias amilolíticas e caracterizaram oito amilases produzidas por essas bactérias. Algumas destas bactérias aderem e colonizam partículas de grãos no rúmen e produzem endo e exo enzimas que hidrolisam as ligações α -1-4 e α -1-6 de amilose e amilopectina. No entanto, nem todas as bactérias possuem conjunto completo de enzimas digestivas, portanto a digestão máxima de amido até monossacarídeos requer integração entre espécies bacterianas. Co-culturas de *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteriodes ruminicola* e *Selenomonas ruminatium* demonstraram a importância da alimentação cruzada entre espécies bacterianas em alcançar maior crescimento bacteriano e a completa digestão do amido (Cotta, 1992). Existe grande diversidade de amilases produzidas pelos microrganismos do rúmen. Formação de complexa associação microbiana frequentemente é observada na superfície do grânulo de amido. Este consórcio microbiano pode produzir grande quantidade de enzimas necessárias para superar barreiras digestivas adicionais que existam na superfície dos grânulos de amido, tais como lipídeos e proteínas.

Embora exista grande quantidade de informações sobre enzimas envolvidas na digestão da parede celular das plantas no rúmen, poucos estudos examinaram a natureza das amilases ruminais. A maioria dos estudos trabalhou com alfa-amilase de *S. bovis*, com apenas um único relato de alfa-amilase de *B. fibrisolvens*. Estudos para isolar e identificar amilases capazes de hidrolisar as ligações α -(1-6) da amilopectina não foram realizados, mas uma vez que os grânulos de amido livres são rapidamente hidrolisados no fluido ruminal (Cone, 1991), tais amilases presumivelmente não representam um passo limitante na degradação de amido no rúmen.

Os protozoários podem contribuir de 40% a 50% da biomassa e da atividade enzimática total do rúmen (Orpin e Joblin, 1997). Possuem papel importante na digestibilidade de amido, atuando por meio da ingestão de grânulos de amido e posterior digestão (com ou sem bactérias em anexo). Apresentam atividade de degradação dos

componentes fibrosos dos alimentos, mas utilizam os carboidratos não fibrosos da dieta com maior eficiência. Mendonza et al. (1995) demonstraram que os protozoários apresentam atividade amilolítica semelhante a de bactérias *in vitro*. São capazes de engolfar facilmente grânulos de amido em suspensão no conteúdo ruminal, sendo responsáveis por até 45% da atividade amilolítica do rúmen.

Algumas espécies de fungos ruminais, como *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces joyonii*, *Neocallimastix particiarum* e *Piromyces communis*, são capazes de colonizar e degradar amido (Orpin e Joblin, 1997). No entanto a maior atividade desses microrganismos é a digestão dos carboidratos fibrosos da dieta, sendo capazes de produzir endoglucanases, xilanases e β -glucosidases de alta atividade (Hodrová et al. 1998). As hifas de fungos também podem ter papel importante na fixação de bactérias, criando lesões na superfície do tecido da planta (McAllister et al. 1994).

Grãos inteiros com pericarpo intacto são em grande parte ou totalmente resistentes à digestão pelos ruminantes porque dificultam a fixação bacteriana (McAllister et al. 1994; Beauchemin et al. 1994). Portanto, o grão é processado pela aplicação de várias combinações de calor, umidade, tempo e ação mecânica. Estes processamentos aumentam a digestibilidade do amido, fornecendo oportunidade para a fixação bacteriana aos grânulos. Rooney e Pflugfelder (1986) descreveram as mudanças químicas e físicas que os métodos mais populares de processamento de grão provocam, por exemplo; a gelatinização, a retrogradação, e dextrinização do amido de cereais. Os ruminantes naturalmente "processam" amido pela mastigação, quebrando assim o pericarpo.

Taxa e extensão da digestão do amido no rúmen são determinadas por interrelações complexas entre vários fatores, incluindo fonte de amido, composição da dieta, quantidade de alimentos consumida por unidade de tempo, alterações mecânicas (processamento de grãos, mastigação), alterações químicas (grau de hidratação, gelatinização) e do grau de adaptação da microbiota ruminal à dieta. Três abordagens para controlar a taxa e extensão da digestão de amido que têm recebido a maior atenção são: o manejo do consumo da dieta, processamento de grãos e aditivos alimentares. Owens e Goetsch (1986) apresentaram uma revisão abrangente dos efeitos dessas abordagens sobre as principais variáveis de cinética ruminal, tais como: diferenças de líquido ruminal e características de partículas alimentares, as propriedades químicas do líquido ruminal (pH, osmolaridade) taxas de passagem de líquido, a taxa de digestão de partículas alimentares, taxa de passagem (escape ruminal), a taxa de diluição do meio ruminal, e escape de proteína microbiana (proteína microbiana). Em geral a taxa de degradação das partículas do alimento no rúmen é diretamente proporcional à extensão de degradação, e o aumento da taxa de passagem é diretamente proporcional ao aumento do consumo. Por isso, alteração do consumo por técnicas de manejo ou por aditivos como ionóforos podem afetar a quantidade de amido que será digerida no rúmen.

Estudos de produção com grãos processados indicam, decisivamente, que o amido é melhor utilizado quando é extensivamente fermentado no rúmen. Segundo Huntington

(1997), em vacas em lactação, 28% do fornecimento total de glicose vêm da glicose absorvida, 67% a partir de ácidos orgânicos da fermentação do amido no rúmen, e 5% de outras fontes tais como aminoácidos. No mesmo estudo, constatou-se que a quantidade de glicose utilizada pelos tecidos viscerais nos ruminantes é igual ou ligeiramente maior do que a quantidade de glicose absorvida no intestino delgado. Entretanto, na fermentação ruminal de amido, há perdas energéticas via metano e calor. Owens et al. 1986 ponderaram desvantagens da digestibilidade ruminal, pontuando que a digestão intestinal do amido seria energeticamente 42% mais eficiente que a digestão ruminal. É importante destacar, que qualquer melhoria energética metabólica atribuível à absorção de glicose deve considerar potenciais perdas de energia relacionadas à fermentação do amido no ceco, intestino grosso e cólon, e não no rúmen (Huntington, 1997).

2.1.5. Digestibilidade intestinal de amido

A digestão enzimática do amido no intestino delgado dos ruminantes é semelhante à que ocorre com outras espécies monogástricas. O pâncreas secreta α -amilase que hidrolisa amilose e amilopectina em dextrinas (principalmente a partir da hidrólise de oligossacarídeos de amilopectina) e oligossacarídeos lineares de dois a três unidades de glicose (Gray, 1992; Harmon, 1993). A amilase chega ao lúmen intestinal via ducto pancreático. O processo é completado por oligosacaridasas de superfície que estão localizadas na membrana das microvilosidades intestinais. A maltase e a isomaltase são dissacaridasas produzidas pela mucosa intestinal e apresentam maior atividade no jejuno e íleo em relação ao duodeno (Harmon, 1993). A maltase digere as moléculas de maltose secretadas do amido, e a isomaltase hidrolisa as ligações α -(1-6) encontradas nos pontos de ramificação da amilopectina, secretando moléculas de glicose livres. As duas principais rotas para a transferência de glicose a partir do lúmen para a corrente sanguínea são o transporte ativo e a difusão paracelular com a absorção de água (Huntington, 1997). O amido que escapa da digestão enzimática no intestino delgado pode ainda ser fermentado até ácidos graxos voláteis no intestino grosso pelos microrganismos anaeróbicos, de forma semelhante a fermentação ruminal, ou ser eliminado pelas fezes.

O uso da alimentação de dietas ricas em grãos despertou o interesse em determinar a capacidade dos ruminantes em digerir o amido no intestino, porque a absorção e metabolismo de glicose parecem ser mais eficientes energeticamente do que a fermentação e absorção dos ácidos graxos voláteis (Owens et al., 1986). Harmon (1993) concluiu em sua revisão que a secreção e produção de enzimas digestivas de amido no intestino respondem mais para a quantidade de energia consumida pelo animal do que para a quantidade de amido dietético. Croom et al. (1992) concluíram que em virtude de serem fermentadores pré-gástricos, os ruminantes têm fluxo relativamente constante de digesta para o duodeno, o que impede a função de uma parte do controle neuro-endócrino para secreção pancreática observada em outras espécies. Em média, 5 a 20% de amido

consumido é digerido após o rúmen, e a maioria desta digestão é feita no intestino delgado (Streeter et al. 1989; Hill et al. 1991; Zinn, 1991). Em sua revisão, Harmon (1992) relatou que digestibilidade intestinal de amido em novilhos ou novilhas (220-395 kg PV) variou de 17,3 a 84,9% (122 a 636g/d) do amido que atingiu o duodeno. Entretanto há exceções. No ensaio de McCarthy et al. (1989), os pesquisadores relataram altas taxas de passagem de grão de milho do rúmen e foi observado que mais de 4 Kg de amido diário foi potencialmente digerido em ambientes pós ruminais. Kreikemeier et al. (1991) infundiram amido de milho no abomaso de novilhos e registraram uma diminuição no desaparecimento de 86% para 55% quando a quantidade de amido infundido aumentou de 480 para 1440 g/d. Owens et al. (1986) encontraram intervalo semelhante em sua revisão da literatura (88% a 45% em digestibilidade do amido de milho ou sorgo no intestino do gado). A regressão linear obtida através de seus dados indicou que 55% do amido de milho que entra no intestino delgado desaparecem. Estes estudos confirmam trabalhos anteriores que identificaram a falta de atividade adequada de amilase pancreática como a principal razão da não digestão de 100% do amido no intestino delgado; e também que a secreção de amilase pancreática continuou a aumentar com um aumento no consumo de energia.

2.2. Enzimas exógenas na dieta de ruminantes

As enzimas são moléculas proteicas que catalisam reações químicas específicas. Várias enzimas têm sido estudadas para uso como aditivos para melhorar o desempenho animal. São catalisadores biológicos produzidos por células vivas para atuar em reações bioquímicas específicas que ocorrem naturalmente. No contexto de aditivos alimentares para ruminantes, as enzimas são utilizadas para catalisar as reações de degradação através da qual os substratos, neste caso alimentos, são digeridos nos seus componentes químicos (por exemplo, os açúcares simples, aminoácidos e ácidos graxos). Estes são por sua vez utilizados para o crescimento das células, quer seja por microrganismos do rúmen ou pelo animal hospedeiro (McAllister et al. 2001). A aplicação bem sucedida de enzima exógena como aditivo dietético foi obtida primeiramente com os animais monogástricos e é prática corrente em nutrição de aves e suínos (Bedford e Schulze, 1998). No entanto, a fermentação microbiana no rúmen fez o uso da tecnologia das enzimas alimentares mais desafiadora em ruminantes.

Os aditivos enzimáticos são produzidos por um processo de fermentação em série, começando com a cultura inicial em meio de crescimento (geralmente contém nitrogênio, hidratos de carbono, minerais, e agentes ativos de superfície). Fermentações industriais costumam levar de três a sete dias, dependendo do microrganismo e condições para o crescimento (Cowan, 1994). Depois da fermentação completa, as enzimas são separadas dos resíduos de fermentação e da fonte microbiana. Os tipos e atividade de enzimas produzidas podem variar amplamente, dependendo da estirpe selecionada e das condições de substrato de crescimento e de cultura utilizadas para a produção da enzima (Considine e

Coughlan, 1989; Gashe 1992; Lee et al. 1998). Produtos enzimáticos são relativamente concentrados e purificados, e contêm atividade específica (Beauchemin et al. 2002).

Para a ação eficiente da enzima, o contato com o substrato é essencial. Morgavi et al. (2000) realizaram estudos com adição das enzimas diretamente no alimento e verificaram maior estabilidade enzimática graças à formação do complexo enzima-substrato, que dificultou a ação das proteases microbianas do rúmen. A formação deste complexo também aumenta seu tempo de permanência no ambiente ruminal por não estar dissolvida no fluido. Quando não há formação do complexo enzima-substrato estável, as enzimas se solubilizam no líquido ruminal e fluem rapidamente para o intestino (Beauchemin et al. 2003).

Atualmente, não é possível prever a eficácia dos aditivos enzimáticos alimentares comerciais para ruminantes com base nas atividades enzimáticas fornecidas pelo fabricante. Essa incapacidade é devido à falta de compreensão das atividades específicas das enzimas necessárias para melhorar a digestibilidade dos alimentos. Além disso, não há padronização entre os fabricantes em termos dos métodos utilizados para determinar a atividade das enzimas (Colombatto e Beauchemin, 2003). As enzimas são analisadas com base na liberação de produtos de hidrólise em substratos padrões em condições ótimas para a enzima (Wood e Bhat, 1988). No entanto, as condições ideais para a atividade das enzimas geralmente são diferentes das encontrados no rúmen (Kung et al. 2002). Por exemplo; 50°C e pH 4,8-5,3 são recomendados para celulasas de *Trichoderma spp.* (Ghose, 1987; Wood e Bhat, 1988), enquanto que a temperatura no interior do rúmen é de aproximadamente de 39°C e o pH varia tipicamente entre 5,8 e 6,8. Para aplicações em ruminantes, o pH e a temperatura nos ensaios para medir a atividade devem assemelhar-se as condições encontradas no animal (Colombatto e Beauchemin, 2003). Ademais, a atividade das enzimas são medidas em substratos modelo, que não representam a complexidade da dieta ingerida. Outro ponto controverso é que os ensaios de enzima são baseados na taxa inicial de reação com o substrato, que não diz respeito à persistência da enzima no ambiente ruminal.

A realização de estudos de alimentação animal usando novilhos ou vacas leiteiras no início da lactação é a melhor avaliação para determinar se um produto enzimático é capaz de melhorar a utilização dos alimentos. No entanto, a realização de experimentos com bovinos para determinar a digestibilidade e desempenho é dispendiosa. Bioensaios laboratoriais que fornecem informação sobre a taxa, em vez da extensão de digestão, são úteis na identificação de produtos enzimáticos que são susceptíveis de serem eficazes *in vivo* (Colombatto e Beauchemin, 2003).

2.2.1 Amilases exógenas na dieta dos ruminantes

As amilases podem ser divididas em três grupos de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam: as α -amilases, que rompem as ligações no interior do substrato, as β -

amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato, e as glicoamilases, que liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato (Moraes, 2004). Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada delas é necessária para a completa hidrólise desse carboidrato.

Pandey et al. (2005) definiram α -amilase como a enzima que cliva as ligações α -1-4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união α -1-4. O ataque da α -amilase ao substrato ocorre de forma não seletiva sobre os vários pontos da cadeia simultaneamente e os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Durante a hidrólise do amido, a α -amilase cliva aleatoriamente o polímero do amido em oligossacarídeos de baixo peso molecular. Eventualmente produz unidades de maltotriose e maltose a partir da amilose e dextrina limite; e glicose e maltose a partir da amilopectina.

Os primeiros estudos que utilizaram alfa amilase como principal componente de enzima foram realizados com alfa amilase extraída do *Bacillus licheniformis* ou glicoamilase proveniente do *Aspergillus niger* (Rojo et al. 2001; Mora et al. 2002; Buendia et al. 2003; Gutierrez et al. 2005; Rojo et al. 2005; Crosby et al., 2006; Rojo et al. 2007), cujo objetivo foi aumentar a digestibilidade de dietas baseadas em sorgo e milho.

O desaparecimento *in vitro* de amido foi maior em milho e sorgo com adição de 400ml de amilase proveniente do *Bacillus licheniformis* (Rojo et al. 2001). Da mesma forma, alfa amilase proveniente de *Bacillus licheniformis* e glicoamilase de *Aspergillus niger* aumentaram o desaparecimento de amido *in situ* (Gutierrez et al. 2005) e *in vitro* (Rojo et al. 2007). Entretanto, efeitos mínimos ou nenhum benefício foram relatados *in vivo*. Mora et al. (2002) observaram aumento na digestibilidade ruminal de amido, enquanto a ingestão de matéria seca e ganho de peso diário não diferiram entre cordeiros alimentados com dietas baseadas em sorgo com e sem adição de amilase exógena de *Bacillus licheniformis* e glicoamilase de *Aspergillus niger*. De maneira semelhante, Crosby et al. (2006) não relataram diferenças para ganho de peso diário, conversão alimentar e digestibilidade de amido *in vivo* em ovelhas, apesar de terem observado melhor digestibilidade de matéria seca. Buendia et al. (2003) não relataram melhoras no ganho de peso diário de cordeiros em dietas baseadas em sorgo com adição de glicoamilase proveniente de *Aspergillus niger*, contudo, foi relatado redução no consumo de matéria seca e consequentemente aumento na eficiência alimentar.

Rojo et al. (2005) realizaram dois estudos para avaliar a fermentação ruminal e digestão de amido, bem como o desempenho de cordeiros com dietas à base de sorgo. No primeiro ensaio os autores utilizaram concentrações diferentes (0; 1,45 ou 2,90 g de enzima por kg de MS de sorgo) de alfa-amilase de *Bacillus licheniformis*. Foi relatado resposta linear ($P < 0,05$), com menor consumo de matéria seca e orgânica e aumento na digestibilidade total e ruminal de amido ($P < 0,05$). No segundo ensaio os autores avaliaram de forma semelhante ao primeiro a adição de glicoamilase proveniente de *Aspergillus*

niger. Contudo não foram observados benefícios com a adição de glicoamilase. Em ambos os estudos não foram relatados diferenças em ganho de peso diário ou conversão alimentar.

Um aditivo comercial feito da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e extrato de *Aspergillus oryzae* foi avaliado em vacas em lactação (Tricarico et al. 2005; Harrison e Tricarico, 2007), vacas de transição (DeFrain et al. 2005), bezerros (Heinrichs et al. 2007) e novilhos de corte (Tricarico et al. 2007).

Apesar dos dados *in vitro* sugerirem melhora na digestão microbiana (Tricarico et al. 2008), experimentos *in vivo* com α -amilase resultaram em respostas variáveis no desempenho animal e na digestibilidade. A inclusão de α -amilase em TMR demonstrou aumentar a produção de leite em vacas em lactação (Tricarico et al. 2005; Harrison e Tricarico, 2007; Klingerman et al. 2009). O aumento concomitante na ingestão de matéria seca foi encontrado no estudo de (Klingerman et al. 2009), mas não nos outros (Tricarico et al. 2005; Harrison e Tricarico, 2007).

DeFrain et al. (2005) constataram que α -amilase exógena melhorou o balanço energético em vacas de transição, mas não alterou a digestibilidade ruminal. Os benefícios para o desempenho das vacas foram mínimos. Entretanto, houve aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β hidroxibutirato no pré parto e tendência de aumento de glicose plasmática no pós parto.

Heinrichs et al. (2007), em dois estudos com bezerros Holandês, trabalharam com adição de amilase exógena na dieta inicial. Os pesquisadores não relataram diferenças para crescimento e consumo de grãos ou melhora em saúde quando os animais receberam amilase exógena. No entanto, houve aumento no desenvolvimento de epitélio ruminal quando a enzima foi adicionada, com potencial benefício para sistemas de desmame precoce.

Três ensaios foram conduzidos por Tricarico et al. (2007) para avaliar a adição de amilase exógena no desempenho de bovinos de corte. No primeiro ensaio, utilizando 162 novilhos, os autores compararam feno de alfafa e caroço de algodão como fonte de fibra em dietas com ou sem adição de amilase, e relataram maior ingestão de matéria seca e maior ganho de peso diário para o tratamento com amilase quando foi utilizado caroço de algodão. Mas as melhoras não ocorreram com feno de alfafa. No segundo ensaio 96 novilhos foram avaliados com uso de dois diferentes processamentos de milho (Milho grão úmido e milho moído) e três concentrações de amilase (0; 580 ou 1160 unidades de dextrinização de enzima por kg/MS de TMR). A adição de amilase aumentou o consumo de matéria seca e ganho de peso diário nos dois processamentos de milho. Contudo, foi relatado efeito quadrático para concentração de amilase. No terceiro ensaio, 64 animais foram avaliados em sistema programado de ganho de peso (restrição alimentar) e não foram observados benefícios no ganho de peso diário ou na conversão alimentar. Segundo os pesquisadores, a melhora no desempenho parece estar principalmente relacionada ao aumento de consumo de matéria seca por efeito no processo de digestão ruminal, sem necessariamente aumentar o desaparecimento de amido no rúmen. No entanto, em outro

estudo com novilhos confinados alimentados com dietas contendo milho moído ou floculado, não houve efeito da α -amilase suplementada sobre o desempenho dos animais ou na digestibilidade da fibra (DiLorenzo et al., 2010). A não interação entre suplementação de amilase e processamento de grãos sugere que não houve aumento da digestibilidade ruminal de amido nestes estudos e a hipótese inicial de que a adição de amilase seria mais eficiente em dietas que contem amido menos disponível (milho moído versus grão úmido) poderia estar incorreta. As razões para a amilase não ser eficiente em dietas com feno de alfafa são desconhecidas (Tricarico et al. 2008).

Em estudo de grande extensão com 45 rebanhos leiteiros (aproximadamente 8150 vacas) em nove estados dos EUA, Harrison e Tricarico (2007), utilizaram amilase exógena adicionada em TMR e observaram tendência de aumento de produção de leite e proteína. Em geral, a produção de leite tendeu a aumentar ($P = 0,059$) em 0,34 kg/d por vaca, e 56% dos rebanhos responderam positivamente com o uso do aditivo. A produção de proteína do leite também tendeu a ser maior (0,01 kg/d, $P = 0,062$) para dietas com alfa-amilase.

Tricarico et al. (2005), trabalharam com 24 vacas em lactação da raça Holandês entre as quais quatro fistuladas no rúmen. Os animais foram distribuídos em quadrado latino 4X4 para avaliar tratamentos com diferentes concentrações da enzima (0; 240; 480 e 720 DU/Kg de TMR). A suplementação com alfa-amilase aumentou a produção de leite ($P=0,02$), gordura ($P= 0,02$) e proteína ($P= 0,06$) de maneira quadrática. A maior produção de leite foi obtida com 240 DU/Kg de TMR. A amilase reduziu a proporção molar de propionato e aumentou a proporção de acetato e butirato. O desaparecimento de amido ruminal *in situ* não foi alterado pela enzima. O aditivo também aumentou a concentração plasmática de β -hidroxibutirato e de ácidos graxos não esterificados. Os autores atribuíram o melhor desempenho aos efeitos da alfa-amilase na fermentação ruminal que provocou possíveis mudanças no metabolismo dos nutrientes.

Klingerman et al. (2009) em ensaio com 28 animais em lactação da raça Holandês e dietas com 26% de amido, avaliaram duas enzimas com atividade amilolítica: 7B - amilase experimental em forma líquida e AMA - proveniente da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e de extrato de *Aspergillus oryzae* em doses alta e baixa. Houve aumento da produção de leite, leite corrigido para gordura e digestibilidade aparente total da matéria seca e orgânica sem alteração no consumo de matéria seca para o grupo que recebeu a dieta 7B em baixa dose. Os animais do tratamento AMA tiveram maior consumo de matéria seca e aumento na produção de leite corrigido para gordura.

Estudo com vacas leiteiras demonstrou melhorias da adição de amilase na eficiência alimentar de vacas em lactação em dieta com amido reduzido (21% na MS) comparado à dieta de amido reduzido sem a adição de amilase quando grão de milho havia sido parcialmente substituído por casquinha de soja (Gencoglu et al., 2010). Houve aumento na digestibilidade de MS, MO, FDN, e PB para vacas alimentados com a dieta reduzida em amido com amilase exógena em relação à dieta de amido normal sem amilase (27% na MS) e a dieta controle de amido reduzido sem amilase (22% na MS). Os autores

concluíram que as melhores conversões alimentares das dietas com amido reduzido associadas à amilase exógena podem melhorar o desempenho econômico dependendo do custo do aditivo.

Em estudo semelhante, Ferraretto et al. (2011), trabalharam com dieta de amido normal (27% na MS) e com dieta de amido reduzido (22% na MS) em que o grão de milho e farelo de soja foram substituídos parcialmente por farelo de trigo e caroço de algodão. A dieta de baixo amido foi fornecida com e sem amilase. Foi observado que as vacas alimentadas em dieta de baixo amido com adição de amilase reduziram a produção de leite em comparação com as vacas alimentadas com a dieta normal (27% na MS) de amido. A eficiência alimentar (Kg de leite/ Kg de MS consumida) foi 6% maior para a dieta com baixo amido e amilase exógena comparada a de mesmo teor de amido sem amilase. Os autores concluíram que a adição de amilase gerou benefício mínimo no estudo.

Weiss et al. (2011), trabalharam com 48 vacas da raça Holandês avaliando dietas de amido reduzido (26% na MS) pela substituição de milho moído grossamente (média de tamanho de partícula, 1,42 mm) por silagem de milho com e sem amilase exógena e dietas de maior inclusão de amido (31% na MS) sem adição de amilase. Não foi encontrado diferenças com o uso de adição de amilase exógena no desempenho dos animais. Contudo, coerente com o estudo de Gencolgu et al. (2010), houve aumento da digestibilidade total de FDN.

Nozière e Morgavi (2012) avaliaram o efeito da amilase exógena (proveniente de *Bacillus licheniformis* DSM 21564) na digestibilidade de dietas de baixo e alto teor de amido (20% vs 30% na MS) em vacas de leite. Os efeitos do aditivo foram observados apenas na digestibilidade ruminal e não na digestibilidade total. A enzima aumentou a digestibilidade ruminal ($P < 0,01$) da matéria orgânica e a digestibilidade ruminal do amido aumentou de 75% do grupo controle para 81% com adição da enzima, mas a diferença foi compensada em ambiente pós ruminal. A enzima reduziu a proporção de acetato e de butirato e induziu aumento de propionato. Entretanto, não houve diferença no consumo de matéria seca, produção de leite, digestibilidade de fibra e de matéria seca.

Trabalhos com mistura de enzimas (amilase, xilanase, celulase e protease) indicaram aumento de produção de leite, devido ao aumento da ingestão de matéria seca (IMS), MO e FDN (Gado et al., 2009). Os autores justificaram o efeito positivo da enzima pelo aumento da fermentação ruminal e a síntese de proteína microbiana. Outros pesquisadores notaram efeito positivo da mistura de enzimas contendo predominantemente amilase na digestibilidade da MS e MO, sem aumento acompanhado na digestibilidade do amido (Tricarico et al., 2007).

A digestibilidade total do amido da maioria dos grãos de cereais varia de 70 a 100%. No grão de milho varia de 85% (milho moído) a 98,8% (milho grão úmido) (Firkins et al., 2001). Portanto, não seria surpresa que a amilase exógena tivesse pequeno efeito na digestibilidade total de amido. De fato, a adição de amilase exógena nas dietas de amido reduzido não alterou a digestibilidade total do amido. Várias hipóteses foram levantadas:

1) a digestibilidade do amido não foi afetada no rúmen ou em sítio pós ruminal (Tricarico et al, 2005), 2) a digestibilidade do amido foi aumentada no rúmen (Klingerman et al. de 2009), mas houve digestão de amido pós ruminal compensatória resultando em digestibilidade total de amido semelhante (Taylor e Allen, 2005) e 3) a digestibilidade do amido foi aumentada no rúmen, mas a fermentação no intestino grosso resultou em digestibilidade total de amido semelhante para os dois tratamentos (Firkins de 1997). Claramente, são necessárias mais pesquisas sobre o modo de ação em relação a efeitos da adição dietética de amilase exógena sobre a digestão de nutrientes.

2.2.2 Experimentos *in vitro* com adição de enzimas exógenas e interação microbiana ruminal

A avaliação da atividade amilolítica das bactérias digestoras de amido, e seus produtos de hidrólise, pode dar alguma ideia sobre o potencial modo de ação da amilase exógena no rúmen. As bactérias ruminais com a maior capacidade para a fermentação do amido são: *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*, seguido por *Prevotella ruminicola* e alguns *Butyrivibrio fibrisolvens* como as cepas 49 e A38 (Cotta, 1988). Estas bactérias produzem oligossacarídeos como resultado da degradação da amilose em laboratório. *Butyrivibrio fibrisolvens* 49, *Ruminobacter amylophilus* H18, *Streptococcus bovis* JB1 e *Prevotella ruminicola* 23 produzem principalmente maltose pela degradação da maltotetraose. *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 também produzem maltopentaose e maltohexaose, e *Prevotella ruminicola* B14 produz maltoheptaose. A exposição prolongada à enzima exógena reduziu a quantidade de moléculas maiores e simultaneamente aumentou os produtos de oligossacáridos menores a partir da hidrólise de amilose. Este padrão de hidrólise é consistente com as enzimas endógenas bacterianas para todas as bactérias estudadas, cuja atividade é semelhante a atividade da alfa amilase. Os genes que codificam a alfa amilase bacteriana já foram clonados a partir de *Streptococcus bovis* (Clark et al, 1992; Cotta e Whitehead, 1993) e *Butyrivibrio fibrisolvens* (Rumbak et al, 1991), proporcionando mais credibilidade para essa hipótese. Portanto, é provável que o amido no rúmen seja hidrolisado a uma variedade de produtos como glicose e maltoheptaose que poderiam ser utilizados como substratos de crescimento por grande variedade de microrganismos do rúmen.

Recentes estudos realizados por Tricarico et al. (2008) sugerem que suplementação de alfa amilase não aumenta necessariamente a digestão ruminal do amido, no entanto aumenta a hidrólise de oligossacáridos que podem ser utilizados por bactérias não amilolíticas. Uma série de experimentos foram realizados para avaliar os efeitos da suplementação de alfa amilase sobre o crescimento de bactérias ruminais em amido. Culturas puras de *Butyrivibrio fibrisolvens*, cepas: D1 , 49 e A38 , *Streptococcus bovis* S1, *Megasphaera elsdenii* T81 e *Selenomonas ruminantium* GA192 foram cultivadas anaerobicamente a 37°C em meio contendo amido solúvel de batata (1,0g/l) como única

fonte de carboidrato. O tratamento com enzima foi aplicado imediatamente antes da inoculação bacteriana por adição de 0,1 ml de solução para proporcionar concentração final de 0,06 DU/mL. As culturas controle receberam 0,1 ml de uma solução preparada com solúveis fermentativos (veículo enzimático). O crescimento microbiano foi estimado em cada cultura por aferição da densidade óptica a 600 nm ao longo do tempo. Cada experimento constou de duas ou três repetições por tratamento. Como esperado, *Streptococcus bovis* S1 e *Butyrivibrio fibrisolvens* 49 cresceram rapidamente em meio contendo amido e alfa amilase e a suplementação não teve nenhum efeito sobre o crescimento. O *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 cresceu igualmente bem em maltose e amido (Cotta, 1988) e cresceram mais lentamente na presença de alfa amilase complementar neste experimento. Por outro lado, *Butyrivibrio fibrisolvens* D1, *Selenomonas ruminantium* GA192 e *Megasphaera elsdenii* T81 só cresceram pouco ou nada em meio contendo amido. No entanto, estas espécies não amilolíticas cresceram rapidamente quando houve adição de amilase em meio contendo amido.

Cotta (1992) estudou diferentes estirpes de bactérias ruminais e observou interações de alimentação cruzada em ambientes com adição de amido solúvel de batata. Em culturas mistas de *B. fibrisolvens* e *S. ruminantium* houve maior crescimento de *S. ruminantium* e menor acúmulo de maltoligossacarídeos do que em monoculturas de *B. fibrisolvens*. Observou que culturas de *S. ruminantium*-*B.ruminicola* desenvolveram-se bem e não houve acúmulo de maltoligossacarídeos no meio. O autor demonstrou também que apesar da *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* crescerem pouco em amido, ambas puderam desenvolver rapidamente em maltodextrinas. De maneira similar, celodextrinas produzidas por bactérias celulolíticas foram utilizadas por espécies não celulolíticas (Russel, 1985) e xiloligossacarídeos provenientes da hidrólise das xilanas foram utilizadas por espécies não xilanolíticas (Cotta, 1993). Estas observações sugerem que os mecanismos de alimentação cruzada são característicos do ecossistema ruminal microbiano e os microrganismos que utilizam produtos da hidrólise de outras espécies contribuem para a fermentação ruminal (Van Soest, 1982).

Tricarico et al. (2008) propuseram que a amilase exógena altera essencialmente a fermentação por aumentar a liberação de produtos de hidrólise de amido tal como as maltodextrinas e oligossacarídeos. Acredita-se que o efeito de α -amilase na fermentação ruminal é causado por estes produtos da hidrólise que oferecem substratos para organismos não-amilolíticos, modificando assim populações bacterianas e produção de AGV. Esta cooperação entre microrganismos pode favorecer a microbiota digestora de fibra e por sua vez explicar os achados literários de aumento na digestibilidade aparente de FDN.

2.3 Seletividade de Partículas

Apesar do fornecimento da alimentação como mistura em dieta completa, os animais selecionam os componentes mais palatáveis da dieta total (TMR) (Leonardi e Armentano,

2003; DeVries et al, 2007), fazendo com que as vacas não consumam a dieta previamente equilibrada. Estudo recente com vacas em lactação demonstrou maior intensidade de seleção contra partículas maiores de forragem e seleção a favor de partículas pequenas provenientes do concentrado quando oferecido dieta de baixa forragem (DeVries et al., 2007). Para vacas em início de lactação, que normalmente recebem dietas com baixa fibra, este comportamento de seleção juntamente com o rápido aumento no consumo de matéria seca nas semanas posteriores ao parto (Kertz et al., 1991) podem exacerbar o consumo de partículas menores e a recusa de partículas longas e fisicamente efetivas. O resultado é o aumento da produção de AGVs e a redução da capacidade tamponante no rumen (Cook et al., 2004; Stone, 2004). Portanto, esta seleção indesejável da dieta pode contribuir significativamente para o rápido aumento na severidade e ocorrência de acidose ruminal, que tem sido observado em vacas no início de lactação (Penner et al., 2007).

Entretanto, tem-se sugerido que, quando dada a oportunidade, os ruminantes podem selecionar a dieta para ajudar a promover um ambiente ruminal saudável (Cooper et al., 1996). Atualmente, as dietas equilibradas para alta produtividade de leite induzem a um alto desafio ruminal, e podem provocar episódios de acidose ruminal subaguda, que é caracterizada por repetidos momentos de pH ruminal entre 5,2 e 5,6 (Cooper e Klopfenstein, 1996). Os efeitos da acidose subaguda são vastos e diversos; variando de decréscimo no consumo de matéria seca (Britton e Stock, 1987; Nocek, 1997), redução da eficiência alimentar (Huntington, 1993; Nocek, 1997) até redução da produção de gordura do leite (Nocek, 1997) e contribuição para laminite (Nocek, 1997; NRC, 2001).

Há crescentes evidências de vacas leiteiras que selecionaram alimentos com alta capacidade de tamponamento ruminal em uma tentativa de atenuar os efeitos do baixo pH ruminal. Keunen et al. (2002) demonstraram que vacas em lactação com acidose ruminal subaguda induzida aumentaram a preferência por feno de alfafa a alfafa peletizada. Além disso, tem-se demonstrado que as vacas com baixo pH ruminal selecionaram em favor de partículas longas provenientes de forragem (Beauchemin e Yang, 2005; Yang e Beauchemin, 2006), possivelmente como tentativa de satisfazer as necessidades de fibra fisicamente efetiva. Infelizmente, até o momento, não há nenhuma evidência para sugerir em que intensidade as vacas em lactação podem selecionar a dieta para atenuar a acidose e até que ponto ela pode ser influenciada pela gravidade da condição desta.

3. Material e métodos

3.1. Local, período e fatores climáticos

O experimento foi realizado no *Better nature research center*, em Ijaci, MG (832m altitude, 21:10:13 de latitude sul, 44:55:31 longitude oeste). A temperatura e umidade das instalações foi mensurada a cada 30min por termômetro digital (EasyLog®, Lascar Electronics Inc., Erie, EUA) para cálculo do Índice de Temperatura e Umidade (ITU). Os termômetros foram colocados no centro do galpão a três metros do piso. A fórmula de ITU utilizada foi a de Yousef (1985): $ITU = T + 0,36 \times DP + 41,2$. Quando: T é a temperatura expressa em graus Celsius e DP é a temperatura de orvalho (Dew Point), também expressa em graus Celsius. Os Índices de temperatura e umidade (ITU) no interior do galpão ao decorrer do dia encontram-se na figura 1.

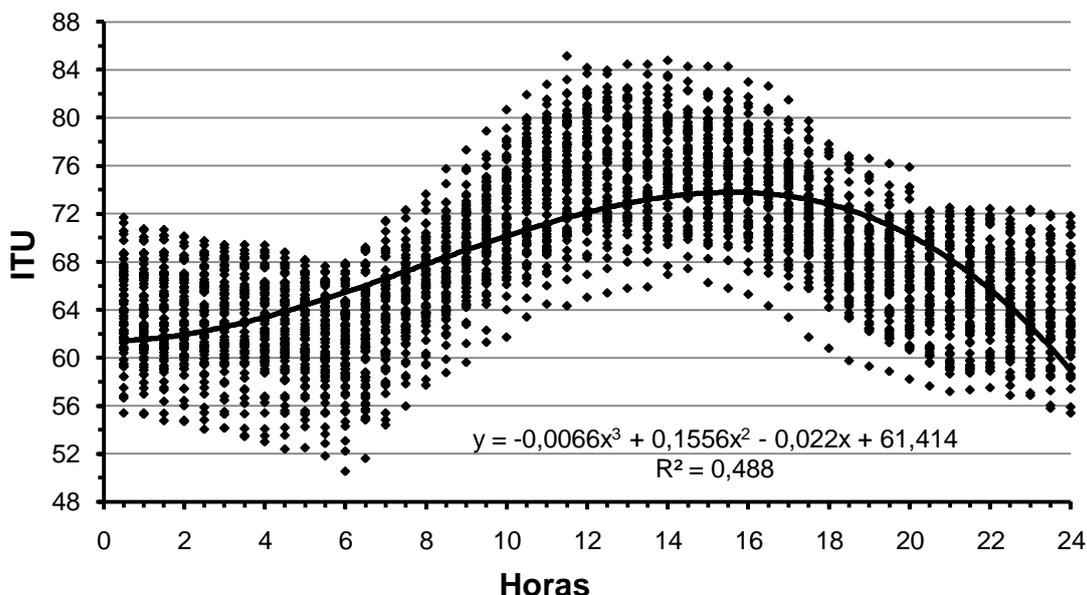


Figura 1: Índice de temperatura e umidade (ITU) no interior do galpão ao decorrer do dia

3.2. Animais e delineamento experimental

Vinte oito vacas Holandesas, 4 primíparas e 24 multíparas, com peso médio de 637 ± 54 Kg, produção média de $33,1 \pm 4,4$ Kg e 171 ± 80 dias em lactação (DEL) no início do experimento, receberam a mesma dieta durante um período de padronização de duas semanas. Nos dias 11 a 14 da padronização, o consumo de matéria seca (CMS), a produção de leite e de sólidos, o peso vivo e a condição corporal foram mensurados e utilizados como covariável no modelo de análise estatística. As vacas formaram blocos de

dois animais de acordo com a ordem de parto e produção de leite e foram aleatoriamente alocadas a um tratamento por 70 dias do período de comparação em delineamento de blocos ao acaso ajustado para covariável e com estrutura de medidas repetidas no tempo.

3.3. Dietas experimentais e Manejo dos animais

As dietas experimentais (Tabela 1) foram: Controle, sem adição da enzima e Enzima, com adição de amilase exógena (DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark). A enzima utilizada foi uma preparação de alfa-amilase produzida por uma estirpe geneticamente modificada do *Bacillus licheniformis* (DSM 21564).

As vacas foram alimentadas individualmente em confinamento total do tipo *tie stall* com camas de areia e foram ordenhadas três vezes por dia, as 5:00, 13:00 e 20:00h. A mistura e oferta dos ingredientes dietéticos foram realizados duas vezes ao dia para fornecimento da dieta total (TMR) às 6:00 e 14:00 h em quantidade suficiente para prover pelo menos 10% do oferecido como sobra diária. A proporção dietética das silagens foi ajustada semanalmente de acordo com variação no teor de MS, determinado por secagem por 60min em aparelho Koster (Koster Moisture Tester, Medina, EUA). A amilase exógena foi misturada manualmente ao milho grão reidratado e moído no momento do fornecimento da dieta. Posteriormente a mistura de milho e amilase foi adicionada para mistura em vagão de ração total com rosca vertical (Unimix 1200. Casale Equipamentos Ltda, São Carlos, SP) para atingir 0.5g de enzima por kg de matéria seca da dieta (300 KNU/kg de TMR MS). Uma unidade Kilo Novo (KNU) é a quantidade de enzima que libera, numa reação α -amylase/ α -glucosidase, 6 μ mol de p-nitrofenol por minuto a partir de 1,86 mM de etilideno-G7-pnitrophenyl-maltoheptaoside a pH 7,0 e 37 °C (Jung e Vogel, 2008).

Amostras dos ingredientes da dieta e das sobras alimentares foram coletadas diariamente e congeladas a -20°C. Ao final da semana foram formadas amostras compostas representativas da semana, por mistura de quantidades idênticas de matéria natural das amostras diárias. As amostras semanais foram posteriormente direcionadas ao laboratório, onde foram pré-secas em estufa ventilada a 55°C por 72 horas e trituradas em moinho do tipo Thomas-Willey em peneira com crivos de 1mm. No final do experimento foi feita uma amostra composta de todas as semanas de cada vaca proporcional ao consumo do animal em cada semana. Esta amostra foi destinada para as análises bromatológicas com objetivo de determinar a composição da dieta consumida. As amostras da semana referente à digestibilidade (semana 10) foram analisadas separadamente. Uma sub-amostra foi destinada para determinação do teor de matéria seca (MS), determinado por desidratação em estufa a 105°C por 24h. O extrato etéreo (EE) foi determinado segundo a AOAC (1990). A fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foi analisada por um analisador de fibra TE-149 (Tecnal Equipamentos Ltda, Piracicaba, SP) com inclusão de sulfito de sódio

e amilase. A proteína bruta (PB) foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1975). As cinzas foram determinadas por meio da incineração das amostras em mufla a 550°C por oito horas. O amido foi analisado por química úmida (Hall, 2009). Os carboidratos não fibrosos foram calculados pela fórmula: CNF= 100 – (PB+EE+Cinzas+FDN). Amostras do milho grão reidratado e moído foram enviadas para o *Soil Testing Laboratories* (Wisconsin, EUA) para análise de concentração de prolamina (Larson and Hoffman, 2008). O milho grão reidratado teve 2,17% e o milho moído 3,22% de prolamina em relação ao total de amido. A composição da dieta em nutrientes e ingredientes está exposta na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das consumidas em nutrientes de vacas suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

	Controle	Amilase
	% da MS	
Silagem de milho	39,4	39,4
Feno de Tifton	7,4	7,4
Silagem de milho grão reidratado	11,2	11,2
Milho finamente moído	11,7	11,7
Farelo de soja	16,8	16,8
Polpa de citros	11,1	11,1
Premix ¹	2,5	2,5
Proteína bruta (PB)	17,7	17,7
Fibra detergente neutro (FDN)	35,5	35,4
FDN oriunda de forragem	22,4	22,4
Extrato etéreo (EE)	4,5	4,3
Cinzas	6,1	6,2
Carboidratos não fibrosos (CNF)	36,2	36,4
Amido	32	32,2
	% da MN ²	
>19mm	6.7±1.8	6.7±1.9
8-19mm	23.9±4.5	23.7±4.0
<8mm	69.4±4.3	69.6±4.3
	% da MN	
Matéria seca	51,3	51,3

¹ Premix Mineral e Vitaminico – composição: Uréia 15,6%; Óxido de magnésio 10,9%; Bicarbonato de sódio 23,4%; Sal branco 6,3%; Vacciphós 156+ADE 12,5%; Calcário Calcítico 23,4%; Farinha de Algas 7,8%.

² Distribuição de partículas na Penn State Separator da dieta total.

3.4. Variáveis analisadas

Amostras de leite foram coletadas de seis ordenhas consecutivas nos dias 6 e 7 de cada semana experimental para determinação de teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais e nitrogênio uréico (NUL). As amostras foram coletadas em frascos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e foram analisadas no Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH, Curitiba, PR) por equipamento Bentley 2000 (Bentley 2000. Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). A secreção diária de energia no leite (EnLeite) foi calculada pela equação (NRC, 2001): $[(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ de proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{kg de leite}$. A produção de leite corrigida para energia foi: Leite E = EnLeite/0,70, assumindo que o conteúdo de energia em leite com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose é 0,70 Mcal/kg. As eficiências alimentares foram: Eficiência 1, pela relação entre a produção de leite e o CMS, e a Eficiência 2, pela relação entre Leite E e o CMS. O peso vivo foi mensurado a cada 7 dias após a ordenha da manhã e a condição corporal avaliada a cada 14 dias por três avaliadores independentes por observação visual em escala de 1 a 5, sendo 1 representativo de magra e 5 de gorda (Wildman et al., 1982).

No dia 59 foi avaliada a seletividade por partículas alimentares (Leonardi & Armentano, 2003). A distribuição de partículas das dietas ofertadas e das sobras por animal foram mensuradas pelo separador de partículas da Penn State (Lammers et al., 1996). Foram amostradas as dietas ofertadas às 6:00h e 14:00h e as sobras às 13:00h, 19:00h e 7:00h. O Consumo Predito em cada peneira do separador de partículas foi: % de retenção da dieta na peneira x quantidade consumida nos períodos (7:00-13:00; 14:00-19:00; 19:00-7:00; 14:00-7:00). O Consumo Observado foi: (% de retenção da dieta na peneira x quantidade oferecida) – (% de retenção da sobra na peneira x quantidade de sobras). O Índice de Seleção (IS) foi: $100 \times (\text{Consumo Observado}/\text{Consumo Predito})$. Valores de IS menores que 100% representam rejeição, maiores que 100% consumo preferencial, e iguais a 100% ausência de seleção.

As digestibilidades aparentes da MS, da matéria orgânica (MO), da FDN e da MO não-FDN no trato digestivo total foram determinadas por coleta total de fezes realizada por oito horas ininterruptas nos dias 67 a 69. A coleta de fezes foi iniciada com oito horas de atraso a cada novo dia, visando obter uma amostragem representativa das 24 horas do dia, sem causar distúrbio no CMS e na produção de leite. As fezes foram continuamente congeladas durante a coleta e uma amostra composta formada por vaca. Os compostos foram desidratados e os teores de FDN e cinzas mensurados como previamente descrito.

Simultaneamente à coleta de fezes, foi realizada coleta total de urina para mensuração da excreção diária de alantoína, para representar a síntese relativa de proteína microbiana no rúmen. Ao volume de urina coletado foi imediatamente adicionado 10% de

ácido sulfúrico a 20% e a amostra foi armazenada a 4°C. Uma amostra composta por vaca foi formada ao final da coleta. As amostras compostas foram diluídas com solução de ácido sulfúrico a 4% na proporção 1:3, urina:solução, e armazenadas a -20°C até mensuração do teor de alantoína (Chen & Gomes, 1992).

Simultaneamente à coleta total de fezes e urina, foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal a cada cinco minutos. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, ingestão de água, ruminação e ócio. O tempo de mastigação em min/d foi definido como a soma dos tempos de ingestão e de ruminação. Os tempos de ingestão, ruminação e mastigação por unidade de matéria seca consumida foram calculados utilizando o consumo de matéria seca dos dias que foram realizados a atividade mastigatória. O tempo da primeira refeição após o fornecimento matinal de alimentos (refeição condicionada) foi cronometrado. O número de refeições diárias e o CMS por refeição foram calculados.

Amostras para determinação de nitrogênio uréico plasmático foram coletadas no dia 70, imediatamente antes da primeira alimentação e nos respectivos tempos 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 horas após a primeira alimentação. Foram coletadas em tubos vacuolizados contendo EDTA e acondicionadas por refrigeração. Posteriormente foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos e o plasma congelado a -20°C para posterior determinação do nitrogênio uréico plasmático pelo kit de análise laboratorial (Uréia 500, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brasil). Neste mesmo dia foram coletadas amostras de sangue para determinação da glicose plasmática as 6 e 12 horas após a primeira alimentação em tubos vacuolizados contendo fluoreto de sódio + EDTA e acondicionados por refrigeração. Posteriormente foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos e o plasma congelado a -20 para posterior análise pelo kit laboratorial (Glicose Enzimática Líquida, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brasil).

No dia 71, foram obtidas amostras de fluido ruminal através de sonda flexível oro-gástrica com auxílio de uma bomba de sucção a vácuo acoplada a um Kitassato. As amostras foram obtidas 12,3±0,8h após a alimentação matinal, ao acaso dentro de blocos. O pH ruminal foi mensurado imediatamente. O fluido ruminal teve a fermentação inibida por congelamento imediato em nitrogênio líquido a -196°C e foi armazenada a -20°C para posteriores análises. As concentrações dos AGVs foram determinadas após a centrifugação do líquido ruminal em centrífuga Sorvall RC-5B- Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments ®) a 5000 r.p.m por 10 minutos e 10°C através de cromatografia gasosa em cromatógrafo de fase gasosa marca Shimadzu ® modelo GC – 17^a com autoinjeter Shimadzu ® CBM -101, acoplado a um microcomputador com software class-GC 10 versão 1,61. Os AGVs foram separados por uma coluna Nukol TM capilar de sílica fundida (10 m x 0,25 mm x 0,25 mm Film Thickness Supelco, INC., Bellefonte, PA).

3.5. Análise Estatística

As variáveis mensuradas ao longo do tempo foram analisadas como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do SAS (Littel et al., 1996). A estrutura de covariância utilizada foi definida pelo critério de informação de Akaike, entre auto regressiva de ordem 1, simetria composta e não estruturada. Para variáveis mensuradas ao longo do tempo o modelo foi: $\mu + CV$ (Covariável efeito contínuo da mesma variável medido no final do período de padronização) + bloco (1 a 14) + Tratamento (Controle, Rumistar) + erro 1 (vaca dentro do tratamento) + tempo (dia, semana ou quinzena) + Tratamento x dia + erro. As variáveis com valor único durante o período experimental foram analisadas por modelo similar, mas sem os efeitos de covariável, tempo e sua interação com tratamentos. A glicose do plasma da semana 10 foi ajustada para covariável. Valores de probabilidade abaixo de 0,05 foram considerados como significativos, e abaixo de 0,10 como tendência.

4. Resultados e Discussão

A composição das dietas oferecidas e dos nutrientes consumidos está presente na tabela 1. As dietas oferecidas foram idênticas em nutrientes entre os tratamentos, pois o intuito do presente estudo foi elucidar os efeitos exclusivos da amilase exógena. Trata-se de uma dieta alta em amido (32% na MS), o que diverge da maioria dos trabalhos com amilase exógena, que propõe dietas de amido reduzido (21% na MS) com objetivo de maximizar seu uso em comparação a dietas com maior inclusão de amido (27% na MS). Entretanto, o amido da dieta no presente estudo é em grande parte proveniente de milho duro, com maior vitreosidade e maiores teores de prolamina. O milho grão reidratado teve 2,17% e o milho moído 3,22% de prolamina em relação ao total de amido, o percentual é considerado moderado. As menores concentrações de prolamina do milho reidratado indicam possível proteólise pela fermentação ocorrida durante o tempo de ensilagem.

O estudo da efetividade da enzima em milho duro é relevante, pois de acordo com Klingerman et al. (2009), em incubações por 6 horas em fluido ruminal na presença de amilase exógena em concentrações crescentes, foi observado efeito linear da amilase ($P < 0,01$) para variedades de milho dentada e duro, mas não para farináceo (vitreosidade = 0). Os resultados sugerem que a eficácia da amilase exógena pode variar dependendo da vitreosidade do milho, com maior potencial de uso para variedades com maior vitreosidade.

Os animais que receberam o tratamento com amilase exógena tiveram maior produção de leite diária com redução no consumo de matéria seca (Figura 2). O ganho em desempenho, com simultânea redução no consumo diário de matéria seca, evidenciou melhora na eficiência alimentar dos animais que receberam a enzima, e não houve interferência no peso e na condição corporal dos animais (Tabela 2).

Outros estudos de inclusão de α -amilase em dietas de amido normal (27% na MS) em TMR demonstraram aumentar a produção de leite em vacas em lactação (Tricarico et al, 2005; Harrison e Tricarico, 2007; Klिंगerman et al, 2009). O aumento concomitante no consumo de matéria seca foi encontrado no estudo de (Klिंगerman et al., 2009), mas não nos outros (Tricarico et al, 2005; Harrison e Tricarico, 2007).

A resposta na produção de leite e de CMS foi consistente ao longo do período experimental e não houve interação entre tratamento e tempo, evidenciando que a enzima não demandou tempo para adaptação bacteriana ou outro aspecto relacionado à possível alteração do ambiente ruminal pela microbiota (Figura 2).

TABELA 2: Desempenho e consumo de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

	Controle	Amilase	EPM ¹	Ptrat ²	Ptempo ²	Ptrat*tempo ²
CMS ³ , kg/d	20,7	19,7	0,16	<0,01	<0,01	0,88
Leite, kg/d	32,3	33,0	0,18	0,02	<0,01	0,91
LCE ⁴ , kg/d	31,0	31,5	0,24	0,26	<0,01	0,96
Gordura, kg/d	1,11	1,10	0,01	0,66	<0,01	0,97
Proteína, kg/d	1,01	1,02	0,01	0,35	<0,01	0,94
Lactose, kg/d	1,49	1,53	0,01	0,01	<0,01	0,93
Sólidos, kg/d	3,91	3,99	0,03	0,07	<0,01	0,95
Gordura, %	3,49	3,38	0,08	0,41	<0,01	0,43
Proteína, %	3,20	3,16	0,03	0,40	<0,01	0,86
Lactose, %	4,64	4,67	0,01	0,31	<0,01	0,19
Sólidos, %	12,26	12,19	0,07	0,59	<0,01	0,19
Peso vivo, kg	647	645	11,4	0,90	<0,01	0,17
ECC ⁵ , 1a 5	3,45	3,41	0,03	0,44	<0,01	0,12
NUL ⁶ , mg/dL	15,7	16,0	0,33	0,53	<0,01	0,50
Leite/CMS	1,58	1,70	0,012	<0,01	<0,01	0,91
LCE/CMS	1,52	1,63	0,013	<0,01	<0,01	0,93

¹Erro padrão das médias. ²P tratamento, Tempo e tratamento*Tempo. ³Consumo de matéria seca. ⁴Leite corrigido para energia. ⁵ Escore de condição corporal. ⁶ Nitrogenio ureico no leite.

O mecanismo de ação das amilases exógenas no potencial de aumentar a produção de leite ainda não está claro, Tricarico et al. (2007) postularam modo de ação para amilase; que sugere que a produção de oligossacarídeos da amilose e da amilopectina na baixa (mas não na alta) inclusão de amilase estimulou mecanismos de alimentação cruzada entre algumas bactérias ruminais, beneficiando inclusive bactérias não amilolíticas. O mecanismo citado pode ter beneficiado a fermentação ruminal e seria uma explicação plausível para o aumento da eficiência alimentar. O aumento da produção de leite pode também sugerir um possível direcionamento do sítio de digestão do amido, com possível incremento da digestibilidade de amido no rúmen e consequente benefício para a população microbiana. Isto foi confirmado em estudo de Nozière e Morgavi (2012), no qual a digestão de amido no rúmen foi aumentada (P <0,05) nas vacas canuladas no rúmen e no duodenal proximal. A queda no CMS pode estar relacionada com o aumento do

propionato ruminal, que teria a capacidade de deprimir consumo (Oba e Allen, 2003), entretanto, não houve diferença na concentração deste AGV entre os tratamentos no presente estudo (tabela 3).

É postulado que aditivos alimentares como inoculantes para silagens, probióticos, enzimas e ionóforos podem aumentar a eficiência alimentar de vacas em lactação (Casper, 2008). No presente estudo a eficiência alimentar (LCE/CMS) foi de 1,52 e 1,63 para a dieta controle e com adição de enzima respectivamente. A maior eficiência dos animais que receberam a enzima ($P < 0,01$), provavelmente foi relacionada com a melhora na digestibilidade de MS no rúmen, que é um dos principais fatores que interferem na eficiência alimentar (Linn et al., 2007 e 2009; Casper, 2008). Dois estudos, Klingerman et al. (2009) e Gencoglu et al. (2010) relataram aumento na eficiência alimentar. Gencoglu et al. (2010), comparando dietas reduzidas em amido com e sem adição de amilase exógena observaram menor consumo de matéria seca e melhor digestibilidade aparente dos nutrientes para as dietas com adição de amilase (exceto para o amido que foi similar). Klingerman et al. (2009) observaram que amilase exógena na dosagem baixa, mas não na alta em dieta normal de amido aumentou a produção de leite e leite corrigido para gordura a 3,5% e não houve aumento no consumo de matéria seca quando comparado a dieta controle normal em amido sem adição de amilase. Entretanto, a comparação de resultados nos diferentes estudos, é duvidosa devido ao uso de enzimas provenientes de diferentes microrganismos, condições experimentais, definição de unidades e composição de dietas.

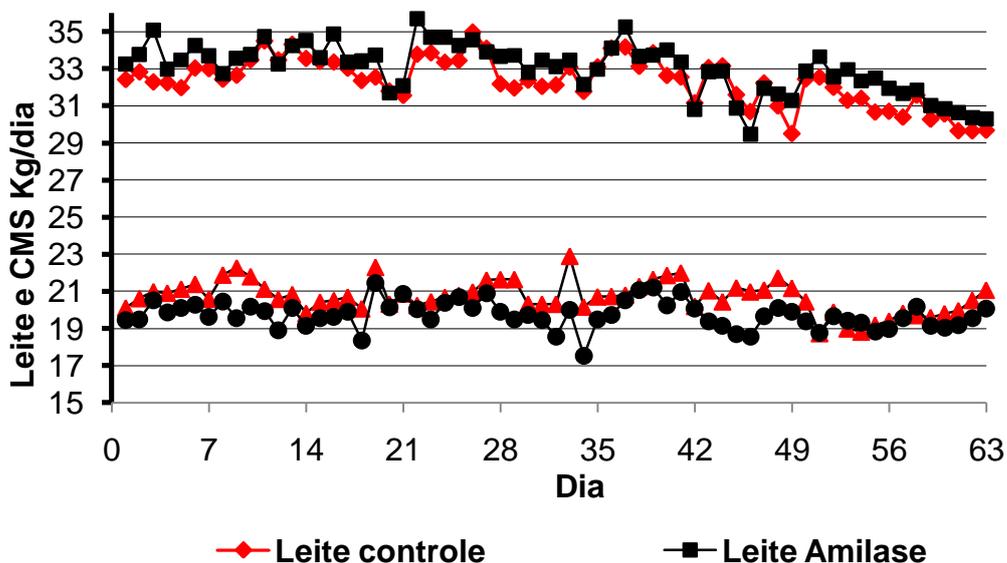


Figura 2: Produção de leite e consumo de matéria seca (CMS) de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

Na composição do leite, o único componente alterado pelo tratamento foi a lactose, com maior produção em quilos dia (Tabela 2). A enzima induziu aumento da síntese de lactose do leite, coerente com a tendência estatística de aumento da glicose plasmática (Tabela 4) nas vacas que receberam amilase. A quantidade de lactose secretada no leite é geralmente equivalente a uma quantidade similar (em base molar) a quantidade de glicose secretada no plasma (Kronfeld. 1982).

A enzima não induziu diferença na produção de gordura do leite (Tabela 2). Adição de amilase exógena não alterou a produção de gordura no leite nos estudos de Tricarico et al. (2005), Harrison e Tricarico (2007), e Klingerman et al. (2009), sugerindo que a possível atividade da enzima na fermentação ruminal não interferiu na síntese de gordura na glândula mamária. A possibilidade de maior taxa de fermentação ruminal de amido induzida pela enzima provavelmente não foi capaz de reduzir o pH do fluido ruminal e não houve o consequente acúmulo de intermediários da bio-hidrogenação de ácidos graxos de cadeia longa capazes de inibir a expressão gênica na síntese de gordura da glândula mamária (Bauman e Griinari, 2003).

O percentual de proteína do leite também não foi alterado pelo tratamento (Tabela 2). A possível maior disponibilidade de carboidrato fermentável no rúmen para a dieta com enzima parece não ter influenciado a síntese de proteína no leite. Gencoglu et al. (2010) observaram maior porcentagem de proteína no leite em dietas de amido reduzido com adição de amilase (3,06 versus 2,99%; $P < 0,10$) do que em dietas de amido reduzido sem adição de amilase. Os autores atribuíram o aumento de proteína a uma melhor digestibilidade de amido no rúmen provocada pela enzima, aumentando a produção de proteína microbiana (NRC, 2001). Como contraponto, a adição de amilase exógena em dietas normais em amido não alterou o conteúdo de proteína no leite nos estudos de Tricarico et al. (2005), Harrison e Tricarico (2007), e Klingerman et al. (2009).

O NUL foi de 15,7 e 16,0 mg/dL para as dietas controle e enzima respectivamente. Os valores foram muito próximos e não houve diferença estatística. Avaliando-se o NUP, que foi menor para os animais na dieta enzima ($P = 0,05$), seria esperado também menor NUL, pois as concentrações de ureia no sangue estão altamente relacionadas com as concentrações de NUL (Bucholtz et al., 2007). Menores concentrações de NUP caracterizam dietas com maior disponibilidade energética no rúmen com uso mais eficiente do nitrogênio proveniente da degradação ruminal e consequente menor absorção de amônia (Sutton et al., 1987). Segundo Grant et al. (2007), o valor médio de NUL em um rebanho leiteiro deve estar entre 12-16mg/dL. Apesar de não ter havido diferença entre os tratamentos, os valores de NUL foram próximos ao limite do recomendado, sugerindo que a alta inclusão de amido não melhorou a eficiência do uso do nitrogênio. Possivelmente porque a degradação ruminal de amido ainda poderia ser melhorada ou por excesso de proteína degradável no rúmen.

Não houve diferença na concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) e na relação acetato/propionato no líquido ruminal das vacas suplementadas ou não com amilase na dieta. O achado poderia explicar diferenças no consumo de matéria seca ou na produção de leite entre os tratamentos (Tabela 3). O efeito hipofágico por infusão de propionato foi extensivamente documentado para ruminantes. O propionato pode ser produzido e absorvido em taxas muito altas e pode ser captado rapidamente pelo fígado, onde é o principal percussor para produção de glicose (Allen, 2000). Entretanto, apesar da não diferença estatística na concentração de propionato, houve tendência (P=0,07) de maior produção de glicose plasmática para as vacas que receberam a enzima, e pode ter interferido no consumo de matéria seca.

Tabela 3. Perfil da fermentação, pH ruminal e excreção da alantoína urinária de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

	Controle	Amilase	EPM ¹	Ptrat ²
	mm/L			
Acetato	66,9	61,7	9,20	0,69
Propionato	20,5	20,7	1,67	0,94
Butirato	9,4	10,0	0,77	0,64
	Mg/dL			
Acetato/ Propionato	3,16	3,02	0,24	0,69
	mmoles/d			
Alantoína na urina %	385	402	18,2	0,54
pH de rúmen	6,45	6,35	0,14	0,63

¹Erro padrão das médias. ²P valores de probabilidade para o efeito de tratamento.

De acordo com Klingerman et al. (2009), a melhor digestibilidade ruminal de amido proporcionada pela amilase exógena poderia reduzir o pH ruminal e a proporção molar de acetato e conjuntamente aumentar a proporção molar de propionato. Coerente com a afirmação acima, Nozière e Morgavi (2012), em ensaio de digestibilidade com animais canulados no rúmen e duodeno proximal observaram que a adição de amilase exógena reduziu a proporção de acetato e butirato e aumentou a de propionato, particularmente nas dietas de alto amido com adição de amilase, quando houve tendência para o aumento da concentração de AGV's no rúmen. É importante ressaltar que neste ensaio de digestibilidade a amilase exógena utilizada foi a mesma utilizada no presente estudo (proveniente do *Bacillus licheniformis* DSM 21564).

Entretanto há resultados controversos. Tricarico et al. (2007), em revisão de literatura sobre suplementação de alfa-amilase proveniente de extratos de *Aspergillus oryzae*, observaram aumento na proporção molar ruminal de acetato e butirato e decréscimo na proporção de propionato em novilhos, vacas em lactação e em culturas contínuas ruminais. Os achados antagônicos podem ter sido causados pelos diferentes aditivos utilizados e as diferenças naturais entre ensaios.

O pH ruminal para os tratamentos estão apresentados na tabela 3. Não houve diferença estatística. Contudo, relacionando as menores concentrações de NUP e maiores concentrações de glicose sanguínea, pode-se sugerir alteração na fermentação ruminal provocada pela enzima, sem promover queda no pH ruminal, pelo menos no momento da coleta do fluido ruminal. As amostras aqui obtidas representaram o fluido ruminal amostrado em apenas um momento do dia (12,3±0,8h após alimentação matinal), o que reduz a possibilidade de encontrar diferenças entre os tratamentos, comparativamente a amostras de fluido obtidas ao longo do dia (Erasmus et al., 1992; Bach et al., 2007).

Tabela 4. Nitrogênio uréico no plasma (NUP) e glicose plasmática 12 horas após alimentação de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

	Controle	Amilase	EPM ¹	Ptrat ²	Ptempo ²	Ptrat*Tempo ²
NUP, mg/dL	14,7	13,6	0,36	0,05	<0,01	0,26
Glicose, mg/dL	59,3	68,6	3,16	0,07		

¹Erro padrão da média. ²P valores para tratamento, Tempo após alimentação e Tratamento*Tempo

Observou-se diminuição de nitrogênio ureico no plasma consistente ao longo do dia (figura 3) para a dieta com adição de enzima, o que sugere aumento da degradação de matéria orgânica no rúmen (Tabela 4). A melhor digestibilidade no rúmen, pode ter provocado queda no teor de nitrogênio uréico no plasma, em razão da menor perda de N-amoniaco, decorrente da maior produção da proteína microbiana pela maior viabilidade de carboidrato fermentável no rumen (Hristov et al, 2004). A concentração de nitrogênio ureico no plasma em ruminantes está diretamente relacionada com o consumo e eficiência de utilização de proteína da dieta, amônia ruminal e NUL (Hammond, 1997). Estudos propõem que valores ideais devem se situar entre 10 e 17 mg/dl, e concentrações de nitrogênio ureico no plasma superiores a 18,7 mg/dl, podem provocar efeitos deletérios na reprodução de vacas leiteiras (Butler et al., 1996). O achado sugere que houve eficiência satisfatória na utilização de proteína degradável no rúmen e disponibilidade adequada de energia fermentável da dieta no presente estudo

Houve tendência (P=0,07) para maior concentração de glicose plasmática para os animais que receberam a enzima (Tabela 4). A maior concentração de glicose plasmática sugere novamente possível interferência da amilase na fermentação ruminal. Estudos com

isótopos demonstraram que o propionato advindo da fermentação ruminal fornece de 43 a 67% do carbono utilizado para síntese de glicose no fígado e que o lactato fornece até 12% (Huntington et al., 1981; Veenhuizen et al., 1988; Amaral et al., 1990). Portanto poderia-se especular que a maior produção de propionato seria o responsável pelas maiores concentrações de glicose plasmática. Entretanto não foi observada diferença estatística entre os tratamentos na produção de AGV, provavelmente porque as amostras representaram o fluido ruminal amostrado em apenas um momento do dia.

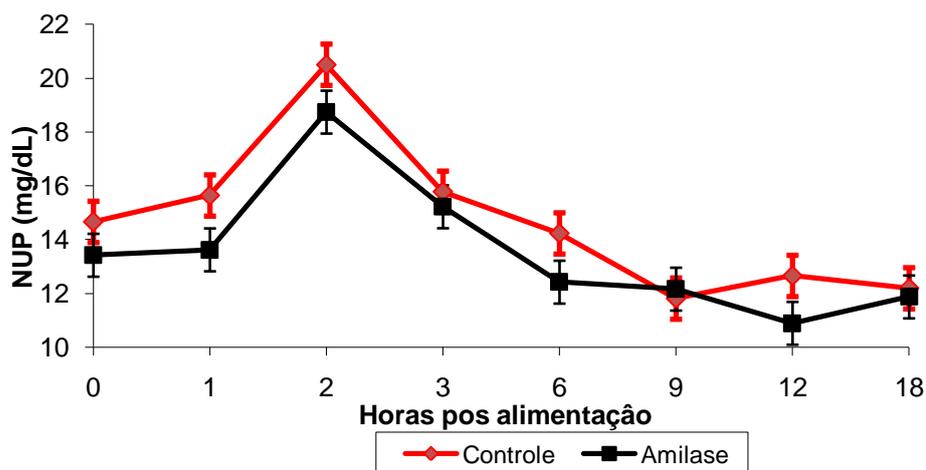


Figura 3: Concentração de nitrogênio uréico no plasma (NUP) de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

A digestibilidade total de amido foi de 96,1% e 96,4% para controle e enzima respectivamente (Tabela 5). Os valores foram muito próximos e não houve diferença ($P=0,41$). A digestibilidade de amido em vacas em lactação em um grande experimento usando dietas baseadas em milho finamente moído foi em média 90,8% (Weiss et al., 2009) e, em revisão, Firkins et al. (2001) relataram digestibilidade do amido média de 90,6% para uma ampla gama de dietas de vacas em lactação. Portanto, pode-se considerar que a digestibilidade de amido no presente estudo foi alta, inclusive na dieta controle, e pode ter prejudicado o achado de resultados mais pronunciados.

A digestibilidade total de matéria seca, orgânica e de matéria orgânica não fibrosa, não foram alteradas pela adição da enzima (Tabela 5). Também não houve diferença na digestibilidade de FDN, apesar de estudos prévios com adição de alfa amilase reportarem aumento na digestibilidade de FDN (Klingerman et al., 2009; Gencoglu et al., 2010 e Weiss et al, 2011) . Os autores argumentaram que a atividade da enzima na liberação de oligossacarídeos e açúcares do amido foi capaz de beneficiar a alimentação cruzada da microbiota ruminal com potencial benefício na digestibilidade de fibra (Cotta, 1992; Tricarico et al., 2008), fato não demonstrado no presente estudo.

Tabela 5. Digestibilidade aparente dos nutrientes no trato digestivo total de vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

	Controle	Amilase	EPM ¹	Ptrat ²
DMS ³ , %	69,4	70,3	0,79	0,46
DMO ⁴ , %	70,9	71,5	0,72	0,58
DFDN ⁵ , %	44,3	44,4	2,07	0,98
DMOnFDN ⁶ , %	87,8	88,7	0,98	0,53
D amido ⁷ , %	96,1	96,4	0,19	0,41

¹EPM=Erro padrão da média. ² Valores de P para tratamento. ³DMS=Digestibilidade de matéria seca. ⁴DMO= Digestibilidade de matéria orgânica. ⁵DFDN= Digestibilidade de fibra detergente neutro. ⁶ DMOnFDN=digestibilidade de materia orgânica não-FDN. ⁷Digestibilidade de amido.

Os achados de NUP, de concentração de glicose no sangue e o menor tempo de ingestão para os animais da dieta enzima sugerem melhora na digestibilidade ruminal (Tabela 4). Entretanto, a digestibilidade aparente total dos nutrientes não foi sensível à enzima (Tabela 5), sugerindo que a digestibilidade no intestino delgado ou possível fermentação no intestino grosso (Taylor e Allen, 2005; Firkins, 1997) compensou a diferença de digestibilidade no rúmen. Em vários estudos com amilase a digestibilidade total de amido não foi alterada, podendo-se sugerir melhora na eficiência e não exatamente melhor digestibilidade total de amido como atuação da enzima (Tricarico et al. 2007).

Tabela 6. Padrão de ingestão, ruminação e seletividade de partículas das vacas leiteiras suplementadas (Amilase) ou não (Controle).

	Controle	Amilase	EPM ¹	Ptrat ²
Ingestão, min/d	347	291	22,4	0,11
Ruminação, min/d	433	408	21,1	0,41
Mastigação, min/d	780	699	26,3	0,05
Ingestão, min/kg CMS	16,8	15,2	1,24	0,40
Ruminação, min/kg CMS	20,6	21,7	1,43	0,58
Mastigação, min/kg CMS	37,4	37,0	2,01	0,89
Refeições por dia	11,5	9,7	0,53	0,03
Primeira refeição, min	43,5	39,0	3,87	0,54
CMS 7:00h – 13:00h, % diária CMS	34,7	37,2	1,98	0,40
DMI 13:00h – 19:00h, % diária CMS	41,7	39,0	1,62	0,28
DMI 19:00h – 7:00h, % diária CMS	23,6	23,8	2,11	0,95
Seletividade 7:00h – 13:00h				
>19mm	117	155	8,4	<0,01
8-19mm	110	97	8,1	0,28
<8mm	96	94	2,4	0,57
Seletividade 13:00h- 19:00h				
>19mm	143	125	9,6	0,22
8-19mm	107	107	4,4	0,98
<8mm	92	96	2,1	0,22
Seletividade 19:00h – 7:00h				
>19mm	91	129	6,9	<0,01
8-19mm	85	97	3,4	0,02
<8mm	104	97	1,3	<0,01

¹Erro padrão da média ² Valores de probabilidade para efeito de tratamento

No comportamento ingestivo (Tabela 6), a amilase diminuiu o tempo de mastigação por dia, como resultado da tendência estatística de queda do tempo de ingestão. Ocorreu também redução no número de refeições por dia pelas vacas que receberam a enzima, de

forma consistente com a diminuição observada no CMS (Tabela5). É postulado que a redução da concentração de propionato ruminal (Allen, 1997) pode aumentar o tamanho das refeições com conseqüente aumento do CMS (Allen et al., 2009), o que justificaria o maior consumo dos animais na dieta controle. Não foi observado diferença na concentração de propionato, mas a menor concentração de glicose plasmática nos animais da dieta controle sugere menores proporções de propionato como discutido anteriormente.

Não houve diferença no tempo de ruminação, mesmo com a seleção em favor de partículas maiores pelas vacas da dieta enzima, provavelmente pelo menor consumo matéria seca. O achado foi coerente com o estudo de Gencoglu et al. (2010), que observaram redução no CMS de vacas que receberam amilase exógena em dieta de amido reduzido (21% na MS) em comparação a dietas com mesmo teor de amido sem adição de amilase e dietas normais (27% na MS) em amido sem adição de amilase. Rojo et al., (2005), também observaram redução linear no CMS em experimento com cordeiros que consumiram dieta a base de sorgo com adição crescente de enzima.

Na avaliação do consumo particionado, surpreendentemente, não houve diferença na ingestão de matéria seca entre as dietas como seria esperado, pois a diferença no CMS foi consistente ao longo do período experimental (Figura 1). O fato ocorrido, pode ser atribuído a flutuação natural de consumo diário das vacas ou possível alteração ambiental no dia da coleta de dados devido a mudança de rotina.

Houve efeito de tratamento sobre a seletividade no período matinal, entre 7:00h e 13:00h. Os animais da dieta enzima selecionaram em favor de partículas maiores (>19mm) mais intensamente. No período vespertino, 14:00h e 19:00h, prevaleceu comportamento comum entre os dois tratamentos de rejeição de partículas pequenas (<8mm). Em período noturno, entre 19:00h e 7:00h, o grupo controle selecionou partículas menores, em contraste à dieta enzima, que manteve a seleção por partículas grandes. Foi curioso o fato das vacas que receberam amilase selecionarem partículas maiores. Especulativamente, poderia ser o resultado do aumento da fermentação ruminal de amido, provavelmente aumentando a necessidade de saliva para tamponamento, embora nenhuma resposta foi observada no tempo de ruminação, apesar do aumento numérico de ruminação por kg de consumo de matéria seca. A seleção em favor de partículas maiores pelos animais que receberam a enzima pode estar relacionado com os achados de Beauchemin e Yang, (2005), que demonstraram que vacas com baixo pH ruminal selecionaram em favor de partículas longas provenientes de forragem, possivelmente como tentativa de satisfazer as necessidades de fibra fisicamente efetiva. O fato observado corrobora com a concepção de que nem sempre as vacas em lactação selecionam partículas menores provenientes do concentrado e, pelo contrário, podem selecionar para promover equilíbrio do pH ruminal, aumentando o consumo de partículas capazes de estimular a ruminação.

5. Conclusões

A adição de amilase exógena em dieta com 32% de amido na matéria seca foi capaz de aumentar a produção de leite e reduzir o consumo de matéria seca de vacas leiteiras, aumentando a eficiência alimentar.

As menores concentrações de nitrogênio ureico no plasma sugerem que a enzima aumentou a degradação de amido no rúmen sem afetar a digestibilidade total dos nutrientes.

A maior fermentabilidade ruminal provocada pela amilase induziu seletividade em favor de partículas longas.

6. Referências

ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.1447–1462, 1997.

AZEM, E.; MEDA F. The effect of feeding a reduced-starch diet supplemented with an exogenous α -amylase on milk yield and milk composition of dairy cows. *Rev. Argentina Prod. Anim.*, v.31, p.325-373, 2011.

BATAJOO, K. K.; SHAVER R. D. Impact of nonfiber carbohydrate on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.77 p.1580–1587, 1994

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, v.81, E suppl. 2, p.E37-E47, 2002.

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, suppl.2 p. E37-E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K.A.; McALLISTER, T.A.; DONG, Y. et al. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *Journal of Animal Science*, v.72, n.2, p.236-246, 1994.

BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. The potential use of feed enzymes for ruminants. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 1996, New York. Proceedings... New York: Rochester Marriott Thruway Hotel. p.131-141, 1996.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG W. Z. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *J. Dairy Sci.* v. 88 p. 2117–2129, 2005.

BECKMAN, J.L.; WEISS, W.P. Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* v.88, p.1015-1023, 2005

BEDFORD, M.R; SCHULZE, H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.* v.1, p.91-114, 1998.

BHATTA, R.; ENISHI, O.; TAKUSARI, N.; HIGUCHI, K.; NONAKA, I.; KURIHARA, M. Diet effects on methane production by goats and a comparison between measurement methodologies. *Journal of Agriculture Science.* v.146, p. 705–715, 2008.

- BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Acidosis, rate of starch digestion and intake. in Symposium Proceedings: Feed Intake by Beef Cattle. F. N. Owens, ed. Oklahoma Agricultural Experiment Station. Oklahoma State University, Stillwater p. 125–137, 1987.
- BUENDIA, G.; MENDOZA, G.D.; BÁRCENA, R. et al. Effects of glucoamylase from *Aspergillus niger* on in vitro digestibility, of maize and sorghum and on lamb performance. *Agrociencia*. v.37, p.317–322, 2003.
- BURROUGHS, W.; WOODS, W.; EWING S. A. et al. Enzyme additions to fattening cattle rations. *Journal of Animal Science* v.19, p.458-464, 1960
- 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. 1993. INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. ROWETT RESEARCH INSTITUTE. Aberdeen, UK. 21 p, 1993.
- CHESSON, A.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart). Elsevier Science Publishers Ltd., London, UK, p. 329-381, 1997.
- COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K.A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Canadian Journal of Animal Science*. v.83, p.559-568, 2003.
- CONE, J.W. Degradation of starch in feed concentrate by enzymes, rumen fluid and rumen enzymes. *Journal of Science of Food and Agriculture*. v. 54, p. 23-34, 1991.
- CONSIDINE, P. J.; COUGHLAN, M. P. Production of carbohydrate- hydrolyzing enzyme blends by solid-state fermentation. ed. *Enzyme systems for lignocellulose degradation*. Elsevier Applied Science. p.273-281, 1989.
- CORREA, C.E.S.; SHAVER, R.D.; PEREIRA, M.N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v.85, n.11, p.3008-3012, 2002.
- COTTA, M. A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 58-48, 1992.
- COTTA, M.A.; WHITEHEAD, T.R. Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.59, p.189–196, 1993.

COWAN, W. D. Factors affecting the manufacture, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. Joint proceedings of the second international roundtable on animal feed biotechnology – Probiotics, and workshop on animal feed enzymes, Ottawa, ON. p. 175-184, 1994.

CROOM, W. J.; BULL, L. S.; TAYLOR, I. L. Regulation of pancreatic exocrine secretions in ruminants: A review. *J. Nutr.* v.122 p.191, 1992.

CROSBY, M.M.; MENDOZA G.D.; MELGOZA L.M. et al. Effects of *Bacillus licheniformis* amylase on starch digestibility and sheep performance. *J. Appl. Anim. Res.* v.30, p.133-136, 2006.

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

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

DILORENZO, N.; SMITH D. R.; QUINN M. J. et al. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. *Livestock Sci.* v.137, p.178–184, 2010.

ENGVALL, A. α -Amylase activity in rumen fluid of cows producing milk of low and normal fat content. *J. Dairy Sci.* v.63, p. 2012-2019, 1980.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER R. D.; ESPINEIRA M. et al. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.94, p.1490–1499, 2011.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P.M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* v. 96, p. 533-550, 2013.

FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L.; ST-PIERRE, N.R. et al. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* v.79, p.E218-E238, 2001.

GADO, H.M.; SALEM, A.Z.M.; ROBINSON, P.H.; HASSAN, M. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. *An. Feed Sci. Tech.* v.154, p.36-46, 2009.

GASHE, B. A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. Measurement of cellulase activity. *Pure Appl. Chem.* V.59 p.257–268, 1992.

GENCOGLU, H.; SHAVER, R.D.; STEINBERG, W. et al. 2010. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.93, p.723-732, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activity. *Pure Appl. Chem.* v.59 p.257–268, 1987.

GRAY, G. M. Starch digestion and absorption in nonruminants. *J. Nutr.* p. 122-172, 1992.

GUTIÉRREZ, C.; MENDOZA, G.D.; RICALDE, R. et al. Effect of exogenous amylase or glucoamylase dose on in situ ruminal digestion of corn and sorghum. *J. Appl. Anim. Res.* v. 27 p.7-10, 2005.

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

HARMON, D. L. Dietary influences on carbohydrases and small intestinal starch hydrolysis capacity in ruminants. *J. Nutr.* v.122 p.203, 1992.

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

HARRISON, G.A.; TRICARICO, J.M. Case Study: Effects of an *Aspergillus oryzae* containing alpha amylase on lactational performance in commercial dairy herds. *The Prof. Animal Scientist.* v.23, p.291-294, 2007.

HEINRICHS, A.J.; KEHOE, S.I.; GEHMAN, A.M. et al. Case Study: Effects of an amylase on ruminal development. *The Prof. Animal Scientist.* v.23, p.64-69, 2007.

HERRERA-SALDANA, R. E.; HUBER, J. T.; POORE M. H. Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *J. Dairy Sci*, v.73 p. 2386-2393, 1990.

HILL, T. M.; SCHMIDT, S.P.; RUSSELL, R.W. et al. Comparison of urea treatment with established methods of sorghum grain preservation and processing on site and extent of starch digestion by cattle. *Journal of Animal Science.* v.69 p.4570, 1991.

HODROVÁ, B.; KOPEČNÝ J.; KÁŠ J. Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces communis*. *Res. Microbiol.* v.149 p.417-427, 1998.

- HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. The nutritional chemistry of dry and high moisture corn. In: ANNUAL SOUTHWEST NUTRITION AND MANAGEMENT CONFERENCE, 26, 2011, Arizona. Proceedings... Arizona: The University of Arizona Department of Animal Sciences. p.12-23, 2011.
- HOOVER, W. H.; STOKES S.R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* v.74 p.3630– 3644, 1991.
- HOSENEY, R. C.; DAVIS, A. B.; HARBERS, L. H. Pericarp and endosperm structure of sorghum grain shown by scanning electron microscopy. *Cereal Chemistry.* v.51, p.553-558, 1974.
- HRISTOV, A.N.; MCALLISTER T.A.; CHENG K.J. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* v.76, p.3146-3156, 1998.
- HRISTOV, A.N.; MCALLISTER. T.A.; CHENG, K.J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *J. Anim. Sci.* p.76, v.477-487, 2000.
- HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* v.75, p.852-867, 1997.
- JOBIM C.C., BRANCO A.B., SANTOS G.T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos. In: V Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite, Goiânia. p. 357-376, 2003.
- JOHNSON, L.; HARRISON J. H.; HUNT C.; SHINNERS K.; DOGGETT C. G.; SAPIENZA D. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. *J. Dairy Sci.* v.82 p. 2813–2825, 1999.
- JUNG, S.; VOGEL, K. Determination of Ronozyme Rumi-Star Alpha-Amylase Activity in Feed and Per Se Samples. DSM Nutritional Products Ltd. Regulatory Report No. 2500706. DSM Nutritional Products Ltd., Basel, Switzerland, 2008.
- KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; MCDONELL, E.E. et al. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.92, p.1050–1059, 2009.
- KOTARSKI, S. F.; WANISKA, R.D.; THURN, K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *Journal of Nutrition.* p.178–190, 1992.

KOTARSKI, S.F.; WANISKA, R.D.; THURN, K.K. Sarch hydrolysis by the ruminal microflora. In: ANNUAL RUMINANT NUTRITION CONFERENCE, 31., 1990. Washington, The Journal of Nutrition, Bethesda, v.122, n.1, p.178-190, 1992.

KREIKEMEIER, K. K.; HARMON, D.L.; BRANDT, R.T. et al. Effect of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin on small intestinal disappearance and net glucose absorption. *Journal of Animal Science*. v.69 p.328, 1991.

LADELY, S.R.; STOCK, R.A.; GOEDEKEN, F.K. et al. Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. *Journal of Animal Science*, v.73, p.360-364, 1995.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, A.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, v.79, n.5, p.922-928, 1996.

LEE, B.; POMETTO, A. L.; DEMICI, A.; HINZ, P. N. Media evaluation for the production of microbial enzymes. *J. Agric. Food Chem.* v.46 p. 4775–4778, 1998.

LEHNINGER, A. L. *Princípio de Bioquímica*. 4ª ed. São Paulo: Savier, 1998. p.105.

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

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of Quantity, Quality, and Length of Alfalfa Hay on Selective Consumption by Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 02, p.557-564, 2003.

Mc ALLISTER T. A., RODE L. M., MAJOR D. J., CHUNG K. J., BUCHAMAN J. G. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Journal of Animal Science*, v. 70, p.571, 1990.

Mc ALLISTER, T. A.; PHILLIPE, R. C.; RODE, L. M. CHENG, K. J. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.71, n.1, p. 205-212, 1993.

Mc ALLISTER, T. A.; PHILLIPE, R. C.; RODE, L. M. CHENG, K. J. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.71, n.1, p. 205-212, 1993.

Mc ALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A.; CHENG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. v.72, p.3004-3018, 1994.

- McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. M. R. Bedford and G. G. Partridge (Eds). CABI Publishing Marlborough, Wiltshire, UK. p. 273-298, 2001.
- McCARTHY, M.M; ENGSTROM, M. A.; AZEM, E.; GRESSLEY, T.F. The effect of an exogenous amylase on performance and total tract digestibility in lactating dairy cows fed a high by-product diet. *J Dairy Sci*, in press, 2013.
- McCARTHY, R.D.; KLUSMEYER, T.H.; VICINI, J.L. et al. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science*. v.72, p.2002-2016, 1989.
- MENDONZA, G.D.; RICALDE, R.; ESPARZA, H.;VELASQUEZ, L. Efecto de dos cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en la degradación ruminal de la fibra neutro detergente de paja de trigo. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, v.10, n.2, p.105-110, 1995.
- MILLER, D.R.; GRANZIN, B.C.; ELLIOTT, R.; NORTON, B.W. Effects of an exogenous enzyme, Roxazyme® G2 liquid, on milk production in pasture fed dairy cows. *Anim. Fd. Sci. Tech*. v.145, p.194- 208, 2008.
- MINOR, D. J.; TROWER S. L.; STRANG B. D. et al. Effects of nonfiber carbohydrate and niacin on periparturient metabolic status and lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci*. v.81 p.189– 200, 1998.
- MOMANY, F.A., SESSA,D.J.; LAWTON J.W.; SELLING G.W.; HAMAKER S.A.; WILLET J.L.; Structural characterization of alpha-zein. *J. Agric. Food Chem*. v.54 p.543-547, 2006.
- MORA, J.G.; BÁRCENA, R.; MENDOZA G.D. et al. Productive response and ruminal fermentation in sheep fed with sorghum grain treated with amylases. *Agrociencia*. v.36, p. 31–39, 2002.
- MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- MORGAVI, D. P.; WUERFEL, R.; NSEREKO, V. L. et al. . Effect of enzyme feed additives and method of application on in vitro feed digestibility. *Journal of Dairy Science*. v.83 p. 291, 2000.
- MOSCHINI, M.; STEINBERG, W.; GALLO, E. et al. Effect of exogenous amylase supplementation on the performance of lactating dairy cows. *Communication. Proc. Rev. Argentina Prod. Anim*. v.31, p.360-367, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7.ed. Washington, DC: Natl. Acad. Sc., p.34-41, 2001.

NOCEK J. E., TAMMINGA S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p.3598, 1991.

NOCEK, J. E.; RUSSELL J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* v.71 p. 2070– 2107, 1988.

NOECK, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v.80, p.1005-1028, 1997.

NOZIERE, P.; MORGAVI, D. Effects of RumiStar on digestion in dairy cows fed high versus low starch diets. *Renc. Rech. Ruminants.* v.19, 2012.

OBA, M.; ALLEN, M.S. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. *J. Dairy Sci.* v.86, p.174–183, 2003.

ORPIN C.G.; JOBLIN, K.N. The rumen anaerobic fungi. In: Hobson PN, Stewart CS (eds). *The rumen microbial ecosystem*. London: Chapman and Hall, p. 140-195, 1997.

OWENS, F. N.; SECRIST D. S.; HILL W. J.; GILL D. R. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* v.76, p.275, 1998.

OWENS, F. N.; ZINN, R. A.; KIM, Y. K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *Journal of Animal Science*, v.66 p.1634, 1986.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: MILLINGAN, L. P., GROVUM, W.L., DOBSON, A. (Eds). *Control of digestion and metabolism in ruminants*. New Jersey: Englewood Cliffs, Prentice Hall, p.196-223, 1986.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Corn grain for cattle: influence of processing on site and extent of digestion. In : *SOUTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 2005, Nebraska. Proceedings...* Nebraska, p. 86-112, 2005.

PANDEY. et al. *Enzyme Technology*. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005.

PEREIRA, M.L.R. Degradabilidade ruminal in vitro de grãos re-hidratado e ensilado de milho e sorgo com diferentes granulometrias. 2012. p.60 Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

- PENNER, G. B.; OBA M.; GABEL G.; ASCHENBACH J. R.. A single mild episode of subacute ruminal acidosis does not affect ruminal barrier function in the short term. *J. Dairy Sci.* v.93 p. 4838–4845, 2010.
- PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. *J. Sci. Food and Agric.* v.80 p.404-408, 2000.
- POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 4^a Ed. New York: John Wiley and Sons, p. 353-364, 1995.
- RALSTON, A.T.; CHURCH, D.C.; OLDFIELD, J.E. Effect of enzymes on digestibility of low quality roughage. *J. Anim. Sci.* v.21, p.306-308, 1962.
- ROJO, R.; MENDOZA G.D.; GONZALEZ S.S. et al. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim. Fd. Sci. Tech.* v.123-124, p.655-665, 2005.
- ROJO, R.; MENDOZA, G.D.; CROSBY, M.M. Use of the thermostable amylase from *Bacillus licheniformis* on in vitro digestibility from sorghum and corn starch. *Agrociencia.* v.35, p. 423–427, 2001.
- ROJO, R.; MENDOZA, G.D.; PLATA, F.X. et al. Comparison of method of application on the effect of amylolytic enzymes on in vitro ruminal starch digestion. *J. Appl. Anim. Res.* v.32 p.81-84, 2007.
- ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *Journal of Animal Science*, v.63 p.1607, 1986.
- RUSSELL, J.B. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* v.49, p.572–576, 1985.
- RUST, J.W.; JACOBSON, N.L.; MCGILLIARD, A.D. Supplementation of dairy calf diets with enzymes. I. Effect on rate of growth. *J. Anim. Sci.* v.22 p.1104-1108, 1963.
- SHAVER, R. Improving Starch Digestibility in Dairy Cows: Opportunities with Reduced-Starch Diets. *Four-State Dairy Nutr. & Mgmt Conf. Dubuque*, p.90-93, 2010.
- SIEVERT, S.J.; SHAVER, R.D. Carbohydrate and *Aspergillus oryzae* effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.245-254, 1993.

STAPLES, C.R. Feeding dairy cows when corn prices are high. Florida Dairy Production Conference, Gainesville, FL. v.44, p.7-22, 2007.

STREETER, M. N.; WAGNER, D. G.; OWENS, F.N.; HIBBERD, C.A. Combinations of high-moisture harvested sorghum grain and dry-rolled corn: Effects on site and extent of digestion in beef heifers. *J. Anim. Sci.* v. 67, p.1623, 1989.

STROBEL, H. J.; RUSSEL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* v.69, p.2941–2947, 1986.

SUTTON, J. D.; BINES J. A. A comparison of starchy and fibrous concentrates for milk production, energy utilization and hay intake by Friesian cows. *J. Agric. Sci., Camb.* v.109 p.375– 385, 1987.

TAYLOR, C.C.; ALLEN, M. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Ruminal fermentation and N partitioning in lactating cows. *J. Dairy Sci.* v.88, p.1434–1442, 2005.

THEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, v.63, n.4, p.1649-1662, 1986.

TRICARICO, J. M.; ABNEY M.D.; GALYEAN M.L.; Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* v.85 p.802–811, 2007.

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

TRICARICO, J.M.; JOHNSTON, J.D.; DAWSON, K.A. et al. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. *Anim. Sci.* v.81, p.365, 2005.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 1st ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA. c.12, p.224-234, 1982.

VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminants*. 2nd edition. Cornell University Press. Ithaca, NY. c.8, p.476, 1994.

VARGAS, C.F.; BRADFORD B. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. p. 16-19, Kansas State Univ. Dairy Day Report, 2011.

WALDO, D.R. Extent and partition of cereal grain starch digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* v.37 p.1062-1074, 1973.

WATTIAUX, M. A . *Nutrição e Alimentação*. Reis, R. B. (Tradução). Instituto Babcock. p.128, 1998.

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

WEISS, W.P.; SHOCKEY, W.L. Value of orchardgrass and alfalfa silages fed with varying amounts of concentrates to dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.74, p.1933-1943, 1991.

WILDMAN, E.E., JONES, G.M., WAGNER, P.E. et al. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* v.65, p.495-501, 1982.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. *Methods in enzymology*. Academic Press Inc., New York, NY. v. 160, p.87-112, 1988.

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

ZINN, R. A. Comparative feeding value of steam-flaked corn and sorghum in finishing diets supplemented with or without sodium bicarbonate. *Journal of Animal Science.* v.69, p.905, 1991.