

MILENA BUGONI

Estratégias nutricionais para aumentar o desempenho produtivo em vacas leiteiras: I. Enzimas exógenas como aditivos alimentares. II. Extrato de malte substituindo parcialmente o milho na dieta.

Pirassununga
2022

MILENA BUGONI

Estratégias nutricionais para aumentar o desempenho produtivo em vacas leiteiras: I. Enzimas exógenas como aditivos alimentares. II. Extrato de malte substituindo parcialmente o milho na dieta.

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Area de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4197 FMVZ	Bugoni, Milena Estratégias nutricionais para aumentar o desempenho produtivo em vacas leiteiras: I. Enzimas exógenas como aditivos alimentares. II. Extrato de malte substituindo parcialmente o milho na dieta / Milena Bugoni. – 2022. 95 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2022. Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal. Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó. 1. α -amilase. 2. Amido. 3. Carboidrato. 4. Malte de cevada. 5. Protease. I. Título.
-----------------	--



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de enzimas exógenas amilolítica e proteolítica no desempenho produtivo de vacas em lactação", protocolada sob o CEUA nº 9274250920 (00 008557), sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Milena Bugoni** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 09/12/2020.

We certify that the proposal "Effect of exogenous amylolytic and proteolytic enzymes on the productive performance of lactating cows", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 9274250920 (00 008557), under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Milena Bugoni** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/09/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2020 a 01/2021** Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 7 anos**

N: **24**

Linhagem: **Raça Holandesa**

Peso: **500 a 700 kg**

Local do experimento: O experimento será conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, do Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Campus USP Fernando Costa - Pirassununga/SP.

São Paulo, 15 de setembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da suplementação dietética de extrato de malte sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação", protocolada sob o CEUA nº 5986020620 (ID 007957), sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Milena Bugoni** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/06/2020.

We certify that the proposal "Effects of dietary supplementation of malt extract on the productive performance of lactating cows", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 5986020620 (ID 007957), under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Milena Bugoni** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/17/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2020 a 09/2020** Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 7 anos**

N: **24**

Linhagem: **Raça Holandesa**

Peso: **500 a 800 kg**

Local do experimento: O experimento será conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, do Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Campus USP Fernando Costa - Pirassununga/SP.

São Paulo, 15 de setembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BUGONI, Milena

Título Estratégias nutricionais para aumentar o desempenho produtivo em vacas leiteiras: I. Enzimas exógenas como aditivos alimentares. II. Extrato de malte substituindo parcialmente o milho na dieta.

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

Data: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a realização desta obra aos meus pais: Valdir Bugoni e Salete Vizentin Bugoni e aos meus irmãos: Eliane Bugoni, Leandro Bugoni, Jeferson Bugoni e Eduardo Bugoni.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelos valores ensinados e esforços que não são medidos. Eles que são meus maiores incentivadores, me apoiando e dando o suporte em cada etapa dessa jornada. Vocês são meus espelhos e a razão dos meus esforços. Obrigada por tudo sempre!

À minha família, em especial aos meus irmãos: Eliane, Leandro, Jeferson e Eduardo. São minhas inspirações e meus melhores amigos nessa caminhada da vida acadêmica. Muito obrigada pelo apoio e incentivo de sempre.

Ao Leandro Sena Zuza, pelo apoio, incentivo e paciência nesse período final de mestrado, sou grata por ser meu alicerce e por não medir esforços pelo meu bem estar.

Ao Rodrigo Félix pelo tempo e conhecimento dedicado em contribuir com minha evolução como pessoa em uma etapa da vida que exige muito. Com sua parceria e sabedoria transmitida a caminhada ficou mais fácil.

Aos meus amigos de Pirassununga, em especial Camila Azzolin e Raquel Buroxid pelo acolhimento, parceria, amizade e por ser minha segunda família nesses anos de USP. Com vocês a trajetória ficou mais leve e feliz.

Ao meu orientador, professor Dr. Francisco Palma Rennó por ser meu mestre nas diferentes etapas do mestrado, por ser e estar sempre presente e disposto a ensinar. Minha admiração pelo professor que és e meus sinceros agradecimentos por confiar em mim.

Aos colegas de pós graduação que ajudaram na condução dos experimentos: Nathália, Caio, Paulo, Alanne, Althieres, Rodrigo, Guilherme, Osmar, Daniel e Carol.

À equipe do LPBL, estagiários, alunos de iniciação científica, funcionários e funcionários terceirizados que se tornaram grandes amigos ao longo destes anos. A todos que ajudaram direta ou indiretamente durante a condução dos projetos.

Agradecimento especial a duas pessoas da equipe: Nathália Trevisan e Caio Takiya. À Nathália que foi meu braço direito, sempre disposta a ajudar, ouvir e ensinar. Com sua amizade a jornada ficou mais leve. Ao Caio pela amizade, paciência, conselhos, puxões de orelha e por ser sempre solícito quando precisei de orientações, minha admiração pela pessoa e profissional que tu és.

Às empresas parceiras nos projetos, Alltech e Liotécnica. Obrigada pela confiança em mim e em nossa equipe, bem como por todo apoio prestado na realização dos projetos.

Agradecimentos a CAPES pela concessão da bolsa como apoio financeiro ao longo do mestrado.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) que possibilitaram a realização do mestrado em uma instituição fantástica.

À Deus por me guiar e proteger sempre.

À todos que torceram por mim!

Muito obrigada!!!

RESUMO

BUGONI, Milena. **Nutritional strategies to increase productive performance in dairy cows: I. Exogenous enzymes as feed additives. II. Malt extract replacing corn in the diet.** 2022. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A presente dissertação apresenta dois experimentos que compreende dois capítulos distintos, correspondentes as sessões um e dois. No primeiro experimento, objetivou-se avaliar os efeitos das enzimas exógenas (ENZ) amilolítica (AmaizeTM, Alltech[®], Nicholasville, KY) e proteolítica (VegproTM Alltech[®]) na dieta de vacas em lactação sobre consumo de matéria seca e digestibilidade dos nutrientes, índice de seleção de partículas, fermentação ruminal, balanço de nitrogênio, derivados de purina, metabólitos sanguíneos e produção e composição do leite. Foram utilizadas vinte e quatro vacas da raça Holandesa, sendo 16 múltiparas e 8 primíparas com 4 canuladas no rúmen ($161 \pm 87,7$ dias em lactação, $681 \pm 96,2$ kg de peso corporal e $35,2 \pm 5,19$ kg/d de produção de leite) distribuídas em quadrados latinos 4×4 replicados. Cada período teve duração de 21 dias, sendo os últimos 7 destinados as coletas. Os tratamentos foram: dieta sem inclusão de enzima, controle (CON); dieta com adição de 0,5 g de enzima amilolítica/kg MS (A5); dieta A5 + 0,2 g de enzima proteolítica/kg MS (A5P2); dieta A5 + 0,4 g de enzima proteolítica/kg MS (A5P4). Os contrastes utilizados para estudar as diferenças entre os tratamentos foram C1: controle vs. enzimas; C2: enzima amilolítica (A5) vs. enzima proteolítica (A5P2 + A5P4); C3: contraste entre doses da enzima proteolítica. De forma geral, vacas alimentadas com A5P2 e A5P4 apresentaram maior seleção para partículas longas da dieta (>19 mm) e menor seleção para partículas pequenas quando comparado com A5. A digestibilidade do amido foi maior para vacas do grupo A5P2 e A5P4 quando comparado com A5. Ainda uma tendência à maior digestibilidade do amido foi observada em vacas alimentadas com A5P4 em comparação com A5P2. A digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foi maior no grupo A5P4 do que no grupo A5P2. A suplementação com ENZ tendeu a aumentar a proporção molar de propionato ruminal, bem como foi maior no grupo A5 do que grupos A5P2 e A5P4. Houve tendência a aumentar o nitrogênio ureico sanguíneo para as vacas alimentadas com ENZ. Tratamentos com enzimas (A5, A5P2 e A5P4) aumentaram a produção de leite comparado ao grupo controle (33,1 vs 32,0 kg/d, respectivamente) e a produção de leite corrigida para gordura (PLCG; 34,4 vs 33,3 kg/d, respectivamente), além de apresentar tendência para maior produção de proteína, aumento na produção de lactose no leite e tendência a aumentar a eficiência produtiva. A adição de ENZ na dieta de vacas em lactação pode ser

positiva melhorando o desempenho, já a associação de enzimas exógenas é capaz de melhorar a digestibilidade do amido e do FDN com alterações na fermentação ruminal. O objetivo do segundo experimento foi avaliar a substituição parcial de milho moído por extrato de malte seco de cevada (EMS) em dietas de vacas leiteiras e avaliadas as mesmas variáveis descritas no experimento anterior. Vinte e oito vacas da raça Holandesa, sendo 4 primíparas e 24 multíparas com quatro canuladas no rúmen (produção de leite de $35,3 \pm 5,88$ kg/d, 148 ± 78 DEL e $696 \pm 80,6$ kg de peso corporal (PC), foram distribuídas em blocos de acordo com a produção de leite, DEL, PC e número de partos e incluídas em delineamento *crossover*. Os períodos e coletas foram iguais às do capítulo anterior. Os tratamentos foram controle (CON) ou EMS de cevada (Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) em substituição ao milho moído em 7,62% MS da dieta (~ 2 kg MS/d). De modo geral, o EMS aumentou a digestibilidade aparente da PB, diminuiu o pH ruminal e a porcentagem molar de butirato e aumentou a porcentagem molar de acetato. Vacas alimentadas com EMS apresentaram menor nitrogênio ureico no sangue e menor NUL. O EMS aumentou a produção de leite, produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, gordura e proteína e melhorou a eficiência alimentar. O extrato de malte seco pode substituir parcialmente o milho moído na dieta, melhorando a produção de leite e a eficiência alimentar.

Palavras-chave: α -amilase, Amido, Carboidrato, Malte de cevada, Protease.

ABSTRACT

BUGONI, Milena. **Nutritional strategies to increase productive performance in dairy cows: I. Exogenous enzymes as feed additives. II. Malt extract from barley partially replacing ground corn in diets.** 2022. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

The present thesis was elaborated in two distinct chapters, corresponding to sessions one and two. In the first one, the objective was to evaluate the effects of exogenous enzymes (ENZ) amylolytic (Amaize™, Alltech®, Nicholasville, KY) and proteolytic (Vegpro™ Alltech) in the diet of lactating cows under dry matter intake and nutrient digestibility, milk yield and composition, sorting index, nitrogen balance, purine derivatives, rumen fermentation and blood metabolites. Twenty-four Holstein cows were used, 4 of which were cannulated in the rumen ($161 \pm 87,7$ DIM, $681 \pm 96,2$ body weight e $35,2 \pm 5,19$ milk yield, $681 \pm 96,2$ body weight peso (BW), in a replicated 4×4 Latin square experiment according DIM, parity, milk yield and BW. Each period lasted 21 days, with the last 7 days for data collection. The treatments were: basal diet, control (CON); basal diet with addition of 0.5 g of amylolytic enzyme/kg DM (A5); basal diet with association of 0.5 g of amylolytic enzyme and 0.2 g of proteolytic enzyme (A5P2); basal diet with association of 0.5 g of amylolytic enzyme and 0.4 g of proteolytic enzyme (A5P4). The contrasts used to study how differences between treatments were C1: control vs. enzymes; C2: amylolytic enzyme (A5) vs. proteolytic enzyme (A5P2 + A5P4); C3: contrast between doses of the proteolytic enzyme. In general, cows fed A5P2 and A5P4 showed a greater sorting for long particles in the diet (>19 mm) and less sorting for small particles when compared to A5. Starch digestibility was higher for cows fed treatments containing protease than A5, yet a trend towards greater starch digestibility was observed in cows fed A5P4 compared to A5P2. Neutral detergent fiber digestibility was greater in the A5P4 group than in the A5P2 group. Enzyme supplementation tended to increase the ruminal propionate molar ratio, an was greater in the A5 group than the A5P2 and A5P4 groups. Milk N production was greater in ENZ-fed cows, which tended to show greater blood urea nitrogen concentration in comparison with CON cows. Enzyme treatments increased milk yield ($33,1$ vs 32 kg/d, respectively) and fat-corrected milk yield ($34,4$ vs $33,3$ kg/d, respectively), tended to increase protein yield, increased the yield of lactose, and tended to increase productive efficiency. The association of exogenous enzymes in the diet of lactating cows can improve starch and NDF digestibility and productive performance. In the second chapter, the general objective was to evaluate the partial replacement of ground corn by dry malt extract (DME) in diets of dairy

cows and evaluated the same variables of the previous chapter. Twenty-eight Holstein cows, four of which were cannulated in the rumen (milk yield $35,3 \pm 5,88$ kg/d, 148 ± 78 DIM, and 696 ± 80.6 kg BW), were distributed in blocks and enrolled in a crossover design. The periods and data collections were the same described in the previous chapter. The treatments were control (CON) or barley DME (Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brazil) replacing ground corn at 7.62% diet DM (~ 2 kg/d). In general, DME increased the apparent digestibility of CP, decreased rumen pH and molar percentage of butyrate and increased molar percentage of acetate. Cows fed DME had lower BUN. Dry malt extract increased milk yield, 3.5% fat-corrected milk yield, fat and protein, and improved feed efficiency. Cows fed DME had lower milk urea nitrogen content. Dry malt extract can partially replace ground corn in the diet, improving milk yield and feed efficiency.

Keywords: α -amylase, Barley malt, Carbohydrate, Protease, Starch.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Concentração ruminal de isobutirato em vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas. CON: controle, dieta basal; A5: tratamento amilolítico (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta).....53
- Figura 2. Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta total (AGCC) em vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas. CON: controle, dieta basal; A5: tratamento amilolítico (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta)..... 53
- Figura 3. pH ruminal de vacas em lactação (n=4) alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído na dieta. Controle (CON) ou extrato de malte seco de cevada (EMS; Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) substituindo parcialmente o milho moído com 7,62% de MS da dieta. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes, composição química e tamanho de partículas da dieta experimental (% MS).....	41
Tabela 2. Composição química dos ingredientes utilizados na dieta experimental.	42
Tabela 3. Consumo de matéria seca e nutrientes, índice de seleção e digestibilidade do trato total da matéria seca e nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas.....	50
Tabela 4. Fermentação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas (n = 4).....	52
Tabela 5. Excreção de derivados de purina e excreção de nitrogênio de vacas alimentadas com diferentes enzimas exógenas.	54
Tabela 6. Metabólitos séricos e produção de leite, composição do leite e eficiência produtiva de vacas alimentadas com diferentes enzimas exógenas.	54
Tabela 7. Composição química (% MS) do extrato de malte seco (EMS; Liotécnica, Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil).....	81
Tabela 8. Ingredientes e composição química da dieta experimental.	82
Tabela 9. Consumo de nutrientes, seleção de partículas e digestibilidade aparente do trato total de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.	84
Tabela 10. Fermentação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.	84
Tabela 11. Excreção de derivados de purina, síntese de proteína microbiana ruminal e excreção de N de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.	85
Tabela 12. Concentração de ureia sérica, produção de leite e produção de leite corrigida para gordura de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.	85

1	Sumário	
1.	ALIMENTAÇÃO COM ENZIMAS AMILOLÍTICA E PROTEOLÍTICA EXÓGENAS: EFEITOS NA DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E DESEMPENHO DE VACAS EM LACTAÇÃO.	6
1.2	INTRODUÇÃO	22
1.3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
1.4	Revisão de literatura	24
1.4.1	Estrutura do grão de milho e propriedades do amido.....	24
1.4.2	Sítio de digestão e eficiência energética do amido	26
1.4.3	Enzimas exógenas na nutrição animal	29
1.4.5	Enzimas amilolíticas na nutrição de ruminantes	31
1.4.6	Enzimas proteolíticas na nutrição animal.....	34
1.5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
1.5.1	Local, Instalações e Animais.....	40
1.5.2	Animais e Dietas Experimentais	40
1.5.3	Consumo da Matéria Seca e Análises de Alimentos.....	43
1.5.4	Índice de Seleção De Partículas	44
1.5.5	Digestibilidade Aparente Total	45
1.5.6	Fermentação Ruminal	46
1.5.7	Balanço de Nitrogênio e Derivados de Purina	47
1.5.8	Metabólitos Sanguíneos	48
1.5.9	Produção e Composição do Leite.....	48
1.5.10	Avaliação do Peso e Escore de Condição Corporal	49
1.5.11	Análise estatística.....	49
1.6	RESULTADOS.....	50
1.7	DISCUSSÃO.....	55
1.8	CONCLUSÃO	62
1.10	REFERÊNCIAS	62
2.	EXTRATO DE MALTE SECO DE CEVADA SUBSTITUINDO PARCIALMENTE O MILHO MOÍDO EM DIETAS DE VACAS LEITEIRAS: DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E DESEMPENHO PRODUTIVO.	73
2.2	INTRODUÇÃO	76

2.3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	77
2.4 REVISÃO DE LITERATURA.....	77
2.5 MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.5.1 Delineamento experimental e tratamentos.....	80
2.5.2 Coletas e análises	82
2.5.3 Análises estatística.....	83
2.6 RESULTADOS	83
2.7 DISCUSSÃO	86
2.8 CONCLUSÃO.....	89
2.9 REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE	95

1. ALIMENTAÇÃO COM ENZIMAS AMILOLÍTICA E PROTEOLÍTICA EXÓGENAS: EFEITOS NA DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E DESEMPENHO DE VACAS EM LACTAÇÃO.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das enzimas exógenas (ENZ) amilolítica (Amaize™, Alltech®, Nicholasville, KY) e proteolítica (Vegpro™ Alltech®) na dieta de vacas em lactação sobre o consumo de matéria seca e digestibilidade dos nutrientes, índice de seleção de partículas, fermentação ruminal, balanço de nitrogênio, derivados de purina, metabólitos sanguíneos e produção e composição do leite. Foram utilizadas vinte e quatro vacas da raça Holandesa, sendo 16 multíparas e 8 primíparas com 4 canuladas no rúmen ($161 \pm 87,7$ dias em lactação, $681 \pm 96,2$ kg de peso corporal e $35,2 \pm 5,19$ kg/d de produção de leite no início do experimento), distribuídas em quadrados latinos 4×4 contemporâneos e balanceados de acordo com a produção de leite, dias em lactação e peso corporal das vacas. Cada período teve duração de 21 dias, sendo os primeiros 14 dias destinados a adaptação e últimos 7 para coletas de amostras. As enzimas foram misturadas junto com o mineral no concentrado e assim ofertado aos animais. Os tratamentos foram: controle, ou seja, dieta basal sem adição das enzimas (CON); adição de 0,5g/kg MS de enzima amilolítica (A5); associação de 0,5g/kg MS de enzima amilolítica e 0,2g/kg MS de enzima proteolítica (A5P2); associação de 0,5g/kg MS de enzima amilolítica e 0,4g/kg MS de enzima proteolítica (A5P4). As vacas foram alimentadas às 7:00h e às 13:00h e ordenhadas duas vezes ao dia. Os contrastes utilizados entre os tratamentos foram C1: controle vs. enzimas; C2: enzima amilolítica (A5) vs. enzima proteolítica (A5P2 + A5P4); C3: contraste entre doses da enzima proteolítica. Os tratamentos não influenciaram o consumo de matéria seca (CMS) e dos nutrientes. Os tratamentos com enzimas aumentaram a produção de leite e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura. Vacas alimentadas com ENZ apresentaram tendência para maior produção de proteína e aumento na produção de lactose no leite. Ainda para os tratamentos A5, A5P2 e A5P4 em contraste ao CON, observou-se tendência em aumentar a eficiência produtiva. A seleção de partículas com tamanho <4 foi menor para vacas que receberam ENZ. Vacas alimentadas com A5P2 e A5P4 apresentaram maior índice de seleção para partículas longas da dieta (>19 mm) e menor para partículas pequenas quando comparado com A5. A digestibilidade do amido foi maior para vacas dos grupos A5P2 e A5P4 quando comparado a A5, ainda uma tendência à maior digestibilidade do amido foi observada em vacas alimentadas com A5P4 em comparação com A5P2. A digestibilidade da fibra em

detergente neutro (FDN) foi maior no grupo A5P4 do que no grupo A5P2. A suplementação com ENZ tendeu a aumentar a proporção molar de propionato ruminal em comparação a CON, bem como foi maior no grupo A5 do que os grupos A5P2 e A5P4. Os tratamentos A5P2 e A5P4 diminuíram a produção de alantoína na urina. A excreção de N no leite foi maior em vacas alimentadas com ENZ do que com CON, e a excreção de N pela urina no grupo A5P2 foi menor comparado ao A5P4. Houve tendência para maior concentração de nitrogênio ureico sanguíneo nesse mesmo contraste. A adição de associação de enzimas exógenas na dieta de vacas em lactação pode ser positiva, melhorando a digestibilidade do amido e do FDN e desempenho produtivo com pequenos efeitos na fermentação ruminal.

Palavras-chave: α -amilase, Amido, Celulase, Digestibilidade, Protease.

1. FEEDING AMYLOLYTIC AND PROTEOLYTIC EXOGENOUS ENZYMES: EFFECTS ON NUTRIENT DIGESTIBILITY, RUMINAL FERMENTATION, AND PERFORMANCE OF DAIRY COWS

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effects of amylolytic (Amaize™, Alltech®, Nicholasville, KY) and proteolytic (Vegpro™ Alltech Nicholasville, KY) exogenous enzymes in the diet of cows on dry matter intake and digestibility of nutrients, milk yield and composition, sorting index, nitrogen balance, purine derivatives, rumen fermentation and blood metabolic profile. Twenty-four Holstein cows, of which 4 were ruminally cannulated (161 ± 87.7 days in milk, 681 ± 96.2 body weight and 35.2 ± 5.19 /d of milk yield, before the start of the experiment) were distributed in a replicated 4×4 Latin design, balanced according to milk yield, days in milk and body weight of the cows. Each period lasted 21 days, with the first 14 days for adaptation and the last 7 for sample collection. Enzyme was provided mixed into the concentrate. Treatments were: control, basal diet without addition of enzymes (CON); basal diet with addition of 0.5 g of amylolytic enzyme/kg DM (A5); basal diet with association of 0.5 g of amylolytic enzyme and 0.2 of proteolytic enzyme (A5P2); basal diet with association of 0.5 amylolytic enzyme and 0.4 g of proteolytic enzyme (A5P4). The contrasts used to study how differences between treatments were C1: control vs. enzymes; C2: amylolytic enzyme (A5) vs. proteolytic enzyme (A5P2 + A5P4); C3: contrast between doses of the proteolytic enzyme. Treatments did not affect DMI and intake of nutrients. The A5, A5P2, and A5P4 treatments increased yields of milk and fat-corrected milk in comparison with CON. In this same contrast, a tendency towards greater protein yield and an increase in the yield of lactose were observed. Yet, enzyme treatments (A5, A5P2, and A5P4) tended to increase productive efficiency compared with CON. The sorting for feed particles with size <4 mm was lower for cows that received ENZ. Cows fed AP2 and A5P4 showed sorting index for the largest particles in the diet (>19 mm) and lower for small particles when compared to A5. Starch digestibility was greater for cows fed the protease containing treatments (A5P2 and A5P4) than A5, yet a tendency towards higher starch digestibility was observed in cows fed A5P4 compared to A5P2. NDF digestibility was greater in the A5P4 group than A5P2 group. Supplementation with ENZ tended to increase the molar ratio compared to CON, the same in the A5P2 and A5P4 groups. The treatments A5P2 and A5P4 decreased the production of allantoin in the urine, and urine N excretion in the A5P2 group was lower compared to the A5P4. The production of MUN was

greater in cows fed with ENZ than CON and there was a tendency for greater blood urea nitrogen concentration in cows fed ENZ. The addition an association of exogenous enzymes in the diet of lactating cows can be positive, improving starch and NDF digestibility and productive performance.

Keywords: α -amylase, Cellulase, Digestibility, Starch, Protease.

1.2 INTRODUÇÃO

A necessidade de satisfazer as exigências energéticas de vacas leiteiras de alto desempenho resulta em dieta com elevada quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, principalmente de amido, sendo os cereais a principal fonte de energia nas rações para bovinos. O milho e soja são denominados como *commodities* e podem sofrer oscilações de preço com as mudanças no preço do dólar, ou com o uso destes para outros fins que não sejam a alimentação animal. Mesmo quando direcionados a indústria animal, seu uso preferencial na alimentação de monogástricos (aves e suínos) pode restringir a disponibilidade e aumentar seu custo quando usados para espécies ruminantes. Nos últimos anos os cereais e as oleaginosas sofreram aumento significativo em seu custo, com isso produtores tem buscado tecnologias para melhorar a eficiência produtiva de seus rebanhos a fim de propiciar melhor desempenho dos animais, redução dos custos com alimentação e consequentemente maior lucratividade (SAGRILO et al., 2003).

No cenário da produção de ruminantes, com propósito de aumentar a eficiência produtiva, as enzimas se destacam como aditivo alimentar utilizado. As enzimas podem ser produzidas pelo próprio animal, por microrganismos que estão presentes no trato digestivo ou suplementadas dieteticamente (TRICARICO et al., 2008; DILORENZO et al., 2011). Quimicamente as enzimas são proteínas com função principal de atuar como catalisador de processos biológicos acelerando a velocidade de uma reação bioquímica específica. Por essa particularidade, cada enzima degrada substratos específicos em sítios específicos de reação (RAVINDRAN, 2013). As enzimas exógenas são consideradas aditivos que adicionamos na dieta dos animais com intuito de trazer benefícios ao seu desempenho. Normalmente essas enzimas provém de culturas fúngicas (NRC, 2001) e são consideradas extratos naturais que possuem o potencial efeito de melhorar a utilização de nutrientes na dieta elevando a eficiência produtiva de vacas leiteiras, além de não possuírem efeitos nocivos à saúde humana e animal (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Os efeitos no rúmen ligados ao modo de ação das enzimas, de forma geral, incluem hidrólise direta, aumento da ligação de bactérias ao substrato, estimulação da população microbiana como aumento da atividade enzimática total e sinergismo com as enzimas microbianas (MCALLISTER et al., 2001; BEAUCHEMIN et al., 2003). Quanto a função de liberação do substrato ou na remoção de barreiras estruturais que limitam a digestão microbiana dos alimentos no rúmen, como exemplo do milho, a matriz proteica que envolve os grânulos de amido determina a extensão e a taxa de degradação do grão, uma vez que esta matriz é

extremamente resistente a digestão por microrganismos ruminais (MCALLISTER et al., 1993); assim, para melhorar a utilização do amido é comumente empregado algum processamento físico nos grãos para otimizar essa utilização. No entanto, ainda é necessária a presença de proteases capazes de digerir a matriz proteica, expondo os grânulos de amido e melhorando a digestão.

Experimentos avaliando enzimas na dieta de ruminantes têm sido realizados desde a década de 60 (BURROUGHS et al., 1960), porém sua utilização de maneira viável iniciou-se neste século, principalmente em virtude do aumento nos custos dos alimentos concentrados e diminuição nos custos de geração de novas tecnologias para produzir essas enzimas de forma mais consistente.

Conseqüentemente, estudos foram desenvolvidos com enzimas, sendo que as enzimas amilolíticas, em específico, têm sido utilizadas em dietas de ruminantes para aumentar a digestibilidade do amido e produção de leite (TRICARICO et al., 2005; NOZIÈRE et al., 2014; ANDREAZZI et al., 2018), bem como o aumento da digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN; KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011) e melhora no balanço de energia de vacas leiteiras em transição (DEFRAIN et al., 2005).

O estudo *in vitro* desenvolvido por McAllister et al. (1993) com cevada e milho tratados com protease demonstrou aumento na degradação do amido após 16 e 24 horas. A cevada, no mesmo estudo, apresentou aumento na degradação do amido somente após 24 horas, visto que a cevada não possui matriz proteica densa como barreira para a degradação. Esses autores sugerem que outros fatores como carboidratos estruturais, além da matriz proteica, podem ser importantes para limitar o acesso de microrganismos ruminais em grânulos de amido de cevada, mostrando que a digestão de grãos de cereais pode ser mais eficiente pelos microrganismos ruminais com uma integração de enzimas. No presente estudo, considerar a associação de diferentes enzimas pode permitir melhor compreensão sobre a atuação dos microrganismos ruminais em melhorar o aproveitamento dos nutrientes da dieta.

1.3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese deste estudo é que a suplementação dietética com enzimas amilolítica e proteolítica exógenas combinadas em diferentes dosagens afetam positivamente o desempenho produtivo de vacas leiteiras, visto a potencial atuação em sinergismo das enzimas na solubilização e hidrólise do complexo proteico do endosperma em ingredientes como o milho

em especial, e dos demais ingredientes que possam limitar a digestibilidade dos nutrientes da dieta de vacas em lactação.

Objetivou-se determinar os efeitos das enzimas amilolítica e proteolítica exógenas sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite, índice de seleção de partículas, balanço de nitrogênio, derivados de purina, fermentação ruminal, e metabólitos sanguíneos em vacas leiteiras.

1.4 Revisão de literatura

1.4.1 Estrutura do grão de milho e propriedades do amido

O amido é um polissacarídeo não estrutural com função de reserva de energia para os vegetais, sintetizado a partir da glicose oriundo da fotossíntese, sendo encontrado principalmente no endosperma dos grãos de cereais como o milho, sorgo, cevada, dentre outros, além dos tubérculos e raízes. No grão de milho a molécula de amido é composta por dois tipos principais de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina. A amilose é caracterizada como um polímero linear não ramificado de glicose, ligadas por ligações glicosídicas α -1,4; enquanto a amilopectina é altamente ramificada, incluindo ligações do tipo α -1,6 nos pontos de ramificação. Esses polissacarídeos são hidrolisados pelas amilases bacterianas do tipo α e β e também por α -glicosidases. As α -amilases são responsáveis por hidrolisar ligações no interior da cadeia (endoglicosidases), liberando maltose como produto final, já as β -amilases atuam no final da cadeia do polímero (exoglicosidases), liberando glicose, moléculas de amilose e amilopectina (KOZLOSKI, 2017).

As moléculas de amilose e amilopectina são unidas por pontes de hidrogênio, gerando grânulos de amido com estrutura fortemente organizada, formando regiões amorfas e cristalinas. As regiões cristalinas são compostas principalmente por amilopectina, enquanto as regiões amorfas por amilose (MCALLISTER et al., 2006). Nesse sentido, a capacidade de os grãos incharem em contato com água é limitada pela estrutura da amilose, e é o que pode torná-lo menos susceptível a digestão enzimática. Ainda, é discutida a possibilidade das moléculas de amilose promoverem aumento nas ligações de pontes de hidrogênios intermoleculares, o que pode ser o fator limitante ao inchaço do grânulo e à hidrólise enzimática. No entanto, o impacto da relação amilose:amilopectina não é bem determinada na digestão de ruminantes (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986; MCALLISTER et al., 2006).

Em algumas partes do mundo, como a América do Sul, predomina o cultivo e utilização

do milho conhecido como duro ou *flint* (*Zea mays ssp. Indentura*), que contém em sua composição elevada percentagem de endosperma vítreo (CORREA et al., 2002). Os polímeros de glicose encontrados no milho *flint* são definidos pela proporção de amilose e amilopectina. A amilopectina é um polímero maior e mais ramificado no grão e por isso possui maior facilidade na digestão (MENEZES et al., 2017). A amilose tem papel de restringir o inchaço do grânulo. É possível que as moléculas de amilose promovam aumento das ligações de pontes de hidrogênios intermoleculares, o que poderia ser fator limitante ao inchaço do grânulo e à hidrólise enzimática.

Sob a questão estrutural dos grãos de cereais, em especial o milho, são constituídos por uma camada externa protetora chamada pericarpo, rica em fibra e de baixa digestibilidade. No milho, em específico, o pericarpo representa de 3 a 8% do peso do grão. Internamente, encontram-se o endosperma que ocupa a maior parte e se caracteriza por ser rico em amido, podendo ser dividido em endosperma amiláceo ou vítreo. O germe restringe-se a porção mais rica em óleo do grão (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986; MCALLISTER et al., 2006).

Nos grãos do milho *flint* o endosperma vítreo ocupa quase todo o seu volume, tendo baixa proporção de endosperma farináceo. A vitreosidade é definida como a proporção de endosperma duro (vítreo) em relação ao endosperma total, uma vez que a dureza do endosperma é determinada pela composição proteica do grão e pela disposição compacta das moléculas de amido (HARMON e TAYLOR, 2005). Ainda, a vitreosidade do grão está diretamente relacionada a digestibilidade do amido, como já é visto em trabalhos com ruminantes (TAYLOR; ALLEN, 2005; LOPES et al., 2009).

Nos cereais, outros componentes como lipídios, proteínas e minerais estão associados aos grânulos de amido. Os lipídeos estão presentes tanto na superfície quanto no interior do grânulo, podendo estar ligado a amilose formando complexos amido-lipídicos que causam a diminuição da digestão do amido por dificultarem o contato entre enzima e substrato, devido a hidrofobicidade causada por esses complexos (VASANTHAN; BHATTY, 1996). Com isso, os lipídeos presentes nos cereais podem prejudicar a digestibilidade do amido, pois a água é necessária para a degradação enzimática. No milho, esse fato não repercute como um grande problema na digestão, visto que a maior concentração de óleo está no gérmen (82,6%) e somente 15,4% no endosperma, onde está presente a maior parte do amido do grão (98%; PAES, 2006).

Grande parte da porção proteica do grão é composta por prolaminas, no que tange o milho a principal é chamada zeína. Estas fazem parte da matriz proteica que envolve os grânulos de amido sendo mais densa na região vítrea em comparação ao endosperma farináceo, onde os

grânulos de amido estão menos associados a proteína. Por esse fator, a matriz proteica e o endosperma vítreo estão menos susceptíveis ao ataque enzimático, reduzindo a digestibilidade do amido (HARMON e TAYLOR, 2005). Os microrganismos ruminais colonizam inicialmente os grânulos de amido que estão mais expostos e a medida que a digestão acontece o amido vai sendo totalmente digerido, posto que a matriz proteica do grão pode permanecer intacta e a digestão ser ineficiente (MCALLISTER et al., 2006). O tipo das proteínas de armazenamento do endosperma que envolve os grânulos de amido (prolaminas) determinam a digestibilidade do amido do grão, que no caso do milho é denominada zeína, conhecida por ser pouco digestível (MCALLISTER et al., 2006).

A prática comumente usada para o rompimento da matriz proteica é o processamento físico dos grãos a serem ofertados na dieta dos animais, o que pode ser uma alternativa cara ou pouco eficiente quando mal empregada. Estes métodos consistem na laminação, moagem, ou processos como ensilagem do grão úmido e floclação. De modo geral, todos os processamentos visam a quebra do grão, diminuindo o tamanho de partícula, causando o rompimento ou solubilização da matriz proteica e facilitando a exposição e digestão do amido (MCALLISTER et al., 2006). Especialmente no milho, os diferentes métodos de processamento utilizados atualmente visam romper a matriz proteica, com intuito de melhorar a digestão do amido. De acordo com Owens e Soderlund (2006) a digestibilidade do amido de milho dentado no trato digestivo total de bovinos de corte em crescimento e/ou terminação é menor para grão inteiro (87,08%), intermediária para grão laminado a seco (91,03%) e maior para grão ensilado úmido (99,25%) ou floclado (99,09%).

De maneira geral, é importante ressaltar que os microrganismos ruminais se aderem aos carboidratos, fibrosos ou não fibrosos e são degradados por um complexo enzimático até suas unidades essenciais, os monossacarídeos (ANTUNES et al., 2006). Estes entram na célula bacteriana, onde são metabolizados até piruvato, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), a principal fonte de energia para o ruminante (ANTUNES et al., 2006). Por fim, a taxa e extensão da digestão ruminal do amido nos cereais dependem de uma série de interações complexas entre microrganismos ruminais, estrutura do grão e o método de processamento empregado.

1.4.2 Sítio de digestão e eficiência energética do amido

A digestibilidade do amido no trato digestivo total em ruminantes varia de 70% a 100% (FIRKINS et al., 2001) enquanto em seu principal sítio de digestão, que é o rúmen, a

digestibilidade aparente do amido varia de 47% a 90% (HUNTINGTON, 1997; FIRKINS et al., 2001). A digestão do amido em ruminantes demanda de processos mecânicos, da ação dos microrganismos ruminais e de enzimas ao longo de todo o trato gastro intestinal, iniciando-se na mastigação por meio da maceração do alimento e ação da α -amilase salivar, que é mínima nos ruminantes (SWENSON; REECE, 1986). No rúmen, o primeiro passo no processo de fermentação do amido é a hidrólise pela ação de enzimas secretadas pelos microrganismos ruminais, principalmente bactérias amilolíticas. As principais bactérias associadas a degradação do amido são: *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*, seguida da *Pretovella ruminicola* e *Butyrivibrio fibrisolvens* (COTTA, 1988). A degradação por essas bactérias envolve a secreção de diversas enzimas (α -amilase; β -amilase; amiloglicosidase; isoamilase; fosforilase; pululanase) que atuando em conjunto vão quebrar as ligações α -1,4 e α -1,6 (MCALLISTER et al., 2006). Após a molécula de amido ser reduzida a oligossacarídeos, dissacarídeos ou monossacarídeos, especialmente maltose e glicose, as bactérias sacarolíticas fermentarão estes substratos rapidamente através da via glicolítica, para produzir piruvato. Este composto é o intermediário através do qual todos os carboidratos passam para posteriormente gerar os AGCC (KOZLOSKI, 2017). Esses processos bioquímicos que dão origem ao piruvato e posterior AGCC geram ATP que, por sua vez, é caracterizado como principal fonte de energia para o metabolismo das bactérias. A partir da digestão dos carboidratos, como o amido, as bactérias utilizam os substratos para a síntese de proteína microbiana, geração de CO_2 e CH_4 (YOKOHAMA E JOHNSON, 1988; KOSLOSKY, 2017).

Os protozoários também possuem papel importante na digestão ruminal do amido, a qual ocorre através do engolfamento das partículas de amido e de forma mais lenta quando comparado com a fermentação por bactérias, podendo levar até 36 horas para total digestão e resultando também em AGCC. Por se tratar de digestão mais lenta, pode auxiliar na manutenção do pH ruminal, impedindo quedas bruscas. Da mesma forma que para as bactérias, esse processo visa a produção de ATP como fonte de energia para o crescimento e multiplicação dos protozoários (YOKOHAMA e JOHNSON, 1988; JOUANY e USHIDA, 1999).

Discute-se que a eficiência energética da digestão do amido no intestino delgado é menos limitada. Isso acontece devido a produção de calor e metano ser insignificante no intestino delgado (HUNTINGTON et al., 2006). Apesar do rúmen ser o principal sítio de digestão do amido, alguma porção do amido pode escapar da fermentação ruminal, isso pode ser causado pelo tipo de processamento dos grãos, níveis de nutrientes na dieta total e taxa de passagem, permitindo que ocorra digestão pós ruminal (FOLEY et al., 2006). No intestino delgado o amido pode ser digerido até glicose por enzimas de origem pancreática ou por maltase

e isomaltase produzidas pela própria mucosa (HUNTINGTON et al., 2006).

No intestino delgado a absorção da glicose se dá pelo transporte ativo consumindo ATP, contra uma absorção por difusão dos AGCC no rúmen e no intestino grosso (BALDWIN, 1968; WEBSTER, 1980). Para absorção no intestino e passagem pelo lúmen intestinal, a glicose faz o uso de transportadores. Até pouco tempo acreditava-se que o principal meio de absorção intestinal de glicose seria mediado pelo transportador sódio dependente SGLT1, com gasto de energia (ATP) durante o processo. Mais recentemente tem havido evidências que o transportador GLUT2, pode ser a principal via de absorção de glicose. Por esta via não há gasto de energia para a absorção de glicose (HARMON, 2009).

Há discussões desde Russell et al. (1981) que a secreção da α -amilase no intestino é diretamente relacionada com a chegada de energia no intestino, no entanto houve confundimento entre consumo de amido e energia, e que este último sim é o fator determinante para a secreção de α -amilase pancreática. Outra discussão importante foi levantada por Huntington et al. (1997) que hipotetizaram que existe falta de resposta adaptativa do pâncreas dos ruminantes ao aumento do amido na dieta, podendo ser este um dos fatores que limita a assimilação do amido pelo intestino delgado. Posteriormente, Harmon et al. (2005) com gado de corte, sugeriram que o aumento da energia da dieta, independente da origem dos carboidratos, seriam capazes de aumentar a secreção e produção de α -amilase no intestino delgado. Estes autores acreditam também que o suprimento de proteína no quimo que entra no intestino delgado também influenciaria na maior secreção de enzimas pancreáticas. Mais tarde, Harmon (2009) realizou ensaio onde infundiram caseína e amido no intestino, e obteve como resultados aumento na quantidade de glicose drenada na veia porta quando a caseína estava presente; nesse sentido, o autor sugeriu que a presença de caseína de alguma forma teria melhorado a assimilação do amido. A hipótese levantada por ele seria que a colecistoquinina, por ser sensível a presença de proteases e teria a capacidade de estimular a secreção de enzimas produzidas pelo pâncreas, estas que atuam na digestão de carboidratos como o amido. Por fim, esse autor discute que o sistema de controle principal parece ser mesmo o consumo de energia e que, por sua vez, aumenta a produção e fluxo de proteína microbiana permitindo estimular a secreção de α -amilase.

O amido de menor digestibilidade, que não foi digerido no rúmen nem no intestino delgado, é novamente submetido à fermentação e ação de enzimas microbianas no intestino grosso, produzindo AGCC, proteína microbiana, metano e calor. Sendo que os AGCC produzidos nesse compartimento normalmente são pouco aproveitados e a proteína microbiana pouco absorvida (OWENS et al., 1986).

1.4.3 Enzimas exógenas na nutrição animal

As enzimas são biocatalisadoras produzidas por células vivas com o objetivo de provocar reações bioquímicas específicas (GURUNG et al., 2013). Dentro do contexto que as enzimas são aditivos alimentares, elas são utilizadas com o intuito de catalisar reações que degradam os substratos, sendo digeridos em seus componentes químicos, por exemplo, açúcares simples, aminoácidos, ácidos graxos; e esses serão usados para o crescimento celular, seja por microrganismos ruminais ou pelo animal hospedeiro.

Por serem denominadas proteínas, as enzimas têm importante implicação para sua estabilidade em altas temperaturas e durante o trânsito no trato digestório, podendo ser desnaturadas pelo calor e pH, e ainda podem ser submetidas a proteólises por enzimas digestivas ou bacterianas. O pH ideal para estabilidade das enzimas está entre 4 e 6, além de ser necessário o fornecimento de substrato constante e inalterado (LEHNINGER, 2005).

Os produtos com enzimas são relativamente estáveis no ambiente ruminal, especialmente quando administrados com os alimentos (HRISTOV et al., 1998; MORGAVI et al., 2000; 2001). Morgavi et al. (2001) concluíram que a estabilidade ruminal parece não ser um fator limitante para a atividade de aditivos de enzimas alimentares provenientes do fungo *Trichoderma*. Ainda, os autores constataam que as enzimas provenientes da *Trichoderma*, tendem a ser mais afetadas pelas proteases gastrointestinais e pelo pH no abomaso e intestinos do que pelas proteases ou pelo ambiente ruminal de forma geral. No entanto, um aumento na atividade enzimática total no rúmen pode aumentar a capacidade hidrolítica ruminal, o que pode melhorar a digestibilidade da dieta, em vez de apenas se limitar aos componentes específicos direcionados pela enzima (BEAUCHEMIN et al., 2004).

Na alimentação animal o uso de enzimas iniciou por volta de 1980, com maior foco em aves e suínos, sendo que o uso desses aditivos era caro e sua eficiência ainda era duvidosa. Nos últimos anos, com a busca por alternativas que melhorem a eficiência na produção animal a pesquisa com enzimas vem crescendo, visto seu potencial de degradar componentes específicos da dieta, permitindo maior aproveitamento dos nutrientes aumentando a eficiência alimentar (BARLETTA, 2011). No entanto, a utilização de enzimas na dieta de ruminantes é relativamente baixa, pela variabilidade de respostas observadas nos estudos, quantidade de produtos fornecidos no mercado e o seu modo de inclusão que pode ser na dieta total, concentrado, diretamente no rúmen ou no processo de ensilagem ou colheita de algum alimento (ARRIOLA et al., 2017).

Muitos benefícios estão relacionados ao desempenho animal com a inclusão de enzimas exógenas na dieta. O primeiro deles é a capacidade de degradar ligações específicas dos alimentos que comumente não são hidrolisadas por enzimas digestivas endógenas. Outro papel importante é a inibição dos fatores anti-nutricionais que prejudicam a digestão dos alimentos, permitindo o rompimento de barreiras presentes nos grãos e liberando os nutrientes, o que pode trazer benefícios a síntese de proteína microbiana pelos microrganismos ruminais. Além disso, as enzimas exógenas podem permitir a mudança no sítio de digestão para locais com maior eficiência de absorção de transformação de nutrientes em energia (SELLE E RAVINDRAN, 2007).

Ao adicionar enzimas exógenas na dieta de vacas em lactação a população microbiana atua de forma cooperativa com a ação da atividade enzimática naquele sítio de digestão favorecida pela inclusão da enzima, melhorando fatores como a fixação microbiana ao substrato (BEAUCHEMIN et al., 2003; IMMANUEL et al., 2006). Conseqüentemente, pode melhorar a digestibilidade da dieta devido ao aumento da atividade enzimática no rúmen (SELL; RAVINDRAN, 2007).

As discussões das formas de aplicação das enzimas é um ponto importante visto que algumas enzimas são mais eficientes quando aplicadas em alimentos com maior umidade, como as silagens, em virtude do maior teor de água ser importante na hidrólise de polímeros de açúcares solúveis (BEAUCHEMIN et al., 2003). Outras enzimas podem ser mais eficientes quando adicionadas de forma líquida em alimentos mais secos, como os fenos (REDDY et al., 2016). De modo geral, as enzimas são estáveis no rúmen, especialmente quando adicionadas com os alimentos, como no concentrado ou na mistura total da ração (TMR). Isso ocorre principalmente devido ao menor pH e menor proteólise ruminal que ocorre logo após a alimentação das vacas, o que ajuda a estabilizar as enzimas, melhorando sua eficiência (HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 1998; MORGAVI et al., 2001).

Na meta análise desenvolvida por Arriola et al. (2017), os autores avaliaram diferentes métodos de aplicação da enzima fibrolítica na forma sólida ou líquida e, em componentes como forragem, concentrado e TMR. Como resultado obtido, a inclusão da enzima fibrolítica na TMR melhorou a concentração de proteína no leite, mas não observaram esse resultado quando aplicada exclusivamente no volumoso ou no concentrado. Melhorar a taxa e extensão da digestão dos nutrientes no rúmen estão associados com maior síntese de proteína microbiana, em especial substratos amiláceos de fermentação rápida, que disponibilizam energia para os microrganismos de forma rápida e constante (FIRKINS et al., 1998; CONE; BECKER, 2012). No estudo desenvolvido por Gado et al. (2009) com vacas leiteiras, utilizando um produto

comercial que continha uma mistura de enzimas (protease, celulase, xilanase e amilase), os autores especularam que o aumento da síntese de proteína microbiana estava relacionado ao estímulo e sinergismo das bactérias no rúmen, que por sua vez, pode ser resultado da melhor digestibilidade dos nutrientes da dieta, em especial a fibra. No entanto, Nozière et al. (2014) avaliaram os efeitos da suplementação com 10 g/dia de enzima amilolítica exógena na dieta de vacas leiteiras, e apesar de mostrar aumento na digestibilidade do amido, não observaram diferenças na síntese de proteína microbiana. Já Toseti et al. (2020) observaram que bovinos de corte em terminação que receberam amilase associada a óleos essenciais na dieta aumentaram a síntese de proteína microbiana em comparação aos animais que receberam monensina.

É importante ressaltar o modo de ação das enzimas exógenas, que atuam de forma sinérgica e estimulam a população presente no rúmen (MCALLISTER et al., 2001; BEAUCHEMIN et al., 2003). Esses aspectos associados ao fato de que a dieta de ruminantes contém grande número de alimentos, sejam eles forragens ou grãos, o ideal seria que diversos tipos de enzimas fossem empregados em única dieta para buscar maior eficiência na digestão. Tendo em vista a especificidade da atuação de cada enzima, muito provavelmente esse seja o maior impasse na utilização dessa alternativa. Levando em conta essa ideia, trabalhar com mais de uma enzima na mesma dieta pode ser uma alternativa viável, e alguns estudos foram redigidos para avaliar os efeitos de diferentes enzimas em associação (GADO et al., 2009; ZILIO et al., 2019), abordados ao longo da presente dissertação. McAllister et al. (2001) e Beauchemin et al. (2003) discutem que a maioria das pesquisas com enzimas para ruminantes são fibrolíticas e foram estudadas com o intuito de melhorar a utilização de nutrientes provenientes dos ingredientes de baixo custo relativo quando comparado aos cereais. Uma abordagem com enzimas que beneficiem a maioria das dietas ou pelo menos os ingredientes mais caros, como os cereais, presentes em grande concentração na dieta de animais confinados, pode ser uma alternativa mais vantajosa a ser pensada.

1.4.5 Enzimas amilolíticas na nutrição de ruminantes

A origem das enzimas pode ser por bactérias, fungos ou leveduras. Especificamente a enzima amilolítica, o objetivo é a extração da amilase, enzima essa que ajuda na quebra do amido em açúcares intervindo nas ligações α -1,4, produzindo mistura de glicose, maltose e dextrinas. O *Aspergillus oryzae* é o microrganismo mais utilizado na extração da amilase (TRICARICO et al., 2008). No entanto, outros microrganismos podem ser utilizados para a

produção de amilase, como *Bacillus licheniformis*, *Chromohalobacter sp.*, *Halobacillus sp.*, *Haloarcula hispanica* e *Halomonas meridiana* (ROJO et al., 2005; PRAKASH et al., 2009).

Estudos utilizando α -amilase proveniente de *A. oryzae* mostram que a suplementação com a enzima não aumentou a digestibilidade ruminal do amido, mas modulou a fermentação ruminal, aumentando a concentração de acetato e butirato e diminuindo a concentração de propionato (TRICARICO et al., 2005; KLINGERMAN et al., 2009). Acredita-se que isso ocorre devido a alteração do metabolismo microbiano ou alteração da população microbiana no rúmen (TRICARICO et al., 2008).

Nesse sentido, em estudos que foi adicionado α -amilase em dietas ricas em amido, observou-se que essa alteração no metabolismo microbiano se deu pelo crescimento de espécies de bactérias não-amilolíticas de maneira mais rápida do que as bactérias amilolíticas, sugerindo que de fato a população produtora de acetato e butirato se beneficia da α -amilase (COTTA et al., 1988).

Tricarico et al. (2008) examinaram a adição de produto comercial contendo a maltodextrina com vários graus de polimerização como fonte de carboidrato e verificou que o crescimento de *B.fibrisolvens*, uma das bactérias conhecidas como beneficiadoras de amido e que crescem normalmente de forma lenta, pode crescer de forma mais rápida e eficiente em maltodextrina com baixo grau de polimerização com ou sem a adição da α -amilase. Quando incluído com maltodextrina de alta polimerização a α -amilase acelerou o crescimento dessa bactéria. As maltodextrinas são resultados da hidrólise do amido, composto por uma mistura de vários oligômeros da glicose, e podem ser utilizadas por diversas bactérias ruminais, como as não amilolíticas.

Ainda, trabalhos conduzidos por Cotta (1992) e Tricarico et al. (2008) demonstraram que as bactérias que estão presentes no ambiente ruminal rico em amido, neste caso, *Selenomas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, e que se caracterizam por crescerem lentamente nesse meio, são capazes de crescer rapidamente em meio rico em maltodextrinas. Da mesma forma foi verificado em outros trabalhos que produtos gerados por bactérias celulolíticas podem ser utilizados por bactérias não celulolíticas (RUSSEL, 1985). Essas informações sugerem que os microrganismos que fazem parte do ecossistema ruminal têm a capacidade de utilizar produtos da hidrólise gerado por outras espécies. De fato, estudos corroboram com a ideia de que a adição da amilase exógena na dieta de vacas leiteiras melhora a digestibilidade da fibra (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011).

Klingerman et al. (2009) em estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a adição da amilase exógena na dieta pode melhorar o desempenho animal. Nozière et al. (2014) demonstraram que

o uso de amilase na dieta de vacas leiteiras aumentou em 65 g/kg a digestibilidade do amido no rúmen. Klingerman et al. (2009) e Gencoglu et al. (2010) observaram aumento na digestibilidade da FDN, ambos em vacas leiteiras, assim como Gallo et al. (2016), que observaram efeito da amilase nos padrões de fermentação ruminal *in vitro* com diminuição do tempo de colonização e taxa de degradação do amido. Em contrapartida, alguns trabalhos observaram que os efeitos da amilase exógena para vacas leiteiras são mínimos quando adicionadas em dietas com teor de 21% de amido, considerado baixo (FERRARETTO et al., 2011; WEISS et al., 2011; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014).

Weiss et al. (2011) utilizando quadrado latino em arranjo fatorial 2×2 testaram a adição de amilase em dietas com 26 e 31% de amido proveniente principalmente de milho moído grosseiramente (1,42 mm) para vacas em lactação, e não observaram efeito de interação entre os tratamentos, mas, encontraram que dietas ricas em amido apresentam maior digestibilidade da MS, matéria orgânica (MO) e energia do que dietas com baixo teor de amido. Além disso, dietas com adição da amilase tiveram maior digestibilidade do FDN do que dietas sem amilase. Os autores concluem que adicionar amilase ao concentrado com milho moído grosseiramente, independente do teor de amido, não afeta o desempenho produtivo.

Tricarico et al. (2005) avaliaram a inclusão de doses dietéticas crescentes do extrato de *A. oryzae* (AmaizeTM, Alltech) no desempenho produtivo de vacas em lactação recebendo dieta com 27,1% de amido, e observaram efeito quadrático positivo para a produção de leite e de gordura no leite sem alteração na ingestão de MS. Além disso, a suplementação com enzimas aumentou linearmente a proporção de acetato e diminuíram linearmente a proporção de propionato no rúmen. Os autores sugerem que a enzima amilolítica, além de melhorar a produção de leite, pode servir como modulador ruminal.

Já o estudo realizado por Takiya et al. (2017) com vacas leiteiras demonstraram que a suplementação com doses crescentes da enzima amilolítica em dietas com 29,2% de amido não afetaram a eficiência alimentar, produção de propionato e de proteína microbiana no rúmen de vacas em lactação, mas os tratamentos aumentaram linearmente a digestibilidade de proteína bruta e o peso corporal das vacas. Silva et al. (2018) ao estudarem aditivos na alimentação de vacas em lactação, sendo um dos tratamentos constituído por uma mistura de óleos essenciais e α -amilase, observaram aumento nas concentrações ruminiais de acetato e butirato, além de redução na concentração de N-NH₃ no rúmen. Puderam observar também que houve melhora na transferência de N para o leite, permitindo aumento no teor e produção de proteína do leite, apesar disso os autores relataram que não foram encontrados efeitos sinérgicos entre uso do óleo essencial com α -amilase. Ainda, neste mesmo trabalho os autores observaram tendência

em aumentar o CMS, consumo de proteína e consumo de FDN para os grupos que continham óleos essenciais e α -amilase contra o grupo com monensina.

Tricarico et al. (2014) realizaram experimentos para avaliar os efeitos da amilase proveniente da fermentação de *A. oryzae* (Amaize™, Alltech Inc.) na dieta de bovinos de corte em terminação. Para os diferentes experimentos foi avaliado ingestão de MS, conversão alimentar e ganho médio diário dos animais. Inicialmente os autores não observaram efeito da enzima nos animais alimentados com diferentes fontes de volumoso (feno de alfafa ou casca de caroço de algodão). Posteriormente, os autores utilizaram novilhas recebendo milho quebrado ou grão úmido e suplementação de amilase em três doses, e também não observaram efeitos com as adições da amilase. Neste último estudo verificou o efeito da suplementação de amilase no crescimento de novilhos com restrição de ingestão de MS e também não encontraram diferenças nos parâmetros avaliados.

A utilização da suplementação com associação de um complexo enzimático contendo enzimas fibrolíticas e amilolíticas na dose de 10 g/d em vacas leiteiras estudada por Hristov et al. (2008) não resultou em efeito na digestibilidade de nutrientes e nos parâmetros fermentativos. Ainda, Zilio et al. (2019) também testaram a associação de amilolítica e fibrolítica na dosagem de 12 g/dia e 8 g/d respectivamente, por animal no concentrado, e observaram que a associação de enzimas não foi eficiente em melhorar o desempenho e a digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação.

De modo geral, estudos citados nesta revisão sugerem que a ação da amilase apresenta relação com a concentração de amido e digestibilidade de FDN na MS da dieta. Contudo, ainda com resultados inconsistentes, as enzimas podem mostrar efeitos positivos no desempenho produtivo de vacas em lactação com teores de amido da dieta mais elevados. Da mesma forma em gado de corte, que na maioria dos trabalhos possibilita maior ganho médio diário.

1.4.6 Enzimas proteolíticas na nutrição animal

Quanto a nomenclatura das enzimas proteolíticas os termos usados são “proteases” ou “peptidases”, que tem como ideia indicar que as enzimas hidrolisam ligações peptídicas, não havendo diferença de significado de protease e peptidase (RAWLINGS, 2004). A enzima proteolítica usada nesse estudo (Vegpro™, Alltech® do Brasil Ltda.) já foi amplamente testada em aves e suínos, mas até onde sabemos este é o primeiro trabalho com vacas em lactação.

Trabalhos com a enzima proteolítica realizados com leitões e em níveis crescentes da enzima (2, 4 e 6 kg por tonelada de ração), em dietas contendo milho e farelo de soja,

observaram resultados em relação a conversão alimentar de 1,60, 1,52 e 1,60 para dietas suplementadas com 2, 4 e 6 kg de protease/ton, respectivamente. Houve aumento linear no ganho de peso dos leitões de acordo com as doses da enzima (DE OLIVEIRA TEIXEIRA et al., 2005).

Ainda, no trabalho de Moura et al. (2007) foi avaliado a digestibilidade dos nutrientes quando empregada a protease na dieta de tilápias, e resultou em melhor coeficiente de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, energia bruta, amido, cálcio e fósforo para os peixes que tiveram a adição do complexo enzimático à ração na inclusão de 0,5% da dieta. A enzima proteolítica melhorou o ganho de peso e conversão alimentar independentemente do tipo de processamento da soja quando testada em frangos de corte. Além disso, na digestibilidade dos frangos a protease melhorou os valores de digestibilidade para MS e PB com soja extrusada (88% de solubilidade; BRITO et al., 2006).

O trabalho realizado para testar a atividade da enzima proteolítica em diferentes temperaturas e pH (DIAS et al., 2002), estudou a atividade da enzima e medida com base na sua atividade, em μ moles de tirosina liberada/minuto de substrato de caseína (YU; TSEN, 1993). Os resultados sugerem que essa enzima é capaz de suportar altas temperaturas, chegando de 70 a 90 °C com valores de pH 5,0; e a avaliação com pH 2,3 sem pepsina e pH 2,3 com pepsina a enzima foi eficiente em todos os cenários avaliados, sendo capaz de exercer sua função.

Além disso, em um estudo *in vitro* testando a enzima proteolítica, onde foi incubado semente de canola com a enzima líquida a 37 °C e agitação suave durante 3 horas, foi observado que a enzima tem capacidade de melhorar a digestibilidade do FDN. Nesse trabalho foi notado que por a canola conter em sua composição barreira estrutural que contém aproximadamente 12-16% de proteína e 44% de fibra bruta, sendo desta a maior parte celulose 32%, esses componentes estruturais do tegumento estariam intimamente associados e degradação e provavelmente se quebrado, iria expor as demais estruturas adicionais ao ataque enzimático. Além disso, foi visto que a celulase e a protease tiveram claro efeito sinérgico em termos de expor a canola a degradação, melhorando a degradação dos componentes fibrosos das sementes (WALSH; POWER; HEADON, 1993).

De modo geral, enzimas exógenas especialmente proteolíticas têm sido exploradas como alternativa associada ao processamento físico de cereais, como o milho, em dietas de ruminantes, com a ideia de destruir as barreiras estruturais que impedem o acesso aos grânulos de amido pela α -amilase (MCALLISTER; RIBEIRO, 2013; AMARO et al., 2021). Estudos com enzimas proteolíticas têm despertado o interesse de pesquisadores recentemente, no

entanto a literatura ainda é limitada e com resultados controversos em relação a adição de proteases em grãos de milho seco e seus efeitos quando comparado com as demais enzimas estudadas. Com ruminantes, proteases exógenas ou misturas de enzimas que contenham proteases foram avaliadas na TMR de vacas leiteiras e de corte, e esses estudos relataram efeitos benéficos no desempenho produtivo (EUN; BEAUCHEMIN, 2005; GADO et al., 2009) ou nenhum efeito (VERA et al., 2012; MESCHIATTI et al., 2019). Esses trabalhos serão descritos posteriormente, nesta mesma seção.

A utilização das proteases como aditivos para silagem tem sido mais explorada e de bastante relevância, com o intuito de durante a fermentação reduzir as subunidades da zeína e ainda auxiliar acelerando o processo de fermentação permitindo fixação microbiana, visto que a digestibilidade do amido é diretamente relacionada com a quebra da matriz proteica que envolve os grânulos (HOFFMAN et al., 2011; GIUBERTI et al., 2014). Essa barreira proteica compreendida no grão de milho pode ser reduzida com o tempo de ensilagem, para correlacionar esse fato com a importância da atividade proteolítica eficiente na silagem. Hoffman et al. (2011) submeteram a planta de milho inteira com alta umidade a 240 dias de ensilagem e observaram que houve diminuição na concentração das zeínas no endosperma do grão de milho por meio da solubilização ou atividade proteolítica dos microrganismos presentes na silagem. Sendo assim, o processo de ensilagem do material junto com a ação das enzimas parece ser eficiente na diminuição dessas proteínas hidrofóbicas que envolvem o grânulo de amido.

Diversos trabalhos realizados com a adição da enzima na silagem apresentam resultados com maior digestibilidade do amido quando comparado ao grupo controle, (YOUNG et al., 2012; KUNG; WINDLE; WALKER, 2014; FERRARETTO et al., 2015; DER BEDROSIAN; KUNG, 2019). No estudo realizado por Ferraretto et al. (2015) foi testada inclusão da enzima proteolítica na silagem de milho grão úmido reidratado e grão úmido, ensilado ou não em curtos períodos. Os resultados obtidos pelos autores em ensaio *in vitro* confirmaram que a adição da protease aumenta a digestibilidade ruminal do amido da silagem de milho reidratado e de grão úmido, e do grão reidratado sem ser ensilado, mas com melhores resultados quando é feita a ensilagem permitindo a fermentação do alimento.

Eun e Beauchemin (2005) trabalharam com vacas em lactação testando a adição de enzimas proteolíticas na forma líquida na dieta (Protex 6L[®]- Genencor International[®], Rochester, NY). A dieta continha diferentes fontes e inclusões de volumosos, sendo silagem de cevada e feno de alfafa nas relações volumoso concentrado de 60:40 vs. 34:66 na MS, e verificaram que a adição da enzima proteolítica na dieta melhorou a digestibilidade aparente

total da MS, MO, proteína bruta (PB), FDN e fibra em detergente ácido (FDA) com melhores resultados para o grupo com baixo volumoso em comparação ao de alto volumoso. No entanto, nos grupos com adição da enzima proteolítica, independente do volumoso, resultou em diminuição do consumo de matéria seca das vacas, sendo compensado pela melhor digestibilidade dos nutrientes da TMR, porém diminuiu a produção de leite. Ainda nesse estudo, foi encontrado maior eficiência produtiva, expressa em produção de leite/kg de MS consumida, no grupo das vacas que receberam baixa forragem com inclusão da enzima proteolítica. Ainda, aumento na porcentagem de gordura e lactose do leite e diminuição da proteína no leite das dietas das vacas alimentadas com baixo volumoso foram encontrados, independente da inclusão da enzima.

Outro resultado interessante foi a diminuição do pH do rúmen na dieta com baixo volumosos e adição da enzima proteolítica, quando comparado ao grupo de baixo volumoso sem a enzima. Eun e Beauchemin (2005) discutem que isso se deve provavelmente pelo aumento na digestibilidade da TMR, podendo ter ocasionado uma leve acidose que pode ser a justificativa para os efeitos negativos no consumo, visto que o pH deste grupo ficou em 5,5. Por fim, os autores reforçam os dados citados anteriormente nesta revisão de que as enzimas exógenas agem sinergicamente com a microbiota ruminal, visto que a inclusão da enzima proteolítica contribuiu para a melhor digestibilidade da fibra, onde foram observados o aumento na atividade de xilanases e endoglucanases.

O estudo dirigido por Gado et al. (2009) trabalharam com vacas da raça Pardo Suíço e testaram um produto com enzimas bacterianas com diversas atividades, dentre elas a de protease. Além da protease, continha celulase, xilanase e amilase nas dosagens de 1 U/g de celulase, 2,3 U/g de xilanase, 61,5 U/g de α -amilase e 29,2 U/g de proteases. As enzimas foram adicionadas na dosagem de 40g/vaca/dia do produto (ZADO[®]), numa relação volumoso concentrado de 70:30, e aplicado diariamente na TMR. Os resultados obtidos foram o aumento na produção de leite e proteína no leite (12,8-15,7 e 0,45-0,57 kg/d, respectivamente), assim como aumento na síntese de proteína microbiana para o grupo com adição do produto. Além disso, a inclusão influenciou positivamente o consumo de MS e MO, da mesma forma a digestibilidade aparente total, sendo maior para todos os nutrientes e ainda mais claro para FDN e FDA (418–584 e 401–532 g/kg, respectivamente) do que para os outros nutrientes, o que provavelmente explica o aumento na produção de leite. Os autores relataram ainda aumento da amônia no rúmen nos animais alimentados com as enzimas, o que foi atribuído pela presença de proteases no aditivo, o que também suporta a ideia de aumentar a capacidade de degradação da proteína no rúmen.

Há discussão que o aumento da degradação da proteína no rúmen pode resultar no pH ruminal mais neutro com a presença da enzima, aumentando a colonização bacteriana ruminal nas partículas de alimento (MORGAVI et al., 2000; NSEREKO et al., 2000; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 2000). Nesse contexto, um estudo com produto enzimático com alta atividade de xilanases concluiu que as enzimas exógenas possuem maior atividade quando o pH está próximo a neutralidade, e a hipótese de que as enzimas exógenas afetam a digestão quando os valores de pH não estão ideais para a degradação da fibra não foi totalmente elucidada (COLOMBATTO; BEAUCHEMIN, 2009).

Amaro et. al. (2021) testaram 3 proteases bacterianas (11P14L, 12P7L e 13P30L) na digestibilidade *in vitro* da MS e do amido de grãos de milho dentado seco e moído. Doses crescentes das enzimas (0; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,00 mg/g de substrato) foram aplicadas diretamente ao substrato e incubados em fluido ruminal por 7 h. As menores doses das proteases exógenas (11P14L e 12P7L) aumentaram a digestibilidade da MS em 98 e 87% e a digestibilidade do amido em 57% e 64%, respectivamente, enquanto a maior dose de 13P30L aumentou a digestibilidade da MS em 44,8% e de amido em 30%, em relação ao controle. Por conclusão os autores esclarecem que a digestibilidade *in vitro* da MS e do amido foram aumentados por todas as proteases testadas, sendo a 13P30L em sua maior extensão. Ainda, relataram que o uso de proteases exógenas pode aumentar a digestibilidade do amido ao quebrar a barreira estrutural, aumentando o acesso das amilases aos grânulos de amido que estão dispostos no interior do grão.

Outros estudos foram conduzidos para determinar os efeitos das proteases exógenas *in vitro*. Colombatto et al. (2003) evidenciaram melhorias na digestibilidade do FDN em feno de alfafa e TMR em dietas a base de silagem de milho e alfafa com adição de produto composto por atividade proteolítica, mas sem atividade de celulase ou xilanase (Protex 6L[®], Genencor International[®], Rochester, NY). Posteriormente, Colombatto e Beauchemin (2009) testaram esse mesmo produto com avaliações *in vitro* e foi utilizado como substrato o feno de alfafa, silagem de milho e milho laminado a seco e TMR composta dos três ingredientes. Foi relatado maior digestibilidade da MS *in vitro* dos substratos, incluindo da TMR após 22 h de incubação. Ainda, o estudo apresentou respostas quadráticas na digestibilidade *in vitro* da MS e FDN do feno de alfafa e maior degradabilidade da proteína.

A planta de alfafa se caracteriza por conter grandes quantidades de proteína de parede celular (BACIC et al., 1988) e a tirosina dessa parede pode ter uma ligação cruzada com a lignina e os polissacarídeos (JUNG, 1997). Os autores mencionaram que a protease utilizada nesse estudo pode ter como alvo essas ligações cruzadas com resíduos de tirosina, acelerando

o processo de fermentação pelos microrganismos, sendo essa a causa importante da discussão no artigo, onde é mensurado que a maior digestibilidade da fibra do feno de alfafa é, possivelmente, resultado da maior degradabilidade da proteína, devido a ação da protease. Por fim, apoiando essa ideia, alguns trabalhos sugerem que de fato os resíduos de tirosina podem ser o local de reconhecimento para algumas proteases (MEANS e FEENEY, 1971; KOPECNY; WALLACE, 1982).

Com gado de corte, especificamente Angus, Vera et al. (2012) avaliaram a enzima proteolítica exógena (27 mg de azocaseína hidrolisada/min/kg MS na TMR) em dietas de crescimento e terminação de alto concentrado contendo 30% de grãos secos de destilaria (DDG). A adição da enzima durante a fase de crescimento aumentou o CMS (+1 kg/d) mas não teve efeitos no peso final, ganho médio diário (GMD) e eficiência alimentar (GMD (kg)/CMS (kg)). Ainda, os autores observaram redução na digestibilidade do FDN, e não observaram efeito na digestibilidade da MS, PB e FDA, contudo isso não impactou no crescimento. Já na fase de terminação, a enzima proteolítica aumentou a digestibilidade da MS, PB, FDN e FDA.

Vera et al. (2012) conduziram testes *in vitro* com culturas contínuas, onde a dieta continha ou não DDG e com inclusão ou não da enzima proteolítica, totalizando 4 tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que a enzima tendeu a aumentar as concentrações de AGCC em ambas as dietas e aumentou a digestibilidade da MS, MO e FDN quando adicionado a dieta sem DDG. Os autores concluíram que o uso da enzima beneficia a digestão da fibra, devido aos resultados positivos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Ressaltaram ainda que, embora alguns resultados *in vivo* e *in vitro* não sejam compatíveis, a enzima proteolítica foi benéfica em dietas de terminação e sugere que pode ser mais eficaz nessas dietas de terminação para gado de corte com alto teor de concentrado contendo DDG.

A associação entre aditivos foi estudada anteriormente em bovinos da raça Nelore em confinamento no estudo de Meschiatti et al. (2019), citado na sessão anterior. Foram testados monensina e a associação de óleos essenciais, enzimas proteolíticas e amilolíticas. A enzima proteolítica utilizada nesse estudo foi a RONOZYME[®] ProAct (DSM[®] Nutritional Products, Basel, Suíça). Os autores observaram que a dieta que continha óleos essenciais, enzima amilolítica e proteolítica diminuiu o CMS, bem como o GMD nos períodos avaliados, mas a eficiência alimentar reduziu apenas quando avaliado todo o experimento, quando comparado com o grupo que continha somente óleos essenciais e enzima amilolítica. Também, o consumo dos nutrientes, exceto o extrato etéreo e proteína, foi menor para o grupo que continha protease em comparação ao grupo com óleos essenciais e amilase, mas sem diferenças na digestibilidade do trato total entre esses dois grupos. A digestibilidade aparente total de proteína foi maior para

os animais alimentados que tinham a inclusão de protease na dieta do que para os que tinham somente a monesina. Ainda, a adição da protease resultou em maior digestibilidade aparente total de FDN e amido em relação a monensina. Resultados relacionados a carcaça foram menor peso da carcaça quente (20 kg menos) e a área de olho de lombo foi menor para o grupo que tinha a inclusão da protease em comparação ao grupo somente com óleos essenciais e amilase.

Meschiatti et al. (2019) discutem ainda, que o decréscimo no CMS no grupo com a protease pode ser relacionada a maior degradação ruminal dos alimentos derivados de soja, diminuindo o fornecimento de PNDR, que por consequência poderá diminuir o CMS e o desempenho. Também mencionaram que as enzimas exógenas, especialmente a proteolítica, variam na sua especificidade e atividade e que a variabilidade da dieta pode alterar as funções das enzimas conforme os alimentos utilizados, inclusão e categoria animal, dificultando sua aplicabilidade devido aos diferentes resultados.

1.5 MATERIAIS E MÉTODOS

1.5.1 Local, Instalações e Animais

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite/LPBL do Departamento de Nutrição e Produção Animal/VNP da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo no Campus de Pirassununga FMVZ/USP, de 04 de setembro a 26 de novembro de 2020. Os procedimentos experimentais foram conduzidos sob a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP sob o protocolo CEUA 9274250920.

As análises bromatológicas e de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL. As demais análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP.

1.5.2 Animais e Dietas Experimentais

Foram utilizadas vinte e quatro vacas da raça Holandesa, com $161 \pm 87,7$ dias em lactação (DEL), $681 \pm 96,2$ kg de peso corporal (PC), $2,41 \pm 0,20$ escore de condição corporal (ECC) e $35,2 \pm 5,19$ kg/d de produção de leite no início do experimento, sendo 8 primíparas e 16 multíparas. Quatro vacas utilizadas no experimento possuíam cânulas ruminais para avaliação de parâmetros de fermentação ruminal.

Foi utilizado o delineamento em Quadrados Latinos replicados, balanceados e contemporâneos. De acordo com a produção de leite, números de partos e presença de cânula ruminal, as vacas foram distribuídas em 6 quadrados. Dentro de cada quadrado foram distribuídas aleatoriamente a uma das quatro sequências de tratamentos. Os períodos experimentais tiveram duração de 21 dias, onde os primeiros 14 dias foram para adaptação da dieta e os últimos 7 para as coletas de amostras. As enzimas foram adicionadas direto no mineral do concentrado e foram ofertadas aos animais por meio do concentrado da TMR, o qual era preparado na fábrica de rações semanalmente. Os tratamentos foram: CON: dieta controle sem inclusão das enzimas; A5: suplementação com enzima amilolítica (0,5 g/kg de MS); A5P2: suplementação com associação de enzima amilolítica (0,5 g/kg de MS) e enzima proteolítica (0,2 g/kg de MS); A5P4: suplementação com associação de enzima amilolítica (0,5 g/kg de MS) e enzima proteolítica (0,4g/kg de MS). A enzima amilolítica utilizada foi Amaize™ (Alltech® do Brasil Ltda., Maringá, PR, Brasil); e VegPro™ (Alltech® do Brasil Ltda., Maringá, PR, Brasil). A composição da dieta experimental está descrita nas Tabelas 1 e 2.

O aditivo utilizado de amilase (Amaize™) utilizado neste trabalho é baseado em extrato de *A. oryzae* em pó que contém principalmente atividade de α -amilase (EC 3.2.1.1). Possui atividade amilolítica conhecida (600 FAU/g do produto) e possui característica de pó marrom. Uma FAU (*fungus amylase unit* ou unidade de amilase fúngica) é definida como a quantidade de amido solúvel que é dextrinizado na taxa de 1 g/h a 30°C e pH 4,8 (FOOD CHEMICALS CODEX, 2010). Atividades de protease, celulase e xilanase são desprezíveis nesta composição (TRICARICO et al., 2005).

Já a enzima proteolítica (Vegpro™) é uma combinação de enzimas fúngicas (protease e celulase) em pó, sendo elas o produto da fermentação de *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*. Sua atividade enzimática é definida como 7.500 μ HUT/g. Unidades da atividade da protease são definidos como unidades de hemoglobina na base de tirosina por min (HUT= *haemoglobin units on the tyrosine basis*; FOOD CHEMICALS CODEX, 2010; TRICARICO et al., 2005). Para testes realizados com o a enzima na forma líquida, seu pH ideal é mais ácido, próximo a 3,5, sendo que em pH entre 3,5 e 7,2 o produto reteve 90% da atividade (FOOD CHEMICALS CODEX, 1996).

Tabela 1. Ingredientes, composição química e tamanho de partículas da dieta experimental (% MS).

Item	Dieta
Ingrediente, % MS	
Silagem de milho	48,0

Milho moído	18,7
Farelo de soja, 48% PB	11,8
Polpa cítrica	8,20
Grão de soja cru e integral	6,42
Farelo de soja <i>bypass</i> ¹	4,01
Minerais e vitaminas ²	1,50
Bicarbonato de sódio	0,80
Ureia	0,15
Calcário	0,20
Sal comum	0,20
Distribuição de partículas, % na TMR	
>19 mm	16,7
19 - 8 mm	39,0
8 - 4 mm	15,7
<4 mm	28,5
Composição química	
Matéria seca, % na TMR	47,8
Matéria orgânica	93,1
Amido	27,5
Proteína Bruta	16,1
Fibra em detergente neutro	39,7
Fibra em detergente ácido	21,8
Extrato etéreo	3,56
Lignina	8,97
PIDA ³	1,64
PDIN ⁴	2,83

¹*Soy Pass* ²Conteúdo por kg de produto: 215 g Ca, 15 mg Co, 700 mg Cu, 10 mg Cr, 20 g S, 40 mg I, 20 g Mg, 1,600 mg Mn, 20 mg Se, 70 g Na, 2.500 mg Zn, 200,000 UI Vit A, 50,000 UI Vit D3, 1-500 UI Vit E. ³Proteína insolúvel em detergente neutro. ⁴Proteína insolúvel em detergente ácido.

Tabela 2. Composição química dos ingredientes utilizados na dieta experimental.

Item	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja	Grão de soja	Polpa cítrica	<i>Soy Pass</i> ⁴
Composição química, g/100g MS						
Matéria seca	31,70	82,83	86,34	87,07	88,75	85,53
Matéria orgânica	96,39	97,65	93,50	94,80	93,97	93,05
Fibra em detergente neutro	56,94	13,35	37,96	34,79	24,46	29,84
Fibra em detergente ácido	31,61	4,84	21,84	18,83	17,51	14,02
Amido	25,16	69,49	9,52	10,12	6,32	3,57
Extrato etéreo	2,16	3,39	1,50	16,38	1,72	2,82

Proteína bruta	7,93	12,25	40,58	39,47	6,63	52,39
Lignina	4,26	2,37	2,21	6,53	3,08	2,27
PDIN ²	1,40	1,97	4,89	9,22	3,63	9,85
PIDA ³	0,94	1,48	2,49	3,72	1,84	5,50

¹ Estimado segundo Hall (2000). ² Proteína indigestível em detergente neutro. ³ Proteína indigestível em detergente ácido. ⁴ Farelo de soja *By Pass*.

As dietas experimentais foram formuladas com relação volumoso:concentrado de 48:52 para atender as exigências nutricionais de vacas em lactação com 650 kg de peso corporal, produção de 34 kg de leite/dia e 3,5% de gordura no leite, de acordo com o NRC (2001). As dietas foram preparadas individualmente e fornecidas duas vezes ao dia, às 08:00 h e 13:00 h, na forma de TMR. O ajuste da dieta foi feito diariamente de forma que as sobras ficassem entre 5 e 10% da quantidade de matéria natural ofertada. Os animais receberam banho de 40 minutos por aspersão no meio do dia. As vacas foram alojadas em estábulo contendo baias individuais (17,5 m²), cama de areia, ventiladores e acesso livre a água e alimentação.

1.5.3 Consumo da Matéria Seca e Análises de Alimentos

Foram coletadas amostras de sobras diariamente durante os últimos 7 dias de cada período experimental, formando uma amostra composta por período. Diariamente foram feitas pesagens das sobras de cada animal, para mensuração do consumo individual. Após o preparo da mistura no cocho, amostras da TMR e da silagem foram coletadas e armazenadas a -20 °C para posterior análises químico-bromatológicas. Além disso, amostras dos ingredientes do concentrado (100 g) foram coletadas na fábrica de ração durante sua preparação semanalmente.

As amostras de alimentos e sobras foram secas parcialmente em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72 horas e processadas em moinhos de facas (TE-650, Tecnal[®] Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil), utilizando peneiras com poros de 1 mm e de 2 mm. Posteriormente, as amostras de 1 mm foram analisadas quanto ao seu teor de matéria seca (MS; método 930.15; AOAC, 2000), proteína bruta (PB; N × 6.25; Kjeldahl método 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), FDA e lignina (método 973.18; AOAC, 2000), cinzas (MM; método 942.05; AOAC, 2000) e FDN usando alfa-amilase (VAN SOEST et al., 1991) em analisador de fibra (TE-149, Tecnal[®] Equipamentos para Laboratório).

Amostras de alimentos foram analisadas também quanto ao teor de amido através de degradação enzimática (Amyloglucosidase[®], Novozymes, Curitiba, PR, Brasil) e as

absorbâncias lidas em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM[®], São Caetano do Sul, SP, Brasil) de acordo com Hendrix (1993). Ainda para caracterização das dietas, os alimentos foram analisados quanto aos teores de proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) e proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) de acordo com Licitra, Hernandez e Van Soest (1996).

1.5.4 Índice de Seleção de Partículas

A TMR e as sobras foram analisadas para a distribuição do tamanho de partículas usando um sistema separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI) como descrito por Kononoff et al. (2003). O separador de partículas utilizado apresenta 4 bandejas sobrepostas (P1 a P4) com orifícios: P1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm; P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm; P3 = retenção de partículas entre 8 e 4 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 4 mm.

O índice de seleção foi calculado como descrito em Silveira et al. (2007), sendo o consumo dos animais correspondentes a cada peneira expresso pela porcentagem do consumo total predito, a partir da equação abaixo:

$$\text{Consumo esperado} \left(\frac{\text{kg}}{\text{dia}} \right) = \text{consumo} \left(\frac{\text{kg MN}}{\text{dia}} \right) \times P_{\text{TMR}} \left(\frac{\text{kg}}{\text{kg}} \right)$$

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

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

em que, P_{TMR} é o tamanho de partícula da TMR, e P_{Sobras} é o tamanho de partícula das sobras.

Interpreta-se o índice de seleção igual a 1 como ausência de seleção, quando < 1 indica seleção contrária ao tamanho de partícula e se > 1, mostra que vacas preferiram um tamanho específico de partícula.

1.5.5 Digestibilidade Aparente Total

Amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto das vacas de 9 em 9 horas, a partir das 06h00 do dia 17 até as 21h00 do dia 19 de cada período experimental, representando uma amostra a cada 3h em um período de 24 horas. As amostras foram congeladas após cada coleta e, ao final de cada período, as amostras foram homogeneizadas para se obter uma amostra composta para cada vaca e período. As amostras foram analisadas para teores de MS, MM, MO, FDN, PB, EE e amido conforme metodologias já descritas.

A excreção fecal diária e a digestibilidade dos nutrientes foram determinadas com base no teor de FDN indigestível (FDNi) nos ingredientes da ração, sobras e fezes, a partir do consumo de FDNi e sua concentração nas fezes e sobras. Todas as amostras foram secas em estufa com ventilação forçada (55° por 72 h) e moídas em moinho de facas (TE-650, Tecnal® Equipamentos para Laboratório) de 2 mm. As amostras foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT, 100 g/m²; CASALI et al., 2008), respeitando a relação de 20 mg de MS por cm² de superfície como descrito em Nocek (1988). Os sacos com amostra foram incubados por 288 horas no rúmen de duas vacas Holandesas previamente adaptadas à mesma dieta do experimento e adaptação de técnica descrita por Huhtanen et al. (1994). Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento desta, e submetidos ao tratamento com detergente neutro por uma hora conforme descrito Van Soest et al. (1991). O FDNi foi utilizado para estimar a excreção total de fezes (ETF) baseada na ingestão de FDNi e concentração do mesmo nas fezes, por meio da seguinte equação:

$$ETF \left(\frac{\text{kg}}{\text{dia}} \right) = \frac{\text{FDNi}_{\text{consumido}} \left(\frac{\text{Kg}}{\text{dia}} \right)}{\left(\frac{\text{Kg}}{\text{dia}} \right) \text{FDNi}_{\text{fezes}}}$$

A digestibilidade da MS e dos nutrientes foi determinada pelas seguintes equações:

$$\text{Digestibilidade MS (\%)} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ consumo de FDNi}}{\% \text{ FDNi nas fezes}} \right) \right]$$

$$\text{Digestibilidade dos nutrientes (\%)} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ consumo de FDNi}}{\% \text{ FDNi nas fezes}} \right) \times \left(\frac{\% \text{ nutriente nas fezes}}{\% \text{ consumo do nutriente}} \right) \right]$$

1.5.6 Fermentação Ruminal

No dia 21 de cada período experimental, amostras de digesta ruminal das vacas canuladas (n = 4) foram coletadas das regiões crânio dorsal, crânio ventral, ventral, caudo-ventral e caudo-dorsal. As coletas foram realizadas antes da alimentação (tempo 0) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 h após a alimentação da manhã. Imediatamente após cada coleta, as amostras foram homogeneizadas e filtradas em pano dessorador para obtenção do líquido ruminal (250 mL). O pH do líquido ruminal foi mensurado imediatamente utilizando um pHmetro (MB-10, Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, Brasil), outras alíquotas (50 ml) foram congeladas para posteriores análises.

Amostras de líquido ruminal foram centrifugadas a $2,000 \times g$ por 15 min e 1800 μL do sobrenadante foram pipetados em *ependorf* juntamente com 200 μL de ácido orto-fosfórico a 1M para determinação de AGCC. Outros 900 μL do sobrenadante de cada uma das amostras foram pipetados juntamente com 400 μL de ácido sulfúrico (1N) para determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃). As amostras foram congeladas para análises posteriores.

As análises de concentrações de AGCC foram realizadas por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás com injetor automático (CG HP 7890A; HP 7683B injetor, Agilent Technologies[®], Santa Clara, CA), coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25m, 0,320mm, 0,50 μm , J&W Agilent Technologies Inc.[®], Palo Alto, CA, EUA) e detector de ionização de chama, após acidificação das mesmas com 1M de ácido o-fosfórico p.a. (Ref. 100573, Merck[®]) e 0,1 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno; PM = 116,16; CAS 88-09-5; Sigma Chemie GmbH[®], Steinheim, Alemanha).

Uma alíquota de 1 μL de cada amostra foi injetada com taxa de split de 20:1, utilizando hélio como gás de arraste à velocidade linear de 31,35 mL/min (9,20 psi). As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 260 °C. A rampa de temperatura da coluna se iniciou com um gradiente 80 °C mantendo por 1 min, até 120 °C à taxa de 20 °C/min, mantendo por 3 min. Seguido de um aumento para 205 °C à taxa de 10 °C/min, mantendo por 2 minutos. Tempo total da corrida 16,5 min, sendo gás de arraste hidrogênio a 1,35 mL/min. No detector, os fluxos de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio foram mantidos a 40, 400 e 40 mL/min, respectivamente. Para a quantificação dos analitos, uma calibração do método foi feita com diluições dos padrões (Chem Service[®], West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6),

isovalérico (99%; CAS 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4), analisadas sob as condições descritas acima.

1.5.7 Balanço de Nitrogênio e Derivados de Purina

Amostras de urina foram coletadas simultaneamente as amostras de fezes sendo de 9 em 9 h; a partir das 06h00 do dia 17 ao até as 21h00 do dia 19 de cada período experimental, durante micção estimulada por massagem; totalizando 8 amostras de urina por vaca por período, de modo a formar um *pool* representativo de 24 h, retirando o efeito da variação diária na excreção urinária. A cada coleta alíquotas de 10 mL de urina foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N, para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e a precipitação do ácido úrico. Após a acidificação, as amostras foram armazenadas a – 20 °C para posteriores análises de N total, alantoína, ácido úrico e creatinina. As análises de alantoína na urina e no leite foram realizadas pelo método colorimétrico, conforme descrito por Chen & Gomes (1992), sendo a leitura realizada em leitor de microplaca (Biochrom Asys Microplate Reader, Biochrom®, Cambridge, RU). As determinações de creatinina e ácido úrico foram realizadas por meio de kits comerciais (Bioclin® K067 e K139, respectivamente).

O nitrogênio excretado no leite foi calculado com base na seguinte equação: leite N (g/d) = concentração de PB do leite (g/kg) × produção de leite (kg/d) ÷ 6,38. O nitrogênio excretado nas fezes foi calculado com base na equação: N fecal (g/d) = PB nas fezes (g/kg) × MS excreção fecal (kg/d) ÷ 6,25. O nitrogênio total da urina foi determinado de acordo com a metodologia descrita pelo AOAC (2000, método 984.13), segundo o método micro Kjeldahl. O balanço de nitrogênio foi calculado com base na diferença entre o consumo de N e a soma do excretado pelas fezes, urina e leite.

Foi avaliado os derivados de purinas (DP) na urina e no leite, de acordo com metodologia descrita por Chen e Gomes (1992), considerando-se a absorção de purinas a partir da fórmula sugerida por Verbic et al. (1990).

A excreção urinária diária de creatinina foi considerada de 29 mg/kg de PC (VALADARES et al., 1999). Para o cálculo da excreção urinária, foi considerado o valor de 29 multiplicado pelo peso corporal das vacas e dividido pela creatinina na urina de cada animal. Após a estimativa do volume diário de urina excretado, a excreção total de DP foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia.

1.5.8 Metabólitos Sanguíneos

As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacuolizados (10 mL) no dia 16 de cada período por punção dos vasos coccígeos, sempre após 4 horas após a alimentação matinal, em tubos sem ativador de coágulo (BD Vacutainer[®], Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Após cada coleta as amostras foram imediatamente refrigeradas para a centrifugação a 3000 g durante 15 minutos, para a separação do soro. O soro obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20 °C, para posteriores análises laboratoriais.

Foram analisados os parâmetros sanguíneos de glicose e ureia no soro por meio de kits comerciais (glicose: cat. n. K-082; ureia: cat. n. K-056; Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil), que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final ou cinético, e analisadas em equipamento automático para bioquímica sanguínea (SBA 200, CELM[®]). O nitrogênio ureico foi calculado multiplicando a concentração de ureia por 0,4667.

1.5.9 Produção e Composição do Leite

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia (6:00 h e 17:00 h), sendo a produção de leite mensurada e registrada eletronicamente (Alpro[®], DeLaval, Tumba, Suíça) diariamente em todos os períodos experimentais. As amostras de leite foram coletadas das ordenhas realizadas nos dias 15, 16 e 17 de cada período experimental, na ordenha da manhã e da tarde, e analisadas quanto aos teores de gordura, proteína e lactose por metodologia infravermelha média (Lactoscan[®], Entelbra, Londrina/PR, Brasil). A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLCG), segundo fórmula descrita por Sklan et al. (1992):

$$3,5\% \text{ PLCG} = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{gordura no leite}) \times PL \left(\frac{Kg}{d} \right)$$

Alíquotas (10 mL) das amostras de leite coletadas no dia 16 foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 25% (5 mL) de acordo com Broderick e Clayton (1997), filtradas em papel filtro qualitativo e congeladas. Posteriormente, essas amostras foram analisadas quanto ao teor de ureia utilizando kits colorimétricos de bioquímica (K056; Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil), sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro semiautomático (SBA 200, CELM[®]). Para valor de N ureico, foi calculado multiplicando o valor de ureia por 0,4667. Alantoína do leite foi analisado conforme já descrito acima.

1.5.10 Avaliação do Peso e Escore de Condição Corporal

As vacas foram avaliadas em relação ao escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal nos dias 7 e 8 do período de adaptação e nos dias 20 e 21 do período de coletas, segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989). O peso dos animais foi correspondente à média de dois dias sucessivos de pesagens, sendo feitas antes do fornecimento das alimentações e após a ordenha da manhã.

1.5.11 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Hartley), segundo Ott (1983), usando os procedimentos UNIVARIATE e GLM, respectivamente, do SAS (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Foram analisados pelo PROC MIXED SAS, versão 9.4, de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + a_{j:i} + T_k + P_l + e_{ijkl}$$

em que: $a_{kl} \approx N(0; \sigma_c^2)$, $e_{ijkl} \approx N(0; \sigma_e^2)$, onde Y_{ijkl} é o valor observado da variável resposta; μ é a média geral; Q_i é o efeito fixo de quadrado ($i = 1$ à 7); $a_{j:i}$ é o efeito aleatório de animal dentro de cada quadrado latino ($j = 1$ à 28); T_k é o efeito fixo do tratamento ($k = 1$ à 4); P_l é o efeito fixo do período experimental ($l = 1$ à 4); e_{ijkl} é o erro experimental; N indica distribuição normal (Gaussiana); σ_c^2 é a variância associada ao efeito aleatório de animal; e σ_e^2 é a variância residual.

Os dados de fermentação ruminal foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + a_{j:i} + T_k + \omega_{ijkl} + H_m + T \times H_{km} + e_{ijklm}$$

Considerando os efeitos já descritos acima, com $\omega_{ijkl} \approx N(0, \sigma_\omega^2)$, e $e_{ijklm} \approx MVN(0; R)$, sendo MVN indica multivariada com distribuição normal; e R é uma matriz de variância e covariância devido às medidas repetidas no tempo; H_m é o efeito fixo do tempo de coleta ($m = 1$ a 9); $T \times H_{km}$ é a interação entre tratamento e tempo; ω_{ijkl} é o erro residual associado com vacas dentro do período experimental ($n = 16$). Foram avaliadas as matrizes: CS, CSH, AR, ARH, TOEP, TOEPH, UN, ANTE e FA. O critério Baisiano foi utilizado para definir a matriz

a ser utilizada. As interações entre tempo e tratamento foram desmembradas pela função SLICE, identificando os tempos com efeito de tratamento.

As diferenças entre os tratamentos foram analisadas por contrastes ortogonais, sendo C1: efeito do controle *vs.* tratamentos (A5 + A5P2 + A5P4); C2: efeito tratamento amilolítica (A5) *vs.* tratamentos com enzima proteolítica (A5P2 + A5P4); C3: efeito inclusão de 2 g de enzima proteolítica kg/MS (A5P2) *vs.* Inclusão de 4 g de enzima proteolítica kg/MS (A5P4). O nível de significância foi considerado quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $0,05 < P \leq 0,10$.

1.6 RESULTADOS

Não foi observado ($P \geq 0,219$) diferenças nos tratamentos no consumo de MS ou nutrientes (Tabela 3). O índice de seleção de partículas da dieta com tamanho < 4 mm foi menor ($P = 0,038$) para vacas alimentadas com ENZ. Vacas alimentadas com A5P2 e A5P4 apresentaram maior ($P = 0,022$) índice de seleção para partículas longas da dieta (>19 mm) e menor ($P = 0,043$) índice de seleção para partículas pequenas (<4 mm) quando comparadas às alimentadas com A5. A adição de ENZ às dietas de vacas em lactação não afetou ($P \geq 0,192$) a digestibilidade da MS e nutrientes. No entanto, a digestibilidade do amido foi maior ($P = 0,009$) nas vacas alimentadas com os tratamentos contendo protease (A5P2 e A5P4) do que aquelas sob o tratamento A5. Em relação aos tratamentos com protease, a digestibilidade da FDN foi maior ($P = 0,021$) no grupo A5P4 do que no grupo A5P2. Uma tendência ($P = 0,063$) à maior digestibilidade do amido foi observada em vacas alimentadas com A5P4 em comparação com A5P2.

Tabela 3. Consumo de matéria seca e nutrientes, índice de seleção e digestibilidade do trato total da matéria seca e nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P -valor ²		
	CON	A5	A5P2	A5P4		C1	C2	C3
Consumo, kg/d								
Matéria seca	28,3	28,5	28,5	28,0	0,93	0,990	0,556	0,429
Matéria orgânica	26,3	26,5	26,5	26,1	0,87	0,993	0,520	0,442
Proteína bruta	4,62	4,65	4,67	4,57	0,15	0,951	0,718	0,219
FDN ³	10,8	10,8	10,8	10,7	0,37	0,994	0,610	0,621
Extrato etéreo	1,03	1,05	1,05	1,02	0,04	0,790	0,632	0,224
Consumo, % PV								
Matéria seca	4,22	4,22	4,20	4,17	0,16	0,739	0,619	0,695
FDN	1,60	1,61	1,60	1,59	0,06	0,936	0,569	0,909

Seleção de partículas⁴

> 19 mm	0,976	0,97	0,995	1,001	0,011	0,297	0,022	0,652
19 – 8 mm	0,986	0,988	0,989	0,984	0,003	0,898	0,593	0,320
8 – 4 mm	0,994	0,995	0,999	1,005	0,004	0,330	0,265	0,395
< 4 mm	1,030	1,026	1,016	1,013	0,005	0,038	0,043	0,601
Digestibilidade, %								
Matéria seca	71,8	71,3	71,8	72,8	0,66	0,820	0,117	0,231
Matéria orgânica	72,9	72,3	72,9	73,9	0,69	0,847	0,144	0,222
Proteína bruta	71,5	71,9	71,5	72,8	1,00	0,529	0,853	0,256
Extrato etéreo	79,5	78,3	77,9	78,9	1,40	0,421	0,949	0,616
FDN	56,1	55,5	55,2	58,1	0,96	0,822	0,273	0,021
Amido	84,1	83,6	85,2	87,3	0,94	0,192	0,009	0,063

¹CON: controle, dieta basal; A5: tratamento com enzima amilolítica Amaize, Alltech® (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease VegPro, Alltech® (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta); ²C1 = CON vs ENZ; C2 = A5 vs A5P2+A5P4; C3 = A5P2 vs. A5P4. ³Fibra em detergente neutro. ⁴Sem seleção = 1, valores < 1 indica seleção contra e valores > 1 indica seleção para partículas na faixa de tamanho de partícula específica. O índice de seleção foi calculado de acordo com Silveira et al. (2007);

A suplementação com ENZ tendeu a aumentar ($P = 0,083$) a proporção molar de propionato ruminal em comparação ao grupo controle (Tabela 4). A porcentagem molar de propionato foi maior ($P = 0,039$) em vacas do grupo A5 do que aquelas alimentadas com protease. Vacas do grupo A5P4 tenderam a ter maior ($P = 0,098$) porcentagem molar de propionato ruminal do que aquelas alimentadas com A5P2. Foi observado um efeito de interação entre tratamento e tempo ($P \leq 0,047$) para porcentagem molar de isobutirato (Figura 1) e concentração total de AGCC (Figura 2).

Tabela 4. Fermentação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas (n = 4).

Item	Tratamento ¹				EPM	P-valor ²					
	CON	A5	A5P2	A5P4		C1	C2	C3	Trt	Time	Trt x Time
pH	6,21	6,20	6,25	6,27	0,12	0,798	0,622	0,862	0,947	<0,001	0,820
N-NH ₃ , mg/dL	13,0	12,0	12,8	11,6	0,79	0,319	0,871	0,303	0,549	<0,001	0,301
Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), %											
Acetato	66,1	65,9	65,8	65,1	0,81	0,557	0,518	0,395	0,674	0,132	0,303
Propionato	18,2	19,2	18,2	18,8	0,75	0,083	0,039	0,098	0,027	<0,001	0,554
Butirato	12,1	11,7	12,3	12,1	0,67	0,949	0,330	0,781	0,778	0,045	0,478
Iso-valerato	1,58	1,54	1,54	1,55	0,09	0,584	0,917	0,867	0,947	<0,001	0,735
Valerato	1,21	1,33	1,29	1,53	0,12	0,224	0,598	0,194	0,327	0,161	0,462
Iso-burirato	0,834	0,780	0,778	0,826	0,04	0,247	0,520	0,249	0,377	<0,001	0,007
Ácidos graxos de cadeia ramificada	3,63	3,65	3,61	3,90	0,17	0,702	0,681	0,353	0,728	<0,001	0,351
Relação acetato propionato	3,66	3,49	3,64	3,51	0,19	0,367	0,556	0,418	0,593	<0,001	0,424
Total de AGCC, mM	66,9	69,8	80,8	60,7	9,49	0,735	0,932	0,152	0,477	<0,001	0,047

¹CON: controle, dieta basal; A5: tratamento com enzima amilolítica Amaize, Alltech® (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease VegPro, Alltech® (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta); ²C1 = CON vs ENZ; C2 = A5 vs A5P2+A5P4; C3 = A5P2 vs. A5.

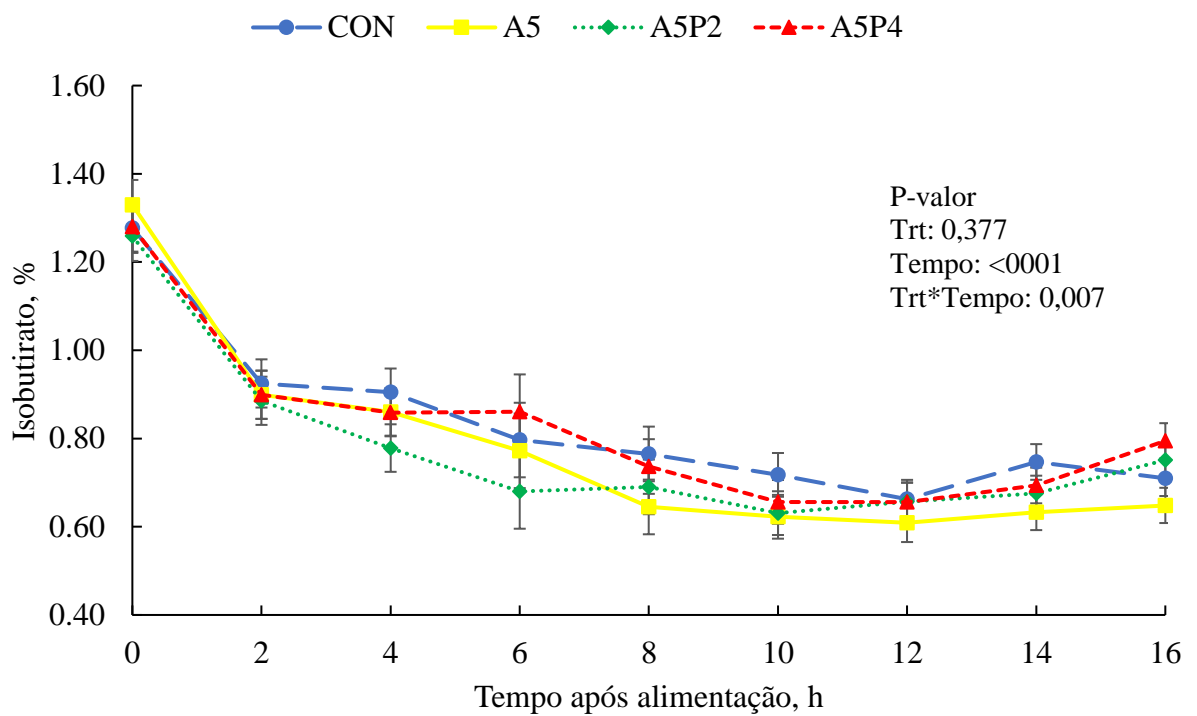


Figura 1. Concentração ruminal de isobutirato em vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas. CON: controle, dieta basal; A5: tratamento amilolítico (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta).

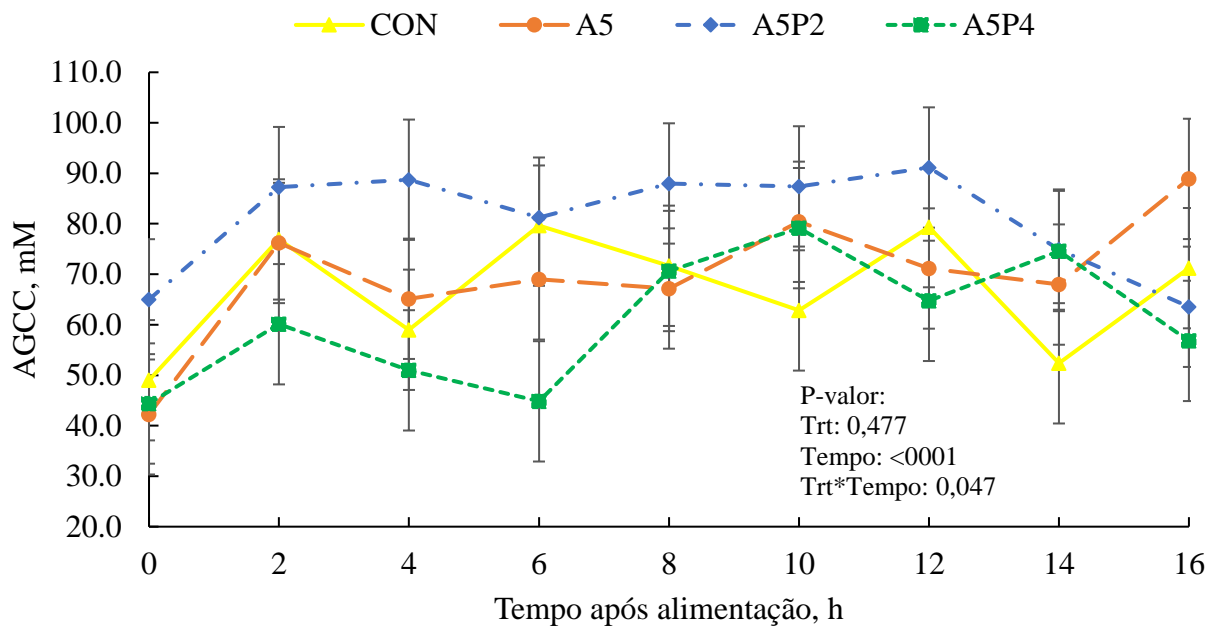


Figura 2. Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta total (AGCC) em vacas leiteiras alimentadas com diferentes enzimas exógenas. CON: controle, dieta basal; A5: tratamento amilolítico (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta).

A adição de ENZ às dietas não influenciaram ($P \geq 0,233$) na excreção de derivados de purina (Tabela 5). A excreção de N no leite foi maior ($P = 0,041$) em vacas alimentadas com ENZ do que com CON. Ao comparar os tratamentos contendo proteases, as vacas alimentadas com A5P2 apresentaram menor ($P = 0,058$) excreção de N pela urina do que A5P4.

Tabela 5. Excreção de derivados de purina e excreção de nitrogênio de vacas alimentadas com diferentes enzimas exógenas.

Item	Tratamento ¹				EPM	P-valor ²		
	CON	A5	A5P2	A5P4		C1	C2	C3
Excreção, mmol/d								
Alantoína urina	178	221	152	169	20,9	0,897	0,016	0,538
Ácido úrico urina	142	156	153	143	13,3	0,549	0,608	0,527
Alantoína leite	83,5	66,1	62	60,6	17,31	0,233	0,792	0,947
Derivados de Purina	403	466	367	438	37,2	0,611	0,140	0,149
N excreção, g/g N ingestão								
Fezes	0,265	0,26	0,267	0,253	0,008	0,593	0,990	0,211
Leite	0,216	0,221	0,222	0,227	0,007	0,041	0,319	0,287
Urina	0,170	0,185	0,168	0,193	0,014	0,261	0,686	0,058

¹CON: controle, dieta basal; A5: tratamento com enzima amilolítica Amaize, Alltech® (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease VegPro, Alltech® (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta); ²C1 = CON vs ENZ; C2 = A5 vs A5P2+A5P4; C3 = A5P2 vs. A5P4; ³Estimada de acordo com Chen e Gomes (1992).

A concentração sérica de nitrogênio ureico tendeu a ser maior ($P = 0,083$) em vacas alimentadas com ENZ do que as do grupo CON (Tabela 6). Não foram encontradas diferenças na concentração sérica de glicose. Vacas alimentadas com ENZ produziram mais leite (+1,17 kg/d) e PLCG (+1,13 kg/d) do que as vacas do grupo CON ($P \leq 0,032$). A produção de proteína obteve tendência ($P = 0,074$) e significância para a lactose ($P = 0,014$) para as vacas alimentadas com ENZ em comparação a CON. O teor de sólidos do leite não foi afetado pelos tratamentos. A eficiência alimentar (produção de leite ÷ CMS) tendeu a ser maior ($P = 0,059$) em vacas alimentadas com ENZ do que as vacas do grupo CON.

Tabela 6. Metabólitos séricos e produção de leite, composição do leite e eficiência produtiva de vacas alimentadas com diferentes enzimas exógenas.

Item	Tratamentos ¹				EPM	P-valor ²		
	CON	A5	A5P2	A5P4		C1	C2	C3
Soro								
Glicose, mg/dL	75,8	76,6	75,5	74,7	2,32	0,936	0,558	0,765

N ureico mg/dL	16,7	17,2	18,0	18,3	1,59	0,083	0,173	0,768
Produção (kg/d)								
Leite	32,0	33,1	33,1	33,3	0,66	0,008	0,805	0,645
PLCG 3,5% ³	33,3	34,2	34,5	34,6	0,85	0,032	0,498	0,861
Gordura	1,20	1,22	1,24	1,24	0,04	0,104	0,443	0,988
Proteína	1,02	1,05	1,05	1,05	0,02	0,074	0,947	0,981
Lactose	1,52	1,57	1,57	1,58	0,03	0,014	0,805	0,628
Composição (%)								
Gordura	3,76	3,73	3,77	3,76	0,081	0,784	0,531	0,932
Proteína	3,16	3,15	3,16	3,15	0,015	0,532	0,776	0,450
Lactose	4,75	4,75	4,74	4,74	0,023	0,704	0,793	0,984
Eficiência								
PL ⁴ /CMS ⁵	1,17	1,20	1,19	1,22	0,039	0,059	0,606	0,184
PLCG ⁶ /CMS	1,21	1,23	1,24	1,26	0,042	0,144	0,410	0,333

¹CON: controle, dieta basal; A5: enzima amilolítica Amaize, Alltech® (0,5 g/kg de MS da dieta); A5P2: tratamento com A5 + protease VegPro, Alltech® (0,2 g/kg de MS da dieta); A5P4: tratamento com A5 + protease (0,4 g/kg de MS da dieta); ²C1 = CON vs ENZ; C2 = A5 vs A5P2+A5P4; C3 = A5P2 vs. A5P4; 33,5% Leite corrigido para gordura = $(0,432 + 0,165 \times \text{porcentagem de gordura do leite}) \times \text{produção de leite (kg/d)}$. ⁴Produção de leite. ⁵Consumo de matéria seca. ⁶Produção de leite corrigida para gordura.

1.7 DISCUSSÃO

Foi hipotetizado que a combinação das enzimas amilolítica e proteolítica resultaria na melhora do desempenho produtivo das vacas devido a maior digestibilidade de nutrientes. De fato, o desempenho melhorou com a adição de enzimas exógenas na dieta, mas não foi observado efeito sinérgico positivo com a associação das enzimas na produção de leite. Contudo, diferenças foram observadas na digestibilidade de nutrientes. Vacas dos grupos com associações das enzimas (A5P2 e A5P4) tiveram melhor digestibilidade do amido em comparação ao A5, enquanto A5P4 obtiveram tendência em maior digestibilidade do amido do que A5P2, mostrando que a ação em conjunto da protease e amilase pode ser positiva na digestibilidade do amido e dependente da dosagem utilizada.

A enzima proteolítica ainda é pouco explorada para ruminantes, especialmente bovinos leiteiros. A usada nesse estudo (Vegpro™ Alltech® do Brasil Ltda.) foi amplamente testada em aves e suínos, mas até onde sabemos, este é o primeiro trabalho com vacas em lactação. Há algumas evidências *in vitro* e *in vivo* sugerindo que a amilase tem potencial para melhorar a digestibilidade do amido (KLINGERMAN et al., 2009), o que corrobora com o encontrado neste estudo. Para ruminantes é esclarecido que a matriz proteica e endosperma vítreo estão menos susceptíveis ao ataque enzimática no amido, podendo reduzir a digestibilidade deste carboidrato no rúmen (HARMON e TAYLOR, 2005). Em aves, foi demonstrado que associar

enzimas contendo amilase, xilanase e protease é eficaz em aumentar o valor nutritivo de dietas à base de milho (PACK et al., 1998), o que corresponde a melhora de 2-5% na energia disponível com a suplementação enzimática de dietas à base de milho para frangos de corte (JOHNSON et al., 2022).

Considerando a eficácia da enzima proteolítica na digestibilidade dos nutrientes, os resultados não são consistentes apesar dos achados neste estudo relacionados ao amido. É importante destacar que os resultados são dependentes da dose e da dieta utilizada em cada espécie. Meschiatti et al. (2019) não encontraram efeitos na digestibilidade de nutrientes quando adicionado protease na dieta de bovinos de corte confinados. Eun e Beauchemin, (2005) relataram aumento na digestibilidade de FDN em resposta a adição da enzima proteolítica na forma líquida. Já Ferrareto et al. (2015) testaram a digestibilidade *in vitro* do amido e perfil de fermentação para milho reidratado, ensilado ou não ensilado; silagem de grão úmido com ou sem protease; e compararam a protease com inoculantes. Os autores puderam observar que a adição de protease em ambos foi eficaz em aumentar a digestibilidade do amido, mas no milho reidratado ensilado a protease foi mais eficaz do que no milho reidratado não ensilado (aumento de 6,4 vs. 2,6 unidades percentuais). Diante disso, podemos especular que apesar da protease melhorar a digestibilidade do amido quando incluída na TMR, se a incluirmos na ensilagem pode ser igual ou mais eficaz na digestibilidade do amido e dos demais nutrientes.

Em relação a produção de leite, no presente estudo houve aumento para os grupos que receberam as enzimas em comparação com controle. Diversos estudos com enzima amilolítica relatam aumento na produção de leite (TRICARICO et al., 2005; TRICARICO et al., 2008; KLINGERMAN et al., 2009) outros relataram nenhum efeito (TAKIYA et al., 2017; ZILIO et al., 2019). Cabe ressaltar novamente que foram estudos com diferentes dosagens e cenários. Já com a utilização da enzima proteolítica, foi relatado diminuição no CMS e produção de leite (EUN e BEAUCHEMIN, 2005) e quando diversas enzimas foram empregadas em conjunto na dieta, obtiveram aumento no CMS e produção de leite (GADO et al., 2009). De fato, no presente estudo, apesar de não obtermos diferenças no consumo, a produção de leite foi maior nos grupos com enzimas, podendo ser relacionado a mudanças na fermentação ruminal. Como exemplo, as mudanças nas concentrações de propionato nos diferentes grupos em relação ao controle. Em função disso, é discutido sobre a capacidade das enzimas exógenas em modular a fermentação ruminal e melhorar a eficiência energética da fermentação. Essa mudança nas proporções de AGCC pode aumentar a disponibilidade de precursores e melhorar a utilização de nutrientes, possivelmente devido à fermentação de açúcares liberados da hidrólise ocasionada pelas enzimas (EUN e BEAUCHIMIN, 2007; GADO et al., 2009). No entanto, os

resultados de estudos com adição de enzimas exógenas na dieta de vacas leiteiras não são consistentes. Estudos com utilização da enzima proteolítica na dieta de vacas leiteiras mostram que não houve mudanças nas concentrações dos AGCC em função da protease (EUN e BEAUCHIMIN, 2007) ou com protease para gado de corte (VERA et al., 2012). Já estudos com a utilização da amilase na dieta das vacas, mostram que pode não ocorrer nenhum efeito (TAKIYA et al., 2016; ZILIO et al., 2019) ou pode ocorrer diminuição nas proporções de propionato e aumento de acetato e butirato (TRICARICO et al., 2005, DE FRAIN et al., 2005; TRICARICO et al., 2008) ou aumento de propionato, como no estudo de Gado et al. (2009) com uma mistura de enzimas.

Gado et al. (2009) correlacionaram o efeito positivo no desempenho produtivo quando empregadas diversas enzimas devido a melhoria no consumo, digestibilidade, fermentação ruminal e melhora na síntese de proteína microbiana. O presente estudo corrobora com os achados por esses autores, onde os grupos com adição de enzimas exógenas melhoraram a digestibilidade dos nutrientes, especialmente FDN e amido, bem como mudanças na fermentação ruminal, como maior produção de propionato, possibilitando maior aporte energético ao animal e melhora no desempenho produtivo.

Nesse sentido, Tricarico et al. (2005) descreveram efeitos positivos na produção de leite dos animais que receberam enzima amilolítica, onde os autores discorreram sobre os benefícios da enzima amilolítica na maior produção de leite associado aos efeitos na fermentação ruminal e as alterações no metabolismo dos nutrientes, e reforçam a ideia que, de fato, a enzima atua como um modulador ruminal. Esses autores ainda encontraram efeitos nos componentes do leite com as doses crescentes da enzima, onde houve aumento quadrático para o teor da gordura e tendência ao aumento da proteína. No presente estudo não houve efeitos para gordura no leite, no entanto, também houve tendência para aumento da produção de proteína nos tratamentos que receberam as enzimas em comparação com o controle, bem como maior produção de lactose. O aumento da produção de lactose está relacionado ao aumento da produção de leite semelhante ao reportado no trabalho de Eun e Beauchemin (2005). O propionato é o principal precursor da gliconeogênese em ruminantes, e a glândula mamária é um dos tecidos de exigência obrigatória de glicose para a síntese de lactose (ASCHENBACH et al., 2010). Portanto, o aumento da produção de lactose do leite pode ter sido apoiado por essa sucessão de resultados: maior digestibilidade do amido, maior produção de propionato, e maiores produções de leite e de lactose no leite.

Não observamos diferenças no consumo de MS e nutrientes nos diferentes tratamentos. Isso foi observado em outros estudos que, da mesma forma, testaram enzimas exógenas na

alimentação de vacas leiteiras (WEISS et al., 2011; VARGAS-RODRIGUES et al., 2014; TRICARICO et al., 2005; TAKIYA et al., 2017), porém vale ressaltar que o CMS está intrinsicamente relacionado com a dieta, teor de amido na dieta e dosagem das enzimas utilizadas, a forma como cada enzima foi ofertada, bem como a fase de lactação das vacas e sua produção diária. Esses fatores, especialmente ligados a dieta, podem ocasionar mudanças fermentativas permitindo melhorar a digestibilidade de alguns nutrientes, como relatado por Arriola et al. (2017) em sua meta análise, onde a inclusão de enzima amilolítica promoveu melhora na digestibilidade da fibra sem afetar CMS. No presente estudo foi encontrado mudanças na digestibilidade de FDN e amido no grupo A5P4, e esses efeitos podem estar relacionados aos benefícios da associação das enzimas, bem como a dosagem da enzima proteolítica utilizada neste tratamento (0,4 g/kg MS), favorecendo a hidrólise e melhorando a disponibilidade dos nutrientes para a digestão.

Alguns autores têm observado que a adição de enzimas exógenas na alimentação de vacas leiteiras pode alterar a seleção de partículas das dietas (ANDREAZZI et al., 2018; ZILIO et al., 2019), podendo promover alterações na digestibilidade da fibra e fermentação ruminal. No presente estudo, para dados de seleção de partículas, as vacas que receberam as enzimas em combinações apresentaram maior seleção para partículas maiores que 19mm e menor índice de seleção para partículas inferiores a 4mm, quando comparada com A5. Curiosamente, a digestão de FDN foi maior nos grupos que tiveram preferência por partículas maiores (A5P2 e A5P4), o que nos leva a presumir que devido aos animais ingerirem mais fibra longa propiciou maior área de contato para os microrganismos ruminais, podendo amparar o aumento da digestibilidade do FDN, a qual foi maior no grupo A5P4 em comparação ao A5P2 (NSEREKO et al., 2000; WANG et al., 2001). Ainda, devido a facilidade dos animais em digerir fibra em função do aumento da digestibilidade da FDN, optaram por maior consumo de fibras longas na dieta, como observado por Silva et al. (2016).

Levando em consideração a dieta com proporção 48:52 volumoso:concentrado, onde o único volumoso é a silagem de milho, pode ser que os animais procurassem por fibra longa para neutralizar os efeitos da maior digestibilidade do amido encontrada no presente estudo. Nesse sentido, os dados de pH ruminal suportariam a ideia, pois se manteve constante mesmo para os grupos que a digestão do amido foi maior. DeVries (2008) observou que vacas em lactação recebendo dietas com menos de 50% de forragem preferem partículas maiores, o contrário também se confirma, onde selecionam menos partículas longas e preferem partículas intermediárias em dietas com mais de 60% de forragem. Ainda, o consumo preferencial de partículas com maior teor de energia é esperado quando a demanda por fibra (partículas longas)

é atendida (MILLER-CUSHON; DEVRIES, 2017), sugerindo que nas proporções de volumoso:concentrado do presente estudo a demanda por energia foi atendida podendo ser atribuído, em partes, pela maior digestibilidade do amido, daí a busca por mais fibras longas pelos animais.

Levando em consideração que as enzimas melhoram a digestibilidade do amido esperávamos aumento nas concentrações de propionato e diminuição do pH. No entanto, não encontramos mudanças no pH ruminal, mas observamos tendência em aumentar o propionato para os grupos com inclusão das enzimas em relação ao controle. As vacas do grupo A5 aumentaram as concentrações de propionato em relação aos grupos que receberam as combinações, corroborando com a ideia de que enzima amilolítica pode modular a fermentação ruminal. De forma geral, a inclusão de enzimas exógenas na dieta melhora a atividade enzimática no rúmen e conseqüentemente, aumenta a degradação ruminal de nutrientes (NOZIÈRE et al., 2014). O aumento da digestibilidade ruminal dos carboidratos ocasiona o aumento da concentração de carboidratos solúveis, que servem de substrato tanto para as bactérias amilolíticas quanto para as não-amilolíticas, afetando os produtos finais da fermentação ruminal (BEUACHEMIN et al., 2003; TRICARICO et al. 2008; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014).

É discutido na literatura que a utilização da enzima amilolítica module a fermentação ruminal. Com os resultados do presente estudo sugerimos que a pretease também contribui com esse processo, como já reportado por Eun e Beauchemin (2005) em seu estudo. Essa alteração no metabolismo microbiano pode acontecer pelo crescimento de espécies de bactérias não-amilolíticas de maneira mais rápida do que as bactérias amilolíticas, sugerindo que populações do rúmen se beneficiem dessas enzimas exógenas. Esse mecanismo é conhecido como alimentação cruzada e é característica do ecossistema microbiano, onde os microrganismos utilizam de produtos da hidrólise de outras espécies, modificando os produtos resultantes da fermentação ruminal (COTTA et al., 1988; TRICARICO et al., 2005), o que pode explicar a maior digestibilidade da fibra no grupo A5P4 encontrada no presente trabalho. Nozière et al. (2014) suplementaram com amilase vacas primíparas e reportaram aumento na digestibilidade ruminal do amido, no entanto encontraram redução na relação acetato:propionato no rúmen. Contudo, no trabalho de Tricarico et al. (2005), a suplementação com enzima amilolítica aumentou linearmente a proporção de acetato e diminuíram de propionato no rúmen. É importante ressaltar que nesses estudos foram utilizadas diferentes fontes de amido e forragem, diferentes estágios de lactação e diferentes níveis de consumo de MS.

Em relação a interação tratamento e tempo para isobutirato encontrados neste trabalho, há autores que sugerem que tanto o isobutirato quanto isovalerato são capazes de aumentar a atividade de bactérias celulolíticas, tendo em vista que estes são fatores de crescimento microbiano (BUTTERY; FOULDS, 1988), o que poderia corroborar com o aumento da digestibilidade do FDN nesse estudo. Além disso, há discussões que produtos gerados por bactérias celulolíticas podem ser utilizados por bactérias não celulolíticas (RUSSEL, 1985). Essas informações sugerem que os microrganismos que fazem parte do ecossistema ruminal têm a capacidade de utilizar produtos da hidrólise gerado por outras espécies.

Estudos corroboram com a ideia de que a adição da amilase exógena na dieta de vacas leiteiras melhora a digestibilidade da fibra (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011), por isso o aumento da digestibilidade da FDN poderia ser esperado em nosso estudo quando utilizada a amilase. No entanto, no presente estudo a digestibilidade do FDN foi maior quando adicionamos mais enzima proteolítica associada a amilolítica e não isolada. Estudos que utilizaram uma mistura de enzimas, contendo entre elas xilanase, amilase e protease, também encontraram maior digestibilidade do FDN (GADO et al., 2009) bem como quando utilizado somente a protease (EUN e BEAUCHEMIN, 2005). Esse aumento da digestibilidade de nutrientes não amiláceos, como a FDN, é suportado pela teoria de Tricarico et al. (2008), em que enzimas exógenas (como a proveniente de *Aspergillus oryzae*) modificam o metabolismo microbiano ou a população microbiana no rúmen. A suplementação com enzima amilolítica aumenta a produção de maltodextrinas que podem ser utilizadas por uma variedade de bactérias incluindo amilolíticas e não-amilolíticas. O autor ainda ressalta o efeito sinérgico entre a protease e celulase quanto há exposição dos grãos de cereais a degradação dos componentes fibrosos do alimento.

O teor de FDN da dieta do presente estudo ficou relativamente alto, 39,7%, o que pode ter favorecido o efeito sinérgico entre celulose e protease, como o mencionado por Walsh; Power; Headon (1993). Outra ideia em relação a esse valor relativamente elevado de FDN na dieta é a levantada por Silvestre et al., (2022) em seu estudo. Os autores utilizaram a adição da enzima amilolítica a dieta experimental com teor de FDN semelhante a utilizada neste trabalho (39,1% de FDN), e discutem que a maior concentração de FDN provavelmente resultou em taxa de passagem mais lenta, o que diminuiu o CMS através de mecanismos de enchimento ruminal (DADO e ALLEN, 1995; ALLEN, 2000; MILLER et al., 2020). Esses dados podem nos levar a discutir sobre a passagem mais lenta da digesta no rúmen e maior tempo de retenção ter contribuído na maior digestibilidade do amido devido ao maior tempo disponível para a atuação das enzimas exógenas. Em contrapartida, Eun e Beauchemin (2005) trabalharam com

vacas em lactação testando a adição de enzimas proteolíticas na forma líquida na dieta, com diferentes proporções de volumoso:concentrado, sendo 60:40 vs. 34:66 na MS. Curiosamente, a enzima proteolítica melhorou a digestibilidade dos nutrientes, dentre eles o FDN para o grupo de baixo volumoso em relação ao de alto volumoso.

Diferente do estudo citado anteriormente, a enzima proteolítica utilizada nesse estudo contém proteases e uma parcela mínima de celulase em sua composição, provenientes do produto da fermentação de *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*, o que pode ser atribuído como motivo para o aumento da digestibilidade do FDN. No entanto, devemos interpretar com cuidado essa informação, pois nos estudos citados anteriormente, as enzimas utilizadas eram unicamente proteases e estimularam populações fibrolíticas quando adicionadas a dieta (EUN e BEAUCHMEIN, 2005). Ainda, o fator da estabilidade ruminal de uma enzima pouco estudada em vacas leiteiras. No entanto, Morgavi et al. (2001) concluíram que a estabilidade ruminal parece não ser um fator limitante para a atividade de aditivos de enzimas alimentares provenientes do fungo *Trichoderma*, o que torna plausível compreender a estabilidade da enzima proteolítica utilizada nesse estudo, visto que provém de *Trichoderma*.

O mecanismo pelo qual a melhora na digestibilidade do FDN acontece, ainda não é claro, mas é discutido neste e em outros estudos que com a utilização das enzimas exógenas há um aumento na atividade enzimática total do rúmen, o que pode contribuir para o aumento da digestibilidade no trato total da dieta fornecida (ZILIO et al., 2019). Morgavi et al. (2000) elucidaram sobre os efeitos sinérgicos da suplementação enzimática, demonstraram sinergismo entre enzimas exógenas e enzimas ruminais, de modo que o efeito hidrolítico combinado no rúmen foi muito maior do que o estimado a partir das atividades enzimáticas individuais. Outra possibilidade já elucidada por EUN e BEACHIMAN (2005) são os efeitos da enzima proteolítica nas barreiras estruturais dos ingredientes da dieta, facilitando o acesso microbiano mais rápido a fibra digestível (NSEREKO et al., 2000; COLOMBATTO et al., 2003a).

Ainda, o aumento da desaminação e conseqüente liberação de amônia no rúmen pela inclusão da enzima proteolítica pode ser correlacionado com o aumento da digestibilidade do FDN. Sugere-se que com aumento da amônia no ambiente ruminal, há um aumento das bactérias celulolíticas, visto que estas utilizam amônia para seu crescimento (HOOVER, 1986), o que pode ter contribuído com a melhora na digestibilidade do FDN no grupo A5P2. Acerca da ideia da desaminação citada anteriormente, parte da premissa que a atividade da enzima proteolítica possa causar um aumento das respostas a proteólise e desaminação, contribuindo na fermentação ruminal (MCDONALD et al., 1991). Em resposta a desaminação, era esperado que o nitrogênio amoniacal no rúmen estivesse elevado, mas isso não foi encontrado neste

estudo, o que vai de acordo com o estudo de Oh et al. (2019), onde a enzima não afetou a concentração de amônia ruminal. No entanto, a amônia pode ter sido utilizada pelos microrganismos ruminais, sendo absorvida pela parede ruminal e levada até a corrente sanguínea. Portanto, podemos correlacionar com os resultados de ureia sérica onde houve tendência pode ser relevante, já que os grupos com enzimas na dieta tiveram maior concentração de ureia no sangue em comparação ao grupo controle. Isso se deve pela amônia, que quando liberada é convertida em ureia, produto de excreção dos ruminantes, por meio do ciclo da ureia. Esse mecanismo consiste na produção de ureia que ocorre quase exclusivamente no fígado, sendo o destino da maior parte da amônia canalizada para esse órgão, passando para a circulação sanguínea e chegando aos rins, sendo excretada na urina (LENINGHER, 2005). Inclusive, autores que utilizaram concentração de amônia quando se avalia a fermentação de silagens, alegam que esse parâmetro pode ser uma boa resposta a ser considerada quando há hidrólise da porção proteica. Em silagens, a amônia tem sido correlacionada com a degradação da matriz proteica dos grãos presentes, e ainda sendo considerados bons indicadores da digestibilidade do amido (DER BEDROSIAN et al., 2012; FERRARETTO et al., 2015).

Já em relação a maior excreção de N no leite, pode estar correlacionado a maior concentração de ureia no sangue, o qual obteve tendência para maior excreção para os grupos que receberam as enzimas. De fato, os resultados da utilização de enzimas exógenas podem ser de difícil interpretação, devido a aplicação aos diferentes cenários entre eles o estágio de lactação das vacas, tipo de enzima, dosagens, associações, forma de aplicação, tipo e qualidade dos alimentos empregados na dieta (YANG et al., 2019).

1.8 CONCLUSÃO

A inclusão de enzimas na alimentação de vacas leiteiras promoveu aumento na PL e PLCG sem afetar o CMS. A associação das enzimas amilolíticas e proteolíticas podem promover mudanças na fermentação ruminal, como aumento na produção total de AGCC sem afetar o pH ruminal, bem como diferentes dosagens de enzimas proteolíticas permite melhorar a digestibilidade de FDN e amido.

1.10 REFERÊNCIAS

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1598 – 1624, 2000.

- AMARO, F. X. et al. Effects of exogenous α -amylases, glucoamylases, and proteases on ruminal in vitro dry matter and starch digestibility, gas production, and volatile fatty acids of mature dent corn grain. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2021.
- ANTUNES, R.C.; RODRIGUES, N.M. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, p.229- 253, 2006.
- ANDREAZZI, A. S. R. et al. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 7199–7207, 1 ago. 2018.
- ARRIOLA, K. G.; OLIVEIRA, A. S.; MA, X. Z.; LEAN, I. J.; GIURCANU, M. C.; ADESOGAN, A. T. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-15, 2017.
- ASCHENBACH, J. R., N. B. KRISTENSEN, S. S. DONKIN, H. M. HAMMON; G. B. PENNER. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* 62 p. 869–877, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington, DC.,USA, 2000.
- BACIC, A.; P. J. HARRIS; B. A. STONE. Structure and function of plant cell walls. **The Biochemistry of Plants**. Vol. 14, p. 297-371, 1988.
- BALDWIN, R. L. Estimation of theoretical calorific relationships as a teaching technique. A review. *Journal Dairy Science* 51: 104-111, 1968.
- BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2. ed. London, UK: CAB International, 2011. p. 1-11.
- BEAUCHEMIN, K. et al. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14_suppl_2, p. E37–E47, 1 fev. 2003.
- BECKMAN, J. L., AND W. P. WEISS. Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. **J. Dairy Science**. 88 p. 1015–1023, 2005.
- BRITO, C. O. et al. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 457–461, 2006.
- BRODERICK, G. A., and M. K. CLAYTON. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal Dairy Science**, v.80, p. 2964–2971. 1997.
- BURROUGHS, W. et al. Enzyme Additions to Fattening Cattle Rations. **Journal of Animal Science**, v. 19, n. 2, p. 458–464, 1 maio 1960.

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

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

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

COLOMBATTO, D. et al. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminai degradation. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 10, p. 2628–2638, 1 out. 2003.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A protease additive increases fermentation of alfalfa diets by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 3, p. 1097–1105, 1 mar. 2009.

CONE, J. W.; BECKER, P. M. Fermentation kinetics and production of volatile fatty acids and microbial protein by starchy feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, n. 1–2, p. 34–41, 28 fev. 2012.

CORREA, C. E. S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 3008–3012, 1 nov. 2002.

COSTA, C. et al. Desempenho de bovinos superprecoce alimentados com silagem de milho ou feno de aveia e grãos de milho ensilados ou secos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, n. 0, p. 1175, 29 abr. 2008.

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

COTTA, M. A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 48-54, 1992.

DADO, R. G., AND M. S. ALLEN. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **J. Dairy Science**. 78 p. 118–133, 1995.

DE OLIVEIRA EIXEIRA, A. et al. Exogenous enzymes in diets with different protein levels and sources for pigs in the nursery period. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 900–906, 2005.

DEFRAIN, J. M. et al. Effects of dietary α -amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4405–4413, 1 dez. 2005.

DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG, L. The effect of various doses of an exogenous acid protease on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.

102, n. 12, p. 10925–10933, 1 dez. 2019.

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

DIAS, J. C. C. A. et al. Evaluation of in vitro stability of a commercial protease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 618–622, 2002.

DILORENZO, N. et al. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**, v. 137, n. 1–3, p. 178–184, 1 maio 2011.

DEFOOR, P. J.; BROWN, M. S.; OWENS, F. N. RECONSTITUTION OF GRAIN SORGHUM FOR RUMINANTS. Invited Presentation. **Oklahoma Cattle Grain Processing Symposium**. p. 93-98, 2006.

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

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2140–2153, 2005.

EUN, J.-S. e BEAUCHEMIN, K.A. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **Journal Dairy Sci.** v. 90 p. 2839–2851, 2007.

FERRARETTO, L. F. et al. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1490–1499, 1 mar. 2011.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of ensiling time and exogenous protease addition to whole-plant corn silage of various hybrids, maturities, and chop lengths on nitrogen fractions and ruminal in vitro starch digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8869–8881, 1 dez. 2015.

FIRKINS, J. L. et al. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. E-Suppl, p. E218, 1 jan. 2001.

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

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, n. 1–2, p. 36–46, 28 out. 2009.

GALLO, A. et al. Short communication: The effect of an exogenous enzyme with amylolytic

activity on gas production and in vitro rumen starch degradability of small and large particles of corn or barley meals. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3602–3606, 1 maio 2016.

GENCOGLU, H. et al. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 723–732, 1 fev. 2010.

GIUBERTI, G. et al. **Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review** *Starch/Staerke* John Wiley & Sons, Ltd, , 1 jan. 2014.

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

HARMON, D. L., R. M. YAMKA, and N. A. ELAM. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: A review. *Can. Journal Animal Science* 84:309-318, 2005.

HARMON, D. L. Understanding starch utilization in the small intestine of cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 7, p. 915–922, 2009.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465–2474, 1 maio 2011.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **J. Dairy Sci.**, 69(10):2755-2766, 1986.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 182–193, 14 ago. 2008.

HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76, n. 1–2, p. 161–168, 1 dez. 1998.

HRISTOV, A. N., J. K. ROPP, K. L. GRANDEEN, S. ABEDI, R. P. ETTER, A. MELGAR, A. E. FOLEY. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. **J. Anim. Science**. 83408– 421, 2005.

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

HUNTINGTON, G. B. Starch Utilization by Ruminants: From Basics to the Bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 852–867, 1 mar. 1997.

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

IMMANUEL, G.; DHANUSHA, R.; PREMA, P.; PALAVESAM, A. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting

effluents of estuarine environment. **International Journal Environmental Science and Technology**, v. 3; p. 25-34, 2006.

JOHNSON, NTINYA C.; OGBAMGBA, VICTOR M.; MBACHIANTIM, JAMES T. A Review on maize (*Zea mays*) Nutritive Value and Exogenous Enzymes Needed for Optimal Digestibility in Non-Ruminants Diets, such as Poultry. **European Journal of Science, Innovation and Technology**, v. 2, n. 1, p. 50-53, 2022.

JOUANY, J. P., and K. USHIDA. The role of protozoa in feed digestion – review. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 12: 113-128, 1999.

JUNG, H. J. G. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. In: *Journal of Nutrition*, 5 SUPPL., **Anais...American Society for Nutrition**, 1 maio 1997.

KLINGERMAN, C. M. et al. An evaluation of exogenous enzymes with amyolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1050–1059, 1 mar. 2009.

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

KOPECNY, J.; WALLACE, R. J. Cellular Location and Some Properties of Proteolytic Enzymes of Rumen Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, 1982.

KOZLOSKI, V, G, *Bioquímica dos ruminantes*, 3 ed, 1º reimpressão, UFSM, Santa Maria, RS, 2016.

KUNG, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1707–1712, 1 mar. 2014.

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

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347- 358, 1996.

LOPES, J. C. et al. Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4541–4548, 1 set. 2009.

MADER T, RUST S. High moisture grains: harvesting, processing and storage. Invited presentation. **Oklahoma cattle grain processing symposium**. p. 88–92, 2006.

MCALLISTER, T. A. et al. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. **Journal of animal science**, v. 71, n. 1, p. 205–212, 1 jan. 1993.

MCALLISTER, T. A., GIBB, D. J., BEAUCHEMIN, K. A. AND WANG, Y. Starch type, structure and ruminal digestion. **In Cattle Grain Processing Symposium**. Nov. 15_17, Oklahoma State University, Tulsa. 2006.

- MCALLISTER, T. A.; RIBEIRO, G. Microbial strategies in the ruminal digestion of starch. **The integration of knowledge in animal production**. 50th Annual Meeting of the Brazilian Society of Animal Science, Campinas, Brazil, 23-26, 2013.
- MCDONALD, P., A. R. HENDERSON, AND S.J.E., HERON. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe Publ., Marlow, United Kingdom, 1991.
- MEANS, G. E.; R. E. FEENEY. *Chemical Modifications of Proteins*. Holden-Day Inc., San Francisco, CA, 1971.
- MENEZES BB, MORAIS MG, BATISTA RDS, MACIEL D, JOSIAS R, BRIXNER BM, GODOY C. Características estruturais do grão de milho sobre a digestibilidade do amido em bovinos. In: X Mostra Científica. Campo Grande: UFMS, p. 155-163, 2017.
- MESCHIATTI, M. A. P. et al. Feeding the combination of essential oils and exogenous α -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 1, p. 456–471, 1 jan. 2019.
- MILLER-CUSHON, E. K.; DEVRIES, T. J. Feed sorting in dairy cattle: Causes, consequences, and management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 4172 – 4183, 2017.
- MILLER, M. D., J. S. LANIER, S. K. KVIDERA, H. M. DANN, C. S. BALLARD, AND R. J. GRANT. Evaluation of source of corn silage and trace minerals on rumen characteristics and passage rate of Holstein cows. **J. Dairy Science**, 103 p. 8864–8879, 2020.
- MORGAVI, D. P. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1310–1321, 2000.
- MOURA, G. D. S. et al. Performance and amylase activity in Nile tilapia submitted to different temperatures. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1609–1615, 2007.
- NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051-2069, 1988.
- NOZIÈRE, P.; ORTIGUES-MARTY, I.; LONCKE, C.; SAUVANT, D. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: From feed starch and fibre nutrients available for tissues. **Animal**, v. 4, p. 1057-1074, 2010.
- NOZIÈRE, P. et al. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2319–2328, 1 abr. 2014.
- NSEREKO, V. L. et al. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, n. 3–4, p. 153–170, 2000.
- OH, J., HARPER, M., MELGAR, A., COMPART, D. P., & HRISTOV, A. N. Effects of *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial and exogenous enzyme products on enteric methane emission and productivity in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**,

v. 102, n. 7, p. 6065-6075, 2019.

OWENS, F. N. et al. **The Effect of Grain Source and Grain Processing on Performance of Feedlot Cattle: A Review** *Journal of Animal Science* American Society of Animal Science, , 1 mar. 1997.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Corn grain for cattle: influence of processing on site and extent of digestion. In: **southwest nutrition conference**, 2005.NNebraska, p. 86-112, 2005.

OWENS FN, Soderlund S. Ruminal and postruminal starch digestion by cattle. In: **Pioneer Hi-Bred, a DuPont business conference**, Johnston, 2007.

PACK, M., M. R. BEDFORD, AND C. L. Wyatt. Feed enzymes may improve corn, sorghum diets. **Feedstuffs** 70 p. 18–19, 1998.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

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

PRIGGE, E. C. Ensiling conditions and soluble nitrogen and high moisture corn utilization. Invited Presentation. **Oklahoma High Moisture Grains Symposium**. p. 76-93, 1976.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. Journal*, 378: 705–16, 2004.

RAVINDRAN, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 628–636, 1 out. 2013.

REIS, W. Dos et al. Características da Carcaça de Cordeiros Alimentados com Dietas Contendo Grãos de Milho Conservados em Diferentes Formas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1308–1315, jul. 2001.

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

ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. **Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn.** *Journal of animal science* Oxford Academic, , 1 nov. 1986.

RUSSEL, J. B. Fermentation of cellodextrins by cellulytic and noncellulolytic rumen bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v. 49, 572-576, 1968.

SAGRILO, Edvaldo et al. Effect of Harvest Period on the Quality of storage roots and protein content of the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta*, Crantz). **Brazilian**

Archives of Biology and Technology, v. 46, n. 2, p. 295-305, 2003.

SALVATI, G. G. S., W. P. SANTOS, J. M. SILVEIRA, V. C. GRITTI, B. A. V. ARTHUR, P. A. R. SALVO, L. FACHIN, A. P. RIBEIRO, N. N. MORAIS JÚNIOR, L. F. FERRARETTO, J. L. P. DANIEL, K. A. BEAUCHEMIN, F. A. P. SANTOS, AND L. G. NUSSIO. Effect of kernel processing and particle size of whole-plant corn silage with vitreous endosperm on dairy cow performance. **J. Dairy Science**. 104:1794–1810, 2021.

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

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

SILVA, G. G., TAKIYA, C. S., DEL VALLE, T. A., DE JESUS, E. F., GRIGOLETTO, N. T., NAKADONARI, B.; RENNÓ, F. P. Nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk yield in dairy cows fed a blend of essential oils and amylase. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 9815–9826, 2018.

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

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

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

TAKIYA, C. S. et al. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity on nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 159–167, 2017.

TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 4, p. 1413–1424, 1 abr. 2005.

TOSETI, L. B. et al. Effects of a blend of essential oils and exogenous α -amylase in diets containing different roughage sources for finishing beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114643, 1 nov. 2020.

TRICARICO, J. M. et al. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Animal Science**, v. 81, n. 3, p. 365–374, dez. 2005.

TRICARICO, J. M. et al. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*-amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 136–150, 2008.

- TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 136–150, 14 ago. 2008.
- VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686–2696, 1999.
- VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 45–53, 1991.
- VARGAS-RODRIGUEZ, C. F.; ENGSTROM, M.; AZEM, E.; BRADFORD, B. J. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4464–4470, 2014.
- VASANTHAN, T.; BAHATTY, R. S. Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular and high amylose barleys. **Cereal Chemistry**, v. 73, p. 199–207, 1996.
- VERA, J. M. et al. Effects of an exogenous proteolytic enzyme on growth performance of beef steers and in vitro ruminal fermentation in continuous cultures I. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 4, p. 452–463, 1 ago. 2012.
- VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243–248, 1990.
- WALSH, G. A.; POWER, R. F.; HEADON, D. R. **Enzymes in the animal-feed industry** *Trends in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, , 1 out. 1993.
- WANG, Y., MCALLISTER, T.A., RODE, L.M., BEAUCHEMIN, K.A., MORGAVI, D.P., NSEREKO, V.L., IWAASA, A.D., YANG, W. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen simulation technique (Rusitec). **Br. J. Nutr.** v. 85 p. 325–332, 2001.
- WEBSTER, A. J. F. Energy costs of digestion and metabolism in the gut. In: **Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants**. [s.l.] Springer Netherlands, p. 469–484, 1980.
- WEISS, W. P.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2492–2499, 2011.
- 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, n. 11, p. 2512–2520, 1 nov. 2000.
- YOUNG, K. M. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6687–6694, 1 nov. 2012.

YU, B.; TSEN, H. Y. An in vitro assessment of several enzymes for the supplementation of rabbit diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 309–320, 1 fev. 1993.

ZILIO, E. M. C. et al. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4179–4189, 1 maio 2019.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. **Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle** **Journal of Animal Science** American Society of Animal Science, 2002.

2. EXTRATO DE MALTE SECO DE CEVADA SUBSTITUINDO PARCIALMENTE O MILHO MOÍDO EM DIETAS DE VACAS LEITEIRAS: DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E DESEMPENHO PRODUTIVO.

BUGONI, M., TAKIYA C. S., GRIGOLETTO N. T. S., NUNES A. T., VITTORAZZI, P. C. J., CHESINI, R. G., SILVA, G., ALCANTARA, L. V. B., RENNÓ, L. N., AND. RENNÓ, F. P. Dry malt extract from barley partially replacing ground corn in diets of dairy cows: nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk composition. **Journal of Dairy Science**, 2022.

RESUMO

O extrato de malte seco (EMS) tem sido utilizado na nutrição animal como fonte alternativa de carboidrato rapidamente fermentável. O experimento foi conduzido para avaliar a substituição parcial de milho moído por EMS em dietas de vacas leiteiras quanto à digestibilidade aparente total, fermentação ruminal, produção de proteína microbiana ruminal, excreção de N, concentração sérica de ureia e produção e composição do leite. Vinte e oito vacas da raça Holandesa (produção de leite de $35,3 \pm 5,88$ kg/d e 148 ± 78 DEL), sendo quatro canuladas no rúmen, foram distribuídas de acordo com a presença de cânulas ruminais, número de partos, produção de leite e DEL e distribuídas em um delineamento *crossover*. Os períodos experimentais duraram 21 dias, dos quais os primeiros 14 dias foram destinados a adaptação ao tratamento e 7 dias foram usados para coleta de dados e amostragem. Os tratamentos foram compostos por controle (CON) ou EMS de cevada (Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) em substituição ao milho moído em 7,62% MS da dieta (~2 kg/d). Os dados foram analisados usando o procedimento MIXED do SAS modelando os efeitos fixos de tratamento, período e sua interação, além do efeito aleatório de animal. Os dados de fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas incluindo o tempo e sua interação com o tratamento no modelo anterior como efeitos fixos. O EMS não afetou a ingestão de nutrientes ou a seleção de partículas. O EMS aumentou a digestibilidade aparente da PB. A alimentação com EMS diminuiu o pH ruminal e a porcentagem molar de butirato e aumentou a porcentagem molar de acetato. Não foram detectados efeitos do tratamento para o fornecimento de proteína microbiana do rúmen ou excreção de N. Vacas alimentadas com EMS apresentaram menor concentração sérica de ureia do que vacas CON. EMS aumentou a produção de leite, produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, produção de gordura e proteína e melhorou a eficiência alimentar ($PLCG \div CMS$). Vacas alimentadas com EMS apresentaram menor teor de NUL em comparação com vacas CON. O extrato de malte seco

pode substituir parcialmente o milho moído na dieta, melhorando a produção de leite e a eficiência alimentar.

Palavras-chave: açúcar, carboidrato rapidamente fermentável, malte de cevada.

2. DRY MALT EXTRACT FROM BARLEY PARTIALLY REPLACING GROUND CORN IN DIETS OF DAIRY COWS: NUTRIENT DIGESTIBILITY, RUMINAL FERMENTATION, AND MILK COMPOSITION.

ABSTRACT

Dry malt extract (DME) has been used in animal nutrition as an alternative source of rapidly fermentable carbohydrate. An experiment was conducted to evaluate the partial replacement of ground corn with DME in diets of dairy cows on apparent digestibility, ruminal fermentation, predicted rumen microbial protein supply, N excretion, serum urea-N concentration, and milk yield and composition. Twenty-eight Holstein cows (35.3 ± 5.88 kg/d milk yield and 148 ± 78 DIM), four of which were rumen cannulated, were blocked according to the presence of rumen cannulas, parity, milk yield, and DIM and enrolled into a crossover design experiment. Experimental periods lasted 21 d of which the first 14 d were allowed for treatment adaptation and 7 d were used for data collection and sampling. Treatment sequences were composed of control (CON) or DME from barley (Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brazil) replacing ground corn at 7.62% diet DM (~ 2 kg/d). Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS modeling the fixed effects of treatment, period, and their interaction, besides the random effect of animal. Ruminal fermentation data were analyzed as repeated measures including time and its interaction with treatment in the previous model as fixed effects. Treatments did not affect nutrient intake or feed sorting. Dry malt extract increased apparent digestibility of CP. Feeding DME decreased ruminal pH and molar percentage of butyrate and increased molar percentage of acetate. No treatment effects were detected for predicted rumen microbial protein supply or N excretion. Cows fed DME had lower serum urea-N concentration than CON cows. Dry malt extract increased yields of actual milk, 3.5% fat-corrected milk, production of fat, and protein, and improved feed efficiency ($\text{FCM} \div \text{DMI}$). Cows fed DME had lower MUN content in comparison with CON cows. Dry malt extract can partially replace ground corn in diet while improving milk yield and feed efficiency.

Keywords: carbohydrate, malting barley, rapidly fermentable carbohydrate, sugar

2.2 INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare L.*) é o cereal primário utilizado na produção mundial de malte e contém (com base na MS) 65 a 68% de amido, 10 a 17% de PB, 4 a 9% de β -glucana, 2 a 3% de lipídios livres e 1,5% a 2,5% de minerais (CZUCHAJOWSKA et al., 1998; IZYDORCZYK et al., 2000). Cerca de dois terços da produção de cevada são usados para alimentação humana e um terço para produção de malte, e cerca de 2% para alimentos diretamente (LI et al., 2001; BAIK e ULLRICH, 2008). Durante a maltagem, a cevada sofre processo incompleto de germinação natural que envolve uma série de degradações enzimáticas do endosperma do grão. Como resultado da atividade enzimática (especialmente das enzimas amilolíticas e proteolíticas), as paredes celulares do endosperma são degradadas, os grânulos de amido são liberados da matriz do endosperma em que estão inseridos (GUPTA et al., 2010), aumentando o conteúdo de proteína solúvel e açúcares simples (HOSENEY, 1994).

Os extratos de malte podem ser obtidos após o malte de cevada passar por uma série de processos que incluem hidratação, extrusão, resfriamento, esmagamento do malte, preparação do mosto (processo de extração), hidrólise do mosto, subsequente separação (filtragem) e evaporação do mosto para produzir o extrato líquido de malte (SAFONOVA et al., 2018). O extrato de malte líquido pode ser posteriormente seco para produzir o extrato de malte seco (EMS), que é cristalino em uma forma semelhante ao açúcar comum. Durante o processo de mostura, polissacarídeos do extrato de malte são degradados e carboidratos fermentáveis (maltose, isomaltose, maltotriose, etc) são produzidos (PAIK et al., 1991). Polissacarídeos não amiláceos também são degradados durante o processo de trituração em carboidratos menores (GUPTA et al., 2010). Assim, o extrato de malte é geralmente composto por carboidratos menores e é mais fermentável que o malte. A cevada maltada contém cerca de 63,0% de amido, 10,1% de carboidratos solúveis e 3,2% de açúcares redutores, enquanto um extrato de malte comercial contém 17,0% de amido, 92,1% de carboidratos solúveis e 35,9% de açúcares redutores (BHATTY, 1996).

Os extratos de malte da cevada possuem metade da doçura do xarope de açúcar e são amplamente utilizados na indústria alimentícia, na preparação de aditivos em massa para panificação, cereais matinais e cerveja (SAFONOVA et al., 2018). Extratos de malte também foram testados em dietas de aves (SEDGHI e AKBARI MOGHADDAM KAKHKI, 2018) e vacas leiteiras (BIAGI et al., 2007) sem influenciar o desempenho animal. Devido ao seu alto teor de carboidratos rapidamente fermentáveis, o extrato de malte pode substituir fontes de amido e açúcares em dietas de ruminantes como milho moído e melaço, dependendo dos custos

e disponibilidade. Extratos de malte podem ser usados para complementar dietas com teor de amido relativamente baixo. A cevada maltada também mostrou propriedades antioxidantes derivadas de seu teor de vitamina E (DO et al., 2015). No entanto, a substituição parcial do milho moído, cevada e sorgo por extrato de malte durante o período de transição e início da lactação não teve efeito sobre a produção e composição do leite durante os primeiros 120 dias de lactação (BIAGI et al., 2007). Até onde sabemos, não há publicações sobre os efeitos de um EMS de cevada na fermentação ruminal e no desempenho de vacas em meio de lactação.

2.3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da substituição parcial do milho moído por EMS (a 7,6% MS da dieta) na digestibilidade aparente total dos nutrientes, fermentação ruminal, fornecimento de proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite e concentrações de N-ureico no sangue de vacas leiteiras. A hipótese é que a substituição parcial do milho moído por EMS altera a fermentação ruminal e melhora o desempenho de vacas em lactação.

2.4 REVISÃO DE LITERATURA

Como visto no capítulo anterior, o amido é o principal carboidrato não fibroso da dieta de vacas em lactação, podendo variar dependendo de sua fonte na taxa de digestão e nos produtos finais da fermentação no rúmen, afetando subsequentemente a utilização de nutrientes pelos animais. Dentre os diferentes tipos de carboidratos empregados na dieta, os carboidratos não fibrosos, como o amido, fermentam mais rápido que a fibra e pode diminuir o pH ruminal, resultando em maior produção de propionato no rúmen (OWENS E GOETSCH, 1988). Embora dietas ricas em amido aumentem a densidade energética, o excesso de produção de propionato pode causar acidose (ALLEN, 2000) e o baixo pH ruminal pode causar depressão da gordura do leite (KALSCHEUR et al. 1997).

O amido pode ser substituído por açúcares na dieta, que se caracterizam por ser carboidratos solúveis em água e incluem dissacarídeos, como sacarose, lactose e maltose, e monossacarídeos, como glicose, galactose e frutose. O açúcar é considerado fração de carboidratos que fermenta muito rapidamente no rúmen (OBA, 2011). A sacarose e o amido são carboidratos não fibrosos que diferem entre si nas características de fermentação ruminal. Os açúcares desaparecem rapidamente no rúmen enquanto o amido fermenta mais lentamente.

O açúcar por não ter barreiras físicas ou porções insolúveis, a taxa ruminal de utilização de carboidrato não fibroso é muito mais rápida para açúcares em melaço do que para amido em grãos de milho (HALL e ZANTON, 2022). A taxa de fermentação do amido em grãos de milho é afetada pelo tamanho das partículas e processamento empregado (GALYEAN et al., 1981), pela matriz proteica associada aos grânulos de amido (PHILIPPEAU et al., 2000) e pela hidrofobicidade de alguns cultivares de milho (PÉREZ et al., 2009).

Essas características nutricionais dos açúcares podem permitir o uso de alimentos ricos em açúcar como fonte alternativa de energia para vacas leiteiras em lactação com redução do risco de acidose ruminal. No entanto, há evidências na literatura indicando que a produção de proteína microbiana não seria melhorada pela sincronia da fermentação ruminal com alimentação de dietas ricas em açúcar com alta proteína solúvel. Essa especulação é suportada por alguns estudos, onde a produção de proteína microbiana aumentou quando a sacarose substituiu o feno de alfafa (RIBEIRO et al. 2005), mas diminuiu (HALL E HEREJK, 2001) ou não foi afetada (VALLIMONT et al. 2004) quando a sacarose substituiu o amido. Ainda, Lean et al. (2005) mostraram que aumentou a eficiência microbiana *in vitro* com adição de açúcar na dieta. Ribeiro et al. (2005) mostraram que a produção de matéria orgânica bacteriana em cultura contínua aumentou linearmente de 12,3 para 14,4 g/d à medida que a concentração de sacarose aumentou de 0 a 8%. O açúcar pode ser menos eficiente em aumentar a síntese de proteína microbiana em comparação com o amido, em parte porque o açúcar fornece menos carbono do que o amido (HALL e HEREJK, 2001). Por outro lado, estudos sugerem que a utilização de N pode ser melhorada quando utilizado açúcares na dieta. Por exemplo, na revisão conduzida por Ondarza et al., (2017), dietas com teor de FDN da forragem variando de 14,61 a 38,48% da MS da dieta, o NUL diminuiu de 14,30 para 12,24 mg/dL com 5 a 7% de açúcar dietético adicionado (% de MS da dieta), indicando uma possível redução no desperdício de N pela vaca. Ainda, os autores mostraram que o açúcar na dieta acima de 7% reduziu as concentrações de amônia (MCCORMICK et al., 2001; BRODERICK et al., 2008; CHIBISA et al., 2015), indicando possíveis melhorias na utilização de N.

Oba (2011) em revisão bibliográfica mostrou que, de forma geral, apesar da rápida fermentação no rúmen e seu potencial para fornecer maior energia fermentável para aumentar a produção de proteína microbiana, a alimentação com açúcares no lugar de fontes de amido na dieta pode não diminuir o pH ruminal ou melhorar a eficiência de utilização de N e produção de proteína do leite em vacas leiteiras. No entanto, a alimentação com dietas ricas em açúcar geralmente aumenta a ingestão de matéria seca, a concentração de butirato no rúmen e a produção de gordura do leite. Os autores observaram ainda que a fermentação de açúcares no

rúmen inicia com a hidrólise de dissacarídeos em monossacarídeos, seguida pela fermentação de monossacarídeos, mas as taxas de hidrólise de dissacarídeos variam muito entre os diferentes tipos de açúcares. Isso indica que diferentes organismos microbianos podem estar envolvidos na hidrólise de diferentes tipos de dissacarídeos ou que a adaptação microbiana pode ser necessária para a hidrólise de dissacarídeos específicos.

Estudos *in vitro* encontrados na literatura indicaram que a alimentação com açúcares pode aumentar a produção de butirato no rúmen; por exemplo, a substituição de sacarose por amido de milho (VALLIMONT et al., 2004; CHIBISA et al., 2015) ou feno (RIBEIRO et al., 2005) aumentou a proporção molar de butirato. Mas esses resultados a respeito da fermentação ruminal são variáveis, a proporção molar de butirato no fluido ruminal *in vivo* foi aumentada (KELLOGG e OWEN 1969a, b), não afetada (SANNES et al., 2002; BRODERICK et al., 2008; PENNER e OBA, 2009), ou tendia a diminuir (MCCORMICK et al. 2001) pela substituição parcial de cereais por sacarose. Ainda, estudos onde o açúcar substituiu parcialmente o amido da dieta mostraram que a proporção molar de propionato foi diminuída (SCHINGOETHE et al. 1980; HELDT et al. 1999; DEFRAIN et al. 2004) ou não afetada (KELLOGG e OWEN 1969a, b; VALLIMONT et al. 2004).

A utilização de fontes de açúcar na dieta tem sido empregada como fonte alternativa de energia para vacas em lactação, especialmente nos cenários atuais em que houve um elevado aumento no preço de cereais como o milho, principal alimento energético da dieta brasileira para vacas em lactação. Nesse sentido, estudos relataram aumentos no consumo de MS (NOMBEKELA et al., 1994; BRODERICK e RADLOFF, 2004, PENNER et al., 2009) ou consumo de matéria orgânica (HELDT et al., 1999) quando as dietas continham sacarose em substituição ao amido. Ainda, estudos observaram que a adição de açúcar não melhorou a produção de leite ou o balanço energético, mas diminuiu o pH ruminal durante um período em que as vacas já estavam em risco de acidose ruminal (PENNER et al., 2007). Estudos na literatura mostram que o pH do rúmen não é afetado quando as fontes de amido da dieta são parcialmente substituídas por sacarose (SUTOH et al., 1996; MCCORMICK et al., 2001; BRODERICK et al., 2008). Ou que o pH do rúmen aumenta (CHAMBERLAIN et al., 1993; HELDT et al., 1999) ou tende a aumentar (PENNER et al., 2009; PENNER e OBA, 2009) com a substituição parcial de fontes alimentares de amido por açúcar.

Há na literatura algumas especulações do porquê essa elevação no pH acontece no rúmen. Uma possível explicação é que o açúcar fornece menos carbono em comparação com o amido para a produção de ácidos de fermentação por unidade de massa (HALL e HEREJK, 2001). Além disso, se maior oferta de açúcar na dieta aumenta a taxa de passagem (SUTOH et

al. 1996) ou produção de massa microbiana (RIBEIRO et al. 2005), menos matéria orgânica estaria disponível para a produção de ácidos de fermentação (ALLEN, 1997). A síntese de glicogênio microbiano a partir de açúcares é outra explicação possível; microrganismos podem converter sacarose em glicogênio como um armazenamento de energia de curto prazo (HALL E WEIMER, 2007), o que reduz temporariamente a produção de ácido de fermentação no rúmen, possivelmente contribuindo para um pH ruminal mais alto. Uma última especulação relacionada a questão do pH é devido a maior produção de butirato no rúmen a partir da alimentação com açúcar (VALLIMONT et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005), a qual diminuiria a produção de prótons por unidade de MO degradada ruminalmente em comparação com a produção de acetato ou propionato. Por exemplo: 1 mol de hexose fermentada para 1 mol de butirato, ou 2 moles para propionato ou acetato (OWENS E GOETSCH, 1988).

Na literatura, o efeito da sacarose na produção de leite é variável, com alguns estudos relatando aumentos na produção de leite (BRODERICK e RADLOFF, 2004; PENNER et al., 2009) e outros relatando nenhum efeito da suplementação de açúcar na produção de leite (NOMBEKELA E MURPHY, 1995; CHERNEY et al., 2003; BRODERICK et al., 2008, MARTEL et al., 2011; SIVERSON et al., 2014). Broderick e Radloff (2004) encontraram efeitos quadráticos da inclusão de açúcar na dieta na produção de leite em que a baixa concentração de açúcar na dieta (até 7%) aumentou a produção de leite, mas dietas com mais de 7% de açúcar diminuíram a produção de leite. DE ONDARZA et al. (2017) em sua meta análise sugerem que o açúcar total ideal na dieta é de 6,75% de MS da dieta, dentro de condições como dietas moderadas de amido (22-27% na MS da dieta) e alta fibra solúvel (6,0 a 8,5% na MS da dieta) para alcançar a resposta ideal de PLCG. Nesse mesmo estudo, os autores ressaltam que parâmetros da dieta incluindo amido, proteína e FDN da forragem influenciam a resposta da vaca à alimentação com açúcar, e ainda que vacas de maior produção têm maiores respostas ao açúcar da dieta.

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

2.5.1 Delineamento experimental e tratamentos

Este estudo foi realizado entre maio e julho de 2020 no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite – LPBL, Campus Pirassununga, sob a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil; protocolo nº 5986020620).

Vinte e oito vacas da raça Holandesa (4 primíparas e 24 multíparas, $35,3 \pm 5,88$ kg/d produção de leite, 148 ± 78 DEL e $696 \pm 80,6$ kg PC), quatro das quais ($30,7 \pm 1,87$ kg/d produção de leite, $171 \pm 112,3$ DEL e $706 \pm 85,6$ kg PC) canuladas no rúmen, foram blocadas de acordo com o número de partos, produção de leite e DEL e foram distribuídas em delineamento *crossover*. Os períodos experimentais duraram 21 dias, dos quais os primeiros 14 dias foram destinados para adaptação ao tratamento e 7 dias foram usados para coleta de dados e amostragem. As sequências de tratamento foram compostas por controle (CON) ou extrato de malte seco (EMS) de cevada (Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) em substituição ao milho moído a 7,62% MS da dieta (~ 2 kg/d). O EMS foi pesado para cada vaca (duas vezes ao dia nos horários de alimentação) e misturado à mão no concentrado preparado para o tratamento EMS (que teve menor inclusão de milho moído do que o concentrado CON). Esse processo de pesar duas vezes ao dia e misturar a mão foi feito devido ao alto poder higroscópico do EMS, o que impossibilitava misturá-lo direto no concentrado na fábrica de rações. O EMS é um composto higroscópico derivado da hidrólise da cevada para malte, seguida de concentração, desidratação a vácuo e moagem. De acordo com as informações do fabricante, para cada kg de malte de cevada processado, obtém-se 590 g de EMS. O EMS é um pó granular de cor acastanhada com densidade 0,300-0,450 g/cm³, 85% de carboidratos totais (mínimo), 5-8% de proteína, 0,6% de gordura e 60% de açúcares redutores (mínimo). A composição química do extrato de malte seco (Tabela 7) foi determinada por análises químicas e cromatografia líquida. Os ingredientes e composição química da dieta experimental estão descritos na Tabela 8.

Os animais foram alimentados individualmente duas vezes ao dia (07:00 h e 13:00 h). A TMR foi preparada individualmente para cada vaca no cocho. A alimentação foi ajustada diariamente para permitir sobras entre 5-10%. As dietas (Tabela 2) foram formuladas de acordo com o NRC (2001) visando as estimativas das necessidades nutricionais das vacas. As vacas foram alojadas em estábulo do tipo *free-stall* com baias individuais (17 m² de área), camas com areia, ventiladores e livre acesso à água e alimentação.

Tabela 7. Composição química (% MS) do extrato de malte seco (EMS; Liotécnica, Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil).

Item	EMS
Composição	
Matéria seca, %	86,8
Matéria orgânica	98,2
Fibra em detergente neutro	2,12

Extrato etéreo	0,45
Amido	-
Proteína bruta	8,17
Açúcares não redutores	71,0
Frutose	0,84
Glicose	3,54
Sacarose	0,94
Maltose	31,7

Tabela 8. Ingredientes e composição química da dieta experimental.

Item, %	Dieta ¹	
	CON	EMS
Ingredientes, % MS		
Silagem de milho	48,0	48,0
Milho moído	18,7	10,1
Polpa cítrica	8,20	8,20
Extrato de malte seco ²		7,62
Farelo de soja 48% PB	11,8	12,8
Grão de soja crua e integral	6,42	6,42
Farelo de soja <i>by-pass</i>	4,01	4,01
Ureia	0,15	0,15
Bicarbonato de sódio	0,80	0,80
Minerais e vitaminas ³	1,50	1,50
Calcário	0,20	0,20
Sal comum	0,20	0,20
Composição, % MS		
Matéria seca	47,3	47,3
Matéria Orgânica	92,8	93,0
Amido	29,9	24,6
Proteína bruta	16,9	16,4
Lignina	3,11	3,01
Fibra em detergente neutro	33,9	32,8
PB insolúvel em detergente neutro	3,24	2,99
Fibra em detergente ácido	26,7	26,4
Energia líquida de lactação ⁴ , Mcal/kg	1,57	1,57

¹Controle (CON) ou extrato de malte seco (EMS) substituindo parcialmente o milho moído em 7,62% de MS da dieta. ²Liotécnica, Tecnologia em Alimentos (Embu das Artes, Brasil). ³Conteúdo por kg de produto: 215 g Ca, 15 mg Co, 700 mg Cu, 10 mg Cr, 20 g S, 40 mg I, 20 g Mg, 1.600 mg Mn, 20 mg Se, 70 g Na, 200.000 UI Vit A, 50.000 UI aVit D3, 1.500 UI Vit E e 2.500 mg Zn. ⁴Estimado de acordo com o NRC (2001).

2.5.2 Coletas e análises

As variáveis avaliadas nesse estudo foram consumo e digestibilidade de nutrientes, índice de seleção de partículas, excreção de derivados de purina e nitrogênio, concentração de ureia sanguínea, fermentação ruminal, produção e composição do leite e seguiram a mesma metodologia descrita no experimento do capítulo 1, com os mesmos pontos de coletas em cada período.

2.5.3 Análises estatística

Os dados foram submetidos a ANOVA usando o PROC MIXED do SAS 9.4, de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + e_{ijk}$$

Onde y_{ijk} representa a observação do animal k dado tratamento i no tratamento j ; é a média geral; α_i representa o efeito fixo do i tratamento ($i = 1$ a 2); β_j representa o efeito fixo do j período ($j = 1$ a 2); γ_k representa o efeito aleatório do animal ($k = 1$ a 28); e e_{ijk} representa o erro aleatório associada a cada observação. Os dados de fermentação foram analisados como medidas repetidas adicionando os efeitos fixos do tempo e sua interação com o tratamento ao modelo anterior. Para as análises de medidas repetidas, matrizes de covariância autorregressiva foram testadas e escolhidas de acordo com os valores de BIC. As médias foram ajustadas por LSMEANS e os graus de liberdade foram calculados pelo método de Kenward e Roger (1997). O nível de significância foi considerado $P \leq 0,05$ e tendência quando $0,05 < P \leq 0,10$.

2.6 RESULTADOS

Nenhum efeito de tratamento ($P \geq 0,174$) no CMS (em kg/d ou % PC), consumo de nutrientes ou seleção de partículas da TMR foi observado neste estudo (Tabela 9). Vacas alimentadas com EMS apresentaram maior ($P \leq 0,048$) digestibilidade de PB e EE em comparação com CON.

A alimentação com EMS aumentou ($P \leq 0,017$) o pH ruminal (Figura 3) e a porcentagem molar de acetato e diminuiu a porcentagem molar de butirato e valerato (Tabela 10). Não foram detectados efeitos de interação entre tratamento e tempo para as variáveis de fermentação ruminal. Os tratamentos não afetaram a excreção de DP nem a excreção de nitrogênio, mas as vacas alimentadas com EMS apresentaram menor ($P < 0,001$) PC do que CON (Tabela 11).

Vacas alimentadas com EMS apresentaram menor ($P = 0,003$) concentração sérica de ureia em comparação com o grupo controle (Tabela 12).

O fornecimento de EMS aumentou ($P \leq 0,026$) a produção de leite, PLCG, gordura, proteína e lactose, bem como a eficiência alimentar em termos de PLCG ($PLCG \div CMS$). A substituição do milho moído por EMS reduziu ($P = 0,038$) a concentração de NUL (Tabela 12).

Tabela 9. Consumo de nutrientes, índice de seleção de partículas e digestibilidade aparente do trato total de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.

Item	Tratamento ¹		EPM	P-valor
	CON	EMS		
Consumo, kg/d				
Matéria Seca	27,5	27,8	0,88	0,473
Matéria Orgânica	25,5	25,8	0,81	0,483
Proteína Bruta	4,79	4,84	0,152	0,521
Fibra em Detergente Neutro	8,78	8,99	0,294	0,174
Consumo, % PC				
Matéria Seca	4,03	4,05	0,138	0,814
Fibra em detergente neutro	1,29	1,32	0,047	0,176
Seleção de partículas ²				
> 19 mm	0,986	0,988	0,008	0,780
19 – 8 mm	0,975	0,973	0,004	0,799
8 – 4 mm	1,01	1,02	0,003	0,771
< 4 mm	1,03	1,03	0,007	0,659
Digestibilidade aparente, %				
Matéria Seca	63,4	63,8	0,85	0,572
Matéria Orgânica	65,6	66,1	1,00	0,672
Proteína Bruta	63,7	64,6	1,18	0,048
Fibra em Detergente Neutro	39,4	39,2	1,64	0,914

¹Controle (CON) ou extrato de malte seco de cevada (EMS; Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) substituindo parcialmente o milho moído com 7,62% de MS da dieta. ²Sem classificação = 1, valores < 1 indica classificação contra e valores > 1 indica classificação para partículas na faixa de tamanho de partícula específica. O índice de seleção foi calculado de acordo com Silveira et al. (2007).

Tabela 10. Fermentação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.

Item	Tratamento ¹		EPM	P-valor		
	CON	EMS		Trt	Tempo	Trt x Tempo
pH	6,13	6,32	0,057	0,017	<0,001	0,367
N-NH ₃ , mg/dL	13,4	13,9	1,67	0,750	<0,001	0,488
Ácidos graxos de cadeia curta, %						
Acetato	64,0	65,3	0,46	<0,001	<0,001	0,457

Propionato	19,0	19,2	0,16	0,347	<0,001	0,309
Butirato	13,4	11,9	0,39	0,003	0,084	0,247
Iso-valerato	1,43	1,48	0,124	0,201	<0,001	0,430
Valerato	1,52	1,28	0,055	0,002	<0,001	0,353
Iso-butilato	0,679	0,799	0,037	0,055	<0,001	0,513
AGCC	3,63	3,56	0,136	0,395	<0,001	0,120
Relação acetato propionato	3,39	3,43	0,038	0,453	<0,001	0,370
Total de AGCC, mM	96,4	96,4	0,136	0,395	<0,001	0,120

¹Controle (CON) ou extrato de malte seco de cevada (EMS; Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) substituindo parcialmente o milho moído com 7,62% de MS da dieta.

Tabela 11. Excreção de derivados de purina, síntese de proteína microbiana ruminal e excreção de N de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.

Item	Tratamento ¹		EPM	P-valor
	CON	EMS		
Peso Corporal, kg	695	687	15,6	<0,001
Excreção, mmol/d				
Alantoína urina	206	218	18,8	0,504
Ácido úrico urina	184	190	17,0	0,747
Alantoína leite	35,8	33,8	4,81	0,768
Derivados de purina total	425	442	31,5	0,625
Síntese de proteína microbiana ruminal, kg/d	1,97	2,04	0,147	0,632
Excreção N, g/g consumo N				
Fezes	0,370	0,357	0,011	0,360
Leite	0,226	0,230	0,008	0,259
Urina	0,268	0,253	0,015	0,362

¹Controle (CON) ou extrato de malte seco de cevada (EMS; Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) substituindo parcialmente o milho moído com 7,62% de MS da dieta.

Tabela 12. Concentração de ureia sérica, produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído.

Item	Tratamento ¹		EPM	P-valor
	CON	EMS		
N ureico, mg/dL	20,2	17,1	0,77	0,003
Produção, kg/d				
Leite	34,4	35,6	1,170	0,003
Leite corrigido para 3,5% de gordura (PLCG)	35,5	37,5	1,030	0,001
Gordura	1,26	1,35	0,039	0,004
Proteína	1,09	1,13	0,034	0,026
Lactose	1,64	1,70	0,052	0,019
Composição, %				
Gordura	3,71	3,85	0,112	0,121
Proteína	3,17	3,15	0,019	0,233

Lactose	4,77	4,75	0,028	0,445
NUL, mg/dL	18,7	17,3	0,533	0,038
Eficiência				
Produção de leite ÷ CMS	1,28	1,31	0,051	0,119
PLCG ÷ CMS	1,31	1,37	0,043	0,015

¹Controle (CON) ou extrato de malte seco de cevada (EMS; Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) substituindo parcialmente o milho moído com 7,62% de MS da dieta.

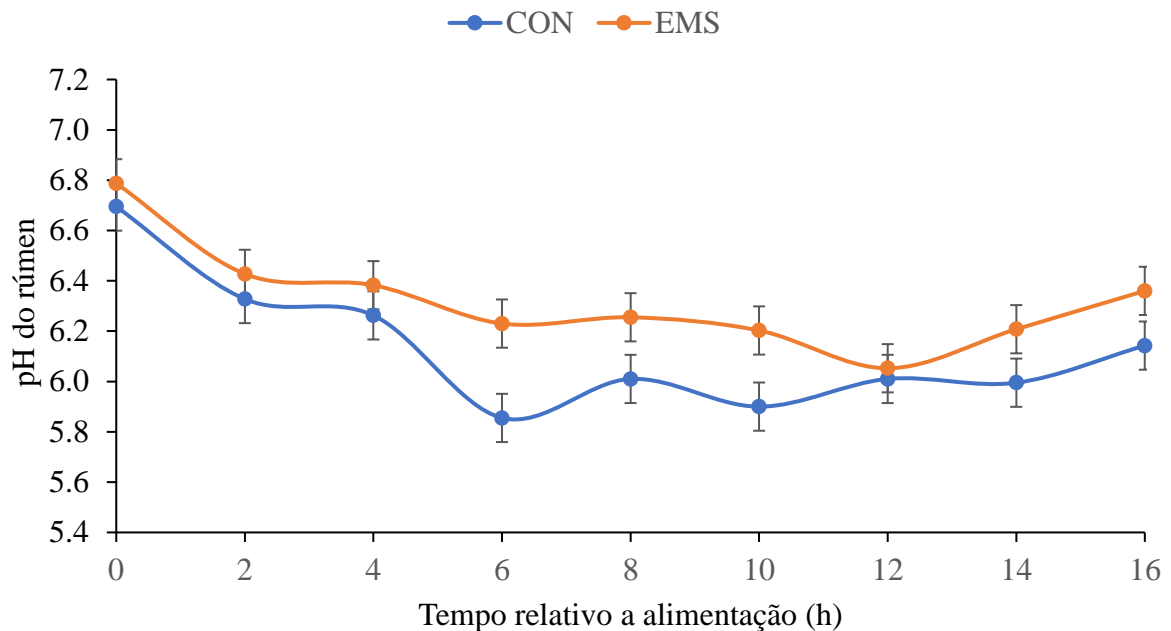


Figura 3. pH ruminal de vacas em lactação (n=4) alimentadas com extrato de malte seco em substituição parcial ao milho moído na dieta. Controle (CON) ou extrato de malte seco de cevada (EMS; Liotécnica Tecnologia em Alimentos, Embu das Artes, Brasil) substituindo parcialmente o milho moído com 7,62% de MS da dieta.

2.7 DISCUSSÃO

Foi hipotetizado que a substituição parcial do milho moído por EMS em dietas à base de silagem de milho melhoraria o desempenho de vacas em meio de lactação, alterando a fermentação ruminal e a digestão de nutrientes. De fato, as vacas alimentadas com EMS produziram 1,2 kg/d mais leite do que as vacas do grupo controle e apresentaram maior digestibilidade de PB e diferentes porcentagens molar de AGCC no fluido ruminal. Embora as diferenças na digestibilidade da PB possam explicar parcialmente a maior produção de leite das vacas alimentadas com EMS, as alterações na fermentação ruminal são provavelmente a principal razão para os resultados da produção de leite. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo investigando os efeitos da inclusão de EMS na fermentação ruminal de vacas em lactação. A alimentação com EMS aumentou o pH ruminal e a porcentagem molar de acetato. Durante o processo de maltagem da cevada, o amido é liberado dos componentes de ligação e

extensivamente degradado por várias enzimas de degradação do amido em açúcares que podem ser facilmente fermentados por leveduras (YU et al., 2020). Devido à fermentação relativamente rápida do açúcar em relação a outras frações de carboidratos, espera-se que o pH ruminal seja menor em vacas alimentadas com EMS. No entanto, concordando com o presente estudo, os autores observaram aumento ou tendência de aumento do pH ruminal com a substituição parcial de fontes de amido alimentar por açúcares (HELDT et al., 1999; PENNER e OBA, 2009; PENNER et al., 2009). Um pH ruminal mais alto provavelmente favoreceu a degradação da fibra ruminal, aumentando assim a porcentagem molar de acetato e sustentando os resultados de gordura do leite. As possíveis razões pelas quais a alimentação com açúcar no lugar do amido pode aumentar o pH ruminal incluem menos ácido produzido por mol de hexose fermentada e armazenamento de glicose como glicogênio microbiano (OBA, 2011).

No presente estudo, vacas alimentadas com EMS apresentaram menor porcentagem molar de butirato ruminal em comparação com CON. Os efeitos da alimentação com açúcar na fermentação ruminal têm sido inconsistentes; a proporção molar ruminal de butirato não foi afetada (BRODERICK et al., 2008; PENNER e OBA, 2009), aumentada (KELLOGG e OWEN, 1969a; b) ou diminuída (MCCORMICK et al., 2001) pela substituição parcial do amido por fontes de açúcar. Ressaltamos que os resultados de fermentação do presente estudo devem ser interpretados com cautela, pois as amostras de fluido ruminal foram coletadas em apenas um dia.

Embora o EMS tenha alterado a fermentação ruminal, não foram detectadas diferenças de tratamento para excreção de DP e fornecimento de proteína microbiana ruminal estimada. O açúcar na dieta pode não afetar a produção de proteína microbiana se diluir o amido da dieta. A produção de proteína microbiana diminuiu (HALL e HEREJK, 2001) ou não foi afetada (VALLIMONT et al., 2004) quando a sacarose substituiu o amido. As razões para maior digestibilidade da PB ao alimentar EMS não são claras, mas podem estar relacionadas ao conteúdo e perfil de PB nos tratamentos dietéticos; a dieta EMS apresentou menores teores de PB (-0,50%) e PB insolúvel em detergente neutro (-0,25%) em comparação com a dieta CON. Diferenças no perfil de prolamina e degradação da PB do EMS e do milho moído também podem ter influenciado a digestibilidade da PB. As proteínas da hordeína (um tipo de prolamina) são significativamente reduzidas (~30%) durante o processo de maltagem (BRIGGS, 1998) e, portanto, espera-se que as proteínas do EMS sejam mais degradáveis do que as do milho moído. As proteínas zeínas do milho moído compreendem de 50 a 60% da PB do milho e têm uma degradabilidade relativamente baixa no rúmen devido à sua hidrofobicidade (HAMAKER et al., 1995).

Apesar da maior digestibilidade da PB observada para as vacas alimentadas com EMS, a ureia sérica e o NUL foram diminuídos devido à maior excreção de N no leite em comparação com o CON. Vale ressaltar que não foram observadas diferenças na concentração ruminal de amônia neste estudo. No presente estudo, o N total excretado foi menor que o N consumido levantando a questão do destino do N. Em uma extensa revisão, Hristov et al. (2019) discutiram os potenciais perdas de N durante a amostragem de fezes e urina e usando diferentes técnicas, além de listar outras perdas de N, incluindo aquelas na expiração, eructação ou perdas dérmicas. Além disso, os ruminantes são capazes de regular a reciclagem de N da ureia para conservar N para manter a síntese de proteína microbiana ruminal e processos catabólicos no animal (LAPIERRE e LOBLEY, 2001). Os autores relataram que as perdas de amônia pela urina são a maior fonte potencial de erros nas medidas do balanço de N em ruminantes (SPANGHERO e KOWALSKI, 1997). Além disso, os débitos fecais e urinários diários foram estimados com base em marcadores (ou seja, nenhuma coleta total foi realizada) que afetam diretamente os resultados de excreção de N.

O extrato de malte seco substituindo parcialmente o milho moído nas dietas melhorou a produção de leite, PLCG e sólidos. Contrastando com o estudo atual, Biagi et al. (2007) alimentaram vacas de transição com extratos de malte (a 7% MS da dieta) substituindo parcialmente milho moído e cevada e não encontraram diferenças de tratamento para produção e composição do leite até 120 DEL. Embora a literatura careça de dados sobre a alimentação com extrato de malte e seus efeitos no desempenho de vacas leiteiras, a suplementação com açúcar tem sido extensivamente avaliada. Dados de pesquisa (23 artigos científicos e 97 observações) de suplementação dietética de açúcar avaliada por análise estatística não linear sugerem que o açúcar total na dieta ideal é de 6,75% de MS da dieta, enquanto a resposta ideal de PLCG foi alcançada ao testar dietas moderadas de amido (22-27% na MS da dieta) e alta fibra solúvel (6,0 a 8,5% na MS da dieta; DE ONDARZA et al., 2017). Em consonância com o último estudo, a dieta EMS tinha teor de amido dentro da faixa para resposta ideal de PLCG à suplementação de açúcar. A melhor produção de leite de vacas alimentadas com EMS neste estudo provavelmente está associada a seus efeitos positivos na degradação e fermentação da fibra ruminal. A maior PLCG das vacas alimentadas com EMS alinha-se com o aumento da proporção de acetato no líquido ruminal quando comparado ao CON. Ressalta-se que os estudos de suplementação de açúcar na produtividade e fermentação ruminal citados anteriormente, utilizam melaço ou sacarose como fontes de açúcar e o EMS é composto principalmente de maltose. Não temos conhecimento de estudos com vacas leiteiras, exceto Biagi et al. (2007), que avaliaram os efeitos de fontes de maltose no desempenho. Finalmente, também precisamos

destacar que, apesar do comportamento higroscópico do EMS, as vacas não separaram partículas de ração durante este experimento. Devido à sua alta higroscópica, o EMS teve que ser pesado e misturado ao concentrado imediatamente após a abertura das embalagens, o que pode dificultar a mistura da TMR. Formulações menos higroscópicas devem ser desenvolvidas e testadas para gado leiteiro. Os custos de substituição do milho moído por EMS devem ser considerados nas formulações das dietas.

2.8 CONCLUSÃO

O extrato seco de malte pode substituir o milho moído em dietas à base de silagem de milho a 7% da MS com aumentos na produção de leite e PLCG sem alterar o consumo de nutrientes. O extrato de malte seco aumentou o pH ruminal e a eficiência alimentar e reduziu o NUL. Mais estudos devem ser realizados para avaliar as doses e a viabilidade econômica da alimentação com EMS, bem como sobre as dificuldades de manuseio.

2.9 REFERÊNCIAS

- ALLEN, Michael S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 7, p. 1447-1462, 1997.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598 – 1624, 2000.
- AOAC International. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 2000.
- BAIK, B.K.; S.E. ULLRICH. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. **Journal Cereal Science**, v.48 p. 233–242, 2008.
- BHATTY, R.S. Production of food malt from hull-less barley. *Cereal Chem.* 73:75–80, 1996.
- BIAGI, G.; I. FUSARO; P. PEZZI; A. FORMIGONI. Effect of dietary supplementation with malt extracts on milk production. *Ital. Journal Animal Science* v. 6 p. 260–262, 2007.
- BOERO, P.O.; J. BALCELLS; S.M. MARTÍN-ORÚE; J.B. LIANG; J.A. GUADA. Excretion of purine derivatives in cows: Endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Prod. Science**, v. 68 p. 243–250, 2001.
- BRIGGS, D.E. Malting conditions and their influence on malting. 1st ed. Blackie Academic, London, 1998.

- BRODERICK, G.A. e J.H. KANG. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63 p. 64–75, 1980.
- BRODERICK, G.A.; N.D. LUCHINI; S.M. REYNAL; G.A. VARGA e V.A. ISHLER. Effect on production of replacing dietary starch with sucrose in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v.91 p. 4801–4810., 2008.
- BRODERICK G. A. RADLOFF W. J. Effect of molasses supplementation on the production of lactating dairy cows fed diets based on alfalfa and corn silage. **J. Dairy Science**. v. 87, n. 9, p. 2997-3009, 2004.
- CASALI, A.O.; E. DETMANN; S.D.C. VALADARES FILHO; J.C. PEREIRA; L.T. HENRIQUES; S.G. DE FREITAS; e M.F. PAULINO. 2008. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37 p.335–342, 2008.
- CHAMBERLAIN D. G., ROBERTSON S., AND CHOUNG J. J. Sugars versus starch as supplements to grass silage: effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives, in sheep. **J. Sci. Food Agric**. v. 63 p. 189-194, 1993.
- CHERNEY, D. J. R., J. H. CHERNEY, AND L. E. CHASE. Influence of dietary nonfiber carbohydrate concentration and supplementation of sucrose on lactation performance of cows fed fescue silage. **J. Dairy Science**. v.86 p.3983–3991, 2003.
- CHIBISA, G. E., P. GORKA, G. B. PENNER, R. BERTHIAUME, AND T. MUTSVANGWA. Effects of partial replacement of dietary starch from barley or corn with lactose on rumen function, short chain fatty acid absorption, nitrogen utilization and production performance of dairy cows. **J. Dairy Science**. v.98 p. 2627–2640, 2015.
- CHIZZOTTI, M.L.; S. DE C. VALADARES FILHO; R.F.D. VALADARES; F.H.M. CHIZZOTTI e L.O. TEDESCHI. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science** v. 13:218 p. 225, 2008.
- CZUCHAJOWSKA, Z.; A. KLAMCZYNSKI; B. PASZCZYNSKA; B.K. BAIK. Structure and functionality of barley starches. **Cereal Chem**. v. 75 p. 747–754, 1998.
- DEFRAIN J. M., HIPPEN A. R., KALSCHEUR K. F., SCHINGOETHE D. J. Feeding lactose increases ruminal butyrate and plasma β -hydroxybutyrate in lactating dairy cows. **J. Dairy Science**. v. 87, n. 8, p. 2486-2494, 2004.
- DEL VALLE, T.A.; T.F. ZENATTI; G. ANTONIO; M. CAMPANA; J.R. GANDRA; E.M.C. ZILIO; L.F.A. DE MATTOS; J.G.P. DE MORAIS. Effect of chitosan on the preservation quality of sugarcane silage. **Grass Forage Science**, v. 73 p. 630–638, 2018.
- DE ONDARZA, M.B.; S.M. EMANUELE; C.J. SNIFFEN. Effect of increased dietary sugar on dairy cow performance as influenced by diet nutrient components and level of milk production. **Prof. Anim. Science**. V.33 p. 700–707, 2017.

- DO, T.T.D.; D. COZZOLINO; B. MUHLHAUSLER; A. BOX; A.J. ABLE. Effect of malting on antioxidant capacity and vitamin E content in different barley genotypes. **J. Inst. Brew.** v. 121 p. 531–540, 2015.
- FUJIHARA, T; E.R. ØRSKOV; P.J. REEDS; D.J. KYLE. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **J. Agric. Science** v. 109 p. 7–12, 1987.
- GALYEAN, M. L., D. G. WAGNER, AND F. N. OWENS. Dry matter and starch disappearance of corn and sorghum as influenced by particle size and processing. **J. Dairy Sci.** v. 64 p. 1804–1812, 1981.
- GONZALEZ-RONQUILLO, M.; J. BALCELLS; J.A. GUADA; F. VICENTE. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal Dairy Science**, v. 86 p. 1282–1291, 2003.
- GUPTA, M.; N. ABU-GHANNAM; E. GALLAGHAR. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Compr. Rev. Food Science Food Saf.** V. 9 p. 318–328, 2010.
- HALL, M. B.; ZANTON, G. I. Substitution of cane molasses for corn grain at two levels of degradable protein. I. Lactating cow performance, nutrition model predictions, and potential basis for butterfat and intake responses. **Journal of Dairy Science**, 2022.
- HALL M. B. AND HEREJK C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **J. Dairy Science.** v. 84, n. 11, p. 2486-2493, 2001.
- HALL M. B; WEIMER P. J. Sucrose concentration alters fermentation kinetics, products, and carbon fates during in vitro fermentation with mixed ruminal microbes. **J. Anim. Science.** v.85 p.1467-1478, 2007.
- HAMAKER, B.R.; MOHAMED, A.A.; HABBEN, J.E.; HUANG, C.P.; LARKINS, B.A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum Kernel Proteins Reveals Higher Prolamin Contents than the Conventional Method. **Cereal Chem.** V. 72 p. 583–588, 1995.
- HELDT, J.S.; R.C. COCHRAN; G.L. STOKKA; C.G. FARMER; C.P. MATHIS; E.C. TITGEMEYER; T.G. NAGARAJA. Effects of different supplemental sugars and starch fed in combination with degradable intake protein on low-quality forage use by beef steers. **J. Animal Science**, v.77 p. 2793–2802, 1999.
- HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Sci.** v. 33 p. 1306–1311, 1993.
- HOSENEY, R.C. 1994. Principles of Cereal Science and Technology. 2nd Ed. AACC, Inc., St. Paul, MN. pp. 270, 1994.
- HRISTOV, A.N.; A. BANNINK; L.A. CROMPTON; P. HUHTANEN; M. KREUZER; M. MCGEE; P. NOZIÈRE; C.K. REYNOLDS; A.R. BAYAT; D.R. YÁÑEZ-RUIZ; J. DIJKSTRA; E. KEBREAB; A. SCHWARM; K.J. SHINGFIELD; Z. YU. Invited review:

Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. **Journal Dairy Science** v. 102 p. 5811–5852, 2019.

HUHTANEN, P.; K. KAUSTELL; S. JAAKKOLA. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Anim. Feed Science Technol.** 48:211–227, 1994.

IZYDORCZYK, M.S.; J. STORSLEY; D. LABOSSIÈRE; A.W. MACGREGOR; B.G. ROSSNAGEL. Variation in total and soluble β -glucan content in hullless barley: Effects of thermal, physical, and enzymic treatments. **J. Agric. Food Chem.** V. 48 p. 982–989, 2000.

KALSCHEUR K. F., TETER B. B., PIPEROVA L. S., ERDMAN R. A. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of Trans-C18-1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **J Dairy Science.** V. 802 p. 104-114, 1997.

KELLOGG, D.W.; F.G. OWEN. 19 Relation of ration sucrose level and grain content to lactation performance and rumen fermentation. **J. Dairy Science.** V. 52 p. 657–662, 1969.

KELLOGG, D.W.; F.G. OWEN. 1969b. Alterations of in vitro rumen fermentation patterns with various levels of sucrose and cellulose. **J. Dairy Science.** 52:1458–1460, 1969.

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

LAPIERRE, H.; G.E. LOBLEY. Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review. **J. Dairy Science.** 84:E223–E236; 2001.

LEAN, I. J., T. K. MILLER WEBSTER, W. HOOVER, W. CHALUPA, C. J. SNIFFEN, E. EVANS, E. BLOCK, AND A. R. RABIE. Effects of Bio Chlor and Fermenten on microbial protein synthesis in continuous culture fermenters. **J. Dairy Sci.** 88:2524–2536, 2005.

LI, J.H.; T. VASANTHAN; B. ROSSNAGEL; R. HOOVER. Starch from hull-less barley: I. Granule morphology, composition and amylopectin structure. **Food Chem.** V. 74 p. 395–405, 2001.

MARTEL, C. A., E. C. TITGEMEYER, L. K. MAMEDOVA, B. J. BRADFORD. 2011. Dietary molasses increases ruminal pH and enhances ruminal biohydrogenation during milk fat depression. **J. Dairy Science.** v.94 p. 3995–4004, 2011.

MAULFAIR, D.D.; A.J. HEINRICHS. REVIEW: Methods to measure forage and diet particle size in the dairy cow. **Prof. Anim. Sci.** 28:489–493, 2012.

MCCORMICK, M.E.; D.D. REDFEARN; J.D. WARD; D.C. BLOUIN. Effect of protein source and soluble carbohydrate addition on rumen fermentation and lactation performance of Holstein cows. **J. Dairy Science.** V. 84 p. 1686–1697, 2001.

NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. National Academies Press, Washington, D.C, 2001.

NOMBEKELA S. W. AND MURPHY M. R. Sucrose supplementation and feed intake of dairy cows in early lactation. **J. Dairy Science**. v. 78 p. 880-885, 1994.

OBA, M. Review: Effects of feeding sugars on productivity of lactating dairy cows. **Can. J. Anim. Science**. V. 91 p. 37-46, 2011.

OWENS FN. New techniques for studying digestion and absorption of nutrients in ruminants. **Fed Proc.** p. 46:283, 1988.

PAIK, J.; N.H. LOW; W.M. INGLEDEW. Malt Extract: Relationship of chemical composition to fermentability. **J. Am. Soc. Brewing Chem.** V. 49 p. 8–13, 1991.

PENNER, G. B., K. A. BEAUCHEMIN, T. MUTSVANGWA. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal Dairy Sci.** 90 p. 365–375, 2007.

PENNER, G.B.; L.L. GUAN; M. OBA. Effects of feeding on ruminal fermentation in lactating Holstein cows fed two dietary sugar concentrations. **J. Dairy Science**. v.92 p. 1725–1733, 2009.

PENNER, G.B.; M. OBA. Increasing dietary sugar concentration may improve dry matter intake, ruminal fermentation, and productivity of dairy cows in the postpartum phase of the transition period. **J. Dairy Science**. 92:3341–3353, 2009.

PÉREZ, S., P. M. BALDWIN, AND D. J. GALLANT. Chapter 5: Structural features of starch granules. Pages 149–188 in *Starch: Chemistry and Technology*. 3rd ed. J. Be Miller and R. Whistler, ed. Academic Press, 2009.

PHILIPPEAU, C., J. LANDRY, AND B. MICHALET-DOREAU. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **J. Sci. Food Agric.** V. 80 p. 404–408, 2000.

RIBEIRO C. V. D. M., KARNATI S. K. R., AND EASTRIDGE M. L. Biohydrogenation of fatty acids and digestibility of fresh alfalfa or alfalfa hay plus sucrose in continuous culture **J. Dairy Science**. v. 88, n. 11, p. 4007-4017, 2005.

SAFONOVA, E.A.; D.M. BORODULIN; V.N. IVANETS; S.S. KOMAROV; K.M. SIDORIN. Innovative Technologies in Production of Malt Extract. **Adv. Eng. Res.** V. 151 p. 610–614, 2018.

SANNES R. A., MESSMAN M. A., VAGNONI D. B. Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. **J. Dairy Science**. v. 85, n. 4, p. 900-908, 2002.

SCHINGOETHE D. J., SKYBERG E. W., AND BAILEY R. W. Digestibility, mineral balance, and rumen fermentation by steers of rations containing large amounts of lactose or dried whey. **J. Dairy Science**. v. 63, n. 5, p. 762-774, 1980.

SEDGHI, M.; R. AKBARI MOGHADDAM KAKHKI. Effects of dietary supplementation of barley malt extract and malt vinegar on growth performance, jejunal morphology and meat quality of broiler chickens. **Poult. Science**. J. v. 6 p. 129–137; 2018.

SHAHANI, K.M.; H.H. SOMMER. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. I. Methods of Analysis. **J. Dairy Science**. 34:1003–1009; 1951.

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

SIVERSON, A., C. F. VARGAS-RODRIGUEZ, B. J. BRADFORD. Short communication: Effects of molasses products on productivity and milk fatty acid profile of cows fed diets high in dried distillers grains with soluble. **J. Dairy Science**. v.97 p.3860–3865, 2014.

SKLAN, D.; R. ASHKENAZI; A. BRAUN; A. DEVORIN; K. TABORI. Fatty Acids, Calcium Soaps of Fatty Acids, and Cottonseeds Fed to High Yielding Cows. **J. Dairy Science**. V. 75 p. 2463–2472, 1992.

SPANGHERO, M.; Z.M. KOWALSKI. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. **Livest. Prod. Science**. V. 52 p. 113–122, 1997.

SUTOH M., OBARA Y., AND MIYAMOTO S. The effect of sucrose supplementation on kinetics of nitrogen, ruminal propionate and plasma glucose in sheep. **J. Agric. Science**. v. 126, n. 1, p. 99-105, 1996.

VALLIMONT, J.E.; F. BARGO; T.W. CASSIDY; N.D. LUCHINI; G.A. BRODERICK; G.A. VARGA. Effects of replacing dietary starch with sucrose on ruminal fermentation and nitrogen metabolism in continuous culture. **J. Dairy Science**. V.87 p. 4221–4229, 2004.

VAN SOEST, P.J., J.B. ROBERTSON, AND B.A. LEWIS. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent Fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Science**. V. 74 p. 3583–3597, 1991.

WEISBJERG M. R., HVELPLUND T., AND BIBBY B. M. Hydrolysis and fermentation rate of glucose, sucrose and lactose in the rumen, Acta Agric. **Scand Anim. Sci**. v. 48 p; 12-18, 1998.

YU, W., R.G. GILBERT; G.P. FOX. Malt protein inhibition of β -amylase alters starch molecular structure during barley mashing. **Food Hydrocoll**. V. 100 p. 105423, 2020.

APÊNDICE

APÊNDICE A – artigo referente ao capítulo 2 desta dissertação publicado no Journal of Dairy Science.



J. Dairy Sci. TBC:1–9

<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21682>

Published by Elsevier Inc. and Fass Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

JDS21682

Dry malt extract from barley partially replacing ground corn in diets of dairy cows: Nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk composition

Milena Bugoni,¹ Caio S. Takiya,¹ Nathalia T. S. Grigoletto,¹ Alanne T. Nunes,¹ Paulo César Vittorazzi Júnior,¹ Rodrigo G. Chesini,¹ Guilherme G. da Silva,¹ Luis V. B. de Alcantara,¹ Luciana N. Rennó,² and Francisco P. Rennó^{1*}

¹Department of Animal Production and Animal Nutrition, University of São Paulo, Pirassununga, Brazil, 13635-900

²Department of Animal Science, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil, 36570-900

ABSTRACT

Dry malt extract (DME) has been used in animal nutrition as an alternative source of rapidly fermentable carbohydrate. An experiment was conducted to evaluate the partial replacement of ground corn with DME in diets of dairy cows on apparent digestibility, ruminal fermentation, predicted rumen microbial protein supply, N excretion, serum urea-N concentration, and milk yield and composition. Twenty-eight Holstein cows (35.3 ± 5.88 kg/d milk yield and 148 ± 78 d in milk), 4 of which were rumen cannulated, were blocked according to the presence of rumen cannulas, parity, milk yield, and days in milk and enrolled into a cross-over design experiment. Experimental periods lasted 91

feed efficiency (fat-corrected milk \div dry matter intake). Cows fed DME had lower milk urea nitrogen content in comparison with CON cows. Dry malt extract can partially replace ground corn in the diet while improving milk yield and feed efficiency.

Key words: carbohydrate, malting barley, rapidly fermentable carbohydrate, sugar

INTRODUCTION

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is the primary cereal used in world malt production and contains (on DM basis) 65 to 68% starch, 10 to 17% CP, 4 to 9% β -glucan, 2% to 3% free lipids, and 1.5% to 2.5% miner-

RAFT