

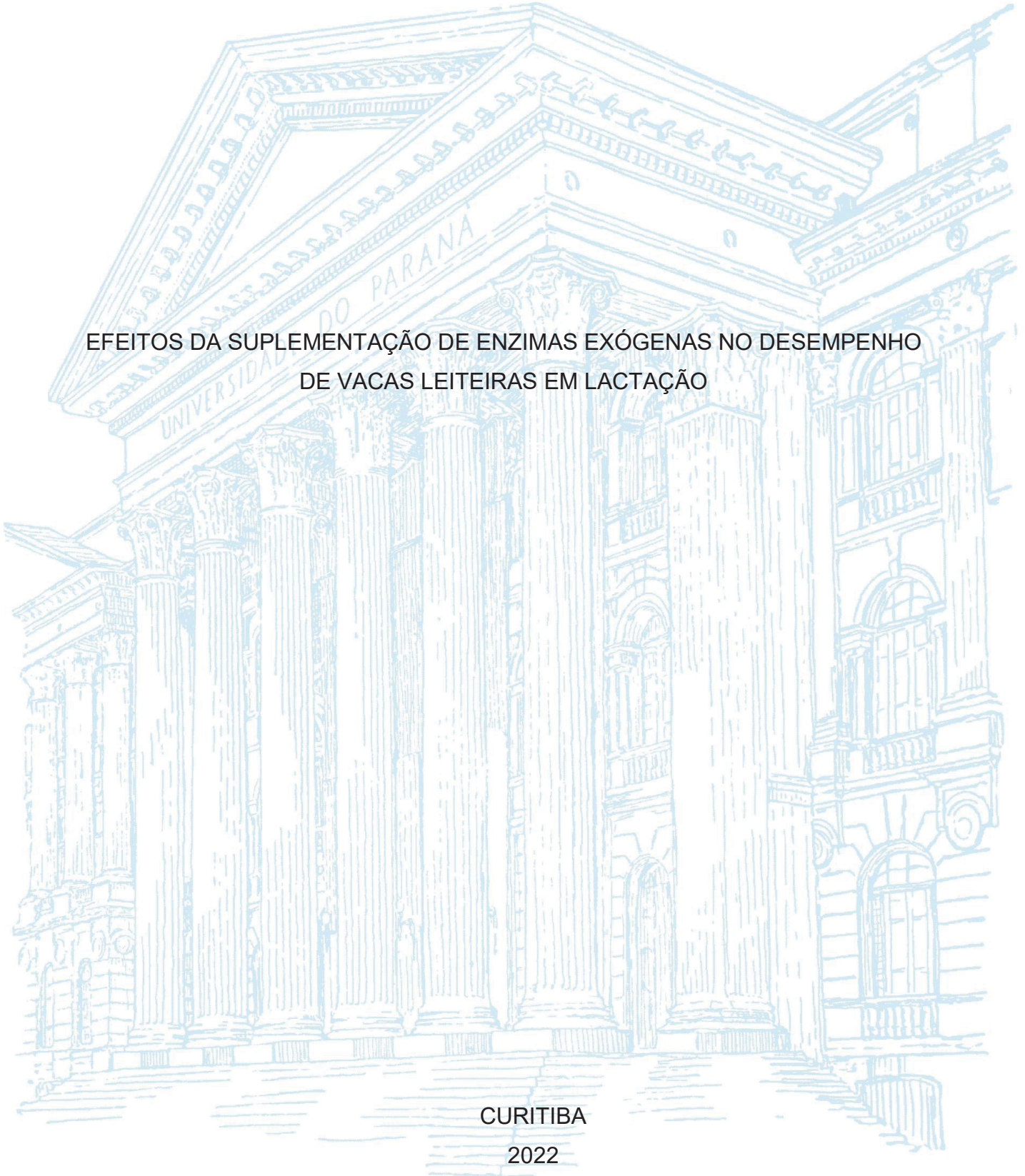
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIDIANE MARCONDES MACIEL RODRIGUES

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NO DESEMPENHO  
DE VACAS LEITEIRAS EM LACTAÇÃO

CURITIBA

2022



LIDIANE MARCONDES MACIEL RODRIGUES

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NO DESEMPENHO  
DE VACAS LEITEIRAS EM LACTAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Rodrigues, Lidiane Marcondes Maciel

Efeitos da suplementação de enzimas exógenas no desempenho de vacas leiteiras em lactação / Lidiane Marcondes Maciel Rodrigues. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

1. Vacas. 2. Enzimas. 3. Leite - Composição. 4. Suplementação nutricional. I. Almeida, Rodrigo de. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -  
40001016082P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de LIDIANE MARCONDES MACIEL RODRIGUES intitulada **Efeitos da suplementação de enzimas exógenas no desempenho de vacas leiteiras em lactação** sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO DE ALMEIDA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

08/12/2022 12:01:07.0

RODRIGO DE ALMEIDA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/12/2022 20:00:05.0

ADRIANA DE SOUZA MARTINS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

09/12/2022 09:52:55.0

JOSÉ LUCIANO ANDRIGUETTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035-050 - Tel. (41) 99283-3742 - E-mail: ppgz@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 240631

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 240631

**Aos meus pais, Jane e Antonio, e ao  
meu esposo Julian, que sempre me  
apoiaram durante minha jornada.**

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por me guiar em minhas escolhas e proteger meus passos.

Ao meu esposo Julian, pelo apoio incondicional, por acreditar no meu potencial, me fortalecer e me motivar nos momentos adversos, por ser esse parceiro incrível, o qual me incentiva a ser um ser humano melhor a cada dia.

Aos meus pais, pelos valores ensinados, por terem me apoiado em minhas decisões e torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus familiares, em especial todos os Marcondes, por vibrarem a cada conquista, pela torcida e incentivo diário, com certeza, vocês são minha fonte de inspiração.

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo de Almeida, por ter me conduzido e prestado todo apoio para o desenvolvimento do projeto.

Ao Grupo do Leite, pelas amizades, colaboração, troca de conhecimentos, em especial às colegas que auxiliaram na realização do experimento, Gabriela, Mariana e Daiane e aos colegas Josué e Jean Carlos que me auxiliaram em diversos momentos para a conclusão do projeto.

À empresa Quimtia, pelo financiamento e pela confiança depositada para a realização do projeto.

À Frisia Cooperativa Agroindustrial pelo apoio no projeto; aos técnicos da Frisia, Fernando Solano e Leopoldo Baptista, pela colaboração durante a realização do experimento.

Ao Sr. Jacob Zijlstra e sua família, os quais são pessoas incríveis, que me receberam calorosamente em sua propriedade durante todo o período de experimento; também aos funcionários da Chácara Boqueirão por seus esforços durante esse período. Com certeza levarei grandes amizades.

Meu muito obrigada!

“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, o que fazemos para  
mudar o que somos.”

*Eduardo Galeano*

## RESUMO

A suplementação de enzimas exógenas na dieta de vacas leiteiras tem como objetivo melhorar o aproveitamento dos nutrientes através do metabolismo digestivo e assim agregar melhor desempenho aos animais. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de um complexo enzimático no desempenho de vacas leiteiras lactantes. Quarenta e oito vacas da raça Holandesa (13 primíparas e 35 multíparas) foram separadas em dois grupos, por dois períodos, recebendo dietas com e sem suplementação enzimática durante 28 dias por período. O delineamento experimental foi um crossover, no qual foram usados dados de paridade, produção de leite e DEL do período covariável como fatores de blocagem. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento GLM para medidas únicas e o procedimento MIXED do SAS para medidas repetidas ao longo do tempo. Os resultados indicam que não houve diferença estatística para produção de leite entre os grupos controle e suplementado com enzimas (40,78 vs. 40,44 kg/d;  $P=0,66$ ) respectivamente, assim como para componentes do leite, como gordura do leite (3,54 vs. 3,58%;  $P=0,45$ ), proteína total do leite (3,40 vs. 3,40%;  $P=0,92$ ), lactose (4,72 vs. 4,71%;  $P=0,54$ ), caseína (2,74 vs. 2,75%;  $P=0,55$ ) e teores de sólidos totais (12,64 vs. 12,67%;  $P=0,73$ ), que não foram afetados pelo tratamento. Não foram encontradas diferenças para nitrogênio ureico no leite (13,30 vs. 13,20 mg/dL;  $P=0,78$ ), para escore linear de CCS (2,03 vs. 2,18;  $P=0,56$ ), bem como para amido fecal (5,18% vs. 5,30%;  $P=0,91$ ). Também não foram observadas diferenças no consumo de MS (24,77 kg/d vs. 24,75 kg/d;  $P=0,96$ ), eficiência leiteira (1,65 vs. 1,64;  $P=0,79$ ) e digestibilidade da MS e MO ( $P=0,22$  e  $P=0,29$ , respectivamente). O complexo enzimático utilizado neste estudo, não apresentou os resultados esperados para desempenho e melhoria no aproveitamento dos alimentos presentes na dieta das vacas avaliadas.

Palavras-chave: Composição do leite. Amido fecal. Eficiência leiteira. Ingestão de matéria seca.



## ABSTRACT

The supplementation of exogenous enzymes in the diet of dairy cows is intended to improve the use of nutrients through digestive metabolism and thus add better performance to the animals. The objective of this trial was to investigate the effects of supplementation of an enzymatic complex on performance of lactating dairy cows. Forty-eight Holstein cows (13 primiparous and 35 multiparous) were separated in 2 groups for 2 periods, receiving diets with and without the enzyme supplementation during 28 d per period. The experimental design was a randomized block design, using parity, milk yield, and DIM data from pre-experimental period as blocking factors. Statistical analyses were performed using the GLM procedure for single measures and MIXED procedure of SAS for repeated measures over time. The results indicate that there was no statistical difference for milk yield between the control and the enzyme supplemented groups (40.78 vs. 40.44 kg/d;  $P=0.66$ ) respectively, as well as milk components as milk fat (3.54 vs. 3.58%;  $P=0.45$ ), milk total protein (3.40 vs. 3.40%;  $P=0.92$ ), milk lactose (4.72 vs. 4.71%;  $P=0.54$ ), milk casein (2.74 vs. 2.75%;  $P=0.55$ ), and milk total solids contents (12.64 vs. 12.67%;  $P=0.73$ ) were not affected by treatment. No treatment differences were found for milk urea nitrogen (13.30 vs. 13.20 mg/dL;  $P=0.78$ ) and for SCC linear score (2.03 vs. 2.18;  $P=0.56$ ), as well as fecal starch (5.18 vs. 5.30%;  $P=0.91$ ). There was no statistical difference for DM intake (24.77 kg/d vs. 24.75 kg/d;  $P=0.96$ ), milk efficiency (1.65 vs. 1.64;  $P=0.79$ ), and DM and OM digestibilities ( $P=0.22$  and  $P=0.29$ , respectively). The enzyme complex used in this study did not present the expected results for performance and improvement in the use of food present in the diet of the evaluated cows.

Keywords: Dry matter intake. Fecal starch. Milk composition. Milk efficiency.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

TABELA 1. PRINCIPAIS ENZIMAS COMERCIAIS, SUBSTRATOS DE ATUAÇÃO E PRINCIPAIS EFEITOS .....	15
---	----

### Capítulo 2

TABLE 1. DIET COMPOSITION DURING THE EXPERIMENTAL PERIOD <sup>1</sup> .....	46
TABLE 2. COMPOSITION OF CONCENTRATE FED DURING THE EXPERIMENTAL PERIOD .....	46
TABLE 3. ADJUSTED MEANS AND STANDARD ERROR OF THE MEANS OF DRY MATTER INTAKE, MILK EFFICIENCY, MILK PRODUCTION, MILK CONTENTS (%) AND YELDS (KG/D) OF COMPONENTS, LINEAR SCORE OF SOMATIC CELL COUNT, MILK UREA NITROGEN, FECAL STARCH, DRY MATTER AND ORGANIC MATTER DIGESTIBILITY, BODY CONDITION SCORE AND BODY WEIGHT OF THE CONTROL (CON) AND PRECIZYON (ENZ) GROUPS.....	51
TABLE 4. ADJUSTED MEANS AND STANDARD ERROR OF THE MEANS OF SERIC METABOLITES.....	52

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

FIGURA 1. FORMA E ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA AMIOSE E AMILOPECTINA. .....	18
FIGURA 2. MECANISMOS DE AÇÃO DAS ENDOPEPTIDASES E EXOPEPTIDASES.....	23
FIGURA 3. CLASSIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS. ....	26
FIGURA 4. ESTRUTURA BÁSICA DE B-GLUCANOS NOS CEREAIS COM LIGAÇÕES COMBINADAS B-(1→3) E B-(1→4). ....	27
FIGURA 5. ESTRUTURA DA XILANA E ENZIMAS DO COMPLEXO XILANOLÍTICO.. .....	28
FIGURA 6. ESTRUTURA DA XILANA E AÇÃO DA XILANASE. ....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	- Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
CCS	- Contagem de células somáticas
CMS	- Consumo de matéria seca
CNF	- Carboidratos não fibrosos
DEL	- Dias em leite
EA	- Eficiência alimentar
FDA	- Fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	- Fibra insolúvel em detergente neutro
MO	- Matéria orgânica
MS	- Matéria seca
NUL	- Nitrogênio ureico no leite
PB	- Proteína bruta
PL	- Produção de leite
PMR	- Parcial mixed ration (dieta total misturada)
PNA	- Polissacarídeos não amiláceos

## LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ADF	- Acid detergent fiber
BCS	- Body condition score
BW	- Body weight
CP	- Crude protein
CON	- Control
DIM	- Days in milk
DM	- Dry matter
DMI	- Dry matter intake
ENZ	- Enzyme
FS	- Fecal starch
iNDF	- Indigestible neutral detergent fiber
MUN	- Milk urea nitrogen
MY	- Milk yield
NDF	- Neutral detergent fiber
NM	- Natural material
OM	- Organic matter
SD	- Standard deviation
SCC	- Somatic cell count
TMR	- Total mixed ration

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	14
1.2 ENZIMAS EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL .....	15
1.3 ENZIMAS AMIOLÍTICAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES.....	18
1.4 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES.....	23
1.5 ENZIMAS FIBROLÍTICAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES.....	25
1.6 <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>32</b>
1.7 <b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
<b>2 CHAPTER II: EFFECTS OF EXOGENOUS ENZYMES SUPPLEMENTATION ON PERFORMANCE OF LACTING DAIRY COWS</b> .....	<b>42</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>42</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>43</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>44</b>
<b><i>COWS, EXPERIMENTAL DESIGN AND TREATMENTS</i></b> .....	<b>44</b>
<b><i>SAMPLE COLLECTION AND ANALYSIS</i></b> .....	<b>47</b>
<b><i>STATISTICAL ANALYSIS</i></b> .....	<b>50</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>51</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>53</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>56</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

## 1 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por proteína de origem animal vem crescendo constantemente e em paralelo vem a necessidade da aplicação de estratégias nutricionais que auxiliem no aumento da produtividade animal. O principal entrave encontrado atualmente no setor pecuário está relacionado ao alto custo alimentar e muitas vezes a baixa qualidade dos recursos alimentares disponíveis para a nutrição animal. Desta forma, algumas estratégias tecnológicas são adotadas na alimentação de vacas leiteiras com o intuito de melhorar o aproveitamento do alimento, através da maior disponibilidade dos nutrientes. Neste sentido, a utilização de enzimas exógenas tem atraído pesquisadores e tornou-se um tema amplamente discutido por nutricionistas animais (McALLISTER et al., 2003).

O uso de enzimas exógenas em dietas de animais monogástricos não é recente. A utilização dessa tecnologia como forma de melhorar o aproveitamento dos alimentos é quase que absolutamente utilizada na dieta de aves e suínos, todavia para ruminantes sua utilização é relativamente recente, devido a variabilidade dos resultados encontrados em pesquisas.

Acredita-se que o principal motivo pelo qual a suplementação de enzimas exógenas para ruminantes ainda não tenha sido estabelecida, seja reflexo da variabilidade de respostas observadas nos estudos já realizados. Além disso, sabe-se que até algum tempo atrás, havia um entendimento generalizado de que as enzimas seriam rapidamente degradadas no rúmen antes mesmo de promoverem qualquer efeito (BEAUCHEMIN et al., 1999b). Todavia, com o avanço das pesquisas, já se sabe que algumas enzimas conseguem melhorar a digestibilidade da dieta, aproveitamento dos nutrientes (MOHAMMED et al., 2018), bem como o desempenho dos animais, devido a sua característica em ser resistente a degradação ruminal (HRISTOV et al., 1998).

As classes de enzimas exógenas, as quais são suplementadas às dietas de ruminantes, são definidas conforme suas atividades enzimáticas, podendo ser classificadas como amilase, celulase, betaglucanase, betamananase, hemicelulase, xilanase, pectinase e protease (BEAUCHEMIN et al., 2003). Além disso, os efeitos das enzimas exógenas podem ser categorizados por seu modo de ação como pré-

consumo (agindo na alimentação), ruminal ou pós-ruminal (MCALLISTER et al., 2001).

## 1.2 ENZIMAS EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL

As enzimas exógenas são substâncias proteicas obtidas de forma natural através da fermentação fúngica, bacteriana ou vegetal. Como catalisadores, as enzimas, são altamente específicas e são classificadas de acordo com o substrato sobre as quais atuam (Tabela 1) (MARZZOCO & TORRES, 1999). As enzimas exógenas são inseridas na dieta dos animais com o objetivo de auxiliar na degradação de substratos, os quais serão utilizados para o crescimento celular, seja através dos microrganismos ruminais ou pelo hospedeiro. Todavia, devido a sua característica proteica, as enzimas podem ser desnaturadas através do calor e do pH sobre o qual são submetidas, podendo sofrer proteólises por enzimas digestivas ou bacterianas. Desta forma, ao suplementar um animal com enzimas, torna-se necessário que haja o controle do pH ruminal (característico de acordo com a enzima) e fornecimento constante de substratos (LEHNINGER, 2005).

TABELA 1: PRINCIPAIS ENZIMAS COMERCIAIS, SUBSTRATOS DE ATUAÇÃO E PRINCIPAIS EFEITOS.

(continua)		
<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Efeitos</b>
Xilanase	Xilanos	Redução da viscosidade da digesta
Mananase	Mananos	Estimular células imunes do epitélio, contribuindo com a saúde intestinal
Betaglucanase	Beta-glucanos	Redução da viscosidade da digesta
Celulase	Celulose	Degradação da celulose, liberando mais nutrientes
Pectinase	Pectina	Redução da viscosidade da digesta
Galactosidase	Galactosídeos	Remoção dos alfa galactosídeos, melhora na disponibilidade dos nutrientes
Protease	Proteínas	Suplementação sobre enzimas endógenas e degradação mais eficiente



TABELA 1: PRINCIPAIS ENZIMAS COMERCIAIS, SUBSTRATOS DE ATUAÇÃO E PRINCIPAIS EFEITOS.

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Efeitos</b>
Amilase	Amido	Suplementação sobre enzimas endógenas e degradação mais eficiente
Fitase	Fitato	Melhora na utilização do fósforo fítico presente nos grãos

Fonte: Adaptado de Krabbe e Mazzuco, 2011.

De acordo com as pesquisas desenvolvidas por Beauchemin et al. (1998), citados por Beauchemin et al. (1999), foram encontradas evidências de que ao utilizar enzimas hidratadas nos alimentos, houve aumento de sua adsorção, com consequente aumento da resistência das enzimas à proteólise, prolongando assim, sua viabilidade no ambiente ruminal.

Segundo Morgavi et al. (2000), quando administradas juntamente com os alimentos, as enzimas tornam-se relativamente estáveis dentro do ambiente ruminal. O aumento de sua atividade no rúmen pode elevar a capacidade hidrolítica ruminal, contribuindo com a melhor digestibilidade dos alimentos, uma vez que, não se limita aos componentes específicos da enzima.

A inclusão de enzimas exógenas na dieta dos ruminantes pode trazer muitos benefícios correlacionados ao desempenho animal, pois as enzimas hidrolisam frações específicas de nutrientes, os quais as enzimas endógenas (produzidas pelo organismo) não são capazes de agir, aumentando as frações digestíveis da dieta, sendo, portanto, complementares umas às outras (SELLE & RAVINDRAN, 2007). A atividade da enzima, no sítio de ligação específico, favorece a fixação microbiana ao substrato (BEAUCHEMIN et al., 2003), além disso, auxiliam na inibição de fatores antinutricionais, que prejudicam a digestão dos alimentos, através do rompimento e liberação dos nutrientes. Os substratos amiláceos de rápida fermentação, quando degradados pelas enzimas disponibilizam grande quantidade de energia, contribuindo com a síntese de proteína microbiana ruminal (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

Os complexos enzimáticos atuam reduzindo a viscosidade da digesta na porção duodenal do trato digestório, favorecendo o aproveitamento dos nutrientes (BEDFORD et al., 1991). Ao fornecer altos níveis de enzimas, Hristov et al. (2000) observaram aumento de 30% na atividade da xilanase no intestino e redução da viscosidade do conteúdo digerido.

Outro ponto importante é o sinergismo que ocorre entre enzimas e entre enzimas e população microbiana, uma vez que, os microrganismos ruminais podem atuar no sítio de digestão facilitado pela ação enzimática, auxiliando sua fixação ao substrato (BEAUCHEMIN et al., 2003). A utilização de um complexo enzimático, ou seja, a associação de diferentes enzimas que atuam em diferentes substratos, na dieta de vacas leiteiras, busca o maior aproveitamento dos nutrientes e conseqüentemente maior eficiência na digestão. As enzimas exógenas mais utilizadas na nutrição de vacas leiteiras, podem ser classificadas como fibrolíticas, amilolíticas e proteolíticas (SUJANI & SERESINHE, 2015).

As enzimas mais utilizadas pela indústria e que apresentam origem microbiana, originam-se de quatro espécies de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* e *Streptococcus faecium* spp.) e três espécies de fungos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* e *Saccharomyces cerevisiae*) (MUIRHEAD, 1996).

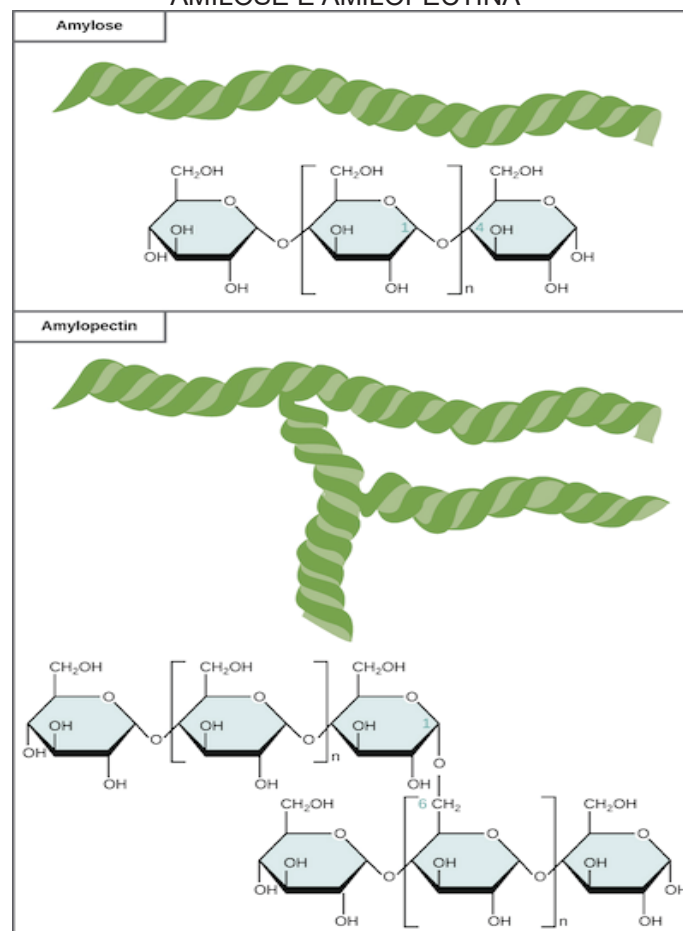
Os fungos filamentosos são geralmente os maiores produtores de enzimas extracelulares (SIBEN, 2007). A espécie *Aspergillus niger* pode produzir cerca de quarenta diferentes tipos de enzimas, como por exemplo, lipase, amiloglicosidase, pentosanase, protease,  $\alpha$ -amilase, fitase, glicosidase, pectinase, celulase, catalase,  $\alpha$ -galactosidase, inulase, etc. De todas as enzimas citadas, as amilases ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e glucoamilase) estão entre as mais importantes enzimas extracelulares.

Os *Aspergillus* spp. são anamórficos e pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. As espécies mais conhecidas são a *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Eles podem tanto ser patogênicos ao ser humano como exemplo o *A. flavus*, que é produtor de aflatoxinas, como também serem amplamente usados nas indústrias como o *A. nidulans*, o *A. oryzae* e o *A. niger* (PEREIRA, 2014).

### 1.3 ENZIMAS AMILOLÍTICAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

As enzimas amilolíticas têm como função atuar na degradação do amido. Desta forma, são suplementadas em dietas compostas por cereais como o milho, a cevada e o trigo. O amido é formado por dois homopolissacarídeos, os quais são ligados entre si através de ligações glicosídicas, constituído por amilose (15-20%) e amilopectina (80-85%) (HARGER, 1982), como demonstrado na FIGURA 1. As amilases, por sua vez, atuam principalmente nas ligações glicosídicas do grânulo de amido (PÉREZ et al., 2009).

FIGURA 1. FORMA E ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA AMILOSE E AMILOPECTINA



FONTE: OpenStax Biology (2022).

A suplementação de vacas em lactação com amilase pode aumentar a digestibilidade do amido ruminal e contribuir com aumento do rendimento de microrganismos ruminais (HALL & HEREJK, 2001), regulação da ingestão induzida pelo aumento da oxidação hepática de propionato e aumento do teor de proteína no leite (NRC, 2001). Em contrapartida, o aumento acelerado da digestão do amido pode

indesejavelmente ocasionar quadros de acidose ruminal subclínica, resultando assim, na queda da síntese de proteína microbiana e da produção de gordura do leite (OBA & ALLEN, 2003).

Apesar disso, conforme citado anteriormente, sabe-se da importância do amido na dieta de vacas leiteiras, uma vez que, pode ser utilizado como fonte de energia para o crescimento de bactérias que degradam fibra (celulolíticas). Desta forma, mesmo que se tenha um leve quadro de acidose ruminal subclínica, ocasionado pela amilase, ainda assim, o efeito da hidrólise do amido pode de alguma forma auxiliar na digestibilidade da fibra no rúmen (TÓTH & TÓTHI, 2016).

A digestibilidade total do amido em vacas leiteiras tem grande amplitude, podendo variar de 70 a 100%, segundo Firkins et al. (2001). Diferentes fatores relacionados à alimentação das vacas leiteiras influenciam a digestibilidade do amido proveniente do grão de milho, como o tamanho de partículas, método de processamento, metodologia de colheita e armazenamento, maturidade na colheita e teor de umidade (GENCOGLU et al., 2010) e do tipo de endosperma (córneo ou amiláceo). Desta forma, o efeito das estratégias nutricionais sobre a digestibilidade do amido ruminal parece ser dependente do tipo de amido presente na dieta.

Em uma meta análise realizada por Ferraretto et al. (2013), com o objetivo de avaliar a influência do tipo de grão, maturidade do milho e métodos de processamento no consumo de matéria seca, digestibilidade e desempenho de vacas em lactação, foram avaliadas três formas de processamento: milho seco moído, milho ensilado (grão úmido) e milho floculado. De acordo com os resultados encontrados, houve redução na digestibilidade do amido total e aumento da concentração de gordura no leite para o milho moído em relação ao milho grão úmido e floculado. Com o aumento de tamanho de partícula, obteve-se redução da digestibilidade do amido, tanto para milho grão seco quanto para milho grão úmido. Quando dietas com maiores concentrações de amido foram fornecidas, houve aumento de produção de leite e na concentração de proteína do leite, porém houve redução da digestibilidade do FDN (fibra em detergente neutro) e na concentração de gordura no leite.

Apesar da concentração de amido utilizada na dieta de bovinos leiteiros variar de 20 a 30% da MS (CHASE, 2007), sabe-se que as enzimas exógenas resistentes a degradação ruminal, podem oferecer melhoria da digestibilidade e do aproveitamento do amido ofertado e contribuir com o desempenho animal. Klingerman et al. (2009) relataram que a adição de amilase exógena a uma dieta de amido considerado normal

(26% da MS) contribuiu com o aumento da produção de leite em vacas leiteiras. Em contrapartida, no estudo realizado por Gencoglu et al. (2010), ao adicionar a amilase exógena em uma dieta com amido baixo (21% da MS), apesar de não ter alterado a produção de leite, aumentou a digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e do FDN, contribuindo com a redução do consumo de matéria seca (CMS), aumento de sólidos e de produção de leite corrigida para gordura.

As amilases são classificadas de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam, ou seja, as  $\alpha$ -amilases, são as que rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases), as  $\beta$ -amilases hidrolisam a penúltima ligação à partir da extremidades não redutoras do substrato (exoamilases), e as glucoamilases (amiloglicosidases) liberam unidades de glicose na extremidade final da cadeia não redutora das moléculas do substrato (MORAES, 2004).

Diferentes microrganismos podem ser utilizados para a produção de amilase, como *Bacillus licheniformis*, *Chromohalobacter sp.*, *Halobacillus sp.*, *Haloarcula hispanica* e *Halomonas meridiana* (ROJO-RUBIO et al., 2005; PRAKASH et al., 2009). Todavia sabe-se que o microrganismo mais utilizado na extração da amilase é o *Aspergillus oryzae* (TRICARICO et al., 2008).

Royo-Rubio et al. (2001) ao avaliarem a eficácia da amilase de *Bacillus licheniformis* in vitro, relataram aumento da digestibilidade dos grânulos de amido de sorgo e milho. Mora-Jaimes et al. (2002) observaram melhorias na digestão ruminal do amido quando o sorgo foi tratado com  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* (digestão de 82,85%) ou glucoamilase de *Aspergillus niger* (87,23%), em comparação com ração não tratada (digestão de 75,13%).

Tricarico et al. (2005) mostraram que a suplementação com diferentes dosagens de  $\alpha$ -amilase não aumentou a digestibilidade ruminal do amido, mas sim, modulou a fermentação ruminal aumentando a concentração de acetato e butirato, diminuindo de propionato.

Royo-Rubio et al. (2007) relataram que a enzima amilolítica  $\alpha$ -amilase foi mais eficaz no aumento da digestão do amido em novilhos canulados. Em avaliação sobre o desempenho de bovinos de corte a partir da suplementação com  $\alpha$ -amilase, Tricarico et al. (2007) encontraram melhorias nas características de carcaça, incremento no ganho de peso e aumento do consumo voluntário de MS. No entanto, quando houve restrição do CMS, a enzima não influenciou no desempenho dos animais. Alguns resultados contraditórios em relação a eficácia da amilase foram

relatados por outros pesquisadores, podendo serem atribuídos a fatores, como: dose enzimática, tipo de alimentação, hospedeiro e questões de manejo (MENDOZA et al., 2014).

Ao suplementar amilase exógena para novilhos de corte confinados, os quais receberam uma dieta composta por milho laminado ou floculado, não foram encontrados efeitos benéficos em relação a digestibilidade total dos nutrientes e ao desempenho dos animais (DILorenzo et al., 2011). Resultado semelhante foi constatado por Lee-Rangel et al. (2010), os quais não observaram efeito da suplementação de amilase no desempenho de cordeiros em crescimento.

Em estudo realizado por Weiss et al. (2011), avaliando a adição de amilase em dietas com 26 e 31% de amido para vacas em lactação, proveniente principalmente de milho moído grosseiramente (1,42 mm), não encontraram efeito de interação entre os tratamentos; todavia, os autores observaram que dietas ricas em amido apresentaram maior digestibilidade da MS, MO e do FDN do que dietas com baixo teor de amido. Os autores atribuíram o resultado da maior digestibilidade do FDN ao suposto aumento da disponibilidade de energia provinda do amido às bactérias celulolíticas. Com isso, concluíram que a amilase exógena quando adicionada a uma dieta com baixo teor de amido não é capaz de tornar a dieta nutricionalmente equivalente a uma dieta rica em amido, concordando com trabalhos que observaram mínimos efeitos da amilase exógena para vacas leiteiras quando adicionadas em dietas com teor de 21% de amido, considerado baixo (FERRARETTO et al., 2011; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014).

A fim de avaliar a inclusão de doses dietéticas crescentes do extrato de *A. oryzae* no desempenho produtivo de vacas em lactação recebendo dieta com 27,1% de amido, Tricarico et al. (2005) observaram efeito quadrático positivo para a produção de leite e de gordura no leite, porém sem alteração na ingestão de MS, mas com redução na produção de propionato. Andreazzi et al. (2018), ao suplementarem amilase exógena para vacas recebendo dietas com alto teor de amido (32% da MS), observaram acréscimo na produção de leite (PL), menor CMS e conseqüentemente melhor eficiência alimentar (EA). Todavia não foi constatado melhoria na digestibilidade total dos nutrientes. Por outro lado, Takiya et al. (2017) demonstraram que a suplementação com doses crescentes da enzima amilolítica em dietas com 29,2% de amido não afetaram a EA, produção de propionato e de proteína microbiana

no rúmen de vacas em lactação. No entanto os tratamentos aumentaram linearmente a digestibilidade de PB e o peso corporal das vacas.

Hristov et al. (2008), utilizando baixas concentrações (10 g/vaca/dia) dos complexos enzimáticos contendo amilases, não observaram nenhum efeito sobre a fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e digestibilidade de nutrientes em vacas leiteiras. Zilio et al. (2018) também testaram a associação de enzimas amilolítica e fibrolítica na dosagem de 12 g/d e 8 g/d respectivamente, por animal no concentrado, e observaram que a associação das enzimas não contribuiu com melhorias de desempenho e da digestibilidade dos nutrientes de vacas em lactação. Em contrapartida, 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 e Klingerman et al. (2009) observaram aumentos na PL, PL corrigida para 3,5% de gordura, melhorias na digestibilidade da MS e MO no trato total dos animais que receberam suplementação do complexo enzimático. Os autores concluíram que a adição de amilase exógena à dieta de vacas leiteiras lactantes apresentou potencial para melhorar a produtividade animal.

Ao suplementar  $\alpha$ -amilase para vacas leiteiras, Chen et al. (1995) não observaram efeitos no CMS e digestibilidade do amido, mas relataram um aumento na digestibilidade da PB. No estudo de Tricarico et al. (2008), a suplementação dietética com  $\alpha$ -amilase aumentou a produção de maltodextrinas (substrato para uma variedade de bactérias ruminais, incluindo as amilolíticas e não amilolíticas), aumentando a digestibilidade geral dos nutrientes. O efeito da  $\alpha$ -amilase sobre a digestibilidade do amido total pode estar associado com alguns fatores como: o aumento da digestão pós-ruminal do amido, em resposta ao aumento da degradação ruminal, fermentação do amido em outro compartimento digestivo, ou ausência de efeito enzimático na degradação do amido ruminal.

Apesar da inconsistência dos resultados, a adição de diferentes amilases exógenas às dietas de ruminantes tem frequentemente aumentado a digestibilidade da MS do trato total (ROJO et al., 2005; KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010), porém os efeitos positivos na digestibilidade do amido no trato total têm apresentado grande variabilidade e geralmente não apresentam significância (ROJO-RUBIOP et al., 2005; HRISTOV et al., 2008; KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010).

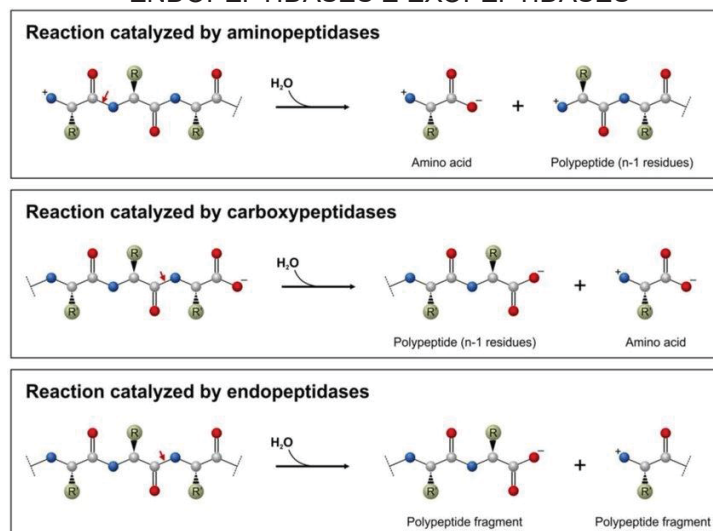


Muitos são os fatores que podem interferir positivamente ou não na ação das enzimas amilolíticas, conforme mostram os estudos citados nessa revisão, sendo que a concentração de amido e a forma com que ele se apresenta na dieta, irão refletir nos efeitos positivos em relação ao desempenho produtivo das vacas em lactação.

#### 1.4 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

As enzimas proteolíticas, também conhecidas por proteases ou peptidases, são classificadas de acordo com sua reação catalisadora, sendo consideradas como exopeptidases ou endopeptidases (FIGURA 2). As exopeptidases, denominadas como aminopeptidases ou carboxipeptidases, são responsáveis pela quebra das ligações peptídicas próximas ao grupamento amino e ao grupo carboxílico terminal do substrato, respectivamente. As endopeptidases fazem a lise das ligações distantes ao grupamento amino ou carboxílico terminal. Em resumo as enzimas proteolíticas catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas (RAO et al., 1998).

FIGURA 2: MECANISMOS DE AÇÃO DAS ENDOPEPTIDASES E EXOPEPTIDASES



FONTE: Mótyán et al. (2013).

As proteases, quando suplementadas nas dietas de ruminantes, degradam a porção proteica presente nos alimentos, liberando aminoácidos, os quais serão aproveitados pelos microrganismos ruminais para a síntese de proteína microbiana. As enzimas proteolíticas também podem liberar a proteína ligada à fibra (PB ligada ao FDN e ao FDA). Embora a proteína ligada à fibra represente apenas 7-11% do



conteúdo total da parede celular, sua contribuição para a digestibilidade total da proteína é reconhecida pelo aumento da fermentação da matéria orgânica no rúmen (SURYANARAYANA, 2020).

As proteases exógenas são capazes de inativar fatores anti-nutricionais presentes em determinados alimentos (COWIESON et al., 2006), auxiliando na maximização da disponibilidade de aminoácidos, colaborando com a energia metabolizável e conseqüentemente aprimorando o desempenho zootécnico dos animais, reduzindo o custo de produção (MENEGHETTI, 2013).

Os estudos conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos específicos das enzimas proteolíticas em ruminantes ainda são restritos. Em contrapartida, o que se tem buscado é a combinação entre as proteases e amilases e/ou carboidrases, possibilitando assim, o sinergismo entre enzimas exógenas e microbianas (MORGAVI et al., 2000). De acordo com McAllister et al. (2001), dentro do compartimento ruminal, as enzimas são capazes de atuar diretamente nos alimentos ou podem estimular a digestão indiretamente, através da potencialização das enzimas microbianas.

Segundo relatos de Eun & Beauchemin (2005), o uso de enzimas proteolíticas exógenas, foi ignorado na época, por acreditarem que a degradação causada pelas proteases acarretaria na insuficiência de uso de nitrogênio. Todavia, pressupõem-se que as proteases deveriam ser adicionadas a uma dieta animal com o objetivo de aumentar a hidrólise da proteína dietética, melhorando o aproveitamento do nitrogênio. Quando os animais utilizam o nitrogênio de forma mais eficiente, pode ser possível diminuir o teor de proteína da dieta, reduzir os custos de alimentação e conseqüentemente reduzir o impacto ambiental com menor consumo de nitrogênio (SUCU et al., 2014).

Em frangos de corte, a adição de proteases melhorou o aproveitamento do nitrogênio (GHAZI et al., 2003). Estudos com suínos, mostraram maior digestibilidade de proteínas e eficiência alimentar ao suplementar os animais com proteases (O'DOHERTY & FORDE, 1999). Estudos com ruminantes, em que as proteases exógenas ou misturas de enzimas que continham proteases foram avaliadas na TMR de vacas leiteiras, evidenciaram efeitos benéficos no desempenho produtivo (EUN & BEAUCHEMIN, 2005; GADO et al., 2009) e nenhum efeito em bovinos de corte (VERA et al., 2012; MESCHIATTI et al., 2019).

Acredita-se que as enzimas proteolíticas tenham capacidade de hidrolisar as cadeias polipeptídicas presentes na matriz proteica dos grânulos de amido e então

liberar compostos que poderão ser aproveitados pelos microrganismos ruminais. Sendo assim, elas também podem auxiliar no aproveitamento do amido dietético. Desse modo, proteases têm sido exploradas como alternativa associada ao processamento físico de cereais em dietas de ruminantes, com a ideia de romper as barreiras estruturais que impedem o acesso aos grânulos de amido pela  $\alpha$ -amilase (McALLISTER & RIBEIRO, 2013; AMARO et al., 2021).

Eun & Beauchemin (2005) avaliaram os efeitos da suplementação de uma enzima proteolítica em dietas de vacas lactantes, contendo duas concentrações de forragens (denominadas como alta e baixa forragem). De acordo com os resultados houve diminuição da ingestão de nutrientes e aumento na digestibilidade no trato total de MS, MO, FDN e hemicelulose para o grupo suplementado com a protease em ambas as concentrações de forragem. Segundo os autores, a adição de enzima às diferentes dietas estudadas favoreceu a atividade ruminal das enzimas fibrolíticas, reforçando o conceito de que enzimas exógenas atuam sinergicamente com a microbiota do rúmen, resultando no melhor aproveitamento dos alimentos.

Durante dois estudos *in vitro* realizados por Colombatto et al. (2003a,b) com a suplementação de proteases sem atividade de xilanase, os pesquisadores observaram aumento na degradabilidade de MS e FDN, tanto em feno de alfafa quanto na TMR. Sucu et al. (2014), com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de proteases nos parâmetros relacionados com a produção de vacas Holandesas, encontraram resultados que indicaram uma tendência a melhor eficiência alimentar. Além disso, as concentrações de nitrogênio ureico no sangue e na urina diminuíram nas vacas suplementadas com proteases, sendo atribuído à melhora na síntese de proteína microbiana no rúmen e na eficiência de utilização do nitrogênio.

Outra forma de utilização das proteases exógenas tem sido como aditivos em silagens de milho de alta umidade e de planta inteira. Neste sentido, os resultados mostraram maior digestibilidade do amido devido à quebra da matriz proteica que envolve os grânulos de amido (FERRARETTO et al., 2015; DER BEDROSIAN & KUNG JR, 2019). Apesar desses estudos, ainda há escassez de pesquisas na literatura sobre os efeitos da inclusão de  $\alpha$ -amilases e proteases sobre a digestibilidade do amido.

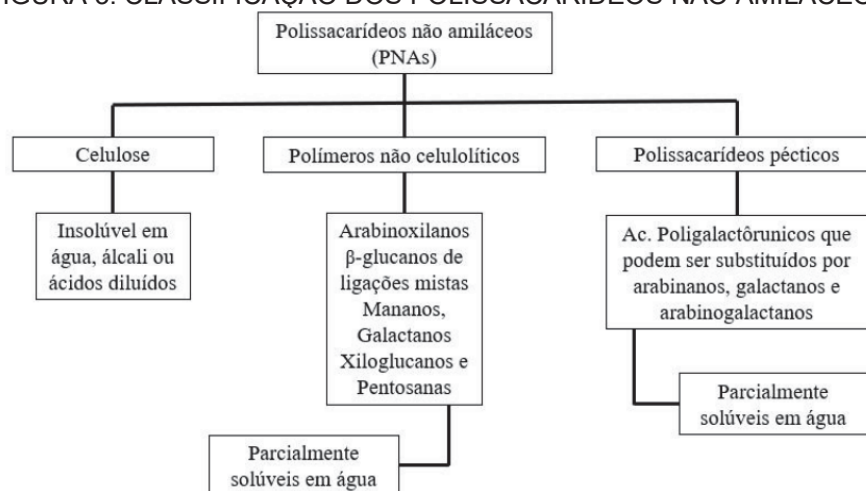
## 1.5 ENZIMAS FIBROLÍTICAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

A maioria dos mamíferos tem limitada capacidade em digerir fibras dietéticas, como a celulose. Todavia, os ruminantes e os animais com ceco funcional, como equinos e coelhos, produzem as celulases endógenas no trato gastrointestinal a partir de suas bactérias simbióticas.

O uso de enzimas exógenas fibrolíticas ( $\beta$ -glucanase, xilanase e celulase) foram inicialmente avaliadas na alimentação de aves e suínos com o objetivo de remover alguns fatores antinutricionais, polissacarídeos não amiláceos (PNA), diminuindo a viscosidade da digesta no duodeno, facilitando desta forma a absorção dos nutrientes (BEDFORD et al., 1991), além de degradar o pericarpo que recobre o endosperma do grão (PONTE et al., 2004; MENDES et al., 2013). O pericarpo é composto por  $\beta$ -glucanos, xilanos e celulose, compostos estes indigestíveis para os animais não ruminantes (BEDFORD & SCHULZE, 1998; BHAT, 2000). As enzimas fibrolíticas, hidrolisam os PNA que podem ser potencialmente utilizados pelo animal, aumentando, por exemplo, a utilização de energia e contribuindo com o seu desempenho.

Os PNA são divididos entre solúveis e insolúveis. Dentro da classe dos solúveis encontram-se a hemicelulose (xiloglucanos, arabinoxilanos,  $\beta$ -glucanos, mananos, dentre outros) e a pectina. Os insolúveis são compostos principalmente por celulose e lignina e por algumas hemiceluloses. A FIGURA 3 representa a classificação dos PNA.

FIGURA 3: CLASSIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS.

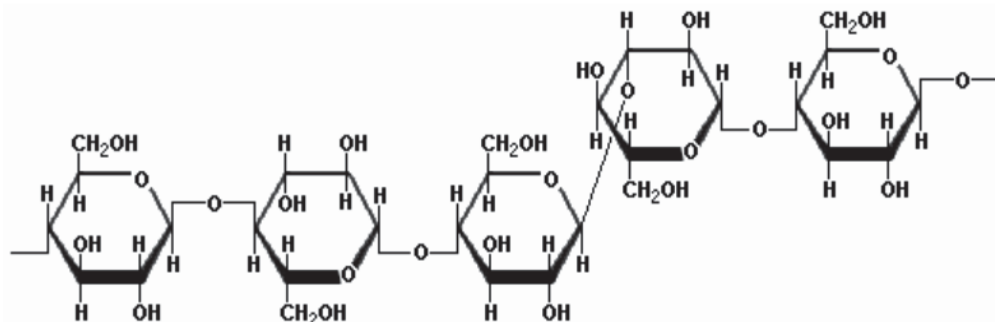


FONTE: Adaptado de Choct (2006).

O xiloglucano é um polissacarídeo ramificado presente na parede celular dos vegetais (ALBERSHEIM et al., 1996). Formado por uma cadeia principal composta por pontes glicosídicas  $\beta$ 1-4 com ramificações laterais de xilose, xilose-galactose ou xilose-galactose-fucose, apresenta função estrutural na planta. Quando hidrolisado com as enzimas endoglucanases, esse polissacarídeo é reduzido a oligossacarídeo composto por quatro resíduos de glicose na cadeia principal e três resíduos de xilose, os quais podem ou não estar ramificados com resíduos de galactose ou galactose e fucose (HAYASHI, 1989).

Os  $\beta$ -glucanos são polissacarídeos que fazem parte da estrutura da parede celular de bactérias, fungos, algas e cereais, principalmente cevada e aveia. Estão presentes no endosperma da semente como polissacarídeos solúveis, não ramificados, constituindo uma cadeia linear composta por unidades de glicose, formada por ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4 e 1-3) (FIGURA 4). As ligações  $\beta$  (1-4) respondem por aproximadamente 70% das ligações glicosídicas, e ocorrem em sequência de duas ou três unidades de glicose, interrompidas por uma ligação  $\beta$  (1-3) isolada (WOOD et al., 1991).

FIGURA 4: ESTRUTURA BÁSICA DE  $\beta$ -GLUCANOS NOS CEREAIS COM LIGAÇÕES COMBINADAS  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) E  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).



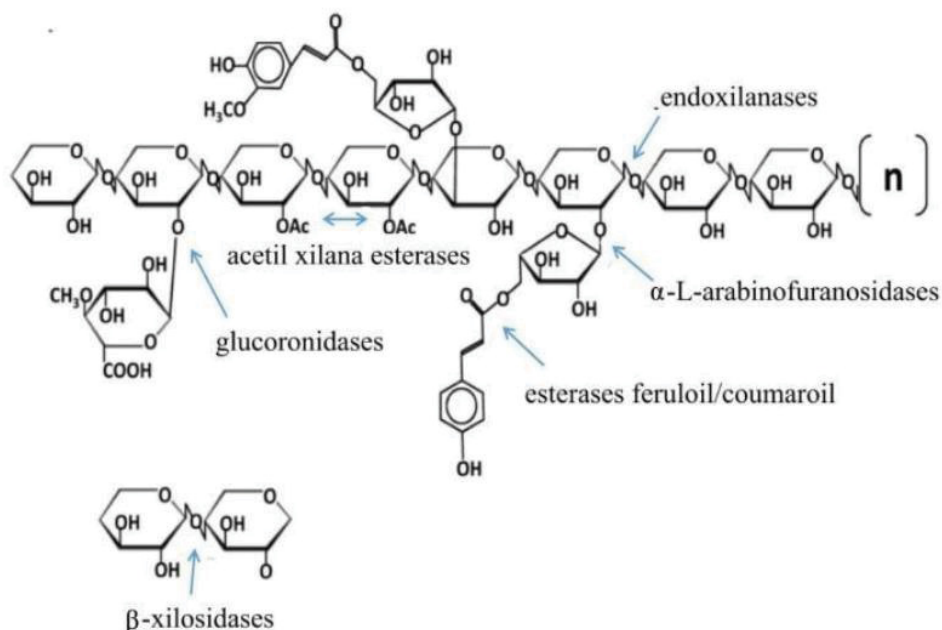
FONTE: Havrlentová et al. (2011).

Os  $\beta$ -mananos são encontrados na maioria dos alimentos de origem vegetal. São fibras polissacarídicas sem amido, constituídas por cadeias lineares de manose e galactose, com ligação do tipo  $\beta$  1-4 e pertencentes às frações hemicelulósicas das plantas. O conteúdo de  $\beta$ -manano solúvel em diferentes ingredientes tem uma variação de 0 a 7%, sendo mais moderado em cereais como milho e sorgo, e relativamente alto em ingredientes proteicos como o soja, e com concentração alta na

casca de soja. Uma vez que o farelo de soja é a fonte de proteína mais importante na produção de rações, podemos considerar que as  $\beta$ -mananas estão presentes na maioria das dietas fornecidas aos animais (HSIAO et al., 2006; SLOMINSKY & CAMPBELL, 1990). Os  $\beta$ -mananos presentes na soja são polissacarídeos compostos por repetições de  $\beta$ -(1-4) manose,  $\beta$ -(1-6) galactose e/ou unidades de glicose ligado a cadeia estrutural de  $\beta$ -mananos. De acordo com Dale (1997), citado por Martinez-Cummer (2013), as cadeias de mananos são altamente viscosas, solúveis em água e resistentes a fase de secagem/torração durante o processamento da soja.

Devido a diversidade e a complexidade da estrutura da hemicelulose, há necessidade de diferentes enzimas para que ocorra sua degradação, incluindo endo-1,4- $\beta$ -xilanasas,  $\beta$ -D-xilosidases,  $\alpha$ -arabinofuranosidases,  $\alpha$ -glucuronidasas, acetil-xilana-esterase e feruloil-esterases (DODD & CANN, 2009) (FIGURA 5). Grande parte dessas enzimas agem exclusivamente sobre as cadeias laterais, liberando principalmente a xilana, a partir da clivagem pelas xilanasas. As  $\beta$ -xilosidases clivam xilobiose em dois monômeros de xilose, sendo que esta enzima também pode liberar xilose a partir do final da cadeia principal de xilana ou de um oligossacarídeo (FARINAS, 2011). A cadeia principal de xilana é hidrolisada principalmente pelas endoxilanasas, enquanto as cadeias laterais de arabinose são removidas por arabinofuranosidases (GILBERT, 2010).

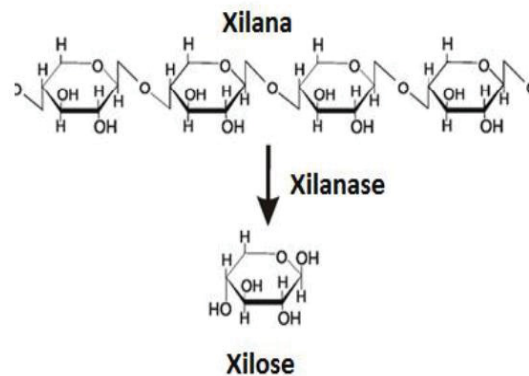
FIGURA 5: ESTRUTURA DA XILANA E ENZIMAS DO COMPLEXO XILANOLÍTICO.



FONTE: Amorim (2017).

As xilanases são extraídas de fungos do gênero *Aspergillus*. São enzimas responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal da xilana, a qual é considerada a maior constituinte do complexo hemicelulósico das paredes celulares das células vegetais. A xilana (FIGURA 6) está presente na parede celular primária e secundária juntamente com a celulose e a lignina, desta forma, acredita-se que ela contribui com a coesão das fibras e com a integridade da parede celular da planta (PINTO, 2005).

FIGURA 6: ESTRUTURA DA XILANA E AÇÃO DA XILANASE.



FONTE: Held (2012).

Apesar de ser a primeira classe de enzimas exploradas em ruminantes, ainda assim, o uso de enzimas fibrolíticas é questionado, devido a crença de que, ao acessar o rúmen as enzimas exógenas, de modo geral, seriam rapidamente destruídas pelas proteases. Além disso, de acordo com a característica digestiva dos ruminantes, acreditava-se que os próprios microrganismos ruminais seriam suficientes em degradar os substratos fibrosos dos alimentos. No entanto, sabe-se que dietas ricas em carboidratos não fibrosos (CNF) podem prejudicar a atividade fibrolítica das enzimas endógenas (BEAUCHEMIN et al., 2001), reduzindo o aproveitamento dos alimentos e consequentemente o desempenho dos animais. Com isso, a adição de enzimas fibrolíticas na dieta de ruminantes, começou a ser estudada, como alternativa de melhoria do aproveitamento dos alimentos fibrosos, buscando melhores produtividades e conversão alimentar dos animais.

As enzimas fibrolíticas usadas na dieta de vacas leiteiras têm demonstrado efeitos positivos na digestibilidade total da MS, FDN e FDA (SALEM et al., 2013;

ARRIOLA et al., 2017). Melhorias na digestibilidade da fibra através da suplementação de enzimas exógenas, sugerem que a produção de enzimas endógenas possa ser limitada ou ineficiente (BEAUCHEMIN et al., 2003). Como a maior parte da alimentação dos ruminantes tende a ser composta por carboidratos fibrosos, as enzimas fibrolíticas hidrolisam os PNA das paredes celulares das plantas, principalmente a celulose e hemicelulose. A função estrutural da hemicelulose na parede celular garante um quarto da biomassa total da planta (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

As enzimas fibrolíticas responsáveis pela hidrólise da hemicelulose no rúmen são xilanase,  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -mananase e a celulase para a celulose. Muitos pesquisadores defendem o uso de uma mistura das diferentes enzimas que degradam os carboidratos estruturais, no formato de complexo enzimático, uma vez que Salem et al. (2013), por exemplo, encontraram resultados positivos para digestibilidade e fermentação ruminal em novilhos de corte.

Na alimentação animal, as xilanases, através da hidrólise das arabinoxilanas, são capazes de reduzir a viscosidade da digesta intestinal e aumentar o valor nutritivo dos alimentos. Segundo Colombato et al. (2003), as xilanases podem alterar as atividades fisiológicas da microbiota ruminal, podendo ser observado aumento da produção de propionato e butirato e redução de acetato e metano (EUN & BEAUCHEMIN, 2007).

A presença de maior concentração de propionato ou menor proporção de acetato:propionato no rúmen podem indicar menor disponibilidade de hidrogênio metabólico para metanogênese. Com base nessa observação, Beauchemin et al. (2008) propuseram realizar a suplementação de aditivos alimentares enzimáticos em dietas de ruminantes como forma de mitigar a produção de metano entérico ( $\text{CH}_4$ ). Em um estudo in vivo, Arriola et al. (2011), ao suplementarem vacas em lactação com aditivo enzimático fibrolítico, observaram que com a quantidade de concentrado na dieta aumentada, houve diminuição no  $\text{CH}_4$  entérico, relacionando-o com a redução da concentração de acetato e aumento de propionato pela dieta.

Yang et al. (2000) avaliaram duas formas de fornecimento de enzimas fibrolíticas com baixa atividade da celulase e alta atividade xilanase na dieta de vacas Holandesas, misturando-as à TMR ou ao concentrado. O consumo de MS (média 19,8 kg/d) não foi afetado pela suplementação enzimática. O fornecimento da enzima misturada ao concentrado resultou em maior digestibilidade da MS no trato total



(66,6% vs. 63,9%) em relação a dieta controle, acarretando aumento da produção de leite (37,4 vs. 35,3 kg/dia). Quando a enzima foi misturada a TMR, houve somente aumento na digestibilidade (65,7% vs. 63,9%) da MS, sem efeito na produção de leite (35,2 vs. 35,3 kg/dia).

Ao avaliarem o desempenho de novilhas de corte com suplementação dietética de  $\beta$ -mananase, Seo et al. (2016) relataram aumento do ganho de peso médio diário desses animais. Tewoldebrhan et al. (2017) ao avaliarem os efeitos da suplementação de duas dosagens de  $\beta$ -mananase na digestibilidade dos nutrientes, eficiência na conversão alimentar, e utilização de nitrogênio em vacas leiteiras, encontraram aumento da produção de leite por unidade de ingestão de matéria seca e produção de proteína do leite por quilograma de proteína bruta ingerida em uma dieta à base de feno de alfafa e silagem de milho fornecida para a vacas Holandesas na fase intermediária da lactação. No entanto, a produção de N fecal mais N urinário foi semelhante em vacas com ou sem suplementação de  $\beta$ -mananase.

Os  $\beta$ -glucanos derivados de levedura também têm sido associados com melhor resposta imune e produtividade em bovinos. A suplementação de  $\beta$ -glucanas melhorou o desempenho de bovinos em crescimento (ANGELAKIS, 2017) e perfil metabólico (CHIOFALO et al., 2004) em ruminantes. Administração dietética de  $\beta$ -glucanas em ovelhas em lactação resultou no aumento de até 14% da produção de leite. Além disso, a composição do leite também foi melhorada, podendo ser encontrado quantidades substancialmente maiores teores de gordura (até 30%) e proteína (até 11%) (ZABEK et al., 2013).

Com objetivo de avaliar os efeitos de um produto comercial com  $\beta$ -1,3-glucano na produtividade, imunidade e status antioxidante de vacas em transição, Xia et al. (2021) encontraram ganhos em produtividade, imunidade e status antioxidante, demonstrados pela redução da contagem de células somáticas do leite e aumento dos níveis de imunoglobulinas no colostro. A suplementação com  $\beta$ -1,3-glucano reduziu os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e proteína C reativa, e aumentou os níveis séricos de imunoglobulinas, indicando os ganhos da imunidade em vacas em transição. A redução do nível sérico de malondialdeído e o aumento das atividades da superóxido dismutase e catalase séricas demonstram o efeito antioxidante.

A maioria dos estudos explorando o uso de enzimas exógenas para gado leiteiro tem focado predominantemente em dietas de forragens de alta qualidade (silagem de milho e alfafa, por exemplo) (MORENO et al., 2007; PINOS-RODRÍGUEZ



et al., 2005). Segundo Oba e Allen (1999), para cada unidade de aumento na digestibilidade in vitro da FDN, o consumo de MS e a produção de leite corrigida para 4% de gordura aumentaram em 0,17 e 0,25 kg/dia, respectivamente. Ao suplementar vacas leiteiras com enzimas fibrolíticas, Gado et al. (2009) relataram aumento de 13% de ingestão de MS e acréscimo de 23% na PL no grupo tratado em comparação com o grupo controle. No entanto, alguns estudos não mostraram alteração na ingestão de MS ou na PL (DHIMAN et al., 2002; DEAN et al., 2013) e outros não relataram alterações na PL, porém houve diminuição na ingestão de MS (ARRIOLA et al., 2011; HOLTSHAUSEN et al., 2011).

Há relatos de diferentes efeitos do uso de enzimas fibrolíticas em dietas para ruminantes. Diferentes compostos enzimáticos estudados, favoreceram o aumento no CMS, na digestibilidade da fibra in vivo e na produção de leite, enquanto muitos outros não relataram efeito algum. As respostas aos aditivos enzimáticos são muito variáveis, isso provavelmente se deve ao tipo de animal (necessidade de energia e nível de alimentação), condições gastrointestinais, pH ruminal, composição dos nutrientes da dieta, variabilidade no tipo de enzima utilizada, espécie, dosagem e método de entrega dos mesmos (MENDOZA et al., 2014).

## 1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do número considerável de pesquisas com a suplementação de enzimas exógenas na dieta de ruminantes e dos resultados positivos apresentados nesta revisão, apontando possíveis melhorias na eficiência da utilização dos componentes nutricionais, sabe-se que ainda são grandes as incógnitas a serem exploradas quanto ao tipo de enzima, dosagens e fatores de interferência, uma vez que, encontramos inúmeros resultados divergentes entre trabalhos e autores. Desta forma, fica evidente a necessidade de outros estudos que possam explorar mais os efeitos das enzimas exógenas sobre as variáveis produtivas em rebanhos leiteiros.

## 1.7 REFERÊNCIAS

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. A hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. Pectins and Pectinases. **Elsevier Science**, p.47-55, 1996.

AMARO, F. X.; KIM, D.; AGARUSSI, M. C. N.; SILVA, V. P.; FERNANDES, T.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; CERVANTES, A. P.; ADESOGAN, A. T.; FERRARETO, L. F.; YU, S.; LI, W.; VYAS, D. Effects of exogenous  $\alpha$ -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, p.1–16, 2021.

AMORIM, C. C. **Liquefação de farelo de trigo para produção de xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger***. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2017.

ANDREAZZI, A. S. R.; PEREIRA, M. N.; REIS, R. B.; PEREIRA, A. N.; MORAIS JUNIOR, N. N.; ACEDO, HERMES, A. S. R. G.; CORTINHAS, C. S. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.7199–7207, 2018.

ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**, v.106, p.162–170, 2017.

ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; STAPLES, C. R.; ADESOGAN, A. T. Effect of fibrolytic enzyme application to low and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.832–841, 2011.

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.4513–4527, 2017.

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

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. K.; KARREN, D. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, p.243-246, 1999b.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. K. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1925–1936, 2001.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, Suppl.2, p.E37–E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; McALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.48, p.21–27, 2008.

BEDFORD, M. R.; CLASSEN, H. L.; CAMPBELL, G. L. The effect of pelleting, salt and pentosanase on viscosity of intestinal contents and performance of broilers fed rye.

**Poultry Science**, v.70, p.1571-1577, 1991.

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

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p.355–383, 2000.

COLONNA, P; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **European J. Clin. Nutrition**, v.46, p17-32, 1992.

CHASE, L. Can we feed less starch to our cows? **Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**, Syracuse, NY, 2007.

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

CHOCT, M. Enzyme for the feed industry: past, present and future. **Worlds Poultry Science**, v.62, p.5-16, 2006.

CHIOFALO, V., LIOTTA, L.; CHIOFALO, B. Effects of the administration of Lactobacilli on body growth and on the metabolic profile in growing Maltese goat kids. **Reproduction Nutrition Development**, v.44, p.449–457, 2004.

COLOMBATTO, D.; HERVAS, G.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high low pH. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2617-2627, 2003a.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, A. F.; BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2628–2638, 2003b.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Using the precision feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes - a new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, p.149-158, 2006.

DEAN, D. B.; STAPLES, C. R.; LITTELL, R. C.; KIM, S.; ADESOGAN, A. T. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolites. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v.13, p.337–357, 2013.

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, p.10925–10933, 2019.

DHIMAN, T. R.; ZAMAN, M. S.; GIMENEZ, R. R.; WALTERS, J. L.; TREACHER, R.

Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v.101, p.115–125, 2002.

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

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v.1, p.2–17, 2009.

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, p.2140–2153, 2005.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1440–1451, 2007.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos, SP: **Embrapa Instrumentação**. 13p. (Embrapa Instrumentação Documentos, ISSN: 1518-7179; 54), 2011.

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

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

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, p.8869–8881, 2015.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; ST-PIERRE, N. R.; NOFTSGER, S. M. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.79 (E. Suppl.), p.E218-E238, 2001.

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

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

GHAZI, S.; ROOKEJ, A.; GALBRAITH, H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease  $\alpha$ -galactosidase treatment in broiler cockerel's broiler chicks. **British Poultry Science**, v.44, p.410-418, 2003.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.153, p.444-455, 2010.

HALL M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2486-2493, 2001.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, p.56, 1982.

HAVRELETOVÁ, M.; PETRULÁKOVÁ, Z.; BURGÁROVÁ, A.; GAGO, F.; HLINKOVÁ, A.; STRUDÍK, E. Cereal  $\beta$ glucans and their significance for the preparation of functional foods – A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v.29, p.1-14, 2011.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.139-168, 1989.

HELD, P. Enzymatic Digestion of Polysaccharides. **BioTek Instruments**. Vermont. 2012.

HOLTSHAUSEN, L.; CHUNG, Y. -H.; GERARDO-CUERVO, H.; OBA, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.899–907, 2011.

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

HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, p.477-487, 2000.

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

HSIAO, H.-Y.; ANDERSON, D.; DALE, N. Levels of  $\beta$ -mannan in soybean meal. **Poultry Science**, v.85, p.1430-1432, 2006.

KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; McDONELL, E. E.; DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG JR, L. An evaluation of exogenous enzymes with amylase activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1050–1059, 2009.

KRABBE, E.; MAZZUCO, H. O uso de enzimas em dietas para poedeiras comerciais. **Avicultura Industrial**, nº06, 2011.

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

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

MARTINEZ-CUMMER, M. A.; BOSTVIRONNOIS, C.; NARANJO, V.; KARL, P. El Uso de  $\beta$ -mananasa para Controlar el Impacto de la Respuesta Inmunitaria Inducida por Alimentos (RIIA) y sus Implicaciones en la Avicultura Comercial. **Congreso Científico de Avicultura**, 2013.

MARZZOCO, A & TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.70-97, 1999.

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. Pages 273–298 in **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, Marlborough, Wiltshire, UK, 2001.

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. **Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)**, Department of Animal Science, University of British Columbia, Lethbridge, Canada, 2003.

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.

MENDES, R.; RIBEIRO, T.; CORREIA, B. A.; BULE, P.; MAÇÃS, B.; FALCÃO, L.; FREIRE, J. P. B.; FERREIRA, L. M. A.; FONTES, C. M. G. A.; LORDELO, M. M. Low doses of exogenous xylanase improve the nutritive value of triticale-based diets for broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.22, p.92–99, 2013.

MENDOZA, G. D.; LOERA-CORRAL, O.; PLATA-PÉREZ, F. X.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, P. A.; RAMÍREZ-MELLA, M. Considerations on the use of exogenous fibrolytic enzymes to improve forage utilization. **The Scientific World Journal**, 2014.

MENEGHETTI, C. Associação de enzimas em rações para frangos de corte. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2013.

MESCHIATTI, M. A. P.; GOUVÊA, V. N.; PELLARIN, L. A.; BATALHA, C. D. A.; BIEHL, M. V.; ACEDO, T. S.; DÓREA, J. R. R.; TAMASSIA, L. F. M.; OWENS, F. N.; SANTOS, F. A. P. Feeding the combination of essential oils and exogenous  $\alpha$ -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.97, p.456–471, 2019.



MOHAMMED, S. F.; MAHMOOD, F. A.; ABAS, E. R. A review on effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed additives in ruminants performance. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, n.6, p.629-635, 2018.

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap.13, p.222–242, 2004.

MORA-JAIMES, G.; BARCENA-GAMA, G.; MENDOZA-MARTINEZ, R.; GONZALEZ MUNOZ, S.; HERRERA-HARO, J. Performance and ruminal fermentation in lambs fed sorghum grain treated with amylases. **Agrociencia**, v.36, p.31–39, 2002.

MORENO, R.; PINOS-RODRIGUES, J. M.; GONZÁLEZ, S.; ÁLVAREZ, G.; GARCÍA, J. C.; MENDONZA, G.; BÁRCENA, R. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal in vitro de dietas para vacas lecheras. **Interciencia**, v.32, p.850–853, 2007.

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

MÓTYÁN, J. A.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. Review. **Biomolecules**, v.3, p.923-942, 2013.

MUIRHEAD, S. Direct fed microbial, enzyme and forage additive Compendium. 3 ed. Minnetonka: Millier Publishing, 391p, 1996.

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

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

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

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

O'DOHERTY, J. V.; FORDE, S. The effect of protease alpha-galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for growing finishing swine. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, v.38, p.217-226, 1999.

PEREIRA, J. L. Produção de enzimas amilolíticas por *aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido. Monografia. **Universidade de Brasília**, Faculdade de Ceilândia, 2014.

PÉREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural features of starch granules. **Chemistry and Technology**, 3rd ed. J. Be Miller and R. Whistler, ed. Academic Press, p.149–188, 2009.

PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, S.; MENDOZA, G.; GARCÍA, J. C.; MIRANDA, L.; DE-LA-CRUZ, G. A.; DE-LERMA, V. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios y en la producción de leche de vacas Holstein. **Interciencia**, v.30, p.752–757, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S.L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Embrapa**, comunicado técnico, Fortaleza, Agosto 2005.

PONTE, P. I. P.; FERREIRA, L. M. A.; SOARES, M. A. C.; AGUIAR, M. A. N.; LEMOS, J. P. C.; MENDES, I.; FONTES, C. M. G. A. Use of cellulases and xylanases to supplement diets containing alfalfa for broiler chicks: effects on bird performance and skin color. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p.412–420, 2004.

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

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **American Society for Microbiology**, v.62, p.597-635, 1998.

ROJO RUBIO, R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; GALVÁN, M. M. C. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* em la digestibilidad “in vitro” del almidón de sorgo e maíz. **Agrociência**, v.35, p.423-427, 2001.

ROJO RUBIO, 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.

ROJO RUBIO, R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; VALDEZ, O. D. M.; REBOLLAR, S. R.; JIMENEZ, D. C.; MARTÍNEZ, J. H.; RAZO, F. J. G. Enzimas amilolíticas exógenas na em la alimentación de ruminantes. **Universidad y Ciencia**, v.02, p.173–182, 2007.

SALEM, A. Z. M.; GADO, H. M.; COLOMBATTO, D.; ELGHANDOUR, M. M. Y. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, v.154, p.69–73, 2013.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.263-289, 2010.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed**



**Science and Technology**, v.135, p.1– 41, 2007.

SEO, J.; PARK, J.; LEE, J.; LEE, J.-H.; LEE, J.-J.; KAM, D. K.; SEO, S. Enhancement of daily gain and feed efficiency of growing heifers by dietary supplementation of  $\beta$ -mannanase in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*). **Livestock Science**, v.188, p.21–24, 2016.

SIBEN, M. Z.; BRUNGERA, A.; PIRES, C. A.; GALERA, D. B.; SANTOS JR, C. O.; BRUM, L. F. W.; LIMA, M.; TRENTINI, M.; RIZZATTI, R.; COLLA, L. M. Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus niger*. **V Simpósio de Alimentos**, Passo Fundo-RS, 2007.

SLOMINSKI, B.; CAMPBELL, L. D. Non-starch Polysaccharides of Canola Meal: Quantification, Digestibility in Poultry and Potential Benefit of Dietary Enzyme Supplementation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.53, p.175-184, 1990.

SUCU, E.; NAYERI, A.; SANZ-FERNANDEZ, M. V.; UPAH, N. C.; BAUMGARDI, L. H. The effects of supplemental protease enzymes on production variables in lactating holstein cows. **Italian Journal of Animal Science**, v.13, p.348-351, 2014.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, p.85-99, 2015.

SURYANARAYANA, M. V. A. N. A Review on Newer Trends in the Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes Use in the Ruminants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.9, 2020.

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

TEWOLDEBRHAN, T. A.; APPUHAMY, J. A. D. R. N.; LEE, J.-J.; NIU, M.; SEO, S.; JEONG, S.; KEBREAB, E. Exogenous mananase improves feed conversion efficiency and reduces somatic cell count in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.244-252, 2017.

TÓTH, T.; TÓTHI, R. Effect of feeding supplemental exogenous amylase on the performance of high yielding dairy cows. **Acta Agriculturae Slovenica**, Supplement v.5, p.80-83, 2016.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A.; HANSON, K. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON D. L. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.8, p.365-374, 2005.

TRICARICO, J. M.; ABNEY, M. D.; GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D.; HANSON, K. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract

containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.145, p.802–811, 2007.

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

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.

VERA, J. M.; SMITH, A. H.; ZOBELL, D. R.; YOUNG, A. J.; EU, J. S. Effects of an exogenous proteolytic enzyme on growth performance of beef steers and in vitro ruminal fermentation in continuous cultures. **The Professional Animal Scientist**, v.28, p.452-463, 2012.

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

WOOD, P. J.; WEISZ, J.; BLACKWELL, B. A. Molecular characterization of cereal b-D-glucans. Structural analysis of oat b-D-glucans and rapid structural evaluation of b-D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. **Cereal Chemistry**, v.68, p.31-39, 1991.

XIA, W.-H.; WANG, L.; NIU, X.-D.; WANG, J.-H.; WANG, T.-M.; LI, Q.-L.; WANG, Z.-Y. Supplementation with beta-1,3-glucan improves productivity, immunity and antioxidative status in transition Holstein cows. **Research in Veterinary Science**, v.134, p.120-126, 2021.

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

ZABEK, K.; MILEWSKI, S.; WOJCIK, R.; SIWICKI, A.K. Effect of  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan in diet on productivity and humoral and cellular defense mechanisms in sheep. **Acta Veterinaria Brno**, v.82, p.141-146, 2013.

ZILIO, E. M. C.; DEL VALLE, T. A.; GHIZZI, L. G.; TAKIYA, C. S.; DIAS, M. S. S.; NUNES, A. T.; SILVA, G. G.; RENNÓ, F. P. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows **Journal of Dairy Science**, v.102, p.4179-4189, 2018.

## 1 CHAPTER II: EFFECTS OF EXOGENOUS ENZYMES SUPPLEMENTATION ON PERFORMANCE OF LACTATING DAIRY COWS\*

\*Written using Journal of Applied Animal Research® Instructions to Authors

### Effects of exogenous enzymes supplementation on performance of lactating dairy cows

Lidiane Marcondes Maciel<sup>1</sup>, Gabriela Mesquita da Rosa<sup>1</sup>, Jean Carlos Steinmacher Lourenço<sup>1</sup>, Josué Teófilo Ramos<sup>1</sup>, Fernando Solano Baptista<sup>2</sup>, Leopoldo Braz Los<sup>2</sup>, Adriana de Souza Martins<sup>3</sup>, Rodrigo de Almeida\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Science, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil 80035-050

<sup>2</sup> Frisia Cooperativa Agroindustrial, Carambeí, Paraná, Brazil 84145-000

<sup>3</sup> Ponta Grossa State University, Ponta Grossa, PR, Brazil 84017-220

\*Corresponding author: ralmeida@ufpr.br

### ABSTRACT

The objective of this trial was to investigate the effects of supplementation of an enzymatic complex on performance of lactating dairy cows. Forty-eight Holsteins were separated in 2 groups for 2 periods, receiving diets with and without the enzyme supplementation during 28 d per period. Cows were housed in individual tie-stalls in the same barn, equipped with food separators. The experimental design was a randomized block design, using parity, milk yield, and DIM data from pre-experimental period as blocking factors. Statistical analyses were performed using the GLM procedure for single measures and MIXED procedure of SAS for repeated measures over time. The results indicate that there was no statistical difference for milk yield between the control and the enzyme supplemented groups ( $P=0.66$ ), as well as milk components as milk fat ( $P=0.45$ ), milk total protein ( $P=0.92$ ), milk lactose ( $P=0.54$ ),

milk casein ( $P=0.55$ ), and milk total solids contents ( $P=0.73$ ) were not affected by treatment. No treatment differences were found for milk urea nitrogen ( $P=0.78$ ) and for somatic cell linear score ( $P=0.56$ ), as well as fecal starch ( $P=0.91$ ). There was no statistical difference for dry matter intake ( $P=0.96$ ), milk efficiency ( $P=0.79$ ), and digestibilities of dry matter and organic matter ( $P=0.22$ ;  $P=0.29$ ). The enzyme complex used in this study did not present the expected results for performance and improvement in the use of food.

**Keywords:** digestibility, dry matter intake, fecal starch, milk efficiency

## INTRODUCTION

The demand of food from animal origin is growing worldwide, mainly in countries which are in development, and because of these strategies that intensify the animal productivity are needed. In order to achieve improvements on productivity is necessary to intensify the critics points of the production system (Sujani and Seresinhe, 2015).

Nowadays, one of the most significant challenges found in dairy cattle production that has the greatest impact on profitability is an increase in feed costs, which is primarily by price fluctuations in corn and soybeans (Conab, 2022). Dairy producers are looking for technologies that will increase production efficiency in their herds, improve animal performance, reduce feeding cost and consequently allow for greater profitability (Sagrilo et al., 2003).

In this context, the use of exogenous enzymes as a ruminant feed additive has piqued the interest of researchers, and it has become a widely debated topic among animal nutritionists (McALLISTER et al., 2003). Various experiments conducted in

recent decades to learn more about the activity of fibrolytic and amylolytic enzymes have provided evidence that enzymes are somewhat resistant to rumen degradation and may potentially increase the rate of carbohydrate degradation (ZILIO et al., 2019). However, responses to supplementation of exogenous enzymes, presents variations and possible interferences from the results found. So, the objective of this work is to evaluate the effects of supplementation of an enzymatic complex in the productive performance, milk composition, seric profile, total tract digestibility of nutrients and fecal starch content of lactating dairy cows.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Cows, experimental design and treatments***

The experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Agricultural Sciences Campus of the UFPR (protocol 055/2021).

Forty-eight Holsteins cows (13 primiparous and 35 multiparous) were blocked according to their parity, milk yield (MY) and days in milk (DIM) in the covariable period and randomly separated into two treatments (24 cows per treatment), receiving or not the enzymatic supplementation. In the covariable period (means  $\pm$  SD), the parity means, body weight (BW), DIM and MY were  $3.08 \pm 1.61$ ,  $686 \pm 58$  kg,  $177 \pm 96$  d, and  $41.4 \pm 6.7$  kg/d, respectively. The experiment lasted 9 weeks, including the first week of data collection for production to block the animals, and 8 weeks in the experimental period, divided into two periods of 4 weeks each, in order to characterize the simple outline reversion (crossover). In this experimental design all experimental cows were exposed to both treatments.

The cows were housed in individual tie-stalls in the same barn, with temperature and humidity controlled by the system “cross ventilation” and they were milked three times daily (07:00, 15:00 and 23:00 h). The water was available ad libitum, the forage feed was offered twice daily (8:30 and 17:30 h) and the concentrate was provided four times daily (08:30, 12:30, 17:30 and 00:00 h), according to the management already adopted in the farm. The tie-stalls were equipped with lateral panels to prevent an animal from eating the food of another.

The only difference between the control and the treatment diets was whether or not the enzymatic complex was present. During a 28-day treatment period, the animals in control (CON) did not receive the enzymatic supplementation in their diet in which was given only finely ground corn grain, as a placebo, in the amount of 30 grams/cow/day. On the other hand, the animals of the treatment group (ENZ) received 2 grams/cow/day of the enzymatic complex Precizyon X50<sup>®</sup>, homogenized with 28 grams/cow/day of finely ground corn grain, divided into two daily meals, supplemented after offering the concentrate.

The enzymatic complex used was provided from Lumis Biotech Unip. LTD. (Mumbai, India). The code IUBMB (Enzymatic Name) is EC 3.2.1.8 and CAS 9025-57-4 (number with a unique registration in database of Chemical Services Resume, a division of Chemical American Society).

According to the manufacturer specification of the product Precizyon X50<sup>®</sup> is compound of  $\alpha$ -amylase (120,000 u/g), xylanase (20,000 UI/g), glucanase (7,500 UI/g), mannanase (250 UI/g), and protease (1,400 u/g). The dose adopted in the present trial followed the manufacturer recommendation, being provided top-dressed on the parcial mix ration (PMR).

The diet composition was followed according to the recommendation of the

responsible nutritionist. The ingredients and nutrients composition of the diet provided during the experimental period is presented in the Table 1. The Table 2 presents the values in DM of the composition of the used concentrated during the trial.

**Table 1:** Diet composition during the experimental period<sup>1</sup>

Item	Diet (DM)
Ingredient, % of DM	
Corn silage	39.50
Ryegrass haylage	11.60
Concentrate	40.40
Wet brewer grain, wet	3.35
Cottonseed, whole	5.15
Chemical Composition, % of DM <sup>2</sup>	
DM	47.37
NDF	34.47
CP	16.99
RDP	10.63
NFC	37.13
Starch	26.23

<sup>1</sup> Nutrient composition was determined from feed ingredients sampled during the last 5 d of 28-d treatment period

<sup>2</sup> DM= dry matter; NDF= neutral detergent fiber; CP= crude protein; RDP= rumen degradable protein; NFC= non-fiber carbohydrate.

**Table 2:** Composition of concentrate fed during the experimental period.

Item	Diet (DM)
Ingredient, % of DM	
Finely ground corn	43.62
Soybean meal	30.07
Soybean hulls	18.00
Limestone	3.88
Sodium bicarbonate	2.22
Vitamin and mineral mix <sup>1</sup>	0.55
Sodium chloride	0.55
Monocalcium phosphate	0.33
Mycotoxins' adsorbent <sup>2</sup>	0.22
Magnesium oxide	0.22
Methionine <sup>3</sup>	0.14
Sulfur	0.11
Premix Difly	0.04
Monensin <sup>4</sup>	0.02
Live yeast <sup>5</sup>	0.01

<sup>1</sup> 15.6 g/kg Ca, 5.1 g/kg P, 5.3 g/kg Mg, 9.1 g/kg K, 3.6 g/kg S, 8.5 g/kg Na, 3.7 g/kg Cl, 183.78 mg/kg Zn, 36.77 mg/kg Cu, 96.17 mg/kg Mn, 1.08 mg/kg Se, 0.88 mg/kg Co, 1.10 mg/kg I, 119.047 UI/kg Vit A, 43.046 UI/kg Vit D3, 716.4 UI/kg Vit E

<sup>2</sup> Mastersorb Gold by Grasp®

<sup>3</sup> Smartamine by Adisseo®

<sup>4</sup> Rumensin 200™ by Elanco Brasil®

<sup>5</sup> Levucell SC by Lallemand Animal Nutrition®

### ***Sample collection and analysis***

The milk production was measured using a milk meter (Tru-Test<sup>®</sup>) and milk samples were collected from nine consecutive milkings on the last three days of each experimental period (days 26, 27, and 28). The milk samples were analyzed for milk fat, total protein, lactose, casein, total solids, milk urea nitrogen (MUN), and somatic cell count (SCC) through the method of infrared spectroscopy (AOAC, 1990; methods 972.160) by the Holstein Cattle Breeders Association of Paraná State (APCBRH).

The individual DM intake was also measured during the last three days of each experimental period. The offered amount of the total diet in kg of natural matter, as well as the amount of leftovers, were individually weighed. The daily parameter DMI was measured by the offered calculation minus the leftovers, multiplying by the daily DM content. Samples of the offered diet and the leftovers were collected to determine the DM content by laboratorial methods (% DM). Following that, the feed efficiency of each animal was calculated by dividing the daily milk production by the daily DMI.

PMR diet samples were collected weekly, just like leftovers, to determine the nutritional composition of the diet. The diet's forage (corn silage and ryegrass haylage) was collected biweekly for bromatological analysis, which evaluates the chemical composition, nutritional and energetic value and physical properties. After collecting the samples, they were all frozen for further chemical-bromatological analysis.

Food and leftovers samples were dried in a forced-air ventilation system at 60°C for 72 hours before being processed in a Willey mill with sieve of 2mm (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA). Following that, forage samples were analyzed for DM (Goering and Van Soest, 1970; AOAC International, 2000, method 930.15), CP (N x



6.25; AOAC International, 2000, method 990.03), ether extract (EE; AOAC International, 2000, method 2003.05), ADF and lignin (AOAC International, 2000, method 973.18), NDF using alpha amylase (Van Soest et al., 1991), ashes (MM; AOAC International, 2000, method 942.05) Ca, P and K. The total diet and leftovers samples were analyzed for CP (AOAC International, 2000, method 990.03), ADF (AOAC International, 2000, method 973.18) and NDF (Van Soest et al., 1991).

To determine the fecal starch content, feces were collected from the rectal ampoule of 13 aleatory cows per group on the last day of each experimental period, totaling 52 analyses. The fecal samples were dried in forced-air ventilation at 55°C for 48 to 72 hours before being processed through a Willey mill sieve of 1mm with a Willey mill (Arthur H Thomas, Philadelphia, PA; Bal et al., 1997). Enzymatic methodology was used to determine the concentration of starch (Demiate et al., 2001).

The fecal samples were collected in the last three days of experiment for further process of rumen incubation. The fecal samples were composed by the joining and homogenization of twelve fecal subsamples, which were collected directly from the rectal ampoule of five animals from each group on the following days: day 1 (08:00, 14:00, 20:00 and 02:00), day 2 (10:00, 16:00, 22:00 and 04:00), and day 3 (12:00, 18:00, 24:00 and 06:00), according to Morris et al. (2018). The fecal samples were also pre-dried in a kiln to determine the partial content of dried matter, and then processed sequentially in a Willey mill, with a sieve 2mm, to determine the total dried matter (TDM) later.

The diet digestibility was measured through the incubation methodology to determine the indigestible NDF (iNDF) referring to the total diet, leftovers, and feces. All the samples were dried in a kiln with forced ventilation and milled through a sieve of 2mm. Approximately 2 grams of sample had been packed in polyester fabric bags

(porosity of 16 microns), duplicated, sealed, and incubated in the rumen (in bovine with ruminal canula), by 12 days (288 hours), according to Pozo et al. (2022). In sequence, the samples were submitted to the NDF determination process (conventional method AOAC Mertens (2002) and method 973.18 (AOAC, 1997) to NDF and ADF, respectively), the results obtained were used to calculate the iNDF value of the sample.

The iNDF was used to estimate the total excretion of feces (TEF) based on iNDF ingestion and concentration in the feces using the following equation:

$$\text{TEF} \left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right) = \frac{\text{iNDF}_{\text{consumed}} \left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right)}{\left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right) \text{iNDF}_{\text{feces}}}$$

The DM and OM apparent digestibilities were determined by the following equation:

$$\text{Apparent digestibility DM (\%)} = \left[ 100 \times \left( \frac{\text{consumed} \left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right) - \text{Feces} \left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right)}{\text{consumed} \left( \frac{\text{kg}}{\text{day}} \right)} \right) \right]$$

Blood samples were drawn on the 27<sup>th</sup> of each period, by venous puncture from the caudal vein into a vacuum tube containing anticoagulant to plasma (VACUETTE from Brazil, Campinas, SP, Brazil). The tubes were centrifuged for 10 minutes at 3.000 x g to separate the serum, which was then stored at -20°C and forwarded for further laboratory analyzes. The Cinetic UV and colorimetric methodology was used to analyzed blood parameters such as glucose, total protein, urea, triacylglycerol, and cholesterol.

The body condition score (BCS) was determined by two trained and registered observers in the covariate period and after each 14 days, totaling two evaluations by experimental period, on a scale of 5 points with increments of 0.25, where 1 = thin and

5 = fat, according described by Wildman et al. (1982). Body weight was also measured using a weighing tape, during the covariate period, at the end of each experimental period, and once a week after the morning milking.

### ***Statistical Analysis***

The experimental design was the simple reversion (*crossover*), using parity data, MY and DIM as blocking factors in the covariant period (3 days or 9 consecutives milking).

The GLM procedure from SAS (v. 9.4) was used to perform statistical analysis on the variables not repeated over time, fecal starch (FS), apparent total digestibility of organic and dry matter (OD; DM), body condition score (BCS), body weight (BW), and blood metabolites. Block, period, and treatment were the fixed effects.

For all other variables analyzed as repeated measures over time, statistical analyzes were performed using the MIXED procedure of SAS (v. 9.4). All data were tested for normal distribution by the Shapiro-Wilk test. Treatment and period were considered as fixed effects and the same variables collected in a week before the trial were included as covariables. Cows nested within treatment was random effect. The covariance structures autoregressive, unstructured, toeplitz and compound symmetry were tested for each variable and defined according with the lowest value obtained for the “Akaike’s Information Criterion Corrected” (AICC). For results interpretation and discussion, a significant, effect was adopted when  $P \leq 0.05$ , whereas  $0.05 < P \leq 0.10$  was considered as a tendency.

## RESULTS

In the Table 3 were found out the results referring to the MY and components. The average MY over the experimental period did not differ between the control and enzyme-supplemented groups (41.68 vs. 42.45 kg/d;  $P=0.29$ ), respectively.

There were no differences in milk fat content (3.48% vs. 3.50%;  $P=0.88$ ) and milk fat yield (1.39 kg/d vs. 1.40 kg/d;  $P=0.93$ ), as well as milk protein content (3.36% vs. 3.34%;  $P=0.86$ ) and milk protein yield (1.36 kg/d vs. 1.36 kg/d;  $P=0.89$ ). The contents and the total amount of milk casein did not differ between the control and enzymatic groups (2.72% vs. 2.71%;  $P=0.85$  and 1.10 kg/d vs. 1.10 kg/d;  $P=0.88$ ), respectively.

The milk lactose content did not differ significantly between the control and enzymatic groups (4.75% vs. 4.75%;  $P=0.98$ ), as well as did not differ the milk lactose amount (1.97 kg/d vs. 1.96 kg/d;  $P=0.97$ ) and percentage and quantity of milk total solids (12.57% vs. 12.57%;  $P=0.99$  and 5.12 kg/d vs. 5.11 kg/d;  $P=0.97$ ), respectively.

Milk urea nitrogen was not affected ( $P=0.84$ ) by treatment, as well as somatic cell linear score ( $P=0.66$ ). There was a difference in BCS variation ( $P=0.04$ ), but no difference in BW ( $P>0.10$ ).

**Table 3** – Adjusted means and standard error of the means of dry matter intake (DMI), milk efficiency, milk production, milk contents (%) and yields (kg/d) of components, linear score of somatic cell count, milk urea nitrogen, fecal starch, dry matter and organic matter apparent digestibility, body condition score and body weight of the control (CON) and Precizyon (ENZ) groups.

Variables	CON	ENZ	SEM	<i>P Value</i>
Intake and production				
DMI, kg/d	24.77	24.75	0.26	0.96
Milk efficiency	1.65	1.64	0.03	0.79
Milk yield, kg/d	41.68	42.45	1.01	0.29
Milk fat, %	3.48	3.50	0.10	0.88
Milk fat, kg/d	1.39	1.40	0.04	0.93

Milk total protein, %	3.36	3.34	0.05	0.86
Milk total protein, kg/d	1.36	1.36	0.04	0.89
Milk casein, %	2.72	2.71	0.04	0.85
Milk casein, kg/d	1.10	1.10	0.03	0.88
Milk lactose, %	4.75	4.75	0.04	0.98
Milk lactose, kg/d	1.97	1.96	0.08	0.97
Milk total solids, %	12.57	12.57	0.15	0.99
Milk total solids, kg/d	5.12	5.11	0.16	0.97
LS_SCC <sup>1</sup>	1.66	1.83	0.28	0.66
MUN <sup>2</sup> (mg/dL)	13.18	13.05	0.47	0.84
Fecal starch, %	5.18	5.30	0.19	0.91
DM apparent digestibility (%)	77.16	79.39	1.21	0.22
OM apparent digestibility (%)	78.10	79.95	1.16	0.29
BCS, $\Delta$ BCS, BW, $\Delta$ BW				
BCS d28 <sup>3</sup>	3.15	3.16	0.02	0.51
$\Delta$ BCS <sup>3</sup>	-0.004	0.12	0.04	0.04
BW d28 (kg) <sup>4</sup>	698	699	0.88	0.61
$\Delta$ BW (kg) <sup>4</sup>	7.41	5.11	2.14	0.45

<sup>1</sup>LS\_SCC = linear score of somatic cells count ( $\log_2(\text{SCC}/100) + 3$ ) (SHOOK & SHUTZ, 1994);

<sup>2</sup>MUN = milk urea nitrogen;

<sup>3</sup>BCS = body condition score;  $\Delta$ BCS = change in BCS;

<sup>4</sup>BW = body weight;  $\Delta$ BW = change in BW;

We did not find any significant differences between the control and supplemented groups for fecal starch (5.18% vs. 5.30%;  $P=0.91$ ), just like the consumption of DM (24.77kg/d vs. 24.75kg/d;  $P=0.96$ ), milk efficiency (1.65 vs. 1.64;  $P=0.79$ ), digestibility of DM (77.16% vs. 79.39%;  $P=0.22$ ), and digestibility of OM (78.10% vs. 79.95%;  $P=0.29$ ). Concerning blood parameters, also did not have statistics differences for the analyzed variables (Table 4).

**Table 4** – Adjusted means and standard error of the means of seric metabolites.

Variables	CON	ENZ	SEM	<i>P Value</i>
Glucose (%)	64.15	62.76	0.93	0.29
Urea (%)	34.94	34.56	0.61	0.66
Total Protein (%)	7.12	7.13	0.14	0.79
Cholesterol (%)	228.38	226.30	3.53	0.67
Triglycerides (%)	9.67	10.22	0.60	0.51

## DISCUSSION

According to the hypothesis of our work, the combinations of different enzymes through the enzymatic complex would result in a better use of the nutrients and consequentially in the improvement of the productive performance in lactating cows. Although opposing our initial hypothesis, the study found no a positive synergistic effect for the production and milk compounds, as well as fecal starch, digestibility of DM and OM, and DMI.

In a meta-analysis conducted by Arriola et al. (2017) to evaluate the effects of supplementation in different compounds of fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows, an increase in the numerical number can be seen, but it is not significant in response to milk yield. Nonetheless, the authors state that various factors such as product preparation, dose, and enzymatic activity can all interfere with the animal's response to supplementation. Others researcher, such Beauchemin and Holtshausen (2010) cite the lactation stage and the energetic status as influencers to the positive response of the additives, in addition to the composition of the basal diet (Gandra et al., 2017; Tirado-González et al., 2018), part of the diet in which the enzymes is added, being concentrated, TMR or silage (Bowman et al., 2002) or even the same factors as stability of the enzymes in the rumen (McAllister et al., 2001).

Arriola et al. (2011) evaluated the effects of the exogenous fibrolytic enzymes, including endoglucanase and xylanase in dairy cows, and found no effects in the MY, like Romero et al. (2016) and Zilio et al. (2018) who also found no differences in the MY by evaluating the supplementation of exogenous fibrolytic and amyolytic enzymes. It is worth mentioning that each study was conducted in different scenarios and dosage.

The presented study, found no differences in DM consumption between treatments, correlating with other studies that tested exogenous enzymes in the feeding of dairy cows (Tricarico et al., 2005; Weiss et al., 2011; Vargas-Rodrigues et al., 2014; Takiya et al., 2017). It is worth noting, however, that the influence on DMI is related to the provided diet, the starch concentration, the lineage and dosage of the used enzymes, the mode of supply, as well as the cows lactation stage and daily production.

Although Yang et al. (2000) found no effect of the fibrolytic enzyme in nutrient ingestion, they did discover an increase in digestibility of DM, OM and CP in the animal's group that received the enzymes. The increase in nutrient digestibility is related to how enzymes act. Furthermore, the synergy between endogenous and exogenous enzymes increases the enzymatic activity and ruminal hydrolysis (Morgavi et al., 2000), improving diet digestibility. However, none of these effects were observed in the current study.

In consent of the actual study, amylolytic enzymes had no effect on DMI, DM digestibility and MY (Ferraretto et al., 2011; Nozière et al., 2014). Gencoglu et al. (2010) founded an increase in the digestibility of DM, CP and NFD when cows were fed a low-starch diet and supplemented with a liquid amylase formulation with an amylase activity of 240 kilo novo units (KNU)/g.

Given that enzymes improve starch digestibility, it was expected to find significant differences in fecal starch content, with the lower in the group treated with the enzymatic supplement, but the results found were really close across treatments. According to Firkins et al. (2001), the amount of starch found in feces has a high correlation with nutrient digestion efficiency and can thus be used as an indicator of starch digestibility in the total tract. Still, a higher concentration of starch in the feces

can indicate a reduction in the availability of digestible starch in the rumen, which reduces microbial growth and, as a result, the supply of metabolizable protein and energy to the animal. A study realized in dairy cows by Ferguson et al. (2003), demonstrated that the fecal starch content must be less than 5% preferably less than 3%, and that failure to do so can result in a reduction in MY.

There were no significant differences discovered for any of the variables in relation to the milk components. Previous studies comparing different fibrolytic enzyme dosages (0, 8, 16 or 24 g/d per cow) of and amylolytic enzyme dosages of 0, 150, 300 and 450 FAU (fungal amylase unit)/kg DM found no effect on milk composition (Silvia et al., 2016; Takiya et al., 2017).

Zilio et al. (2018) discovered similar results for the milk components, with the exception of protein concentration in milk, which presented a tendency of increasing with enzymatic supplementation at 12g/day. In supplementation with  $\beta$ -mannanase, the enzyme had no effect the concentration of fat and milk protein (Roque et al., 2019), similar to others experiments in lactating cows fed with fibrolytics enzymes, which had small but not significant effects on milk fat (Romero et al., 2016) and milk protein percentage (Zheng et al., 2000). The amylase supplementation had no effect on fat, protein and lactose percentages (Gencoglu et al., 2010; Ferrareto et al., 2011; Weiss et al., 2011; Nozière et al., 2014), although Gencoglu et al. (2010) detecting a trend in increasing milk protein concentration. Silvestre et al. (2022), observed an increase in the percentage of fat and solids in milk, as well as concentrations of MUN, when evaluating the effect of exogenous enzymes in diets with reduced starch, whereas diets with lower levels of starch resulted in a decrease in the concentration (kg/d) of lactose and solids in milk.

Propionate is the primary precursor of gluconeogenesis in ruminants, and the



mammary gland is one of the mandatory glucose requirement tissues for lactose synthesis (Aschenbach et al., 2010). Therefore, the similarities in milk lactose production among treatments can be explained by this sequence of similar results in production, components, digestibility, and fecal starch.

Blood glucose is extensively produced through the liver via gluconeogenesis, and its concentration is also an indicator of how the animal's energetic metabolism is during lactation (Drackley and Cardoso, 2014). The blood parameters most commonly determined in the metabolic profile represent the main metabolic ways of the organism, according to Dirksen and Breitner (1993), that glucose, cholesterol, and triglycerides represent energetic metabolism and urea, and total proteins represent protein metabolism. There was no difference between glucose and urea in this study, as in other studies such as Holtshausen et al. (2011) or in high concentrated diet (48%) from Arriola et al. (2011).

## **CONCLUSIONS**

This study no found evidence that combining xylanases, carbohydrases and proteases, provide at a dosage of 2g/cow/day can improve lactating cow performance. The ruminant's nutritionist also did find challenges in recommending enzymatic supplements since the results found in literature are inconsistent. Even though it is well known that positive results are intrinsically related to different traits of the diet, from the origin and dosage of enzymes and that the most positive effects already founded with enzymatic supplements have been related in specific conditions, as low levels of starch and forage sources with low degradability diets.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their appreciation for the technical and financial support provided by Quimtia SA and Frísia Cooperativa Agroindustrial and acknowledge the producer Jacob Zijlstra for the assistance during this trial.

## REFERENCES

- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC International.
- Arriola, KG, Kim, SC, Staples, CR, Adesogan, AT. 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:832-841.
- Arriola, KG, Oliveira, AS, Ma, XZ, Lean, IJ, Giurcanu, MC, Adesogan, AT. 2017. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:4513–4527.
- Aschenbach, JR, Kristensen, NB, Donkin, SS, Hammon, HM, Penner, GB. 2010. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life.* 62:869–877.
- Bal, MA, Coors, JG, Shaver, RD. 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2497-2503.
- Beauchemin, KA, Holtshausen, L. 2010. Developments in enzyme usage in ruminants. *Enzymes in Farm Animal Nutrition.* 2nd ed. CAB Int., Wallingford, UK. 206–230.
- Bowman, GR, Beauchemin, KA, Shelford, JA. 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:3420–3429.
- Conab. Boletim de Safra de Grãos 2022. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos> > Acesso: 23/05/2022.
- Demiato, IM, Konkel, FE, Pedroso, R.A. 2001. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – composição química. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 21:108-114.

Dirksen, G, Breitner, W. 1993. New quick-test for semi quantitative determinations of beta-hydroxybutyric acid in bovine milk. *J. Vet. Med. Anim. Phys. Path. Clinical Med.* 40:779-784.

Drackley, JK, Cardoso, FC. 2014. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. *Animal.* 8:5–14.

Ferguson, JD. 2003. Monitoring feeding programs on dairy farms. *Proceedings of Nutrition and Management of Dairy Cattle. Conzorcio Ricerca Fileria Lattiero Casearia Regione Siciliana.* 3-7.

Ferraretto, LF, Shaver, RD, Espineira, M, Gencoglu, H, Bertics, SJ. 2011. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1490-1499.

Firkins, JL, Eastridge, ML, St-Pierre, NR, Noftsgger, SM. 2001. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. *J. Animal Sci.* 79:218-E238.

Gandra, JR, Miranda, GA, Goes, RHTB, Takiya, CS, Del Valle, TA, Oliveira, ER, Freitas Junior, JE, Gandra, ERS, Araki, HMC, Santos, ALAV. 2017. Fibrolytic enzyme supplementation through ruminal bolus on eating behavior, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Jersey heifers fed either corn silage- or sugarcane silage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 231:29–37.

Gencoglu, H, Shaver, RD, Steinberg, W, Ensink, J, Ferraretto, LF, Bertics, SJ, Akins, MS. 2010. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:723-732.

Goering, HK, Van Soest, PJ. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications). *Agriculture Handbook.* United States Department of Agriculture, Washington DC.

Holtshausen, L, Chung, YH, Gerardo-Cuervo, H, Oba, M, Beauchemin, KA. 2011. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. *J. Dairy Sci.* 94:899–907.

McAllister, TA, Hristov, AN, Beauchemin, KA, Rode, LM, Cheng, KJ. 2001. Enzymes in ruminant diets. Pages 273–298 in *Enzymes in Farm Animal Nutrition.* M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, Marlborough, Wiltshire, UK.

Morgavi, DP, Beauchemin, KA, Nsereko, VL, Rode, LM, Iwaasa, AD, Yang, WZ, Mcallister, TA, Wang, Y. 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 83:1310-1321.

Morris, DL, Rebelo, LR, Dieter, PA, Lee, C. 2018. Validating intrinsic markers and optimizing spot sampling frequency to estimate fecal outputs. *J. Dairy Sci.* 101:1-10.

Nozière, P, Steinberg, W, Silberberg, M, Morgavi, DP. 2014. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. *J. Dairy Sci.* 97:2319-2328.

Pozo, CA, Mezzomo, MP, Frasson, J, Leonardi, LE, Christmann, CM, Rösler, DC, Kozloski, GV. 2022. Relationship between intake and faecal excretion of indigestible fractions in trials with sheep: impact of the method of analysis, diet and trial. *The Journal of Agricultural Science.* 160:3-4.

Romero, JJ, Macias, EG, Ma, ZX, Martins, RM, Staples, CR, Beauchemin, KA, Adesogan, AT. 2016. Improving the performance of dairy cattle with a xylanase-rich exogenous enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* 99:3486-3496.

Roque, BM, Reyes, GC, Tewoldebrhan, TA, Apphuamy, JADRN, Lee, JJ, Seo, S, Kebreab, E. 2019. Exogenous  $\beta$ -mannanase supplementation improved immunological and metabolic responses in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:4198-4204.

Sagrilo, E, Vidigal Filho, PS, Pequeno, MG, Scapim, CA, Vidigal, GMC, Diniz, SPSD, Modesto, EC, Kvitschal, MV. 2003. Effect of harvest period on the quality of storage roots and protein content of the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta*, Crantz). *Braz. Archives Biol. Technol.* 46:2:295-305.

Silva, TH, Takiya, CS, Vendramini, THA, Ferreira de Jesus, E, Zanferari, F, Rennó, FP. 2016. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 221:35-43.

Silvestre, T, Fetter, M, Raisänen, SE, Lage, CFA, Stefenoni, H, Melgar, A, Cueva, SF, Wasson, DE, Martins, LF, Karnezos, TP, Hristov, AN. 2022. Performance of dairy cows fed normal-or-reduced-starch diets supplemented with an exogenous enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* 105:2288-2300.

Sujani, S, Seresinhe, RT. 2015. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. *Asian J. Animal Sci.* 9:85-99.

Takiya, CS, Calomeni, GD, Silva, TH, Vendramini, THA, Silva, GG, Consentini, CEC, Bertoni, JC, Zilio, EMC, Rennó, FP. 2017. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity in nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 228:159-167.

Taylor, CC, Allen, MS. 2005. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. *Journal of Dairy Science.* 88:4:413–1424.

Tirado-Gonzalez, DN, Miranda-Romero, LA, Ruiz-Flores, A, Medina Cuellar, SE, Ramirez-Valverde, R, Tirado-Estrada, G. 2018. Meta-analysis: Effects of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. *J. Applied Animal Res.* 46:771–783.

Tricarico, JM, Johnston, JD, Dawson, KA, Hanson, KC, Mcleod, KR, Harmon, DL. 2005. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on

ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 8:365-374.

Van Soest, PJ, Robertson, JB, Lewis, BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.

Vargas-Rodriguez, CF, Engstrom, M, Azem, E, Bradford, BJ. 2014. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. *J. Dairy Sci.* 97:4464–4470.

Weiss, WP, Steinberg, W, Engstrom, MA. 2011. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. *J. Dairy Sci.* 94:2492-2499.

Wildman, EE, Jones, GM, Wagner, PE, Boman, RL, Troutt Jr, HF, Lesch, TN. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.

Yang, WZ, Beauchemin, KA, Rode, LM. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512–2520.

Zheng, W, Schingoethe, DJ, Stegeman, GA, Hippen, AR, Treacher, RJ. 2000. Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulase and xylanase enzyme mixture to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2319-2325.

Zilio, EMC, Del Valle, TA, Ghizzi, LG, Takiya, CS, Dias, MSS, Nunes, AT, Silva, GG, Rennó, FP. 2018. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:4179-4189.

## REFERÊNCIAS

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. A hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *Pectins and Pectinases*. **Elsevier Science**, p.47-55, 1996.

AMARO, F. X.; KIM, D.; AGARUSSI, M. C. N.; SILVA, V. P.; FERNANDES, T.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; CERVANTES, A. P.; ADESOGAN, A. T.; FERRARETO, L. F.; YU, S.; LI, W.; VYAS, D. Effects of exogenous  $\alpha$ -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, p.1–16, 2021.

AMORIM, C. C. **Liquefação de farelo de trigo para produção de xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger***. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2017.

ANDREAZZI, A. S. R.; PEREIRA, M. N.; REIS, R. B.; PEREIRA, A. N.; MORAIS JUNIOR, N. N.; ACEDO, HERMES, A. S. R. G.; CORTINHAS, C. S. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.7199–7207, 2018.

ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**, v.106, p.162–170, 2017.

AOAC International. *Official Methods of Analysis*. 17th ed., 2000.

ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; STAPLES, C. R.; ADESOGAN, A. T. Effect of fibrolytic enzyme application to low and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.832–841, 2011.

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.4513–4527, 2017.

ASCHENBACH, J. R.; KRISTENSEN, N. B.; DONKIN, S. S.; HAMMON, H.M.; PENNER, G. B. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. **IUBMB Life**, v.62, p.869–877, 2010.

BAL, M. A.; COORS, J. G.; SHAVER, R.D. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2497-2503, 1997.

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

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. K.; KARREN, D. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, p.243-246, 1999b.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. K. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1925–1936, 2001.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, Suppl.2, p.E37–E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; McALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.48, p.21–27, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A.; HOLTSHAUSEN, L. Developments in enzyme usage in ruminants. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2nd ed. **CAB Int., Wallingford, UK**. p.206–230, 2010.

BEDFORD, M. R.; CLASSEN, H. L.; CAMPBELL, G. L. The effect of pelleting, salt and pentosanase on viscosity of intestinal contents and performance of broilers fed rye. **Poultry Science**, v.70, p.1571-1577, 1991.

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

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p.355–383, 2000.

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

COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **European J. Clin. Nutrition**, v.46, p17-32, 1992.

CHASE, L. Can we feed less starch to our cows? **Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**, Syracuse, NY, 2007.

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

CHOCT, M. Enzyme for the feed industry: past, present and future. **Worlds Poultry Science**, v.62, p.5-16, 2006.

CHIOFALO, V., LIOTTA, L.; CHIOFALO, B. Effects of the administration of Lactobacilli on body growth and on the metabolic profile in growing Maltese goat kids. **Reproduction Nutrition Development**, v.44, p.449–457, 2004.

COLOMBATTO, D.; HERVAS, G.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of



enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high low pH. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2617-2627, 2003a.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, A. F.; BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2628–2638, 2003b.

CONAB. Boletim de Safra de Grãos 2022. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> > Acesso: 23/05/2022.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Using the precision feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes - a new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, p.149-158, 2006.

DEAN, D. B.; STAPLES, C. R.; LITTELL, R. C.; KIM, S.; ADESOGAN, A. T. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolites. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v.13, p.337–357, 2013.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – composição química. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.21, p.108-114, 2001.

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, p.10925-10933, 2019.

DHIMAN, T. R.; ZAMAN, M. S.; GIMENEZ, R. R.; WALTERS, J. L.; TREACHER, R. Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v.101, p.115–125, 2002.

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

DIRKSEN, G.; BREITNER, W. New quick-test for semi quantitative determinations of beta-hydroxybutyric acid in bovine milk. J. Vet. Med. **Animal Physiology Pathology Clinical Med**. v.40, p.779-784, 1993.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v.1, p.2–17, 2009.

DRACKLEY, J.K.; CARDOSO, F.C. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. **Animal**. v.8, p.5-14, 2014.



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, p.2140–2153, 2005.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1440–1451, 2007.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos, SP: **Embrapa Instrumentação**. 13p. (Embrapa Instrumentação Documentos, ISSN: 1518-7179; 54), 2011.

FERGUSON, J. D. Monitoring feeding programs on dairy farms. **Proceedings of Nutrition and Management of Dairy Cattle**. Conzorcio Ricerca Fileria Lattiero Casearia Regione Siciliana. 3-7, 2003.

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

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

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, p.8869–8881, 2015.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; ST-PIERRE, N. R.; NOFTSGER, S. M. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.79 (E. Suppl.), p.E218-E238, 2001.

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

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

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

GHAZI, S.; ROOKEJ, A.; GALBRAITH, H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease  $\alpha$ -galactosidase treatment in broiler cockerel's broiler chicks. **British Poultry Science**, v.44, p.410-418, 2003.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.153, p.444-455, 2010.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage Fiber Analysis (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications). **Agriculture Handbook**. United States Department of Agriculture, Washington DC, 1970.

HALL M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2486-2493, 2001.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, p.56, 1982.

HAVRLETOVÁ, M.; PETRULÁKOVÁ, Z.; BURGÁROVÁ, A.; GAGO, F.; HLINKOVÁ, A.; STRUDÍK, E. Cereal  $\beta$ glucans and their significance for the preparation of functional foods – A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v.29, p.1-14, 2011.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.139-168, 1989.

HELD, P. Enzymatic Digestion of Polysaccharides. **BioTek Instruments**. Vermont. 2012.

HOLTSHAUSEN, L.; CHUNG, Y. -H.; GERARDO-CUERVO, H.; OBA, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.899–907, 2011.

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

HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, p.477-487, 2000.

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

HSIAO, H.-Y.; ANDERSON, D.; DALE, N. Levels of  $\beta$ -mannan in soybean meal. **Poultry Science**, v.85, p.1430-1432, 2006.

KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; McDONELL, E. E.; DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG JR, L. An evaluation of exogenous enzymes with amylase activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1050–1059, 2009.

KRABBE, E.; MAZZUCO, H. O uso de enzimas em dietas para poedeiras comerciais. **Avicultura Industrial**, nº06, 2011.

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

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

MARTINEZ-CUMMER, M. A.; BOSTVIRONNOIS, C.; NARANJO, V.; KARL, P. El Uso de  $\beta$ -mananasa para Controlar el Impacto de la Respuesta Inmunitaria Inducida por Alimentos (RIIA) y sus Implicaciones en la Avicultura Comercial. **Congreso Científico de Avicultura**, 2013.

MARZZOCO, A & TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.70-97, 1999.

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. Pages 273–298 in **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, Marlborough, Wiltshire, UK, 2001.

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. **Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)**, Department of Animal Science, University of British Columbia, Lethbridge, Canada, 2003.

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.

MENDES, R.; RIBEIRO, T.; CORREIA, B. A.; BULE, P.; MAÇÃS, B.; FALCÃO, L.; FREIRE, J. P. B.; FERREIRA, L. M. A.; FONTES, C. M. G. A.; LORDELO, M. M. Low doses of exogenous xylanase improve the nutritive value of triticale-based diets for broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.22, p.92–99, 2013.

MENDOZA, G. D.; LOERA-CORRAL, O.; PLATA-PÉREZ, F. X.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, P. A.; RAMÍREZ-MELLA, M. Considerations on the use of exogenous fibrolytic enzymes to improve forage utilization. **The Scientific World Journal**, 2014.

MENEGHETTI, C. Associação de enzimas em rações para frangos de corte. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2013.

MESCHIATTI, M. A. P.; GOUVÊA, V. N.; PELLARIN, L. A.; BATALHA, C. D. A.; BIEHL,

M. V.; ACEDO, T. S.; DÓREA, J. R. R.; TAMASSIA, L. F. M.; OWENS, F. N.; SANTOS, F. A. P. Feeding the combination of essential oils and exogenous  $\alpha$ -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.97, p.456–471, 2019.

MOHAMMED, S. F.; MAHMOOD, F. A.; ABAS, E. R. A review on effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed additives in ruminants performance. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, n.6, p.629-635, 2018.

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap.13, p.222–242, 2004.

MORA-JAIMES, G.; BARCENA-GAMA, G.; MENDOZA-MARTINEZ, R.; GONZALEZ MUNOZ, S.; HERRERA-HARO, J. Performance and ruminal fermentation in lambs fed sorghum grain treated with amylases. **Agrociencia**, v.36, p.31–39, 2002.

MORENO, R.; PINOS-RODRIGUES, J. M.; GONZÁLEZ, S.; ÁLVAREZ, G.; GARCÍA, J. C.; MENDONZA, G.; BÁRCENA, R. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal in vitro de dietas para vacas lecheras. **Interciencia**, v.32, p.850–853, 2007.

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

MORRIS, D. L.; REBELO, L. R.; DIETER, P. A.; LEE, C. Validating intrinsic markers and optimizing spot sampling frequency to estimate fecal outputs. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.1-10, 2018.

MÓTYÁN, J. A.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. Review. **Biomolecules**, v.3, p.923-942, 2013.

MUIRHEAD, S. Direct fed microbial, enzyme and forage additive Compendium. 3 ed. Minnetonka: Millier Publishing, 391p, 1996.

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

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

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

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

O'DOHERTY, J. V.; FORDE, S. The effect of protease alpha-galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for growing finishing swine. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, v.38, p.217-226, 1999.

PEREIRA, J. L. Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido. Monografia. **Universidade de Brasília**, Faculdade de Ceilândia, 2014.

PÉREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural features of starch granules. **Chemistry and Technology**, 3rd ed. J. Be Miller and R. Whistler, ed. Academic Press, p.149–188, 2009.

PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, S.; MENDOZA, G.; GARCÍA, J. C.; MIRANDA, L.; DE-LA-CRUZ, G. A.; DE-LERMA, V. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios y en la producción de leche de vacas Holstein. **Interciencia**, v.30, p.752–757, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S.L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Embrapa**, comunicado técnico, Fortaleza, Agosto 2005.

PONTE, P. I. P.; FERREIRA, L. M. A.; SOARES, M. A. C.; AGUIAR, M. A. N.; LEMOS, J. P. C.; MENDES, I.; FONTES, C. M. G. A. Use of cellulases and xylanases to supplement diets containing alfalfa for broiler chicks: effects on bird performance and skin color. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p.412–420, 2004.

POZO, C. A.; MEZZOMO, M. P.; FRASSON, J.; LEONARDI, L. E.; CHRISTMANN, C. M.; RÖSLER, D. C.; KOZLOSKI, G. V. Relationship between intake and faecal excretion of indigestible fractions in trials with sheep: impact of the method of analysis, diet and trial. **The Journal of Agricultural Science**. v.160, p.3-4, 2022.

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

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **American Society for Microbiology**, v.62, p.597-635, 1998.

ROJO RUBIO, R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; GALVÁN, M. M. C. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* em la digestibilidad “in vitro” del almidón de sorgo e maíz. **Agrociência**, v.35, p.423-427, 2001.

ROJO RUBIO, 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.

ROJO RUBIO, R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; VALDEZ, O. D. M.; REBOLLAR, S. R.; JIMENEZ, D. C.; MARTÍNEZ, J. H.; RAZO, F. J. G. Enzimas amilolíticas exógenas na em la alimentación de ruminantes. **Universidad y Ciencia**, v.02, p.173–182, 2007.

ROMERO, J. J.; MACIAS, E. G.; MA, Z. X.; MARTINS, R. M.; STAPLES, C. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; ADESOGAN, A. T. Improving the performance of dairy cattle with a xylanase-rich exogenous enzyme preparation. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.3486-3496, 2016.

ROQUE, B. M.; REYES, G. C.; TEWOLDEBRHAN, T. A.; APPHUAMY, J.; LEE, J. J.; SEO, S.; KEBREAB, E. Exogenous  $\beta$ -mannanase supplementation improved immunological and metabolic responses in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.4198-4204, 2019.

SAGRILO, E.; VIDIGAL FILHO, P. S.; PEQUENO, M. G.; SCAPIM, C. A.; VIDIGAL, G. M. C.; DINIZ, S. P. S. D.; MODESTO, E. C.; KVITSCHAL, M. V. Effect of harvest period on the quality of storage roots and protein content of the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta*, Crantz). **Braz. Archives Biol. Technol.** v.46, p.2:295-305, 2003.

SALEM, A. Z. M.; GADO, H. M.; COLOMBATTO, D.; ELGHANDOUR, M. M. Y. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, v.154, p.69–73, 2013.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.263-289, 2010.

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

SEO, J.; PARK, J.; LEE, J.; LEE, J.-H.; LEE, J.-J.; KAM, D. K.; SEO, S. Enhancement of daily gain and feed efficiency of growing heifers by dietary supplementation of  $\beta$ -mannanase in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*). **Livestock Science**, v.188, p.21–24, 2016.

SIBEN, M. Z.; BRUNGERA, A.; PIRES, C. A.; GALERA, D. B.; SANTOS JR, C. O.; BRUM, L. F. W.; LIMA, M.; TRENTINI, M.; RIZZATTI, R.; COLLA, L. M. Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus niger*. **V Simpósio de Alimentos**, Passo Fundo-RS, 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 Technology**. v.221, p.35-43, 2016.

SILVESTRE, T.; FETTER, M.; RAISÄNEN, S. E.; LAGE, C. F. A.; STEFENONI, H.; MELGAR, A.; CUEVA, S. F.; WASSON, D. E.; MARTINS, L. F.; KARNEZOS, T. P.; HRISTOV, A. N. Performance of dairy cows fed normal-or-reduced-starch diets supplemented with an exogenous enzyme preparation. **Journal of Dairy Science**, v.105, p.2288-2300, 2022.



SLOMINSKI, B.; CAMPBELL, L. D. Non-starch Polysaccharides of Canola Meal: Quantification, Digestibility in Poultry and Potential Benefit of Dietary Enzyme Supplementation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.53, p.175-184, 1990.

SUCU, E.; NAYERI, A.; SANZ-FERNANDEZ, M. V.; UPAH, N. C.; BAUMGARDI, L. H. The effects of supplemental protease enzymes on production variables in lactating holstein cows. **Italian Journal of Animal Science**, v.13, p.348-351, 2014.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, p.85-99, 2015.

SURYANARAYANA, M. V. A. N. A Review on Newer Trends in the Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes Use in the Ruminants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.9, 2020.

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

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

TEWOLDEBRHAN, T. A.; APPUHAMY, J. A. D. R. N.; LEE, J.-J.; NIU, M.; SEO, S.; JEONG, S.; KEBREAB, E. Exogenous mananase improves feed conversion efficiency and reduces somatic cell count in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.244-252, 2017.

TIRADO-GONZALEZ, D. N.; MIRANDA-ROMERO, L. A.; RUIZ-FLORES, A.; MEDINA CUELLAR, S. E.; RAMIREZ-VALVERDE, R.; TIRADO-ESTRADA, G. Meta-analysis: Effects of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. **Journal of Applied Animal Science Research**, v.46, p.771–783, 2018.

TÓTH, T.; TÓTHI, R. Effect of feeding supplemental exogenous amylase on the performance of high yielding dairy cows. **Acta Agriculturae Slovenica**, Supplement v.5, p.80-83, 2016.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A.; HANSON, K. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON D. L. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.8, p.365-374, 2005.

TRICARICO, J. M.; ABNEY, M. D.; GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D.; HANSON, K. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.145, p.802–811, 2007.

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

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

VERA, J. M.; SMITH, A. H.; ZOBELL, D. R.; YOUNG, A. J.; EU, J. S. Effects of an exogenous proteolytic enzyme on growth performance of beef steers and in vitro ruminal fermentation in continuous cultures. **The Professional Animal Scientist**, v.28, p.452-463, 2012.

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

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT JR, H. F.; LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.495-501, 1982.

WOOD, P. J.; WEISZ, J.; BLACKWELL, B. A. Molecular characterization of cereal b-D-glucans. Structural analysis of oat b-D-glucans and rapid structural evaluation of b-D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. **Cereal Chemistry**, v.68, p.31-39, 1991.

XIA, W.-H.; WANG, L.; NIU, X.-D.; WANG, J.-H.; WANG, T.-M.; LI, Q.-L.; WANG, Z.-Y. Supplementation with beta-1,3-glucan improves productivity, immunity and antioxidative status in transition Holstein cows. **Research in Veterinary Science**, v.134, p.120-126, 2021.

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

ZABEK, K.; MILEWSKI, S.; WOJCIK, R.; SIWICKI, A.K. Effect of  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan in diet on productivity and humoral and cellular defense mechanisms in sheep. **Acta Veterinaria Brno**, v.82, p.141-146, 2013.

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

ZILIO, E. M. C.; DEL VALLE, T. A.; GHIZZI, L. G.; TAKIYA, C. S.; DIAS, M. S. S.;



NUNES, A. T.; SILVA, G. G.; RENNÓ, F. P. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows **Journal of Dairy Science**, v.102, p.4179-4189, 2018.

