

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DESEMPENHO DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS
CONTENDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS EXÓGENAS**

Leonardo Guimarães de Oliveira
Orientador: João Teodoro Padua

GOIÂNIA
2012

LEONARDO GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**DESEMPENHO DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS
CONTENDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS EXÓGENAS**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:
Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. João Teodoro Padua – EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

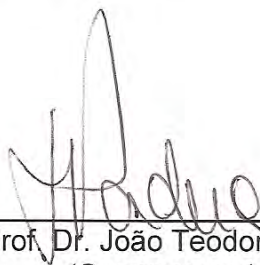
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira - ICB/UFG

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - ICB/UFG

GOIÂNIA
2012

LEONARDO GUIMARÃES DE OLIVEIRA

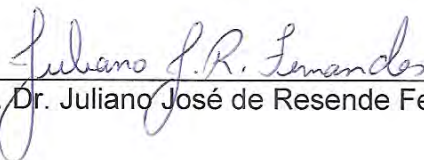
Dissertação defendida e aprovada em **27/02/2012**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. João Teodoro Pádua
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Pedro Veiga Rodrigues Paulino - UFV/MG



Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes

Dedico este trabalho em primeiro lugar a DEUS, por estar presente em toda minha caminhada, dedico também aos meus pais Orci e Ângela e aos meus irmãos Cristiane e Wellington por toda força e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, que juntamente aos meus, me ajudou a superar todos os obstáculos que a vida apresenta.

Aos meus pais Orci de Oliveira e Ângela das Dores Guimarães de Oliveira e aos meus irmãos Wellington Guimarães de Oliveira e Cristiane Guimarães de Oliveira pelo apoio e sábios conselhos, nunca me deixando desistir dos meus sonhos.

Ao professor Dr. João Teodoro Padua, pela orientação e apoio neste trabalho.

Ao professor Dr. Reginaldo Nassar Ferreira, pela amizade e por todos os passos da minha caminhada científica, pela oportunidade da primeira pesquisa no meu primeiro ano da graduação, e desde então sempre auxiliando nesta caminhada.

Ao professor Cirano José Ulhôa, pelos sábios conselhos e ajuda no desenvolver da pesquisa.

À Dra. Cristine dos Santos Settimi Cysneiros, por toda ajuda no decorrer deste trabalho.

Aos amigos, Reginaldo Jacovetti e Sérgio Ferreira, pela amizade e pela ajuda nas horas boas e principalmente nas horas de dificuldade.

Aos amigos da pós graduação, Marcondes Dias, Paula Lobo, Kíria Karolline, Tiago Pereira, Hugo Jaime, Tayrone Prado, Gustavo Feliciano, Marcela Luzia, Barbara Lemos, Eduardo Mazon, Evando Alves, Flavia Martins, Elis Bento, Ubirajara Bilego e José Tiago por toda ajuda e todos os bons momentos de convivência.

À empresa Nutripura Nutrição Animal e seu Diretor Técnico Luciano Santos Resende pela grande contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação e todos os professores da Escola de Veterinária e Zootecnia, que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da secretaria de Pós Graduação e do Departamento de Produção Animal, pelo suporte nas nossas necessidades acadêmicas.

A todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada.

"Um dia, quando olhares para trás, verás
que os dias mais belos foram aqueles
em que lutaste."

Sigmund Freud

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Amido..	3
2.2 Amilases.....	6
2.3 Utilização de enzimas na nutrição de ruminantes	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Produção da solução de enzimas amilolíticas.....	12
3.1.1 Linhagem utilizada e manutenção do fungo	12
3.1.2 Determinação da atividade da amilase	12
3.2 Ensaio de desempenho animal	13
3.3 Degradabilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca da ração (DIVMS)	16
3.4 Abate e obtenção do peso da carcaça quente.	18
3.5 pH fecal	18
3.6 Determinação do amido.	18
3.7 Análise estatística	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Ganho de peso diário, consumo de matéria seca, conversão alimentar e rendimento de carcaça	21
4.2 Degradabilidade “ <i>in vitro</i> ” das rações experimentais.....	25
4.3 Amido residual fecal e pH fecal	27
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura química da amilose.	4
FIGURA 2 Estrutura química da amilopectina.....	5
FIGURA 3 Classificação das enzimas amilolíticas	7
TABELA 3 Composição bromatológica da dieta base experimental.	14
FIGURA 4 Distribuição dos lotes dos animais nos currais.	14
FIGURA 5 Mistura dos complexos enzimáticos e ingredientes da ração. A) complexo enzimático produzido na UFG. B) Complexo enzimático Biofórmula.....	15
FIGURA 6 Curva da degradabilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca (DIVMS) das dietas experimentais	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Fontes de amido	5
TABELA 2 Médias de produção obtidas em teste com vacas em lactação suplementadas com enzimas.....	10
TABELA 3 Composição bromatológica da dieta base experimental.	14
TABELA 4 Dados de peso médio de entrada dos animais no confinamento (PMI), peso médio dos animais ao final do confinamento (PMF), ganho de peso diário (GPD), consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA) e rendimento de carcaça (RC).	21
TABELA 5 Degradabilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca (DIVMS) das dietas experimentais.....	25
TABELA 6 Amido residual fecal (ARF) e pH fecal.....	27

RESUMO

O uso de ionóforos como promotores de crescimento em bovinos de corte está sendo colocado como barreira pelos países da União Européia para a exportação de carne bovina. Diante desse desafio, novos produtos estão sendo pesquisados para incrementar o desempenho animal, dentre os quais aqueles contendo atividade enzimática. O presente trabalho teve como objetivo produzir um complexo enzimático amilolítico, utilizando o fungo *Aspergillus awamorii*, e avaliar o desempenho de animais confinados suplementados com este complexo enzimático amilolítico e a suplementação com um produto comercial contendo complexo multienzimático, leveduras, mananoligossacarídeos e cepas bacterianas. A produção, caracterização e avaliação enzimática foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Laboratório de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás e a parte de experimentação com os animais foi realizada em um confinamento localizado em Rondonópolis – MT. Os tratamentos experimentais realizados foram: tratamento controle (dieta base composta por 16% de silagem de capim mombaça, 66,0% de milho triturado, 3,0% de núcleo mineral vitamínico e 15% de torta de algodão), tratamento UFG (dieta base com adição de 23,8 mL por animal contendo 23,27 unidades sacarificantes por mL da solução enzimática produzida no Laboratório de Enzimologia da UFG, resultando em 48,67 unidades sacarificantes/Kg da dieta) e tratamento Biofórmula (dieta base com adição de 5,0 gramas de complexo enzimático à base de enzimas exógenas, produzido pela empresa Super Premium Tecnologia em Agropecuária Ltda, composto por 10% de mananoligossacarídeos, 40% de levedura inativa, 180 unidades sacarificantes/g, resultando em 83,13 unidades sacarificantes/Kg da dieta). A adição dos produtos com atividade amilolítica não alterou significativamente ($P < 0.05$) o ganho de peso diário, consumo voluntário, conversão alimentar e rendimento de carcaça dos bovinos confinados, provavelmente pela quantidade do complexo enzimático com atividade amilolítica aplicado nas rações não ter sido suficiente para promover a quebra de uma quantidade de moléculas de amido significativa para alterar a disponibilidade de nutrientes no rúmen, o que provavelmente melhoraria o desempenho destes animais. Não houve diferença estatística entre as DIVMS das dietas do presente experimento, o que juntamente com os dados de consumo, possivelmente explica o fato dos animais não apresentarem diferença estatística no ganho de peso e conversão alimentar. A porcentagem de amido residual fecal não foi influenciada pela suplementação com enzimas amilolíticas exógenas dos tratamentos UFG e Biofórmula. Uma vez que não houve diferença estatística na concentração de amido residual fecal e na DIVMS, isso demonstra que os produtos testados não influenciaram na digestibilidade do amido pelo animal. Com os dados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que os níveis de inclusão do extrato enzimático bem como o produto comercial contendo complexo multienzimático, leveduras, mananoligossacarídeos e cepas bacterianas na dieta de bovinos confinados não foram eficazes em melhorar o desempenho dos animais.

Palavras-chave: Amido, Biotecnologia, Confinamento, Nutrição, Ruminantes.

ABSTRACT

The use of ionophores as growth promoters in beef cattle is being placed as a barrier by EU countries for beef exports. Faced with this challenge, new products are researched to increase animal performance and some of the products that can be selected for such are the products with enzymatic activity. The present work aims to produce an amylolytic enzyme complex, using the fungus *Aspergillus awamorii*, and evaluate the performance of confined animals supplemented with this complex and amylolytic enzyme supplementation with a commercial product containing multienzyme complex, yeast, MOS, and bacterial strains. The production, characterization and evaluation of enzyme were performed at the Laboratório de Enzimologia and Laboratório de Fisiologia da Digestão of the Instituto de Ciências Biológicas /ICB II, Universidade Federal de Goiás and the share of experimentation with animals was conducted in a feedlot located in Rondonópolis - MT . The tests performed were: treatment control (basal diet composed of 16% grass silage Mombasa, 66.0% ground corn, 3.0% vitamin and mineral mixture 15% cottonseed meal), UFG treatment (basal diet with the addition of 23.8 ml per animal containing 23.27 saccharificant units per ml of enzyme solution produced in Laboratório de Enzimologia da UFG, resulting in 48.67 saccharificant units / kg diet) and Biofórmula treatment (basal diet with addition of 5 , 0 grams of enzymatic complex based on exogenous enzymes, produced by Super Premium Tecnologia em Agropecuária Ltda., composed of 10% MOS, 40% inactive yeast, saccharificant 180 units / g, resulting in 83.13 saccharificant units / kg diet). The addition of products with amylolytic activity was not significantly ($P < 0.05$) daily weight gain, intake, feed conversion and carcass yield of feedlot cattle, probably by the amount of the enzyme complex with amylolytic activity used in the diets was not sufficient to promote the breakdown of a number of starch molecules to significantly change the availability of nutrients in the rumen, which is likely to improve the performance of these animals. There was no statistical difference between the IVDMD of the diets of this experiment, which together with consumption data, possibly explains the fact that the animals do not show any statistical difference in weight gain and feed conversion. The percentage of residual fecal starch was not influenced by supplementation with exogenous amylolytic enzymes of UFG and Biofórmula treatments. Since there was no statistical difference in the excretion of starch and IVDMD, this possibly explains the similar performance between treatments. With the data presented in this study we conclude that the extract of the fermentation of the fungus *Aspergillus awamorii* presents amylolytic action, but the inclusion levels of the enzyme extract and the commercial product containing multienzyme complex, yeast, and bacterial strains MOS in the diet of feedlot cattle were not effective in improving animal performance.

Key words: Biotechnology, Feedlot, Nutrition, Ruminant, Starch.

1 INTRODUÇÃO

O uso de ionóforos como promotores de crescimento em bovinos de corte está sendo colocado como barreira pelos países da União Européia para a exportação de carne bovina. Diante desse desafio, novos produtos estão sendo pesquisados para incrementar o desempenho animal, dentre os quais aqueles que apresentam enzimática.

As pesquisas vêm sendo desenvolvidas pelo potencial de degradação do substrato específico de cada enzima. Os estudos dão destaque às pesquisas envolvendo enzimas que degradam carboidratos da dieta como as celulasas, xilanases e amilases, buscando melhorar o aproveitamento da dieta pelos ruminantes (TRICARICO, et al., 2005; BEAUCHEMIN, et al., 2007; KLINGERMAN, et al., 2009).

As rações fornecidas a animais confinados apresentam, geralmente, grande inclusão de grãos, visando assim aumentar o fornecimento energético diário aos animais e com isso aumentar o ganho de peso diário e diminuir o tempo de permanência no confinamento. Sob essa perspectiva, quanto maior o aproveitamento dos nutrientes pelos animais menor será o gasto de ração, com isso um menor gasto com alimentação. Para incrementar este aproveitamento da ração pelos animais confinados, o uso de enzimas amilolíticas exógenas apresenta-se promissor uma vez que as rações podem conter níveis de inclusão de grão correspondendo a 60% de amido na dieta.

Enzimas exógenas podem derivar de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo que a maioria é obtida pela fermentação de microrganismos. O maior grupo é formado pelos fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*. Os fungos são mais empregados para esta fermentação pelo fato de produzirem uma maior quantidade de enzimas com maior estabilidade e menor custo.

A eficiência das enzimas em hidrolisar seus substratos irá depender de vários fatores como o pH, concentração do substrato e da enzima, a temperatura e a sua afinidade pelo substrato. As enzimas amilolíticas exógenas utilizadas na alimentação de ruminantes, geralmente, apresentam uma faixa ótima de pH de 5,5 a 6,3, o que é muito desejável pelo fato de ser uma faixa de

pH em que normalmente o rúmen apresenta, principalmente quando os animais são alimentados com rações contendo altas inclusões de amido. As enzimas também necessitam ter atividade na faixa de temperatura ruminal para que possa apresentar resultado na hidrólise do amido.

O produto da hidrólise do amido dependerá do tipo de enzima, podendo gerar glicose, maltose, dextrinas e oligossacarídeos diversos. Os produtos da hidrólise podem servir de substrato para os microorganismos ruminais, contribuindo assim para aumentar a população bacteriana. A ação da enzima no substrato poderá aumentar também a superfície específica do substrato, com isso, aumentando as condições de degradação ruminal. A enzima, passando intacta pelo abomaso, também poderá atuar no intestino, auxiliando assim a digestão intestinal do amido. O mecanismo de atuação das enzimas amilolíticas em melhorar o desempenho animal, a sua interação com os microorganismos ruminais e a sua atividade intestinal, ainda não estão bem esclarecidos.

Resultados obtidos com a suplementação animal de enzimas amilolíticas em melhorar a digestibilidade da ração e aumentar o desempenho são controversos e não conclusivos e poucas pesquisas tem sido feitas para elucidar a melhor aplicação desta tecnologia (ROJO RUBIO et al. 2007)

O presente trabalho tem como objetivo produzir um complexo enzimático amilolítico, utilizando o fungo *Aspergillus awamorii*, e avaliar o desempenho de animais confinados suplementados com este complexo enzimático amilolítico ou com um produto comercial contendo complexo multienzimático, leveduras, mananoligossacarídeos e cepas bacterianas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amido

Encontrado principalmente em sementes de cereais como o milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos como a batata e a mandioca, o amido é o mais importante polissacarídeo de reserva das plantas (MORAES, 2004).

Em sua forma nativa apresenta-se, geralmente, sob a forma de grânulos, formados por camadas sucessivas dispostas radialmente, insolúveis em água à temperatura ambiente. O amido é um polímero de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas, sendo esta estável em pH alcalino, mas hidrolisado em pH ácido apresentando no final de sua cadeia polimérica um grupo aldeído latente. Dois tipos de polímeros estão presentes no amido: amilose e amilopectina (NELSON & COX, 2002).

Amilose é um polímero linear constituído de unidades de glicose que se unem por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 1). O número de resíduos de glicose, também indicado pelo grau de polimerização, varia com a origem. A média do conteúdo de amilose pode variar de valores próximos a zero chegando a 75%, mas o valor típico é de 20 a 25% (BULEÓN et al., 1998; MORAES, 2004).

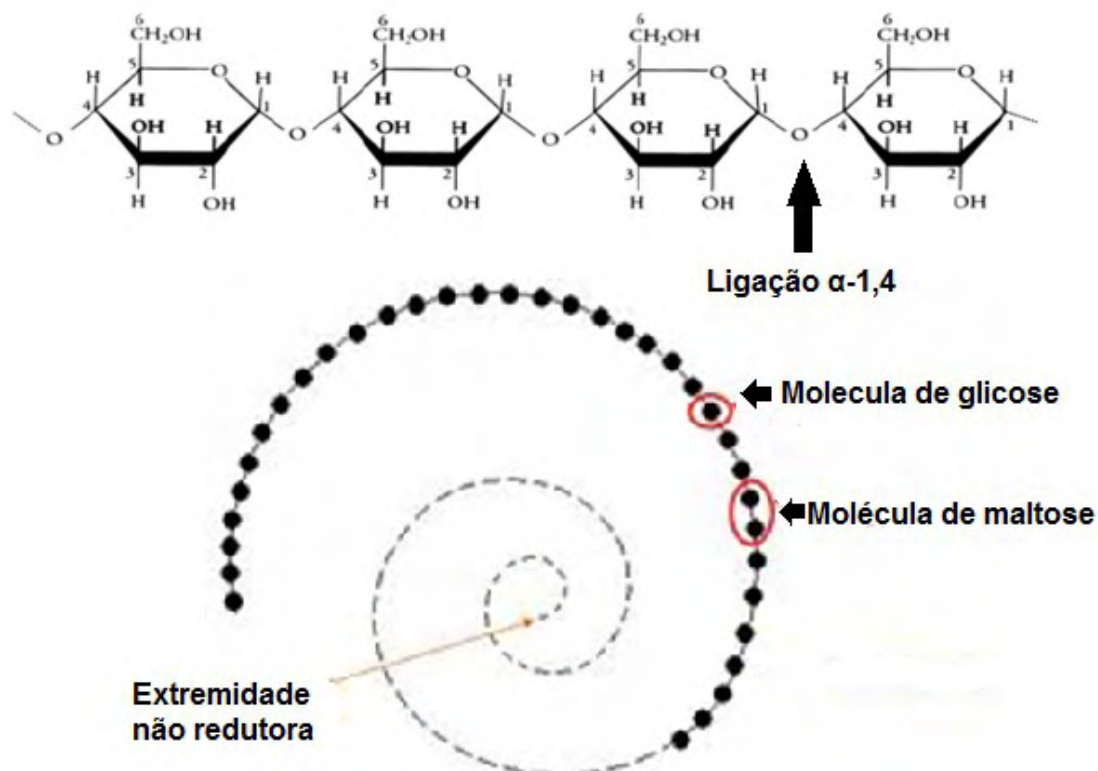


FIGURA 1 Estrutura química da amilose.

Fonte: Adaptado de KOZLOSKY (2009).

A amilopectina é formada de pequenas cadeias lineares de 10 a 60 resíduos de glicose que se unem por ligações glicosídicas com configuração α ($1 \rightarrow 4$) e de cadeias laterais de 15 a 45 resíduos unidos por ligações α ($1 \rightarrow 6$) (Figura 2). A média do número de ramificações na amilopectina é de 5%, mas pode variar com a fonte de amido. A molécula completa contém em média cerca de 2.000.000 de unidades de glicose, sendo uma das maiores moléculas encontradas na natureza (BULEÓN et al., 1998, SAID & PIETRO, 2004).

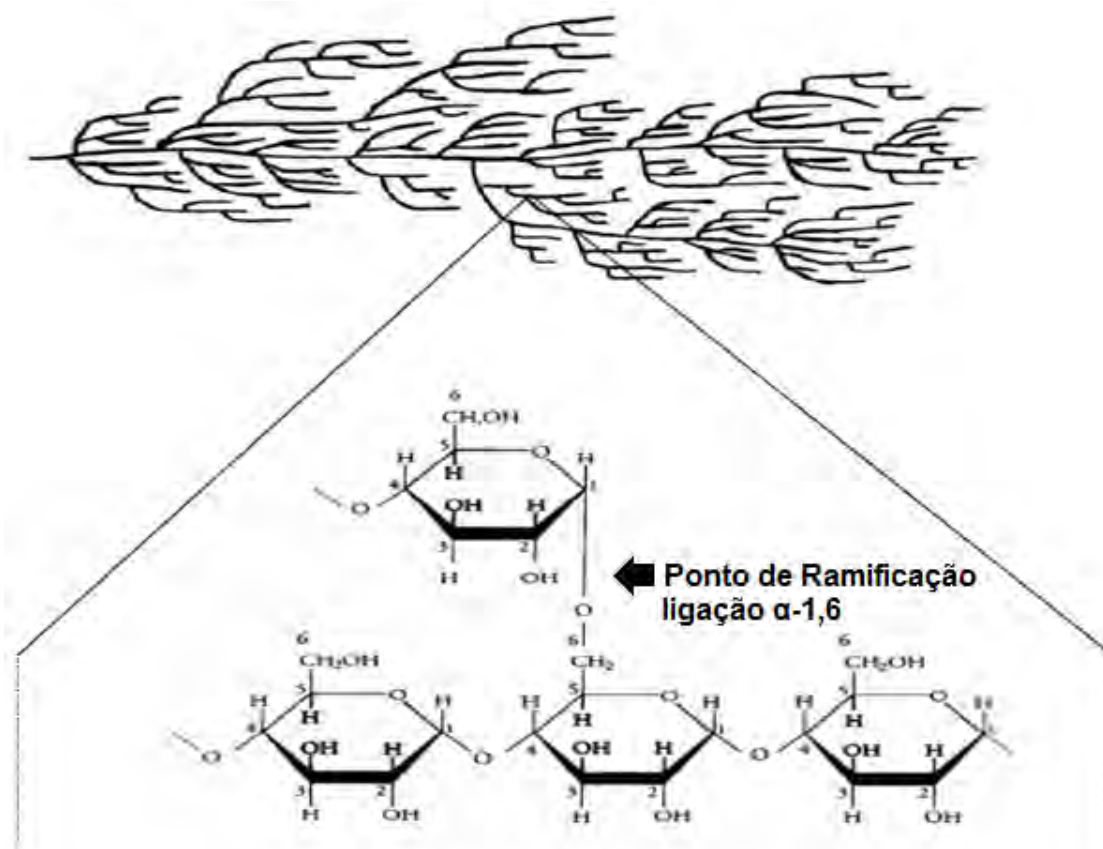


FIGURA 2 Estrutura química da amilopectina

Fonte: Adaptado de KOZLOSKY (2009)

A quantidade de amido presente em cada alimento é variável (Tabela 1) sendo usados estes valores para o balanceamento das dietas oferecidas para os animais (CQBAL, 2012)

TABELA 1 Fontes de amido

Fonte	Amido %
Arroz quirera	73,72
Arroz farelo	17,60
Arroz farelo desengordurado	26,00
Gérmen de milho	57,87
Mandioca integral raspa	79,57
Milheto	62,08
Milho	70,98
Milho pré cozido	61,00
Soja farelo	5,77
Sorgo grão	62,99
Trigo farelo	34,20

Fonte: Adaptado de CQBAL (2012)

2.2 Amilases

Conforme HARGER (1982), enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações.

As enzimas efetuam processos metabólicos na célula viva e ocorrem em todos os organismos vivos, sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida até os mais desenvolvidos. Embora a maioria das enzimas seja endocelular, algumas são exocelulares e são excretadas para fora da célula viva, como por exemplo as amilases fúngicas. Conforme LEADLAY (1993), as enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos.

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam (HARGER, 1982), portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo). As amilases atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos hidrolisando as ligações glicosídicas e variam de peso e conformação conforme o organismo que a produz.

Como exemplo, o peso molecular da α -amilase varia de 10 a 210 KDa, dependendo da sua origem. As α -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60 KDa (GUPTA et al., 2003), sendo que as α -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 KDa e as α -amilases fúngicas de 41 a 69 KDa, de acordo com os resultados de diferentes autores citados por PANDEY et al. (2005).

GUPTA et al. (2003) e PANDEY et al. (2005) citaram que as amilases hidrolisam moléculas de amido, glicogênio e polissacarídeos liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Essas enzimas apresentam grande importância em aplicações biotecnológicas desde a aplicação em alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel. Apesar das amilases poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis

comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento de cereais.

As amilases podem ser divididas em três grupos de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases), as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases), e as glucoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (MORAES, 2004).

Atualmente, são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise desse carboidrato. COSTA (1996) apresentaram um esquema (Figura 3) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

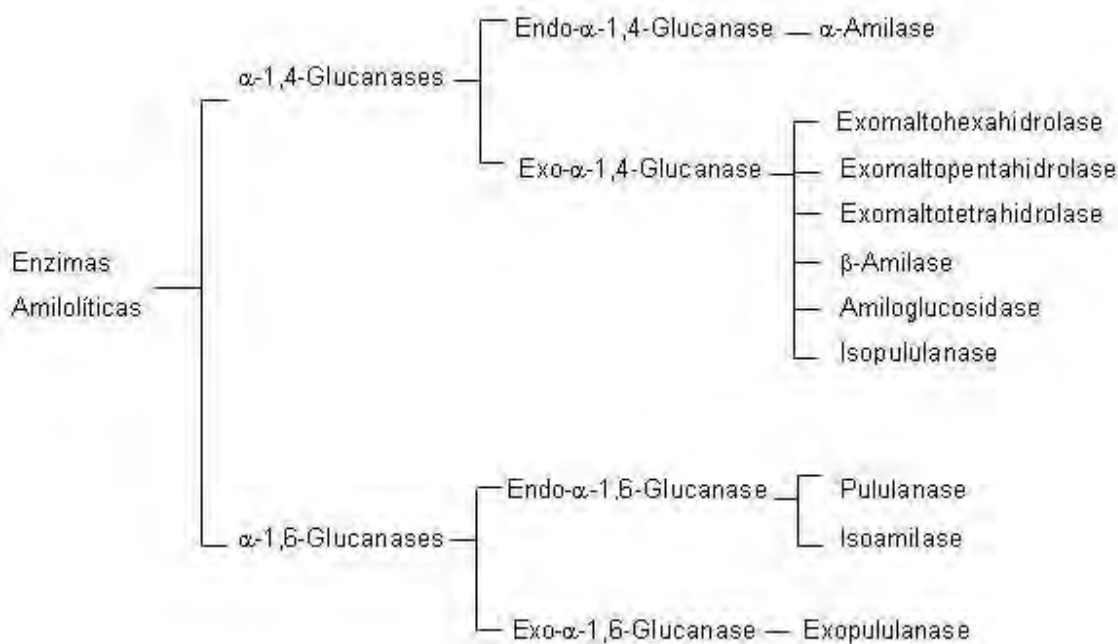


FIGURA 3 Classificação das enzimas amilolíticas

Fonte: COSTA (1996).

PANDEY et al. (2005) definiram α -amilase (1,4- α -glucano-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1.) como sendo uma enzima que quebra as

ligações α -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união α -1,4.

O ataque da α -amilase ao substrato ocorre de forma não seletiva (tipo endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose.

Durante a hidrólise do amido, a α -amilase cliva aleatoriamente o polímero do amido em oligossacarídeos de baixo peso molecular e, eventualmente produz unidades de maltotriose e maltose da amilose e dextrina-limite, glicose e maltose a partir de amilopectina. Os produtos da ação das enzimas pertencentes ao grupo das exoamilases (exo- α -1,4-glucanases) sobre os resíduos externos de glicose da amilose e amilopectina, como a β -amilase (EC 3.2.1.2), a amiloglucosidase (EC 3.2.1.3), são a glicose, maltose e dextrinas limite (MORAES, 2004).

São adotadas várias unidades de medida da atividade amilolítica das enzimas utilizadas na suplementação de animais nos trabalhos científicos. HRISTOV et al. (2008), adicionando a enzima diretamente no rúmen, utilizaram a formação de açúcares redutores (FUWA, 1954) de acordo com o tempo em um determinado pH. WALSH et al. (2005) propuseram um método de difusão radial em ágar para quantificação das enzimas adicionadas na alimentação animal. TRICARICO et al. (2007) e DE FRAIN et al. (2005) adotaram a unidade dextrinizante como medida da atividade das amilases, o que equivale a quantidade de enzimas necessárias para degradar o amido na velocidade de 1g/h a 30°C em pH 4,8 (FOOD CHEMICAL CODEX, 1996).

2.3 Utilização de enzimas na nutrição de ruminantes

Pesquisas com enzimas amilolíticas, obtidas pelo cultivo de bactérias, datam do final da década de 60. A sua utilização na alimentação animal tem sido amplamente estudada, visando melhorar a eficiência de conversão da dieta oferecida aos animais, diminuir os custos de produção e aumentar o retorno econômico (BEAUCHEMIN et al., 1995; BEAUCHEMIN et al., 2003).

Estudos mostram que a adição de misturas enzimáticas pode melhorar a digestão de nutrientes e o desempenho animal. Contudo, o modo de ação das enzimas não está completamente elucidado. Evidências sugerem que o mecanismo de ação não é simples e pode ser o efeito de vários fatores (BEAUCHEMIN et al., 1998; MCALLISTER et al., 2001).

Para a ação da enzima, o contato com o substrato é essencial e para isso MORGAVI et al. (2000) realizaram estudos com a adição das enzimas diretamente no alimento e verificaram uma maior estabilidade enzimática graças à formação do complexo enzima-substrato, dificultando a ação de proteases microbianas. A formação desse complexo também aumenta o seu tempo de permanência no ambiente ruminal por não estar dissolvida no fluido ruminal. Na falta do complexo enzima-substrato estável, as enzimas se solubilizam no líquido ruminal e fluem rapidamente para o intestino (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Dietas com inclusão de ingredientes com alto teor de amido podem resultar em alterações no trato digestivo dos bovinos e uma possível deficiência na digestão dessa fonte de amido poderá representar perdas desse nutriente pelas fezes. ROJO RUBIO et al. (2005), avaliando a eficiência no aproveitamento do amido proveniente do grão do sorgo, observaram aumento de 13,9% no ganho de peso diário de cordeiros que receberam amilase na ração.

No rúmen, as enzimas podem agir diretamente nos alimentos ou estimular indiretamente a digestão, por potencializar as atividades das enzimas microbianas (MCALLISTER et al., 2001). MORGAVI et al. (2000) verificaram sinergismo entre enzimas exógenas e microbianas pelo aumento do potencial hidrolítico no meio ruminal. Algumas enzimas são estáveis o suficiente para deixarem o rúmen e permanecerem ativas no abomaso e intestino, auxiliando a digestão dos materiais que escapam à fermentação ruminal (HRISTOV et al., 1998).

Aumentos da taxa de degradação do alimento no rúmen estão relacionados com a melhora na colonização dos alimentos pelos microrganismos ruminais em função do tratamento enzimático (COLOMBATTO et al., 2003). Os aditivos enzimáticos aumentam a disponibilidade de carboidratos fermentescíveis que contribuem para o adicional crescimento e

multiplicação dos microrganismos ruminais. Um maior número de bactérias significa digestão mais extensiva da dieta total (LEWIS et al., 1996; BEAUCHEMIN et al., 2000).

Por meio da sua ação hidrolítica, a α -amilase, hipoteticamente, aumenta a disponibilidade de produtos resultantes da hidrólise do amido no rúmen, como os oligossacarídeos, conseqüentemente alterando o processo de fermentação ruminal pelo fornecimento de substratos mais facilmente hidrolisáveis pelos microrganismos ruminais e aumentando a degradação do amido no rúmen (TRICARICO et al., 2008).

Efeito quadrático na adição de enzimas amilolíticas na dieta de vacas em lactação foi observado por KLINGERMAN et al. (2009) com o decréscimo na produção leiteira a medida que se aumenta a proporção de fornecimento do suplemento enzimático.

HRISTOV et al. (2008), utilizando baixas concentrações dos complexos enzimáticos contendo amilases, não observaram nenhum efeito sobre a fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e digestão de nutrientes em vacas leiteiras. Por outro lado KLINGERMAN et al. (2009) observaram aumento na produção leiteira com a adição do complexo enzimático, apesar de seu mecanismo não ser totalmente conhecido.

TABELA 2 Médias de produção obtidas em teste com vacas em lactação suplementadas com enzimas.

	Tratamentos			
	Controle	Amilase Baixa	Amilase Alta	Amilase Comercial
Ingestão de MS (Kg/d)	27,0 ^b	28,1 ^{ab}	29,0 ^a	28,5 ^a
Produção Leite (Kg/d)	43,2 ^b	47,1 ^a	44,2 ^b	45,2 ^{ab}

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram estatisticamente (P<0,05)

Fonte: Adaptado de KLINGERMAN et al. (2009)

Com a adição de compostos enzimáticos de α -amilase (950 unidades dextrinizantes/kg) melhoras nas características de carcaça, incremento no ganho de peso e aumento do consumo voluntário de matéria seca foram observados, mas no entanto, a enzima não influenciou o desempenho quando

houve uma restrição do consumo de matéria seca (TRICARICO et al., 2007). TRICARICO et al. (2005) não verificaram incremento no desaparecimento ruminal do amido em novilhas leiteiras canuladas no rúmen alimentados com α -amilase obtida a partir do fungo *Bacillus licheniformis*, porém verificaram aumento na produção de leite e na proporção de gordura no leite, com a adição de 240 unidades dextrinizantes/Kg de matéria seca da dieta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção da solução de enzimas amilolíticas

Três discos de cultura (5 mm), contendo esporos do fungo *Aspergillus awamori* foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 mL de meio de indução (extrato de levedura, 1,0 g; MgSO_4 , 0,05 g; FeSO_4 , 0,01g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g; KH_2PO_4 , 0,02 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,125 g; amido, 1%; água destilada q.s.p. 100 ml). Os erlenmeyers foram incubados durante 72 horas em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shaker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A) a 30°C e velocidade de 180 rpm. Após 72 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada a vácuo. Alíquotas foram retiradas e congeladas para avaliação da atividade de amilase e posterior fornecimento aos animais.

3.1.1 Linhagem utilizada e manutenção do fungo

A amostra do fungo *Aspergillus awamori* utilizada no trabalho foi isolada de amostra de solo na Universidade de Brasília. Para manutenção do fungo, foram utilizadas placas de Petri, contendo meio MEX [extrato de malte 3,0% (p/v) e Ágar 2,0% (p/v)], autoclavado a 120° C por 20 minutos. A cultura foi mantida por 10 dias a 30°C e, posteriormente, as placas foram estocadas a 4°C.

3.1.2 Determinação da atividade da amilase

A atividade amilolítica foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959).

A 40 µl de tampão citrato-fosfato (50 mmol. L⁻¹, pH 6,8), foram adicionados 60 µl de amostra enzimática e 100 µl de solução de amido (0,5 %). A mistura foi incubada a 39°C por 15 minutos. Posteriormente, 1,0 mL de reagente ácido dinitrosalicílico {10 g.L⁻¹ ácido dinitrosalicílico (DNS), 100 mL de

NaOH (2 mmol.L⁻¹), 300 g.L⁻¹ de tartarato de sódio e potássio} foi adicionado nos tubos de ensaio. A mistura foi fervida por 5 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

3.2 Ensaio de desempenho animal

O ensaio de desempenho animal foi realizado em um confinamento comercial, localizado em Rondonópolis - MT de propriedade da empresa Nutripura Nutrição Animal Ltda., sediada na mesma cidade.

Foram confinados 63 animais da raça Nelore, com média de 24 meses de idade, procedentes de uma mesma propriedade, divididos em nove lotes de sete animais cada, onde cada lote foi alojado em um curral, recebendo água e dieta *ad libitum*. Os animais foram desverminados e vacinados contra clostridioses na entrada do confinamento.

Os tratamentos experimentais realizados foram: tratamento controle (dieta base composta, na base da matéria seca, por 16% de silagem de capim mombaça, 66,0% de milho triturado fino, 3,0% de núcleo mineral vitamínico e 15% de torta de algodão), cujos valores das análises bromatológicas estão demonstrados na Tabela 3; tratamento UFG (dieta base com adição de 23,8 mL da solução de enzima amilolítica produzida na UFG por animal, contendo 23,27 unidades sacarificantes por mL, resultando em 48,67 unidades sacarificantes/Kg de matéria seca da dieta) e tratamento Biofórmula (dieta base com adição de 5,0 gramas de complexo enzimático à base de enzimas exógenas, produzido pela empresa Super Premium Tecnologia em Agropecuária Ltda, sediada em Goiânia, composto por 10% de mananoligossacarídeos, 40% de levedura inativa, 180 unidades sacarificantes/g, 6 unidades celulolíticas/g, 10 unidades hemicelulolíticas/g, 3 unidades xilanolíticas/g, 1x10⁹UFC de *Saccaromyces cerevisiae* e *Lactobacillus*

acidophilus e 5×10^6 UFC de *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis*, resultando em 83,13 unidades sacarificantes/Kg da dieta).

TABELA 3 Composição bromatológica da dieta base experimental.

Itens	Valores
Umidade (%)	39,23
Proteína Bruta (% MS)	12,77
Extrato Etéreo (% MS)	3,80
Matéria Mineral (% MS)	3,31
FDA (% MS)	13,48
FDN (% MS)	28,39
Amido (% MS)	32,43
CNF (%)	51,73
NDT (%)	75,12

Os lotes de animais 1, 2 e 3 receberam a dieta controle, os lotes 4, 5 e 6 receberam a dieta com o complexo enzimático da UFG e os lotes 7, 8 e 9 receberam o tratamento com o complexo enzimático da empresa Biofórmula. Os lotes foram distribuídos nos currais aleatoriamente, conforme distribuição mostrada na Figura 4.

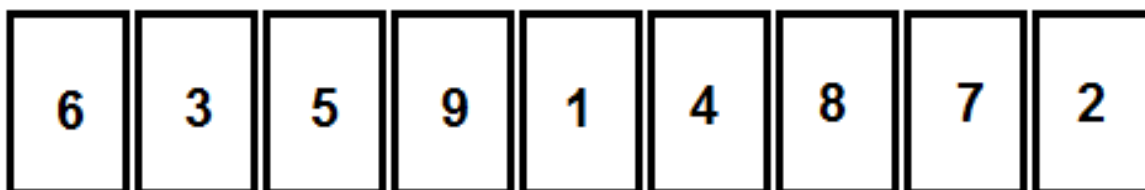


FIGURA 4 Distribuição dos lotes dos animais nos currais.

O complexo enzimático da UFG foi diluído em 3,5 litros de água à temperatura ambiente, aspergido sobre o milho triturado depositado no misturador, e após, misturado com o restante dos ingredientes no momento da confecção da ração para os animais. O produto enzimático da empresa Biofórmula era misturado previamente em 20 Kg de milho e esta pré-mistura distribuída sobre o restante do milho triturado depositado no misturador, e juntamente aos demais ingredientes misturados conforme demonstrado na Figura 5, durante 5 minutos. Em seguida, a mistura total era distribuída nos

cochos dos respectivos currais, 10% a mais do que o consumido no dia anterior pelos animais.



FIGURA 5 Mistura dos complexos enzimáticos e ingredientes da ração. A) complexo enzimático produzido na UFG. B) Complexo enzimático Biofórmula.

Fonte: Arquivo pessoal (2010).

Os animais foram adaptados à dieta durante 14 dias, seguido por período de 43 dias de tratamento e abatidos ao final para avaliação do desempenho em rendimento de carcaça.

A ração de cada tratamento foi oferecida *ad libitum* aos animais, com sobras diárias de 10% do consumo voluntário fornecida uma vez ao dia e revolvida manualmente no cocho duas vezes diariamente com o auxílio de uma pá, com a finalidade de estimular o consumo voluntário da ração pelos animais. Foram pesadas diariamente as sobras da ração do dia anterior para estimar o consumo diário e ajustar a quantidade a ser oferecida no dia.

As pesagens dos animais no início e final do confinamento foram realizadas por meio de balança eletrônica aferida pelo INMETRO (0,1%), no curral de manejo, precedidas por jejum alimentar e hídrico de 16 horas. Os

animais foram recolhidos no final da tarde anterior, pesados na manhã do dia seguinte e o ganho de peso obtido segundo a fórmula:

$GPD = PF - PI / PC$, onde:

GPD = ganho de peso diário (Kg)

PF = peso final (Kg)

PI = peso inicial (Kg)

PC= período de confinamento (Dias)

As análises de matéria mineral (MM), matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) da dieta total oferecida, e das sobras, foram feitas de acordo com AOAC (1990). A determinação da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foi realizada de acordo com a metodologia de VAN SOEST (1991).

3.3 Degradabilidade “*in vitro*” da matéria seca da ração (DIVMS)

A DIVMS foi obtida utilizando a metodologia do fermentador artificial de rúmen (Incubadora *in vitro*, TE-150 - TECNAL), descrita por HOLDEN (1999).

Amostras das rações experimentais foram coletadas durante o período experimental e congeladas para determinação da DIVMS. As amostras de cada tratamento foram misturadas e homogeneizadas para formar um “pool” e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C durante 72 horas. As amostras foram moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de crivo de 1mm no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da UFG.

Para a determinação da DIVMS, será usada 0,5g da ração moída, acondicionadas em saquinhos da marca ANCOM F57 e estes selados com seladora a quente e submetidos á marcha analítica descrita por HOLDEN (1999).

Os saquinho foram identificados, colocados em estufa a 105°C, e posteriormente colocados em dessecador por 40 minutos, tendo seu peso registrado e em seguida em cada saquinho foram adicionados 0,5 g das rações

de cada tratamento correspondente, sendo logo após selados para serem colocados nos jarros do fermentador artificial.

Em cada jarro foram colocadas, equitativamente, 26 saquinhos, nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, sendo dois saquinhos por tempo de incubação e dois saquinhos lacrados vazios para correção do peso. Os saquinhos foram adicionados nas jarros de forma decrescente nos tempos e retirados juntos. O branco (saquinho lacrado vazio) foi utilizado para o cálculo do fator de correção. Os saquinhos de cada tratamento foram colocados em jarros separados (rúmen artificial).

Inicialmente, a solução tampão A composta de 10g/L de KH_2PO_4 , 0.5g/L de $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0,5g/L de NaCl, 0,1g/L de $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ e 0,5g/L de uréia, e a solução B composta por 15g/L de Na_2CO_3 e 1g/L de $\text{Na}_2\text{S}(9\text{H}_2\text{O})$, foram pré-aquecidas (39°C), posteriormente misturados 266 mL da solução B a 1330 mL da solução A (1:5). A solução resultante foi ajustada para obter pH final de 6,8 a 39°C e adicionados em cada jarro de digestão.

O conteúdo ruminal foi coletado de um novilho mestiço (Holandês x Girolando), com peso de 370 kg, provido de cânula ruminal. O animal foi adaptado à dieta composta por 89% de feno de tifton, 10% de milho moído e 1% de mistura mineral, por um período de 14 dias antes das coletas do líquido ruminal. O animal teve livre acesso à água e à ração durante todo o período.

A coleta de líquido ruminal foi realizada manualmente, em que o conteúdo ruminal foi retirado de vários pontos do rúmen, sendo filtrado em pano limpo até a obtenção de um volume aproximado de 2000 mL, que foram acondicionados em garrafa térmica pré-aquecida a aproximadamente 39° C e levados ao laboratório.

O líquido ruminal levado rapidamente ao laboratório, foi processado em liquidificador pré aquecido com infusão de CO_2 e misturado à velocidade alta durante 30 segundos. Após a mistura, o líquido foi filtrado em tecido de algodão e adicionado (400 mL) em cada jarro, contendo a solução tampão (1596 mL). Todo procedimento foi realizado com infusão constante de CO_2 .

Após os períodos, os saquinhos foram lavados até a água ficar límpida no recipiente. Em seguida, foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas e, após 40 minutos no dessecador, o peso foi registrado.

Os dados de DIVMS foram avaliados conforme modelo proposto por ORSKOV & MACDONALD (1979) para determinação da curva de degradabilidade da MS.

3.4 Abate e obtenção do peso da carcaça quente.

O abate foi realizado em frigorífico sob Inspeção Federal (SIF). Ao final obteve-se o peso das meias carcaças e posterior cálculo do rendimento de carcaça quente.

3.5 pH fecal

Para determinação do pH fecal, foram coletadas amostras de fezes de todos os animais, logo após defecarem, uma vez ao dia, no horário de 13:00 horas às 15:00 horas, diretamente do chão, durante cinco dias do período experimental, tomando-se o cuidado para não haver contaminação das amostras com terra. Logo após coletada diluiu-se 50g de fezes em 50mL de água destilada e deionizada. O pH da solução foi medido com potenciômetro manual. O restante da amostra foi acondicionada em caixa térmica com gelo e congelada logo em seguida para posterior determinação de amido residual fecal.

3.6 Determinação do amido.

A determinação da concentração de amido na dieta e da porcentagem de amido residual fecal foram feitas pelo método enzimático proposto por BACH KNUDSEN et al. (1997).

As amostras de fezes coletadas foram secas em estufa à temperatura de 105°C durante 72 horas e posteriormente moídas em moinho do tipo willey com peneira de crivo 1 mm. Foram utilizadas 0,1g da amostra das dietas e 0,2g da amostra das fezes, para a deretminação da porcentagem de amido residual fecal.

Cada amostra foi pesada e acondicionada em tubo de ensaio de 30mL. Posteriormente, foram adicionados em cada tubo 15ml de uma solução de acetato de sódio $0,1\text{mol L}^{-1}$, pH 5.00 e 25 μL da enzima α -amilase (Novozymes, Termamyl 2X). A mistura foi homogenizada em agitador e os tubos colocados em banho-maria a 100°C , durante 60 minutos com nova homogenização aos 10, 30 e 50 minutos de incubação. Após, os tubos foram retirados e deixados em repouso até atingir temperatura ambiente, quando foram adicionados 500 μL de uma solução contendo 100 unidades da enzima amiloglicosidase (NOVOZYMES, SIGMA-ALDRICH). Os tubos foram incubados novamente a 60°C durante 120 minutos com homogenização após 60 minutos de incubação.

Após a segunda incubação, foi retirada uma alíquota de 1,5mL, acondicionada em eppendorf, centrifugada a 2.060g durante 10 minutos a temperatura de 10°C . Foram utilizados 10 μL de cada eppendorf para reagir com a solução estável do Kit de dosagem de glicose comercial (DOLES – glicose enzimática líquida) e, após 5 minutos, foi feita leitura em espectrofotômetro (SPECTRUM 20000 uv) a 510nm de absorvância.

Para não superestimar a quantidade de amido, a mesma quantidade das amostras das dietas foi pesada, colocada em tubos de ensaio de 30 mL e adicionados 15mL da solução de acetato de sódio $0,1\text{mol L}^{-1}$, pH 5.00. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 240 minutos, homogenizados de 30 em 30 minutos e adotado o mesmo procedimento de dosagem de glicose pelo Kit comercial. Os valores encontrados foram descontados dos obtidos com o procedimento enzimático, pois representam a quantidade de açúcar livre presente nas amostras antes da hidrólise do amido.

Para obtenção da curva padrão, utilizou-se amido puro nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 95%, respectivamente.

3.7 Análise estatística

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, com três lotes de sete animais cada por tratamento experimental. Cada tratamento foi composto, portanto, por 21 animais e cada curral foi considerado como uma repetição.

Os dados de ganho de peso, consumo de matéria seca, conversão alimentar, pH fecal, rendimento de carcaça e amido fecal residual foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P>0,05$) com o auxílio do programa estatístico R (R, Development Core Team, 2010).

O modelo matemático empregado foi:

$$Y_{ij} = \mu + S_j + e_{ij};$$

onde:

Y_{ij} = representa a observação realizada no i-ésimo animal, pertencente ao j-ésimo grupo suplementado;

μ = representa a média geral da característica;

S_j = representa o efeito do tipo de suplementação

e_{ij} = representa o efeito residual.

Os parâmetros de tempo de colonização, degradabilidade efetiva, degradabilidade potencial, fração solúvel, fração potencialmente degradável e fração indegradável. As curvas obtidas foram analisadas pelo teste de identidade de modelos (REGAZZI, 2003) com o auxílio do programa estatístico R (R, Development Core Team, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ganho de peso diário, consumo de matéria seca, conversão alimentar e rendimento de carcaça

TABELA 4 Dados de peso médio de entrada dos animais no confinamento (PMI), peso médio dos animais ao final do confinamento (PMF), ganho de peso diário (GPD), consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA) e rendimento de carcaça (RC).

	Tratamentos			P valor
	Controle	UFG	Biofórmula	
PMI (Kg)	417,42 ^{a*} ± 4,78	418,52 ^a ± 4,62	419,00 ^a ± 4,69	0,97
PMF (Kg)	486,52 ^a ± 7,35	487,38 ^a ± 5,06	486,42 ^a ± 7,01	0,99
GPD (Kg)	1,47 ^a ± 0,07	1,47 ^a ± 0,04	1,44 ^a ± 0,07	0,91
CMS (Kg)	11,15 ^a ± 0,24	1,14 ^a ± 0,20	10,83 ^a ± 0,17	0,15
CMS (%PV)	2,47 ^a ± 0,04	2,51 ^a ± 0,03	2,39 ^a ± 0,05	0,15
CA	7,62 ^a ± 0,28	7,78 ^a ± 0,20	7,56 ^a ± 0,29	0,71
RC (%)	55,60 ^a ± 0,31	56,22 ^a ± 0,79	55,06 ^a ± 0,30	0,29

*Médias na mesma linha precedidas por letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Tuckey (P<0,05).

A adição das enzimas com atividade amilolítica não alterou significativamente (P<0,05) o ganho de peso diário, consumo voluntário, conversão alimentar e rendimento de carcaça dos bovinos confinados (Tabela 4), provavelmente devido à quantidade do complexo enzimático aplicado nas rações não ter sido suficiente para promover a quebra de uma quantidade de moléculas de amido significativa para alterar a disponibilidade de nutrientes no rúmen, o que provavelmente melhoraria o desempenho destes animais. A enzima do tratamento UFG foi produzida pelo fungo a partir do milho moído, o que contribuiria para a sua atividade, enquanto a enzima do produto Biofórmula não foi produzida com o mesmo substrato, o que provavelmente explica não encontrar diferenças no desempenho. Manter a atividade enzimática no rúmen

é um fator primordial para que essa possa desempenhar a sua função, e a presença de íons Ca^{2+} no ambiente ruminal é um fator importante para a manutenção da atividade enzimática da amilase, cálcio este proveniente da dieta. A ligação do Ca^{2+} com a enzima mantém a sua estrutura, essencial para a funcionalidade enzimática (BOEL et al., 1990).

Efeito da estabilidade enzimática ruminal foi observado por VAN DE VYVER et al. (2004), que utilizaram glicosilação como forma de proteção da enzima xilanase contra diversas proteases produzidas por microrganismos ruminais. Os autores verificaram redução da atividade da enzima glicosilada incubada com várias proteases nas 6 primeiras horas, em relação a enzima não tratada. No entanto, após 24 horas de incubação a enzima tratada manteve a sua atividade e a enzima não tratada apresentou mais de 60% de perda na sua atividade. A glicosilação da enzima mostrou-se eficaz em manter a atividade enzimática na presença de proteases.

O processo de moagem incrementa a digestibilidade do milho e do sorgo pelo aumento da superfície específica para adesão bacteriana aos grânulos de amido e também incrementa a ação enzimática tanto no rúmen quanto no intestino. A floculação do grão do milho também incrementa a taxa de digestibilidade do grão. No entanto não foi verificado o incremento quando foram adicionadas enzimas amilolíticas, talvez pelo fato da maior disponibilidade ruminal do amido provocar um abaixamento do pH, resultando assim, em acidose sub clínica, o que prejudica o ganho de peso (OWENS et al., 1997), e também devido a taxa de passagem do grão moído ser menor em relação ao grão floculado, proporcionando assim um maior tempo de ataque das enzimas e de digestão total. Além da diferença no processamento, um efeito quadrático foi evidenciado quando um nível maior de enzima amilolítica foi utilizado na suplementação de novilhas confinadas (TRICARICO et al., 2007).

Em experimento realizado com novilhas de corte em fase de terminação, suplementadas com 580 unidades dextrinizantes de α -amilase por Kg de matéria seca da dieta contendo alta inclusão de milho moído em sua composição, TRICARICO et al. (2007) verificaram aumento na ingestão voluntária de matéria seca na ordem de 4% e de 14% no ganho de peso nos primeiros 28 dias de confinamento. Também um aumento no rendimento de

carcaça, devido a atividade amilolítica induzir o aumento na ingestão de matéria seca pelos animais, gerando uma maior disponibilidade de nutrientes para deposição de tecidos de constituintes da carcaça.

Aumento no ganho de peso diário de cordeiros foi evidenciado por ROJO RUBIO et al. (2005), que avaliando a eficiência no aproveitamento do amido proveniente do grão do sorgo, verificaram melhoria de 13,9% no ganho de peso fornecendo 2,9 g de α -amilase (0,018 unidade de atividade amilolítica/mg) e 1,45 g de glicoamilase (4,19 por unidade de atividade amilolítica/mg) por kg de sorgo na ração.

Em experimento com bovinos confinados e suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas com diferentes fontes de amido (milho e cevada), conduzido por BEAUCHEMIN et al. (1997), não foram encontradas diferenças entre o ganho de peso dos animais que receberam ou não tratamento enzimático com ganhos diários de 1,530 Kg/dia para os animais alimentados com cevada e 1,280 Kg/dia para os que receberam milho, valores abaixo dos ganhos obtidos no presente experimento. Os autores evidenciaram diferença entre as fontes de amido da dieta, sendo os animais alimentados com cevada os que obtiveram melhor desempenho em relação aos que receberam milho, o que segundo os autores foi proveniente da maior digestibilidade apresentada pela cevada na presença das enzimas fibrolíticas, por esta apresentar maior nível de fibra em relação ao milho.

Resultados semelhantes aos do presente experimento foram encontrados por QUEIROZ et al. (2004) que suplementando com hemicelulases e leveduras bovinos Guzará confinados, recebendo ração composta por 24% de milho triturado, 65% de silagem de milho e sorgo e 7% de farelo de algodão com 4% de mistura mineral e uréia, observaram ganho de peso diário de 0,915 Kg/dia, não evidenciando diferença entre os tratamentos com enzima e levedura em relação ao controle.

Em experimento com vacas leiteiras recebendo dieta com alta porcentagem de grãos e suplementadas com produtos com atividade amilolítica, TRICARICO et al. (2005) observaram incremento na produção leiteira utilizando 240 unidades dextrinizantes por kg de matéria seca da ração contendo 27,1% de amido, o mesmo trabalho também foi observado um efeito

quadrático com a inclusão enzimática, em que aplicação de maiores níveis enzimáticos, não resultou em incrementos lineares na produção leiteira.

De acordo com TRICARICO et al. (2005), uma maior produção leiteira de vacas suplementadas com enzimas amilolíticas exógenas pode ser atribuída a maior digestibilidade intestinal do amido, favorecida pelas enzimas, quando passam intactas pelo abomaso. KLINGERMAN et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes suplementando vacas com enzimas amilolíticas exógenas (0,88 mL de enzima/Kg MS), com um aumento na produção leiteira e na digestibilidade da MS em relação ao tratamento controle. Resposta não-linear à suplementação com enzimas amilolíticas exógenas também foi encontrada por SAN EMETERIO et al. (2000) e foi atribuída a interação entre o tratamento enzimático e a microbiota ruminal e uma alteração na proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) formados pelos microrganismos ruminais. Esta mudança na proporção de formação dos AGCC não foi relacionada com aumento na digestibilidade da dieta pelo autor.

4.2 Degradabilidade “*in vitro*” das rações experimentais

TABELA 5 Degradabilidade “*in vitro*” da matéria seca (DIVMS) das dietas experimentais.

Parâmetros*	Tratamentos		
	Controle	UFG	Biofórmula
Fração a (%)	12,11	15,11	20,62
Fração b (%)	63,36	67,58	58,12
Fração c	4,40	3,50	3,22
DE(kp=2%)	55,68	58,12	56,49
DE(kp=5%)	41,78	42,95	43,4
DE(kp=8%)	34,60	35,69	37,31
Lag Time (horas)	3,94	3,67	0,26
FI (%)	24,54	17,31	21,26
DP (%)	75,46	82,69	78,74

Degradabilidade Efetiva (DE), Fração Indegradável (FI), Degradabilidade Potencial (DP)

*Os dados não apresentaram diferença estatística de acordo com teste de identidade de modelos.

Na Figura 6 pode-se observar as curvas de degradação das dietas.

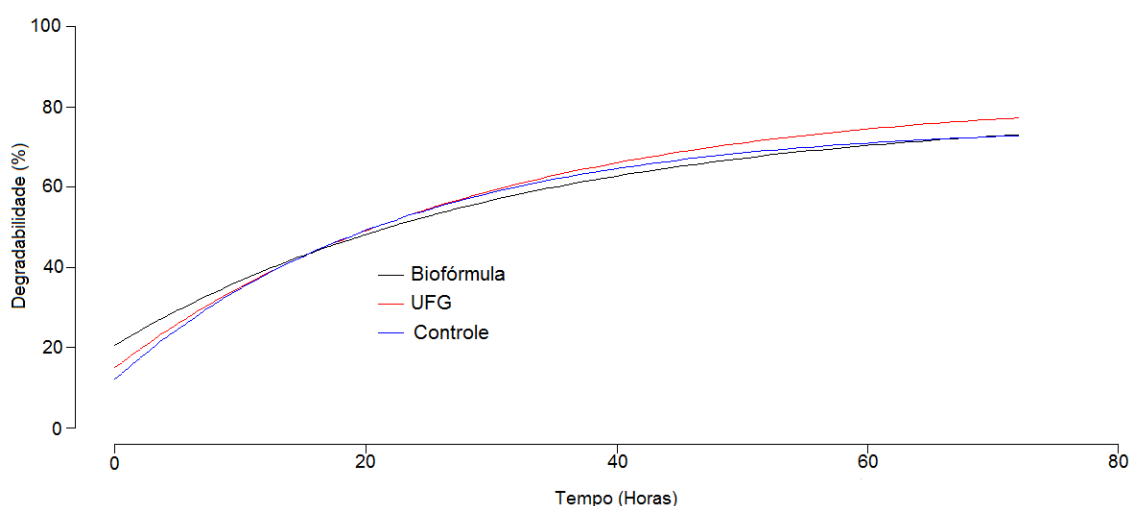


FIGURA 6 Curva da degradabilidade “*in vitro*” da matéria seca (DIVMS) das dietas experimentais

Não houve diferença estatística entre as DIVMS das dietas do presente experimento (Tabela 5), o que juntamente com os dados de consumo, possivelmente explica o fato dos animais não terem apresentado diferença estatística no ganho de peso e conversão alimentar. Resultados semelhantes foram reportados por HRISTOV et al. (2000), HRISTOV et al. (2008), TRICARICO et al. (2005), em que não foi evidenciada diferença estatística ($P < 0,05$) na digestibilidade da matéria seca da dieta de animais tratados com complexo enzimático amilolítico.

ROJO RUBIO et al. (2001) evidenciaram incremento de 64,3% na digestibilidade “*in vitro*” do amido tratados com enzimas amilolíticas exógenas produzidas a partir de cepa de *Bacillus licheniformis*, incubados por 12 horas.

Os efeitos de enzimas exógenas na digestão das dietas incluem a ação hidrolítica direta das enzimas sobre o substrato específico de cada enzima, o aumento da colonização dos alimentos pelos microorganismos ruminais devido ao aumento da superfície específica dos alimentos, elevando com isso a população de microorganismos no rúmen (MCALLISTER et al., 2001; BEAUCHEMIN et al., 2003). Aumentos da taxa de degradação da dieta no rúmen estão relacionados à melhora na colonização dos alimentos em função do tratamento enzimático (COLOMBATTO et al., 2003). Os aditivos enzimáticos também aumentam a disponibilidade de açúcares solúveis que contribuem para o adicional crescimento e multiplicação dos microorganismos. Maior número de bactérias significa digestão mais extensiva da dieta total.

Diferença no consumo de matéria seca não foi observada por HRISTOV et al. (2000) que suplementaram novilhas com complexo enzimático com atividade sobre polissacarídeos incluindo o amido. Uma das justificativas para não se verificar efeito das enzimas sobre a digestibilidade das dietas se deve a proteólise das enzimas exógenas pelas proteases ruminais, uma vez que estas foram adicionadas diretamente no rúmen e pelo aumento da taxa de passagem ruminal. Devido à alta proporção de grãos presente nas dietas, o fluxo da passagem da dieta pelo rúmen provavelmente foi aumentado e a presença de proteases no rúmen pode ter contribuído para não ocorrer uma melhora na digestibilidade da dieta.

4.3 Amido residual fecal e pH fecal

TABELA 6 Amido residual fecal (ARF) e pH fecal.

	Tratamentos			P valor
	Controle	UFG	Biofórmula	
ARF (%)	14,09 ^{a*} ± 0,63	15,06 ^a ± 0,59	14,32 ^a ± 0,46	0,45
pH fecal	5,61 ^{ab} ± 0,04	5,50 ^b ± 0,03	5,71 ^a ± 0,06	0,008

*Médias na mesma linha precedidas por mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

A porcentagem de amido residual fecal não foi influenciada pela suplementação com enzimas amilolíticas exógenas dos tratamentos UFG e Biofórmula (Tabela 6). Uma vez que não houve diferença estatística na porcentagem de amido residual fecal e na DIVMS, isso possivelmente explica o desempenho semelhante entre os tratamentos.

Uma alta inclusão de milho na dieta de bovinos de corte confinados influenciou negativamente a digestibilidade do amido e aumentou o percentual de amido excretado nas fezes (CAETANO et al., 2010).

A excreção de amido nas fezes é influenciada também pela forma de processamento do grão e pelo tipo de cereal oferecido, sendo que a forma como o alimento é tratado pode influenciar na taxa e no local de digestão do amido (HUNTINGTON, 1997). O processamento dos grãos de milho e sorgo como a moagem, a floculação e a laminação promove aumento na digestibilidade total e diminui a excreção fecal de amido nos bovinos pela maior disponibilização dos grânulos desse carboidrato, promovendo assim maior ataque dos microorganismos ruminais e enzimas intestinais no seu substrato, aumentando a sua taxa de digestão, minimizando as perdas pela excreção fecal e promovendo melhor aproveitamento da dieta (YANG et al., 2001, ZINN et al., 2002).

Outro fator que prejudica a quebra dos grânulos de amido nos cereais é a presença da prolamina, uma proteína que tem como função promover a união dos grãos de amido e geralmente tem nomes específicos de acordo com o cereal, como zeína no milho, kafirina no sorgo, aveína na aveia e gliadina no trigo (CHANDRASHEKAR et al., 1999).

No milho, a prolamina está presente no endosperma e tem grande importância na nutrição de ruminantes. Essa proteína constitui de 30 a 60% da proteína do milho e tem como função o envolvimento dos grãos de amido em uma matriz hidrofóbica, impermeabilizando o grânulo e dificultando o acesso das enzimas e microorganismos ao grânulo pela sua baixa degradabilidade ruminal e sua alta hidrofobicidade (NASCIMENTO et al., 2009).

O pH fecal apresenta comportamento inversamente proporcional a digestibilidade e à excreção fecal de amido, conforme relatado por BARAJAS & ZINN (1998) e DEPENDBUSH et al. (2008). Portanto, em dietas com alta inclusão de grãos processados, o amido estará mais prontamente disponível à fermentação ruminal, gerando maior produção de AGCC como o ácido lático, que possui um pKa de 3,85, abaixando rapidamente o pH ruminal.

O tratamento UFG, por conter em sua formulação somente enzimas amilolíticas, apresentou pH mais baixo em relação ao tratamento Biofórmula que além de enzimas possui em sua constituição leveduras e mananoligossacarídeos. As leveduras utilizadas nas dietas de bovinos atuam na remoção do O₂ que chega ao rúmen pelo alimento e saliva, provocando um aumento no número de bactérias celulolíticas viáveis. As bactérias que utilizam o ácido lático são estimuladas pela presença de ácidos dicarboxílicos, diminuindo assim a concentração do ácido lático, com consequente aumento do pH (WALLACE, 1994; NEWBOLD, 2001).

5 CONCLUSÕES

Com os dados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que 48,67 unidades sacarificantes do extrato da fermentação do fungo *Aspergillus awamorii*, bem como cinco gramas do produto comercial contendo complexo multienzimático, leveduras, mananoligossacarídeos e cepas bacterianas na dieta de bovinos confinados não foram eficazes em melhorar o desempenho dos animais.

Mais pesquisas são necessárias para elucidar o nível ideal de aplicação das enzimas para melhorar o desempenho animal.

6 REFERÊNCIAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. 1990. **Official methods of analysis**. 15.ed., Arlington, Virginia. 1117p.
2. BACH KNUDSEN K.E.; JOHANSEN, H.N.; GLITSO, V. Methods for analysis of dietary fibre — advantage and limitations. **Journal Animal Feed Science**,, p. 185–206., 1997.
3. BARAJAS, R.;ZINN, R. A. The feeding value of dry-rolled and steam-flaked corn in finishing diets for feedlot cattle: Influence of protein supplementation. **Journal of Animal Science**. v.76, p.1744–1752, 1998.
4. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science**, v. 75, p. 641-644, 1995.
5. BEAUCHEMIN, K. A.; JONES, S. D. M.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 77, p. 645-653, 1997.
6. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; W, Z. YANG.; McALLISTER, T. A. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd, 1998. Vancouver. **Proceedings...**Vancouver, 1998. 14 p.
7. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D. P.; KAMPEN, R. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 3, p. 543-553, 2000.
8. BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P. D.; YANG, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.
9. BOEL, E.; BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z.; DODSON, G. G.; JENSEN, V. J.; PETERSEN, S. B.; SWIFT, H.; THIM, L.; WOLDIKE, H. F. Calcium binding in α -amylases: An x-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. **Biochemistry**. v.29, p.6244–6249, 1990.
10. BULEÓN, A.; COLONNA, P., PLANCHOT, V. BALL, S. Starch granules: structures and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. Nantes, v. 23, p. 85-112, 1998.
11. CAETANO, M.; NUÑEZ, A. J. C.; LANNA, D. P. D. Teor de amido fecal e desempenho de bovinos de corte. Anais da 47^a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Salvador, 2010.

12. CHANDRASHEKAR, A.; MAZHAR, H. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. **Journal Cereal Science**, v.30, p.193-207, 1999.
13. COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzyme for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628 – 2638, 2003.
14. COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.
15. DE FRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHUR, K. F.; TRICARICO, J. M. Effects of dietary α -amylase on metabolism and performance of transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.12, p.4405-4413, 2005.
16. DEPENDBUSH, B. E.; NAGARAJA, T. G.; SARGEANT, J.M.; DROUILLARD, J. S.; LOE, E. R.; CORRIGAN, M. E. Influence of processed grains on fecal pH, starch concentration, and shedding of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**. v.86, p. 632-639, 2008.
17. FOOD CHEMICAL CODEX. Imprensa Acadêmica Nacional, Washington, DC. 1996
18. FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
19. GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. Jan. 2003. p. 1- 18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>
20. HARGER, C.; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 1982. 56 p.
21. HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**, v. 2, n. 8, p. 1791-1794, 1999.
22. 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.
23. HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T.A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polisacharide-

- degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle feed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, p.477- 487, 2000.
- 24.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**. N. 145, p. 182 – 193, 2008.
 - 25.HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**. v. 75, p.852-867, 1997.
 - 26.KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; McDONELL, E. E.; DERBROSIAN, M. C.; KUNG JUNIOR, L. An evaluation of exogenous enzyme with amylolytic activity for dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1050-1059, 2009.
 - 27.KOZLOSKI, V. G. Bioquímica microbiana ruminal. In: **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFMS, 2009, cap. 1, p. 124p
 - 28.LEADLAY, P.F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82p.
 - 29.LEWIS, G. E.; HUNT, C. W.; SANCHEZ. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3020-3028, 1996.
 - 30.McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, cap 11, p.273-298, 2001.
 - 31.MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959
 - 32.MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap. 13, 222 – 242, 2004.
 - 33.MORGAVI, D. P.; NEWBOLD, C. J.; BEEVER, D. E. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzyme sin rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 171-177, 2000
 - 34.NASCIMENTO, M.L.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E. Fontes de energia em suplementos múltiplos para recria de novilhos mestiços em pastejo durante o período de transição seca/águas: desempenho produtivo e características nutricionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1133-1141, 2009.

35. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York, Worth Publishers, 3 ed. 2002, 977 p.
36. NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; McINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal Nutrition**, v.76, p.249-261, 1996.
37. ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, v.92, n.2, p.499-503, 1979.
38. OWENS, F. N., SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**. v.75, p.868-879, 1997.
39. PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1ª ed. New Delhi: **Asiatech Publishers**, Inc, 2005. 760 p.
40. QUEIROZ, R. C.; BERGAMASCHINE, A. F.; BASTOS, J. F. P.; SANTOS, P. C.; LEMOS, G. C. Uso de produto à base de enzima e levedura na dieta de bovinos: digestibilidade dos nutrientes e desempenho em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.6, p. 1548-1556, 2004.
41. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2010. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
42. REGAZZI, A. J. Teste para identificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não linear. **Revista Ceres**, v. 50, n. 287, p. 9-26, 2003.
43. 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**. Texcoco, v. 35, n. 4, p. 423-427, 2001.
44. 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 Technology** 124, p.655–665, 2005.
45. 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**. Villahermosa n. 23, v. 02, p. 173 – 182, 2007.
46. ROSTAGNO, H. S. Tabelas brasileiras para aves e suínos: **composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2005. 186p.

- 47.SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto. Legis Summa, 2004.
- 48.SAN EMETERIO, F.; REIS, R. B.; CAMPOS, W. E.; SATTER, L. D. Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.12, p.2839-2848, 2000.
- 49.TRICARICO, J. M., J. D. JOHNSTON, K. A. DAWSON, K. C. HANSON, K. R. MCLEOD, AND D. L. HARMON. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **British Society of Animal Science**. v.81, p.365–374, 2005.
- 50.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.
- 51.TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. ^a Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**. v. 145, p 136-150, 2008.
- 52.VAN DE VYVER, W. F. J.; DAWSON, K. A.; CASEY, N. H.; TRICARICO, J. M. Effect of glycosylation on the stability of fungal xylanase exposed to proteases or rumen fluid in vitro. **Animal Feed Science and Technology**. v. 116, p 259-269, 2004.
- 53.VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- 54.WALLACE, R.J. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2992-3003, 1994.
- 55.WALSH, G.; MURPHY, R. A.; KILLEEN, G. F.; POWER R. F. Quantification of supplemental enzymes in animal feedstuffs by radial enzyme diffusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.67 p.70–74, 2005
- 56.WEISS, W.P. Method estimates available energy value for ruminants. **Feedstuffs**, p.13-14, 1993.
- 57.YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on

rumen pH and digestion by dairy cows. **Journal of Dairy Science.** v.84, p.2203-2216, 2001.

58. ZINN, R. A.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **Journal of Animal Science.** v.80, p.1145-1156, 2002.