JOHNNY MACIEL DE SOUZA

**Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica
para bovinos de leite: Efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema
ruminal**

Pirassununga
2019

JOHNNY MACIEL DE SOUZA

Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica para bovinos de leite: Efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema ruminal

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro

Coorientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2019

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3814
FMVZ

Souza, Johnny Maciel de
Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica para bovinos de leite: efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema ruminal / Johnny Maciel de Souza. – 2019.
139 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Aditivos zootécnicos. 2. Eficiência. 3. Fermentação ruminal. 4. Probiótico. 5. Ruminantes. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica para bovinos de leite: Efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema ruminal", protocolada sob o CEUA nº 7551070817, sob a responsabilidade de **Júlio Cesar de Carvalho Balieiro e equipe; Johnny Maciel de Souza; Francisco Palma Rennó** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 25/10/2017.

We certify that the proposal "Supplementation with live cultures of *Aspergillus oryzae* and fibrolytic enzyme for dairy cattle: Effects on metabolism, kinetics and rumen ecosystem", utilizing 8 Bovines (8 females), protocol number CEUA 7551070817, under the responsibility of **Júlio Cesar de Carvalho Balieiro and team; Johnny Maciel de Souza; Francisco Palma Rennó** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/25/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2017** a **01/2018** Área: **Biologia Molecular**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 anos**

N: **8**

Linhagem: **Vacas Holandesas fistuladas**

Peso: **400 a 600 kg**

Resumo: A digestibilidade da parede celular é o principal fator limitante do valor nutritivo de forragens. Assim, a utilização de aditivos que possam favorecer a digestibilidade da fibra é de grande importância para ruminantes. O objetivo da presente pesquisa consiste em avaliar o efeito da suplementação com culturas vivas do fungo *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica sobre a digestibilidade da fibra, cinética e ecossistema ruminal de vacas alimentadas com silagem de milho. Experimento 1: será realizada a avaliação da composição química e perfil fermentativo de silagens inoculadas com doses de enzimas fibrolíticas (0, 1,3 e 2,6g/kg MS, Fibrozime®, Alltech) no processo de ensilagem da cana-de-açúcar (alta e baixa DFDN) em diferentes tempos de ensilagem (0, 30, 60 e 120d). O delineamento será em DIC, com 24 tratamentos e 3 repetições por tratamento. Experimento 2: cujo objetivo é avaliar a digestibilidade in vitro da MS (DIVMS) e FDN (DIVFDN), através de ensaio de cinética fermentativa e degradação in vitro, de diferentes fontes volumosas (silagem de cana-de-açúcar de milho), em resposta à adição de doses de culturas vivas do fungo *A. oryzae* (0, 1 e 2g) ou doses de enzima fibrolítica (0, 8, 16 e 24g), ou a combinação de ambos aditivos. O delineamento será em DIC, com 24 tratamentos com 3 repetições por tratamento. Experimento 3, com o objetivo de quantificar o efeito da inclusão de *A. oryzae*, enzima fibrolítica (melhores doses obtidas no Experimento 2) e combinação de ambos sobre o consumo de MS, taxa de digestão e passagem ruminal da FDN, fermentação ruminal, e composição da população de bactérias ruminais. Serão utilizados 8 vacas Holandesas, canuladas no rúmen. As rações experimentais serão compostas de 50% de volumoso na MS, a base de silagem de milho. O delineamento será de dois quadrados latinos 4x4 contemporâneos, com 4 tratamentos e 8 repetições por tratamento.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) e Laboratório de Genômica Funcional, do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZUSP), em Pirassununga.

São Paulo, 09 de maio de 2018

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Prof. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Johnny Maciel

Título: Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica para bovinos de leite: Efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema ruminal

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Janaina Cristina, que de uma forma muito especial e carinhosa me deu força e coragem, apoiando-me em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Moreira de Souza (em memória) e Maria das Graças Maciel de Souza, meus maiores exemplos, pelo grande carinho, apoio, compreensão, que, apesar de todas as dificuldades e obstáculos ao longo de suas vidas, me proporcionaram uma educação essencial e imprescindível para me tornar a pessoa que sou hoje. E toda minha família, pelo apoio incondicional, à minha irmã, Rosi, e às minhas sobrinhas Yasmin e Ingrid, amo vocês.

À minha esposa, Janaina Cristina da Silva Maciel de Souza, um agradecimento muito especial, por todo apoio e incentivo nos momentos difíceis, todo carinho, amizade e atenção, e por me tornar um homem mais feliz a cada dia que passa. Você me fez seguir em frente, seguir batalhando pelo que acredito, se não fosse pelo teu apoio talvez não chegaria ao final desta etapa, você foi fundamental para a conclusão deste trabalho, te amo muito.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, que aceitou me orientar, mesmo sabendo que não seria fácil realizar este estudo. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e a possibilidade de realizar este trabalho que tanto queria, sempre presente nos momentos de dúvida. Muito obrigado por todos os ensinamentos, dedicação e compreensão em todos os momentos ao longo deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com você.

Agradecimento mais que especial para Lígia Garcia Mesquita, a especialista do Laboratório de Genômica Funcional, por todo o apoio, paciência, amizade, dedicação e por todos os ensinamentos e auxílio nesta pesquisa. Tua ajuda e amizade foram fundamentais para conclusão deste trabalho. Te considero uma grande amiga, e você será uma das pessoas que mais sentirei falta em Pirassununga.

Aos meus grandes amigos da Pós-Graduação, Tiago Del Valle, Lucas Ghizzi, Júlia Marques e Mauro Sérgio, agradeço por toda ajuda durante o experimento, não tenho palavras para agradecer todo auxílio durante o experimento, muito obrigado.

Aos amigos que fiz durante o período de experimento, que me ajudaram diretamente na conclusão das atividades: Lucas Sakamoto e Alanne Tenório, muito obrigado pela amizade e apoio durante o experimento.

Às alunas Camila Perruchi, Amanda Alcântara e Ester, que foram fundamentais na conclusão das análises laboratoriais, não tenho palavras para expressar minha gratidão, muito obrigado por todo auxílio laboratorial que vocês proporcionaram.

Ao meu grande amigo Dannylo Sousa, por todo o apoio e auxílio ao longo desses anos de amizade, muito obrigado por tudo.

Aos meus grandes amigos Renan Dutra, Lucas Toffoli e Luis Henrique pela amizade e todo apoio ao longo dessa jornada.

Ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, coordenado Prof. Francisco Palma Rennó, por disponibilizar toda infraestrutura e condições necessária para que o experimento fosse conduzido. Estendo meus agradecimentos aos funcionários por todo o auxílio durante o experimento: Diogo Martinelli, Lucas, Carlos Schmidt, Denis, Marcos José, Lupercio Marchetti (Toco), Fernandes Marques, Wilson, Maida (Bigode). Muito obrigado a todos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) pela oportunidade de realização deste trabalho. E a todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal - VNP.

A todos os funcionários do VNP. Em especial, aos secretários João Paulo e Alessandra pela disponibilidade e atenção de sempre; e à Renata e Ana, do laboratório de bromatologia do VNP. A vocês meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, e o doutorando João Paulo, da UNESP de São José do Rio Preto, pelo auxílio na produção em larga escala do fungo em biorreator. Agradeço imensamente pela disposição, teu auxílio foi fundamental para o início dos experimentos.

À Alltech, pela doação da enzima fibrolítica utilizado durante o estudo.

Ao Laboratório de Instrumentação do CENA pelas avaliações de Cobalto.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto e Dra. Marília Milanetto pelo auxílio nas análises de atividade enzimática.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2017/11537-6), que foi fundamental para que a realização deste estudo fosse possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo fornecimento da bolsa de estudo no início do doutorado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste trabalho, muito obrigado.

EPÍGRAFE

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

SOUZA, J. M. **Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica para bovinos de leite: Efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema ruminal** (Supplementation with live cultures of *Aspergillus oryzae* and fibrolytic enzyme for dairy cattle: Effects on metabolism, kinetics and rumen ecosystem). 2019. 139 p. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica sobre a digestibilidade da fibra, cinética e ecossistema ruminal de vacas em lactação. Experimento 1: foi realizada a avaliação da composição química e perfil fermentativo de silagens inoculadas com doses de enzimas fibrolíticas (0, 1,3 e 2,6g/kg MS, Fibrozime®, Alltech) no processo de ensilagem de cana-de-açúcar (alta e baixa digestibilidade da FDN) e de milho em diferentes tempos de ensilagem (30, 60 e 120d). O delineamento foi DIC, com 27 tratamentos e 3 repetições por tratamento. A inclusão de enzima fibrolítica, assim como o aumento do tempo de ensilagem, promoveram o aumento nos conteúdos de FDN e FDA, e redução da digestibilidade da FDN das silagens de cana-de-açúcar, acompanhado de aumento de perdas de MS por efluentes, e redução da recuperação de matéria seca, sem efeito na silagem de milho. Experimento 2: o objetivo foi avaliar a digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN), através de ensaio de cinética fermentativa e produção de gases *in vitro*, de volumosos (silagem de milho e de cana-de-açúcar), em resposta à adição de doses de *A. oryzae* (0, 1, 3 e 5g/100ml) ou doses de enzima fibrolítica (0, 8, 16 e 24g/100ml), ou a combinação de ambos. O delineamento foi em DIC, com 32 tratamentos com 3 repetições por tratamento. A inclusão de *A. oryzae* aumentou a DIVFDN e DIVMS, independentemente do volumoso. A maior dose do fungo aumentou a produção potencial de gases na silagem de cana. A enzima fibrolítica elevou a DIVFDN e DIVMS apenas na silagem de milho, aumentou o volume final de gases e reduziu o tempo de colonização, independente da dose. Experimento 3, com o objetivo de quantificar o efeito da inclusão de *A. oryzae* (5g/animal/d), enzima fibrolítica (24g/animal/d) e combinação de ambos sobre o consumo de MS, taxa de digestão e passagem ruminal da FDN, fermentação ruminal, e composição da população de bactérias ruminais, foram utilizadas 8 vacas em lactação, da raça Holandesas, canuladas no rúmen. As rações experimentais foram compostas de 61% de volumoso na MS, a base de silagem de milho. O delineamento foi de dois quadrados latinos 4x4 contemporâneos, com 4 tratamentos e 8 repetições por tratamento. Os aditivos elevaram o

consumo de MS e FDN potencialmente degradável, em comparação ao controle. Não houve efeito sobre a produção de leite, mas o tratamento com o fungo elevou a gordura do leite. O tratamento com fungo e sua combinação com enzima fibrolítica elevaram a concentração de acetato ruminal. O tratamento com o fungo, assim como sua combinação com a enzima fibrolítica, elevaram a digestibilidade ruminal da FDN e FDNpd. Foi observado aumento da taxa de digestão ruminal da FDN nos tratamentos com fungo e a combinação com enzima fibrolítica. Os aditivos apresentaram potencial para modular a fermentação ruminal, onde a combinação do fungo com a enzima apresentou resultados positivos sobre os parâmetros de digestibilidade ruminal da fibra.

Palavras-chave: Aditivos. Eficiência. Fermentação ruminal. Probiótico. Ruminantes.

ABSTRACT

SOUZA, J. M. **Supplementation with live cultures of *Aspergillus oryzae* and fibrolytic enzyme for dairy cattle: Effects on metabolism, kinetics and rumen ecosystem** (Suplementação com culturas vivas de *Aspergillus oryzae* e enzima fibrolítica para bovinos de leite: Efeitos sobre o metabolismo, cinética e ecossistema ruminal). 2019. 139 p. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

This study aimed to evaluate the effects of supplementation with live cultures of *Aspergillus oryzae* and fibrolytic enzyme on fiber digestibility, kinetics and rumen ecosystem of lactating cows. Experiment 1: the chemical composition and fermentative profile of silages inoculated with doses of fibrolytic enzymes (0, 1,3 e 2,6g/kg MS, Fibrozime®, Alltech) at ensiling of sugarcane varieties and corn, in different ensilage periods (30, 60 e 120d), was evaluated. The design was completely randomized (CRD), with 27 treatments and 3 repetitions by treatment. The inclusion of fibrolytic enzyme, as well as increased silage time, promoted the increase of NDF and ADF contents, and the reduction of NDF digestibility of sugarcane silages, accompanied by increased losses of DM by effluents and reduction of dry matter recovery, with no effect on corn silage. Experiment 2: the objective was to evaluate the *in vitro* digestibility of DM and NDF by fermentative kinetics and *in vitro* gas production of roughage (corn and sugarcane silage) in response to the addition of live cultures doses of *A. oryzae* (0, 1, 3 and 5g/100ml) or doses of fibrolytic enzyme (0, 8, 16 and 24g/100ml), or the combination of both. The design was completely randomized (CRD), with 36 treatments and 3 repetitions by treatment. The inclusion of *A. oryzae* increased IVDNDF and IVDDM, regardless of the roughage. The higher dose of the fungus increased the potential gas production in sugarcane silage. The fibrolytic enzyme elevated IVDNDF and IVDDM only in corn silage, increased the final volume of gases and reduced colonization time, regardless of the dose. Experiment 3: in order to quantify the effect of the inclusion of *A. oryzae* (5g/animal/d), fibrolytic enzyme (24g/animal/d) and combination of both on DM intake, digestion rate and ruminal passage of NDF, ruminal fermentation, and population composition of ruminal bacteria, eight ruminal-cannulated Holstein cows were used. The experimental diets was composed of 61% roughage in DM, containing corn silage. The design was two contemporary 4x4 Latin squares, with 4 treatments and 8 repetitions per treatment. The additives increased the consumption of DM and NDF potentially degradable fraction in comparison to the control. There was no effect on milk production, but treatment with the fungus raised the milk fat content. *A. oryzae* and its

combination with fibrolytic enzyme increased the ruminal acetate concentration, and increased ruminal digestibility of NDF and pdNDF. An increase in the ruminal digestion rate of NDF was observed in treatments with fungus and the combination with fibrolytic enzyme. The additives had the potential to modulate the ruminal fermentation, where the combination of the fungus with the enzyme presented positive results on the ruminal digestibility parameters of the fiber.

Keywords: Additions. Efficiency. Ruminal fermentation. Probiotic. Ruminants.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CARACTERÍSTICAS DO RÚMEN COMO CÂMARA FERMENTATIVA	18
2.2 MICRORGANISMOS RUMINAIS	19
2.3 MANIPULAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL	24
2.4 ADITIVOS E MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	27
2.4.1. Enzima fibrolítica	27
2.4.2. <i>Aspergillus oryzae</i>	32
3. OBJETIVOS GERAIS	34
4. REFERÊNCIAS	35
5. EFEITO DA INCLUSÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PERFIL FERMENTATIVO DE SILAGENS	48
5.1. INTRODUÇÃO	48
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	50
5.2.1. Tratamentos e Delineamento Experimental	50
5.2.2. Ensilagem e Amostragem	50
5.2.3. Análises Bromatológicas e Cálculos	51
5.2.4. Forma de Análise dos Resultados	53
5.3. RESULTADOS	55
5.3.1. Pré-ensilagem	55
5.3.2. Composição Química	55
5.3.3. Parâmetros Fermentativos	60
5.3.4. Perdas e Recuperação de MS	63
5.3.5. Estabilidade Aeróbia	66
5.4. DISCUSSÃO	69
5.4.1. Pré-ensilagem	69
5.4.2. Composição Química das silagens e Perdas de MS	69
5.4.3. Parâmetros Fermentativos	72
5.4.4. Estabilidade Aeróbia	73
5.5. CONCLUSÕES	74
5.6. REFERÊNCIAS	75
6. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA FIBRA DE VOLUMOSOS, PRODUÇÃO DE GASES, DEGRADABILIDADE DA MATÉRIA SECA E CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA E ÁCIDOS GRAXOS	83
6.1. INTRODUÇÃO	83

6.2.	MATERIAL E MÉTODOS	85
6.2.1.	Animais	85
6.2.2.	Substrato.....	85
6.2.3.	Preparação do inócuo	86
6.2.4.	Bionsaios de metanogênese e cinética fermentativa	87
6.2.5.	Análises laboratoriais	89
6.2.6.	Delineamento experimental e análise estatística.....	89
6.3.	RESULTADOS.....	90
6.4.	DISCUSSÃO	97
6.5.	CONCLUSÕES	100
6.6.	REFERÊNCIAS.....	101
7.	CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E CINÉTICA RUMINAL DE BOVINOS DE LEITE ALIMENTADOS COM SILAGEM DE MILHO, COM OU SEM INCLUSÃO DE CULTURAS DE <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> OU ENZIMA FIBROLÍTICA.	108
7.1.	INTRODUÇÃO	108
7.2.	MATERIAL E MÉTODOS	110
7.2.1.	Animais, delineamento e dietas experimentais	110
7.2.2.	Procedimentos experimentais e coleta de amostras.....	111
7.2.3.	Análises laboratoriais	113
7.2.4.	Cálculos.....	115
7.2.5.	Forma de análise dos resultados.....	116
7.3.	RESULTADOS.....	117
7.3.1.	Consumo e produção de leite	117
7.3.2.	Parâmetros fermentativos e metabólitos sanguíneos	118
7.3.3.	Índice de seleção.....	119
7.3.4.	Comportamento ingestivo	120
7.3.5.	Fluxo de nutrientes e digestibilidade aparente ruminal e total	120
7.3.6.	Dinâmica ruminal e microbiota ruminal.....	121
7.3.7.	Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana.....	123
7.4.	DISCUSSÃO	125
7.5.	CONCLUSÕES	130
7.6.	REFERÊNCIAS.....	130

1. INTRODUÇÃO

A principal função dos volumosos nas dietas para ruminantes é fornecer fibra, uma fonte de carboidratos utilizada na obtenção de energia pelos microrganismos ruminais, além de ser essencial para estimular a mastigação, produção de saliva e ruminação (MERTENS, 2001).

Visto a importância da fibra, pesquisas têm sido realizadas visando aumentar sua digestibilidade, com o intuito de potencializar a eficiência de utilização dos alimentos fibrosos pelos ruminantes. Dentre os aditivos existentes no mercado voltados para melhoria da eficiência produtiva, tem-se as enzimas fibrolíticas e os probióticos. Um meio de maximizar a utilização do alimento fibroso seria através do aumento na quantidade de enzimas fibrolíticas presentes no rúmen, celulasas e hemicelulasas, o que pode ser conseguido através da suplementação com enzimas fibrolíticas exógenas (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Estudos relatam melhorias em ganho de peso (McALLISTER et al., 1999), digestibilidade da MS e FDN (OZDUVEN et al.; 2010; ELWAKEEL et al., 2007) em resposta ao tratamento com enzimas fibrolíticas. Entretanto, alguns estudos não apresentaram resultados positivos similares com a utilização destas enzimas (ZOBELL et al., 2000; KRUEGER et al., 2008).

Beauchemin et al. (1995) observaram que a resposta das enzimas fibrolíticas na dieta de bovinos de corte foi dependente da fonte de volumoso, sendo que a aplicação de um produto enzimático a base de xilanase e celulase resultou em aumento de 30% no ganho média diário de novilhos de corte alimentados com feno de alfafa, mas sem efeito quando aplicado na silagem de cevada. Contudo, Zilio et al. (2018) ao suplementar vacas leiteiras com enzima fibrolítica não observaram efeito sobre o consumo de nutrientes, produção de leite e digestibilidade da fibra.

Além disso, a adição de enzimas fibrolíticas no processo de ensilagem tem sido objeto de estudo de trabalhos recentes (OZDUVEN et al., 2010; LI YING et al. 2017), pelo fato de interferir no perfil fermentativo e alterar positivamente a composição bromatológica da forrageira ensilada, principalmente na redução dos conteúdos de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA), contribuindo assim para maior consumo e eficiência digestiva da MS (CYSNEIROS et al., 2006).

Por depender de condições favoráveis específicas para sua ação, tais como temperatura e pH (MORGAVI et al., 2000), as respostas positivas em função da suplementação com enzimas dependem de fatores como composição da dieta, método de aplicação e nível utilizado, especificidade ao substrato e tipo de complexo enzimático utilizado, bem como as condições

ruminais, como tempo de retenção e susceptibilidade a proteólise, que podem afetar a estabilidade ruminal das enzimas limitando sua atividade sobre a digestibilidade da fibra (MORGAVI et al., 2000; MEALE et al., 2014). Assim, os resultados de pesquisa com enzima fibrolítica têm se mostrado inconsistentes, sendo que a forma de ação das enzimas sobre a degradação da fibra não é totalmente entendida.

Neste contexto, outra alternativa viável seria a utilização de microrganismos vivos na alimentação de ruminantes, com o intuito de elevar a eficiência de utilização da dieta pelos ruminantes. Além de bactérias, culturas vivas de fungos, como *Aspergillus oryzae*, também são explorados como agentes de manipulação da fermentação ruminal (SOSA et al., 2011, SUN et al., 2014).

A utilização de *A. oryzae* na dieta tem gerado muito interesse, principalmente pelo seu potencial na degradação da fibra (REIS et al., 2006; SUN et al., 2014). Há relatos de que o efeito do *A. oryzae* deve-se, em parte, à produção de enzimas polissacaridases (celulase e xilanase), cuja ação interfere na degradação da parede celular (NEWBOLD et al., 1992). Além disso, há indícios de que este fungo pode facilitar a aderência de bactérias fibrolíticas à fibra, favorecendo a degradação da fibra (NEWBOLD, 1997, SOSA et al., 2011), estimulando os microrganismos ruminais fibrolíticos (WIEDMEIER et al., 1987, SUN et al., 2014) ou consumidores de lactato (BEHARKA; NAGARAJA, 1998). Concomitantemente, estudos indicam aumento no consumo de matéria seca em animais suplementados com *A. oryzae* (CATON et al., 1993, LATIF et al., 2014).

Gomez-Alarcon et al. (1991) relataram aumento da digestibilidade ruminal e do trato total das frações fibrosas ao suplementar vacas holandesas com 3 g/dia de *A. oryzae*, além de aumentar a taxa de fermentação ruminal da alfafa. Já Caton et al. (1993) observaram aumento no consumo de forragens ao suplementar com *A. oryzae*, sem efeitos significativos sobre a digestibilidade da MS, concentração de ácidos graxos e pH ruminal. Sun et al. (2017) observaram aumento na proteína microbiana e produção total de ácidos graxos, sem efeitos sobre o consumo de matéria seca em vacas leiteiras recebendo culturas de *A. oryzae*. No entanto, Chiquette (1995) descreve que a adição de *A. oryzae* na dieta de novilhos de corte não alterou o consumo de MS e digestibilidade ruminal e do trato total.

Com base nos dados apresentados, tanto a enzima fibrolítica quanto extratos e culturas vivas do fungo *A. oryzae* apresentam efeitos significativos na digestibilidade da fibra. Porém, apesar de relatos positivos da adição de enzimas e *A. oryzae* na dieta de bovinos, assim como a adição de enzima fibrolítica no processo de ensilagem, os resultados são bastante inconsistentes. O mecanismo de ação, e a especificidade do substrato, bem como efeito dose resposta, são

pouco compreendidos para ambos aditivos, havendo ainda necessidade de mais estudos elucidativos, avaliando o efeito da suplementação de ambos os aditivos em dietas à base de silagem de milho sobre a digestibilidade da fibra.

Neste contexto, com base em nosso conhecimento, estudos avaliando o fluxo de nutrientes, bem como a cinética de degradação da fibra no ambiente ruminal, são escassos, e não há trabalhos avaliando ambos os aditivos em conjunto e seus efeitos sobre a digestibilidade da fibra. Portanto, o objetivo da presente pesquisa consiste em avaliar o efeito da suplementação com culturas vivas do fungo *A. oryzae* e também de enzima fibrolítica exógena (Fibrozyme®Alltech) sobre a digestibilidade da fibra, consumo, cinética e ecossistema ruminal de vacas holandesas alimentadas com silagem de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO RÚMEN COMO CÂMARA FERMENTATIVA

Os ruminantes, ao longo de sua evolução, desenvolveram características anatômicas simbióticas, que lhes permitiram utilizar eficientemente carboidratos estruturais como fonte de energia e compostos nitrogenados não-proteicos como fonte de proteína. O sucesso evolutivo desses animais pode ser atribuído, principalmente, ao desenvolvimento do processo de fermentação pré-gástrica (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

O rúmen é um ecossistema complexo e aberto no qual o alimento consumido pelo ruminante é fermentado por ação dos microrganismos ruminais. A fermentação em ruminantes é resultado da atividade física e microbiológica, que converte os componentes dietéticos a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana (Pmic) e vitaminas do complexo B e vitamina K, metano e dióxido de carbono, amônia, nitrato, dentre outros (OWENS; GOETSCH, 1993).

Espécies de microrganismos ruminais possuem uma série de interações complexas, fazendo do ruminante um dos melhores exemplos de simbiose entre microrganismos na natureza (WEIMER, 1998). A manutenção de uma população microbiana ativa no ambiente ruminal depende de algumas características do órgão, essenciais para o desenvolvimento da mesma que são mantidas pelo animal hospedeiro, tais como a remoção dos produtos da fermentação, tamponantes via saliva por meio da ruminação para contribuir com a manutenção do pH ruminal, temperatura, anaerobiose, dentre outros fatores que proporcionam condições ideais para o crescimento da microbiota.

Os ruminantes diferem dos outros mamíferos pelo fato de o alimento sofrer fermentação microbiana no rúmen antes de alcançar o estômago verdadeiro e intestino. Tal processo de fermentação ocorre no rúmen, devido à atividade microbiana na degradação de carboidratos como a celulose, que não pode ser utilizada pelo animal sem ação destes microrganismos ruminais. Outros compostos, como proteínas e ácidos orgânicos, também são utilizados pela microbiota, resultando nos principais produtos da fermentação, que são os ácidos graxos de cadeia curta, além de dióxido de carbono, metano, amônia e proteína microbiana (BRYANT, 1959).

Para a manutenção e o bom desenvolvimento de uma população microbiana ruminal ativa, os animais devem manter o ambiente ruminal com condições adequadas. Nesse contexto, o ambiente ruminal apresenta características favoráveis ao desenvolvimento contínuo de

microrganismos, tornando-o um local ideal para fermentação, sendo um ambiente anaeróbio, com temperatura oscilando entre 38 a 42°C (média de 39°C), com pH ruminal variando entre 5,5 a 7,0, dentre outros fatores, além da remoção contínua dos produtos de fermentação (KOZLOSKI, 2002; LANA, 2005). Valores de pH ruminal abaixo de 6,0 podem inibir a ação de bactérias fibrolíticas e reduzir significativamente a eficiência de síntese de proteína microbiana.

O potencial redox no rúmen está usualmente entre -250 e -450 mV, refletindo ausência de oxigênio e o excesso de potencial redutor (VAN SOEST, 1994). Em virtude dessa característica do ambiente ruminal, as opções metabólicas dos microrganismos se tornam limitadas, sendo que esses são obrigados a trabalhar com esse excesso de equivalentes redutores (NADH), utilizando-os em uma variedade de reações. Para dispor destes compostos, eles reduzem todos os compostos disponíveis, sendo o CO₂ reduzido a metano, sulfatos e nitratos a sulfetos e amônia e ácidos graxos insaturados em saturados. Apesar desse excesso de compostos redutores, o crescimento microbiano permanece limitado pela disponibilidade de ATP (OWENS; GOETSCH, 1993).

Devido ao seu papel na degradação da parede celular das plantas, a dinâmica das populações de bactérias fibrolíticas ruminais em resposta à mudanças dietéticas têm recebido grande atenção da comunidade científica. Grande parte do conhecimento atual sobre o metabolismo ruminal foi obtida através do estudo *in vitro* de espécies bacterianas, a maioria das quais foram isolados nas primeiras décadas da microbiologia ruminal, sendo que as alterações na composição da microbiota ruminal em função de diferentes tratamentos foram monitoradas por técnicas baseadas no cultivo de microrganismos (HUNGATE, 1966; KRAUSE; RUSSELL, 1996). Entretanto, limitações inerentes da técnica e o desenvolvimento de métodos de detecção moleculares mais sensíveis e acurados têm trazido novos desenvolvimentos na área. Tajima et al. (2001) utilizaram a técnica de quantificação relativa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), com o intuito de avaliar o efeito da dieta no tamanho da população de *F. succinogenes* e *R. flavefaciens*. O maior conhecimento a respeito da população de bactérias fibrolíticas no rúmen permitirá o entendimento sobre as capacidades de digestão de fibra em ruminantes.

2.2 MICRORGANISMOS RUMINAIS

A microbiologia ruminal ampliou o conhecimento acerca da ecologia microbiana e, com base nas características dos diferentes microrganismos ruminais, melhorou o aproveitamento

da dieta ofertada e, dessa forma, promovendo melhor desempenho animal (MORGAVI et al., 2013).

Grande concentrações de microrganismos podem ser encontrados no ambiente ruminal (KRAUSE; RUSSELL, 1996), principalmente bactérias (10^{10} - 10^{11} células/mL), protozoários (10^4 - 10^6 /mL), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 zoospóro/mL) e bacteriófagos (10^8 - 10^9 /mL) (KAMRA, 2005). Para Belanche et al. (2012) as interações entre esses grupos microbianos, fermentação ruminal e metabolismo do hospedeiro ainda não são totalmente compreendidos, apesar da riqueza de conhecimento que foi adquirida nos últimos anos.

Dentre estes microrganismos, as bactérias representam o grupo microbiano mais importante e diversificado no ambiente ruminal e desempenham um papel importante na degradação biológica de carboidratos. Tais microrganismos são classificados de acordo com sua principal atividade metabólica no ambiente ruminal. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus flavefaciens* são reconhecidas como as principais bactérias fibrolíticas encontradas no rúmen, responsáveis pela degradação da fibra e apresentam uma interação positiva entre elas (FOSBERG et al., 1997; FORSTER et al., 1997; SHINKAI; KOBAYASHI, 2007; WANAPAT; CHERDTHONG, 2009). Tais microrganismos hidrolisam a celulose, por meio de complexos enzimáticos denominados celulasas. As celulasas da maioria dos microrganismos fibrolíticos estão associadas às células, aderidas firmemente às partículas fibrosas do conteúdo ruminal. Em animais submetidos a dietas a base de grãos, o pH ruminal pode decrescer, inibindo o crescimento das bactérias fibrolíticas. As espécies fibrolíticas produzem, principalmente, acetato, propionato, butirato, succinato, formato, CO_2 e H_2 . A bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* fermenta tanto celulose quanto hemicelulose (ARCURI et al., 2011).

Além das fibrolíticas, tem-se as bactérias amilolíticas (*Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*), proteolíticas (*Prevotella spp.*), lipolíticas (*Anaerovibrio lipolytica*), produtoras de lactato (por exemplo, *S. bovis* e *S. ruminantium*) e consumidoras de lactato (*Megasphaera elsdenii*) (BELANCHE et al., 2012). Além destes microrganismos, há ainda o importante grupo de organismos *Archaea*, distintos filogeneticamente de bactérias, cujos principais representantes no rúmen são os metanogênicos, responsáveis pela produção de um subproduto da fermentação ruminal, o metano (CH_4) (HINDRICHSEN; KREUZER, 2009). Importante ressaltar que a produção deste gás viabiliza o funcionamento do rúmen, pelo fato de servir como um dreno para hidrogênio, fundamental bioquimicamente para a regeneração de cofatores, como NAD^+ e NADP^+ , essencial para a manutenção de todo o conjunto de processos fermentativos no rúmen.

Além das bactérias, outro grupo de microrganismos ruminais importantes são os fungos, que estão diretamente relacionados com a digestão da fibra pelo fato de produzir enzimas com atividade para degradação dos componentes fibrosos, como celulose, hemicelulose e lignina (CERDÀ, 2003). Os fungos anaeróbios obrigatórios foram primeiramente relatados por Orpin (1975), onde foi descoberto que o microrganismo flagelado *Neocallimastix frontalis*, que acreditava-se ser um protozoário (BRAUNE, 1913), era na verdade um zoósporo fúngico da subclasse dos zigomicetos. A partir de então os estudos envolvendo o papel dos fungos no metabolismo ruminal foram impulsionados. Cinco gêneros de fungos anaeróbios são reconhecidos: *Neocalimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces* e *Caecomyces*, os quais se diferem quanto a morfologia do talo e pelo número de flagelos por zoósporo (XIMENES, 2003).

Tais microrganismos são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas, possibilitando a degradação de um espectro maior de substratos quando comparado às bactérias ruminais (SELINGER; FOSBERG; CHENG, 1996; XIMENES, 2003). Dentre as enzimas, tem-se celulasas, xilanases, mananases, pectinases, b-glucanases, b-glucosidases, acetil-xilana esterases e esterases fenólicas, podendo estar presentes em forma de um complexo multiproteico de alta massa molecular similar aos celulosossomas presentes em bactérias ruminais anaeróbias (LI et al., 1997; XIMENES, 1999), apresentando assim grande capacidade para degradar a parede celular das forrageiras. Em função desta gama de enzimas produzidas, há indícios de que os fungos são essenciais na degradação da fibra pelo fato de acelerar a degradação da celulose e hemicelulose lignificadas (CERDÀ, 2003).

Além da ação enzimática, os fungos apresentam uma ação física sobre a fibra em função dos rizoides, que penetram na partícula fibrosa lignificada, desestruturando parede celular e, conseqüentemente, aumentando a área de superfície de ação, e assim favorecendo de forma indireta o desenvolvimento de outros microrganismos ruminais (PAUL et al., 2004). Lee et al. (2000) observaram aumento na digestibilidade dos nutrientes e aumento do número de fungos ruminais em resposta à administração de culturas de fungos anaeróbios no rúmen de ovinos.

Além dos fungos anaeróbios, habitam o ambiente ruminal fungos aeróbios, que também exercem efeito significativo sobre a digestibilidade da fibra. A ocorrência de fungos aeróbios no rúmen tem sido pouco descrita na literatura científica. Almeida et al. (2014) avaliaram a atividade celulolíticas de fungos aeróbios ruminais de bovinos leiteiros recebendo forragens tropicais, e observaram que, dos 49 isolados avaliados, o gênero *Aspergillus* foi predominante (27 isolados), seguido dos gêneros *Gliocladium spp.* (4 isolados), *Paecilomyces spp.* (6

isolados) *Rhizopus spp.* (9 isolados) e *Scedosporium* (3 isolados), ao passo que o *Aspergillus* apresentou maior atividade celulolítica.

Os fungos apresentam grande potencial em elevar a degradabilidade ruminal da fibra, possibilitando assim sua utilização como probiótico na dieta dos ruminantes. Estudos têm apontado grande potencial na utilização de culturas vivas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e *Aspergillus oryzae* como suplementos na dieta de ruminantes, promovendo melhoras no desempenho, ganho de peso e produção de leite, em aproximadamente 7 a 8% (GOES et al. 2005, OLIVEIRA et al. 2008).

Além de uma relação benéfica recíproca, denominada simbiose mutualística, casos de predação, competição, mutualismo e antibiose são exemplos de outras interações entre os microrganismos ruminais. Consequentemente, qualquer estratégia de manipulação da fermentação ruminal deve levar em consideração estes aspectos ecológicos (ARCURI et al., 2011).

As características do rúmen como câmara de fermentação, em consequência das condições alimentares, podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos ruminais (BRYANT, 1959; HUNGATE, 1966). Dentre estes fatores, o pH ruminal é um dos mais importantes, pelo fato de as bactérias fibrolíticas serem muito sensíveis à variação de pH (MIRON et al., 2001; SUNG et al., 2007). Estudos anteriores com microbiologia ruminal demonstraram que as bactérias fibrolíticas tem predileção de crescimento em uma faixa de pH ruminal em torno de 6,2 (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; WEIMER, 1993). Quando ruminantes são alimentados com quantidades inadequadas de fibra na dieta, pode resultar em quedas de pH ruminal e, consequentemente, a microbiota ruminal é alterada, e os animais se tornam mais suscetíveis a distúrbios metabólicos (RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Além disso, o pH ruminal, juntamente com outros fatores, como temperatura, carboidratos e cátions solúveis, podem influenciar a aderência bacteriana ao substrato (MIRON et al., 2001).

De acordo com Belanche et al. (2012) a degradação da fibra requer um conjunto de microrganismos agindo de forma simbiótica. Os fungos anaeróbios têm sido sugeridos como os colonizadores primários da fração fibrosa, permitindo o subsequente acesso de outros microrganismos fibrolíticos. De modo semelhante, as bactérias fibrolíticas estão altamente especializadas na degradação da fibra em pequenos carboidratos, que por sua vez são consumidos por outras espécies bacterianas.

A proliferação das bactérias fibrolíticas no rúmen está diretamente correlacionada com a quantidade de fibra da dieta, e a substituição desta fibra por carboidratos mais fermentáveis no rúmen reduz o pH e eficiência das bactérias fibrolíticas, alterando desta forma a dinâmica

no ecossistema ruminal (TAJIMA et al., 2001). Assim como ocorre com as bactérias, a composição da dieta afeta diretamente a composição da população dos fungos ruminais. Estudos revelam maior população desses microrganismos em animais alimentados com dietas contendo mais fibras, com concentração média de $1,5 \times 10^5$ fungos por grama de conteúdo ruminal (OBISPO; DEHORITY 2002).

Com o aumento da concentração de carboidratos fermentáveis no rúmen, o crescimento microbiano é estimulado, resultando no aumento da taxa de fermentação ruminal. Por outro lado, o aumento da digestibilidade dos carboidratos resulta na queda do pH ruminal muitas vezes para valores abaixo de 6,0, devido a maior produção de AGCC. Nesta situação, ocorre a redução da atividade das bactérias fibrolíticas, prejudicando desta forma a digestibilidade da fibra e, simultaneamente, ocorre estímulo à atividade das bactérias amilolíticas e utilizadoras de lactato no rúmen (TAJIMA et al., 2001; NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Além da inibição direta, na situação de pH abaixo de 6,0, a adesão dos microrganismos ao substrato é reduzida, em função da menor concentração de bicarbonato, ou pela presença de inibidores de adesão, como o amido solúvel (OWENS; GOETSCH, 1993).

Carboidratos não fibrosos (CNF - açúcares, amido e pectina) provêm a maior parte da energia para o crescimento de animais na fase de terminação em confinamento, sendo que o excesso de fermentação ruminal de CNF pode levar a acidose ruminal, redução na digestibilidade da fibra, queda no consumo e, conseqüentemente, redução no ganho de peso dos animais (GONZÁLEZ et al., 2012). Petri et al. (2012) observaram que em dietas com alto teor de concentrado, em substituição ao volumoso, a população de bactérias fibrolíticas, tais como a *F. succinogenes*, foi menor, quando comparado à dietas com alto concentrado e inclusão de forragem. Esta substituição do volumoso por concentrado, carboidratos de rápida fermentação, promoveu a redução do tamanho da partícula do alimento, queda da fibra em detergente neutro (FDN) fisicamente efetiva, reduzindo motilidade, salivação e, conseqüentemente, o tamponamento do rúmen. Dessa forma, promove queda do pH, aumentando a duração em que os microrganismos ficaram expostos a pH mais baixo.

Selenomonas ruminantium, *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.* são bactérias ruminais que proliferam no rúmen de bovinos alimentados com alto teor de concentrados e que contribuem para o rápido acúmulo de ácido láctico e AGCC (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Quando a taxa de produção de lactato excede a taxa de absorção ou fermentação, seu acúmulo pode levar à queda do pH ruminal e redução na eficiência de conversão de alimentos em AGCC e proteína microbiana (OUWERKERK et al., 2002). Contudo, em uma situação de queda brusca do pH ruminal, ocorre a lise das bactérias gram-negativas de uma maneira mais

acelerada, resultando no aumento da concentração de endotoxinas, componentes bioativos da parede celular destes microrganismos, no ambiente ruminal, entrando na corrente sanguínea e, conseqüentemente, resultando em uma resposta inflamatória sistêmica (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Uma vez que o lactato é um produto intermediário da fermentação ruminal que pode ser ainda metabolizado à AGCC, é comum a presença de bactérias utilizadoras de lactato no rúmen de animais alimentados com alta inclusão de grãos na dieta, sendo que *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacterium acnesi* e *Selenomonas ruminantium* spp. *lactilytica* são as espécies mais comuns (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980).

A *M. elsdenii* é um microrganismo ruminal consumidor de lactato, que converte o ácido láctico produzido pela fermentação do amido no rúmen em ácido propiônico. Comparada com a maioria das outras bactérias ruminais, a *M. elsdenii* é relativamente mais resistente ao baixo pH. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a utilização de *M. elsdenii* foi capaz de modificar a fermentação ruminal e prevenir o acúmulo de ácido láctico durante mudanças na dieta (GREENING et al., 1991; KUNG; HESSION, 1995; OUWERKERK et al., 2002). Estudos realizados por Petri et al. (2012) demonstraram que, em dietas de alto concentrado, a inclusão de silagem de cevada como fonte de volumoso aumentou a população de *Ruminobacter amylophilus*, ao passo que nas dietas sem volumoso a população de *M. elsdenii* foi maior.

A composição da dieta é um fator extremamente importante nas mudanças da população bacteriana do rúmen e a compreensão do impacto da mudança da dieta sobre estes microrganismos pode influenciar diretamente sobre a saúde e produtividade animal. A elucidação dos mecanismos pelos quais o excesso de fermentação ruminal de carboidratos não fibrosos leva a queda da digestibilidade da fibra e a acidose ruminal, bem como das principais populações afetadas, auxiliará no desenvolvimento de técnicas para manutenção da função ruminal, como processamento do amido, nível e tipo de volumoso, bem como a utilização de aditivos, tais como os probióticos.

2.3 MANIPULAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL

A manipulação da fermentação ruminal é uma ferramenta nutricional utilizada com o intuito de melhorar o desempenho produtivo de ruminantes, por meio de pequenos ajustes que possibilitam a exploração do potencial produtivo dos ruminantes (DILORENZO, 2004). A

manipulação da fermentação é resultado de uma extensa pesquisa na área de microbiologia ruminal, com o objetivo de controlar algum processo fermentativo no rúmen, atingindo assim uma utilização mais eficiente dos nutrientes (NAGARAJA, 2003).

Diversos fatores podem interferir no desenvolvimento e estabilidade da microbiota ruminal. A composição da dieta passa a ser o fator mais importante, influenciando o número e a proporção relativa das diferentes espécies de microrganismos ruminais. A composição da dieta faz com que os microrganismos presentes alterem o padrão de fermentação, sendo seguido pelo ajuste das espécies microbianas às novas situações. No caso de mudanças abruptas para uma dieta com maior inclusão de concentrado, o desequilíbrio das espécies microbianas pode abrir a porta para organismos facultativos oportunistas na fermentação, por meio da produção de ácidos e redução do pH ruminal, conduzindo a distúrbios metabólicos (VAN SOEST, 1994). Na figura 1, é possível observar as consequências da alimentação sobre o pH ruminal de bovinos de corte, influenciando consequentemente a composição da microbiota ruminal.

Figura 1 - Consequências metabólicas da ingestão de alimentos por bovinos de corte sobre pH ruminal e a população microbiana

Fonte: Adaptado de Schwartzkopf-Genswein et al. (2003)

A quantidade e a composição da dieta são variáveis externas que afetam a taxa de digestão, a taxa de passagem e, consequentemente, o *turnover* do conteúdo ruminal. Nesse contexto, dietas com altos teores de proteína favorecem microrganismos proteolíticos, enquanto que em dietas com alta inclusão de amido, e baixa fibra, estão associadas a uma grande

população de bactérias amilolíticas (VAN SOEST, 1994). Conforme a Figura 1, a disponibilidade de carboidratos não fibrosos, como açúcares e amido, permite que bactérias amilolíticas (por exemplo, *Ruminococcus amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus spp.*) se proliferem. Consequentemente, grandes quantidades de AGCC são produzidas. O acúmulo de ácido láctico pode resultar em acidose metabólica, uma vez que o rúmen entra em estase devido à queda brusca de pH (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003).

Mudanças na relação volumoso:concentrado resultam em uma sucessão de mudanças na população microbiana. Em dietas com alto nível de inclusão de concentrados, bactérias consumidoras de lactato que são sensíveis à acidez, tais como *Selenomonas* e *Veillonella*, são substituídas pelas tolerantes à acidez, tais como *Anaerovibrio* e *Megasphaera*. As bactérias amilolíticas pertencentes ao gênero *Prevotella* são substituídas pelas produtoras de lactato, tais como as dos gêneros *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Streptococcus*. A acidose láctica, que surge nessas condições, parece ser resultado da incapacidade de aumento das bactérias que utilizam este substrato, ocorrendo o seu acúmulo de lactato no rúmen e, consequentemente, a redução no pH ruminal (OWENS; GOETSCH, 1993). As principais bactérias fibrolíticas, como *F. succinogenes*, *R. albus*, e *R. flavefaciens*, assim como os fungos, importantes na degradação da fibra, são sensíveis à baixo pH. Aumentando o nível de inclusão de concentrado, mais carboidratos não-fibrosos são consumidos, que por sua vez contribuem para maior produção de AGCC. Essa maior concentração de AGCC no rúmen contribuem para queda de pH e, consequentemente, proporciona a redução da quantidade e atividade das bactérias fibrolíticas.

De acordo com Krause et al. (2013) os diferentes métodos de manipulação da fermentação ruminal e, consequentemente, da população microbiana, tais como a utilização de ionóforos, probióticos (leveduras e fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae*), mudanças na dieta (relação volumoso:concentrado, tipo de carboidrato não fibroso), dentre outros, podem ser avaliados por meio de técnicas da biologia molecular, elucidando seu mecanismo de ação em detalhes com o intuito de compreender o impacto de sua inclusão sobre o ecossistema microbiano e como tais mudanças podem proporcionar maior eficiência e desempenho animal.

O metabolismo no rúmen pode ser manipulado de maneira direta ou indireta, cujo objetivo consiste na melhora da digestibilidade do alimento ofertado. A manipulação indireta está relacionada com as características do alimento, sendo que a composição da dieta pode influenciar na atividade metabólica dos microrganismos. Nesse contexto, o tipo de carboidrato fornecido influencia diretamente no pH do rúmen e na população microbiana, alterando a produção de AGCC e, consequentemente, a relação acetato:propionato (McSWEENEY et al., 1999). Já a manipulação direta do rúmen relaciona-se com o uso de aditivos zootécnicos, usados

para favorecer a digestibilidade de alimentos fibrosos, modificando a fermentação ao terem efeito sobre a microbiota ruminal.

2.4 ADITIVOS E MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Grande variedade de aditivos apresentam potencial para manipular o ambiente ruminal, influenciando alguns componentes do metabolismo do rúmen, incluindo inibidores de metano, de proteólise, de deaminação, agentes defaunantes, enzimas microbianas, agentes tamponantes, aumento na produção de propionato por ionóforos, probióticos, aditivos microbianos e surfactantes não-iônicos. Concomitantemente, os aditivos agem na redução da excreção de compostos nitrogenados e a emissão de metano, que representam a ineficiência do processo fermentativo do rúmen, aumentando a eficiência de utilização de alimentos, proporcionando aumento do desempenho produtivo dos animais (MORAIS et al., 2006).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os aditivos são definidos como substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudiquem seu valor nutritivo. Ionóforos, antibióticos não ionóforos, leveduras e fungos, enzimas, tampões, dentre outros, são alguns dos os aditivos liberados para o uso no Brasil e utilizados na nutrição de ruminantes.

Dentre os aditivos existentes no mercado voltados para melhoria da eficiência produtiva, tem-se as enzimas fibrolíticas e os probióticos. Dentre os probióticos, destaca-se as leveduras e culturas vivas do fungo *Aspergillus oryzae*. Tais aditivos apresentam efeitos positivos significativos sobre a digestibilidade da fibra e, conseqüentemente, sobre a produtividade animal. Entretanto, apesar de relatos positivos, o mecanismo de ação, e a especificidade do substrato, bem como efeito dose resposta, são estão completamente elucidados (REIS et al., 2006).

2.4.1. Enzima fibrolítica

As enzimas são proteínas produzidas por um organismo vivo que aceleram reações químicas específicas devido ao seu grau de afinidade com o substrato (GURUNG et al., 2013). Elas catalisam diversas reações em cadeia e tornam as macromoléculas em precursores simples. A natureza protéica das enzimas tem importante implicação para sua estabilidade em altas

temperaturas ou durante o trânsito no trato digestório. Como proteínas, elas podem ser desnaturadas pelo calor e pH, e ainda podem ser submetidas a proteólises por enzimas digestivas ou bacterianas. Uma característica única das enzimas é a alta especificidade por um substrato, sendo que cada enzima degrada substratos em sítios específicos de reação (RAVINDRAN, 2013). As enzimas possuem origem de um organismo vivo, podendo ser bacteriana, fúngica ou de leveduras.

Especificamente, as enzimas fibrolíticas exógenas podem ser classificadas com base em sua atividade específica como celulase, que hidrolisam a fibra da parede celular da planta em glicose, celobiose ou celooligossacarídeos com atividade combinada de três enzimas: endoglucanases, exoglucanases e glucosidase (ZHANG; LYND 2004). A xilanase catalisa a hidrólise de ligações β -1,4-xilosídicas em xilano que são constituintes da hemicelulose. O grupo de enzimas com atividade xilanase inclui endo xilanases que atacam a cadeia principal de xilano e xilosidases que hidrolisam xilooligassacarídeos em xilose (KAMBLE; JADHAV, 2012). Bactérias, fungos e leveduras tem sido identificados como adequados para produção de xilanases (KAMBLE; JADHAV, 2012). Os mais importantes produtores de xilanases são: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridia* e *Bacillus* (CAI et al., 2004). Comercialmente são utilizadas cepas clássicas ou geneticamente modificadas para produzi-las, em que o fungo filamentoso *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus niger* é um dos mais bem conhecidos sistemas de produção industrial (PALOHEIMO et al., 2011).

Celulases são produzidas utilizando fungos e bactérias, com ênfase na utilização de fungos por causa da sua capacidade de produzir quantidades de enzima e por vezes o processo é menos complexo do que a extração da celulase de origem bacteriana (SUJANI; SERESINHE, 2015). Com aumento da tecnologia disponível para estudos em microbiologia, o isolamento e caracterização de novas celulases de origem bacteriana estão se tornando mais populares. Com o refinamento dos estudos os procedimentos de extração das bactérias frequentemente têm uma taxa de crescimento maior do que os fungos, as celulases bacterianas são muitas vezes mais complexas e estão em complexos enzimáticos que proporcionam função e sinergia (SUJANI; SERESINHE, 2015).

O uso de enzima fibrolítica exógena com intuito de aumentar a eficiência alimentar por ruminantes tem despertado interesse da comunidade científica. Adição de complexos enzimáticos para degradação da fibra na dieta de ruminantes tem sido estudada desde 1960 e, pelo fato de depender de condições favoráveis específicas para sua ação, tais como temperatura e pH (MORGAVI et al., 2000), as respostas positivas em função da suplementação com

enzimas dependem de diversos fatores, tais como tipo de forragem, método de aplicação e doses, especificidade ao substrato e tipo de complexo enzimático utilizado (MEALE et al., 2014). Assim, os resultados de pesquisa com enzima fibrolítica na alimentação de ruminantes têm se mostrado inconsistentes, com grande variabilidade de resultados dificultando a comparação entre estudos, assim como a validação da eficácia da enzima, sendo que a forma de ação das enzimas sobre a degradação da fibra não é totalmente entendida.

Beauchemin et al. (1995) observaram que a resposta das enzimas fibrolíticas na dieta de bovinos de corte foi dependente do tipo de volumoso, sendo que a aplicação de um produto enzimático a base de xilanase e celulase resultou em aumento de 30% no GMD de novilhos de corte alimentados com feno de alfafa, mas sem efeito quando aplicado na silagem de cevada. Entretanto, Silva (2016) observou que a utilização de doses crescentes de enzima fibrolítica na dieta de vacas leiteiras, da raça Holandesa no terço médio da lactação, promoveu aumento linear no consumo de matéria orgânica, fibra em detergente neutro e matéria seca, refletindo no aumento linear de consumo de energia líquida e no balanço de energia líquida, porém o tratamento enzimático não afetou a produção de leite e seus componentes.

Tanto a forma de inclusão da enzima na dieta como avaliação dos resultados usualmente é realizada de duas formas: via mistura no concentrado ou incorporação no volumoso no momento da ensilagem e avaliação de efeitos no desempenho animal assim como no processo fermentativo e composição química da silagem (SCHMIDT et al., 2014).

Resultados de pesquisa têm indicado que a aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas possuem efeitos pré-ingestivo. A adsorção da enzima pelo substrato é um pré-requisito importante para hidrólise (PELL; SCHOFIELD 1993), cujo efeito indica alteração estrutural na matriz fibrosa da planta e melhor aproveitamento pelo animal. Kung Jr. (2009) observou redução nos teores de FDN e FDA na silagem de milho quando ensilados com enzima fibrolítica, ao passo que Mandebvu et al. (1999) não encontraram efeito quando testado em silagem de capim. Segundo Bauchemin et al. (2003), essa inconsistência pode estar relacionada à composição do produto utilizado e ao binômio enzima substrato. Além disso, a dose utilizada reflete diretamente no custo do produto, por isso é imprescindível estabelecer dose e tipo enzima específica para cada tipo de forragem, assim como objetivo do seu uso, para que essa tecnologia possa ser utilizada com resultados positivos e consistentes.

Esta estratégia de aplicação das enzimas fibrolíticas no processo de ensilagem tem sido objeto de estudo de trabalhos recentes (OZDUVEN et al., 2010; LI YING et al. 2017), pelo fato de interferir no perfil fermentativo ao liberar maiores conteúdos de carboidratos solúveis. O tratamento enzimático na ensilagem pode alterar positivamente a composição bromatológica da

forrageira ensilada, principalmente na redução dos conteúdos de FDN e fibra em detergente ácido (FDA), contribuindo assim para maior consumo e eficiência digestiva da MS (CYSNEIROS et al., 2006, LALA et al., 2010).

Quando se trata de conservação de forragens, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de modificar o processo fermentativo, reduzindo perdas e/ou melhorando o valor nutritivo das silagens e, conseqüentemente, tornando o processo mais eficiente. Dentre eles estão os aditivos, cuja vasta gama de substâncias, orgânicas e inorgânicas, vem sendo objeto de estudo de várias pesquisas (SCHMIDT et al., 2014).

Os aditivos são recomendados para forrageiras que não apresentam condições favoráveis para o processo fermentativo e auxilia na conservação. Há diversos tipos de aditivos, incluindo inoculantes bacterianos, enzimas e nitrogênio não protéico. Importante ressaltar que, assim como ocorre na alimentação animal, existe uma grande variabilidade nos resultados oriundos de pesquisas avaliando aditivos, dificultando a tomada de decisão na escolha de qual produto usar com base na forrageira escolhida para ensilagem (SCHMIDT et al., 2014).

Atualmente as pesquisas com uso de enzimas fibrolíticas no processo de ensilagem tem ganhado destaque, os primeiros estudos são reportados por Feng et al. (1996). A utilização de enzimas tem como função a degradação da parede celular com o intuito de reduzir o conteúdo de fibras e aumentar a disponibilidade de açúcares solúveis para fermentação (WOOLFORD, 1984). Os aditivos estimulantes da fermentação são responsáveis pelo aumento da produção de ácido lático, reduzindo as perdas de matéria seca, e como consequência, a redução do pH. Os carboidratos são responsáveis pela relação açúcar:proteína, resultando na hidrólise da proteína (REIS; MOREIRA, 2017).

A degradação de carboidratos fibrosos em açúcares solúveis disponibiliza substrato para as bactérias ácido lácticas as quais produzem lactato e mantém o pH baixo (CAI et al., 1999). Esse processo pode evitar as perdas de nutrientes no silo, inibindo a fermentação prolongada. A expectativa do efeito benéfico da enzima fibrolítica para ensilagem depende do estudo de fatores inerentes à: composição do volumoso (SELMEROLSEM et al., 1993) método de aplicação da enzima (YANG et al., 2000), dose (BEAUCHEMIN et al., 1997), ao tipo de volumoso, (KUNG JR., 2009) disponibilidade de substrato para fermentação láctica (ADESOGAN et al., 2004) e teor de MS do material ensilado (SPOELSTRA, 1991) por exemplo.

Selmerolsem (1993) demonstraram que a ensilagem de material com baixo disponibilidade de carboidratos solúveis como capins tropicais foi favorecida com a adição da enzima, em relação aos com alto teor de carboidratos solúveis. Resultado semelhante foi

encontrado por Adesogan et al. (2004). Segundo Spoelstra (1991), a atividade enzimática aumenta quando adicionadas em volumosos com baixo teor de MS em relação a volumosos com teor de MS mais alto. Ademais o pH que favorece a ação de enzimas está entre 4 e 5, assim quaisquer característica inerentes ao processo de fermentação no interior do silo que induz o não abaixamento do pH está sujeito a reduzir a atividade enzimática no material (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Em outras palavras, as enzimas fibrolíticas são utilizadas como meio para melhorar a fermentação da silagem, disponibilizar a fração fibrosa indigestível e melhorar o valor nutritivo do volumoso. A redução da fibra em resposta a inclusão de enzima fibrolítica é relacionado à conversão de componentes fibrosos em açúcares redutores (KUNG et al., 2003). Também foi relatado redução de produtos indesejáveis da fermentação, como o ácido butírico (ADESOGAN et al., 2005) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (XING et al., 2009). Dean et al. (2005) reportaram redução linear nas perdas de MS na silagem de Tifton tratadas com aumento de doses de enzima fibrolítica (7, 14 e 29 mg/Kg de MS). Guo et al. (2014) avaliaram a inclusão de enzima fibrolítica (0,1% da matéria natural), inoculante microbiano (*Lactobacillus plantarum*) e melaço (4% da matéria natural) em uma silagem contendo 50% milho e 50% palha. A inclusão de cada aditivo isoladamente melhorou os parâmetros de fermentação da silagem, com menor pH e reduziu a concentração de amônia, ácido acético e butírico em relação ao tratamento controle. No mesmo estudo, adição de enzima fibrolítica diminuiu o teor de FDN. Nota-se que a inclusão de enzima fibrolítica melhora o processo de fermentação da silagem e a composição química da mesma.

Em estudo realizado por Li Ying et al.(2017), utilizando enzima fibrolítica (celulase, glucosidase e xilanase) e inoculante microbiano (*L. rhamnosus*) na ensilagem de milho, observaram aumento na concentração de ácido láctico e redução da produção de N-NH₃ e da FDN com a inclusão de ambos os aditivos. A enzima fibrolítica também foi capaz de diminuir o teor da FDN e aumentar a digestibilidade *in vitro* da FDN e PB. Xing et al. (2009) reportaram redução no teor da FDN e da FDA na silagem de palha de sorgo tratada com 0,003 mg/g de matéria natural (MN) de um mix de celulases e hemicelulases. No mesmo estudo, houve um aumento no teor de PB da silagem tratada com enzima fibrolítica em comparação ao tratamento controle, devido à redução da atividade enzimática proteolítica, consequentemente uma diminuição na concentração de N-NH₃ (XING et al., 2009).

2.4.2. *Aspergillus oryzae*

O fungo *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosos pertencente ao filo *Ascomycota*, com capacidade de produzir uma grande gama de enzimas em diferentes formas de cultivo (KITANO et al., 2002). Esta espécie foi isolada pela primeira vez por H. Ahlburg em 1876, a partir do *koji* (TOLEDO PINTO, 2012), e é utilizada na cultura oriental há um milênio, na produção de comidas fermentadas da culinária japonesa (MACHIDA et al., 2005).

O genoma deste fungo foi completamente sequenciado por MACHIDA et al. (2005), e observou-se que o genoma do *A. oryzae* é entre 25 a 30% maior do que outras espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. nidulans* e *A. fumigatus*. Importante ressaltar que, apesar de apresentar os genes relacionados com a síntese de aflatoxina, não há relatos de expressão gênica desta substância por parte deste microrganismo. A aflatoxina é uma substância carcinogênica produzida pelo gênero *Aspergillus*, principalmente pela espécie *Aspergillus flavus*, e o fato da espécie *A. oryzae* não produzir tal toxina pode ser explicado pela seleção de linhagens não-tóxicas para utilização na culinária oriental.

Sabe-se que o efeito deste gênero de fungo deve-se em parte à presença de enzimas nos extratos fermentativos, como celulase e xilanase, que consequentemente podem afetar a degradação da parede celular (NEWBOLD et al. 1992). Concomitantemente, há indícios de que os benefícios da suplementação com *A. oryzae* pode ocorrer de forma indireta, pelo fato de facilitar a aderência de bactérias fibrolíticas à fibra, através de atração quimioestática em resposta à liberação de compostos, tais como açúcares solúveis, ou por alteração da própria superfície da fibra, devido à ação física sobre a mesma, promovendo assim aumento da degradação da fibra (NEWBOLD et al., 1992; NEWBOLD, 1997; SOSA et al., 2011). Além disso, é possível que tal microrganismo aumente a taxa ou extensão de degradação da fibra por meio de estímulo aos microrganismos fibrolíticos, tais como os fungos ruminais, como o *Neocallimastix frontalis* (CHANG et al., 1999; WIEDMEIER et al., 1987, SUN et al., 2014). O fungo *A. oryzae* produz maltodextrinas que servem de substrato para bactérias como *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, indicando que a suplementação com este fungo pode atuar estabilizando o pH ruminal (BEHARKA, NAGARAJA, 1998; TRICARICO et al., 2008).

Toledo Pinto (2012) identificou 47 proteínas distintas do secretoma de *A. oryzae* quando crescido em estado sólido de bagaço de cana, sendo que 19 são pertencentes à família das glicosil hidrolases, que por sua vez estão relacionadas com a degradação de biomassa

lignocelulósica, ao passo que o grupo enzimático mais abundante nas identificações é o relacionado à degradação de celulose, como as beta-glicosidases.

Almeida et al. (2012) avaliaram 49 isolados do trato digestório de bovinos leiteiros, alimentados com forragem tropical, sendo 27 *Aspergillus spp.*, quatro *Gliocladium spp.*, seis *Paecilomyces spp.*, nove *Rhizophus spp.* e três *Scedosporium*, e observaram que o gênero *Aspergillus* apresentou maior média de índice de atividade celulolítica quando comparado ao gênero *Rhizophus*.

Sua utilização na dieta de ruminantes têm apresentado resultados satisfatórios quanto ao desempenho e produtividade animal, promovendo aumento de consumo (VAN HORN et al., 1984; GOMEZ-ALARCON et al., 1991; CATON et al., 1993; LATIF et al., 2014) e aumento no ganho de peso (TRICARICO et al., 2007) e produção de leite (HUBER et al., 1985; KELLEMS et al., 1987; DENIGAN et al., 1992).

Meta-análise de dados realizada por Williams e Newbold (1990) reporta que a suplementação de *A. oryzae* teve efeito variável na produção de leite (-9% a +12%), em função de diferentes demandas nutricionais dos animais e proporções de concentrado na dieta utilizados, com valores médios em torno de 5%. Concomitantemente, as respostas em função da suplementação com *A. oryzae* parecem ser maiores no início da lactação (KELLEMS et al., 1987; DENIGAN et al., 1992). Huber et al. (1985) reportaram aumento na produção de leite quando a suplementação com este fungo esteve associada a uma dieta com maior proporção de concentrado.

Caton et al. (1993), em estudo sobre o efeito da suplementação com extratos do fungo *Aspergillus oryzae* em novilhos pastejando gramínea de clima temperado (*Bromus inermis*), relataram aumento na eficiência de síntese microbiana e no fluxo de N microbiano para o duodeno com a suplementação. Gomez-Alarcon et al. (1991) relataram aumento da digestibilidade do trato total e ruminal das frações fibrosas ao suplementar vacas da raça Holandesas com 3g/dia de *A. oryzae*, além de aumentar a taxa de fermentação ruminal da alfafa. Entretanto, Chiquette (1995) descreve que a adição de *A. oryzae* na dieta de novilhos de corte não afetou a IMS ou a digestibilidade ruminal e do trato total.

3. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos da presente pesquisa são:

- I. Quantificar o efeito da inclusão de enzima fibrolítica na ensilagem da cana-de-açúcar e milho sobre a composição química, digestibilidade *in vitro* da fibra e matéria seca, parâmetros fermentativos, perdas e recuperação de matéria seca, e estabilidade aeróbia, avaliados em diferentes tempos de ensilagem.
- II. Avaliar o efeito de doses de culturas vivas de *Aspergillus oryzae*, enzima fibrolítica e a combinação de ambos sobre a digestibilidade de volumosos por meio de um ensaio de produção de gases e degradabilidade *in vitro*.
- III. Avaliar o efeito de culturas vivas de *Aspergillus oryzae*, enzima fibrolítica e a combinação de ambos sobre o consumo, digestibilidade, metabolismo, cinética ruminal, fluxo de nutrientes e microbiota ruminal de vacas em lactação.

4. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.T. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. In: **Proceedings of 16th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**, Gainesville, p. 91–109, 2005.

ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.A.; SALAWU, M.B.; DEAN, D.B.; STAPLES, C.R. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. **Journal of Dairy Science**. v.87, p.3407-3416. 2004.

ALMEIDA, P. N. M.; FREITAS, C. E. S.; ABRÃO, F. O.; RIBEIRO, I. C. O.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 202 –207, 2014

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 111-150.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, v.75, p.641–644, 1995.

BEAUCHEMIN, K.A., JONES, S.D.M., RODE, L.M., SEWALT, V.J.H. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**.v.77, p.645-653,1997.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG., W Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**.v.81: p.37-47. 2003.

BEHARKA, A.A., NAGARAJA, T.G. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.1591-1598. 1998.

BELANCHE, A.; FUENTE, G.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J.; BALCELLS, J. Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 3924-3936, 2012.

BRAUNE, R. Untersuchungen ubre die im Widerkäuermagens vorkommenden Protozoen. **Arch. Protistenkd.**, Jena, v.32, p.111-170, 1913.

BROSSARD, L.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; MICHALET-DOREAUAND, B.; MARTIN, C. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. **Animal Science**, v. 82, n. 6, p. 829–836, 2006.

BRYANT, M. P. Bacterial species of the rumen. **Bacteriological Reviews**, v. 23, p. 125–153, 1959.

CAI, Q.; YUE, X.; NIU, T.; JI C.; MA, Q. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1561-1566, 2004.

CATON, J.S.; ERICKSON, D.O.; CAREY, D.A. et al. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site of digestion, in situ degradability and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture. **Journal of Animal Science**, v.71, p.779-787, 1993.

CERDÀ, A.R. **Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intenso**. 2003. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha.

CHANG, J.S.; HARPER, E.M.; CALZA, R.E. Fermentation extract effects on the morphology andmetabolism of the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.389–398. 1999.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 30–36, 2002.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; GOUET, P. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. **Current Microbiology**, v. 31, p. 201–205, 1995.

CHIQUETTE, J. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science** v.75, p.405-415, 1995.

CYSNEIROS, C.S.S.; FRANCO, G.L.; ULHOA, C.J.; DIOGO, J.M.S.; RAMOS, A.K.B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, p.339-348, 2006.

DEAN, D.B.; ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.; LITTELL, R.C. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of *bermudagrass* silage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 994-1003, 2005.

DENIGAN, M.E., HUBER, J.T., ALHADHRAMI, G., AL-DEHNEH, A. Influence of feeding varying levels of Amaferm® on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1616 – 1621. 1992.

DILORENZO, N. **Effects of feeding polyclonal antibody preparations against rumen starch and lactic-fermenting bacteria on target bacteria populations and steer performance**. 2004. 101 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – University of Minnesota, Saint Paul, Minnesota, 2004.

DING, G.; CHANG, Y.; ZHAO, L.; ZHOU, Z.; REN, L.; MENG, Q. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, p. 24, 2014.

ELWAKEEL, E. A.; TITGEMEYER, E. C.; JOHNSON, B. J.; ARMENDARIZ, C. K.; SHIRLEY, J. E. Fibrolytic Enzymes to Increase the Nutritive Value of Dairy Feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.5226–5236, 2007.

FENG, P.; HUNT, C.W.; PRITCHARD, G.T.; JULIEN, W.E. Effect of enzyme preparations on in situ and in vivo degradation and in vivo digestive characteristics of mature coolseason grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1349-1357, 1996.

FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVA, U. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Oklahoma, v. 76, n. 22, p. 7482-7490, 2010.

FORSBERG, C. W.; CHENG, K. J.; WHITE, B. A. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A. (Ed.). **Gastrointestinal microbiology**. New York: Chapman and Hall, p. 319–379. 1997.

FORSTER, R. J.; GONG, J.; TEATHER, R. M. Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1256–1260, 1997.

GOES, R.H.T.B.G.; ALVES, D.D.; VALADARES FILHO, S.C.; MARSON, E.P. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.8, p.47-56, 2005.

GOMEZ-ALARCON, R.A., HUBER, J.T., HIGGINBOTHAM, G.E., WIERSMA, F., AMMON, D.; TAYLOR, B. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk yields, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.1733-1740. 1991.

GONZÁLEZ, L. A.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIA, S.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; FERRET, A. Ruminant acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 66-79, 2012.

GREENING, R. C.; SMOLENSKI, W. J.; BELL, R. L.; BARSUHN, K.; JOHNSON, M. M.; ROBINSON J. A. Effects of inoculation of *Megasphaera elsdenii* strain 407A(UC-12497) on ruminal pH and organic acids in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 518, (Suppl. 1). 1991.

GUEDES, C. M.; GONGALVES, D.; RODRIGUES, M. A. M.; DIAS-DA-SILVA, A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fiber degradation of maize silages in cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p.27–40, 2008

GUO, G.; YUAN, X.; LI, L.; WEN, A.; SHAO, T. Effects of fibrolytic enzymes, molasses and lactic acid bacteria on fermentation quality of mixed silage of corn and hulless–barely straw in the Tibetan Plateau. **Japanese Society of Grassland Science**, v. 60, p. 240-246, 2014.

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

HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GOONEWARDENE, L. A.; WANG, Z.; DURUNNA, O. N.; MOORE, S. S.; GUAN, L. L. Impact of Feed Efficiency and Diet on Adaptive Variations in the Bacterial Community in the Rumen Fluid of Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, Canada, v. 78, n. 4, p. 1203-1214, 2012.

HUBER, J. T., HIGGINBOTHAM, G. E.; Ware, D. Influence of feeding vitaferm, containing an enzyme-producing culture from *Aspergillus oryzae*, on performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.30. (Suppl. 1) 1985.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. p. 53.

KAMBLE, R.D.; JADHAV, A.R. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi and its production. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 14175-14181, 2012.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124-134, 2005.

KELLEMS, R. O.; JOHNSTON, N. P.; WALLENTINE, M. V.; LAGERSTEDT, A.; ANDRUS, D.; JONES, R.; HUBER, J. T.; Effect of feeding *Aspergillus oryzae* on performance of cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**. v.70 (Suppl.1), p. 219 (Abstr.). 1987.

KITANO, H., KATAOKA, K., FURUKAWA, K., HARA, S. Specific expression and temperature-dependent expression of the acid-protease-encoding gene (*pepA*) in *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (rice-koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.93, p. 565-567. 2002.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140 p.

KRAUSE, D. O.; NAGARAJA, T. G.; WRIGHT A. D. G.; Callaway T. R. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 331-341, 2013.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, v. 9, p. 1467–1475, 1996.

KŘÍŽOVÁ, L.; RICHTER, M.; TŘINÁCTÝ, J.; ŘÍHA, J.; KUMPRECHTOVÁ, D. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redox potential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. **Czech Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 1, p. 37–45, 2011.

KRUEGER, N.A.; ADESOGAN, A.T.; STAPLES, C.R.; KRUEGER, W.K.; DEANA, D.B.; LITTELL, R.C. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.95–108, 2008.

KUNG JR L.; STOKES M.R.; LIN, C.J. Silage additives, in Silage Science and Technology, ed. by Buxton DR, Muck RE and Harrison JH. **American Society of Agronomy, Madison, WI.** p. 305-360, 2003.

KUNG JR., L. Side effects of microbial inoculants on silage fermentation In: International symposium on forage quality and conservation, 1, São Pedro. **Proceedings of 1st International symposium on forage quality and conservation**, Piracicaba: FEALQ, p.7-26, 2009.

KUNG JR., L.; HESSION, A. O. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 250–256, 1995.

LALA, B.; PEREIRA, V.V.; POSSAMAI, A.P.S.; DINIZ, P.P.; SILVA, S.C.C.; GRANDE, P.A. Aditivos no processo de ensilagem. **BioEng – Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v.4 n.3, p. 175-183, 2010.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343 p.

LATIF, M. R.; ZAHRAN, S. M.; AHMED, M. H.; ZEWEIL, H. S.; SALLAM, S. M. A. Effect of Feeding *Saccharomyces cerevisiae* and/or *Aspergillus oryzae* on Nutrient Utilization and Rumen Fermentation Characteristics of Sheep. Alex. **Journal of agricultural research**, v.59, n.2, p.121-127, 2014.

LEE, S.S.; HAB, J.K.; CHENG, K.-J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v.88, p.201-217, 2000.

LI YING, H.; BORJIGIN, N.; ZHU, Y. Effect of inoculants and fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, in vitro digestibility and aflatoxins accumulation of whole-crop corn silage. **Grassland Science**, v. 63, p. 69-78, 2017.

LI, M.; PENNER, G. B.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; OBA, M.; GUAN, L. L. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Canada, v. 107, p. 1924-1934, 2009.

LI, X.L.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L. G. Monocentric and polycentric anaerobic fungi produce structurally related cellulases and xylanases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.63, p.628-635, 1997.

MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., TERA, G., *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v.438, p. 1157-1161. 2005.

MANDEBVU, P.; WEST, J.W.; FROETSCHER, M.A.; HATFIELD, R.D.; GATES, R.N.; HILL, G.M. Effect of enzyme or microbial treatments of *bermudagrass* forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. **Animal Feed Science Technology**.v.77, p.317-329. 1999.

MCALLISTER, T. A.; GIBB, D. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; WANG, Y. Starch type, structure and ruminal digestion. In: PIONEER HI-BRED, A DUPONT BUSINEDD CONFERENCE, 2007, Jonston. **Proceedings...** Jonston, p. 30-41. 2007.

McALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J.; POPP, J. D.; MIR, Z.; YANKE, L. J.; HRISTOV, A. N.; TREACHER, R. J.; CHENG, K.J. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, p.353-360, 1999.

McSWEENEY, C. S.; DAALRYMPLE, B. P.; GOBIUS, K. S.; KENNEDY, P. M.; KRAUSE, D. O.; MACKIE, R. I.; XUE, G. P. The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pre- and post-ingestion. **Livestock Production Science**, v. 59, n. 3, p. 265-283, 1999.

MCSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. I.; WHITE, B. A. Transport and intracellular metabolism of major feed compounds by ruminal bacteria: the potential for metabolic manipulation. **Australian Journal of Agricultural Research**, n. 45, p. 731-756. 1994.

MEALE, S.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; HRISTOV, A.N.; CHAVES, A.V.; MCALLISTER, T.A. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427-442, 2014.

MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA-FAEPE, 2001. p.25-36.

MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Invited review:adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1294-1309, 2001.

MONNERAT, J. P.; PAULINO, P. V.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. D.; DUARTE, M. S. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and monensin on digestion, ruminal parameters, and balance of nitrogenous compounds of beef cattle fed diets with different starch concentrations. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 5, p. 1251-1257, 2013.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 539-570.

MORGAVI, D. P.; KELLY, W. J.; JANSSEN, P. H.; ATTWOOD, G. T. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v. 7, n. 1, p. 184–201. 2013.

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.

NAGARAJA, T. G. Response of the gut and microbial populations to feedstuffs: the ruminant story. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 64., 2003, St. Paul, MN. **Proceedings...** 2002. p. 64-77.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 17–38, (Suppl. 1.) 2007.

NEWBOLD, C., FRUMHOLTZ, P., WALLACE, R. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. **The Journal of Agricultural Science**, v.119, n.3, p.423-427. 1992.

NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: Florida Ruminant Nutrition Symposium, 1997, Gainesville. **Proceedings...** University of Florida, Gainesville, January, 16-17, 1997.

OBISPO N.E.; DEHORITY B.A. Factores affecting the concentration and cellulolytic activity of sheep rumen fungi. **Livestock Research for Rural Development**., 14:5-10, 2002.

OLIVEIRA B.M.L., BITENCOURT L.L., SILVA J.R.M., DIAS JUNIOR G.S., BRANCO I.C.C. & PEREIRA M.N. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. In: **Anais 45ª Reunião Anual da sociedade brasileira de zootecnia**, Lavras, MG, 2008. P.1-3.

ORPIN, C. G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. **Journal of general microbiology**, Reading, v.91, p.249-262, 1975.

OZDUVEN ML, ONAL ZK, KOC F. The effects of bacteria inoculants and/or enzymes on the fermentation, aerobic stability and *in vitro* dry and organic matter digestibility characteristics of triticale silages. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**. v.16, p.751–756, 2010.

OUWERKERK, D.; KLIEVE, A. V.; FORSTER, R. J. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 753-758, 2002.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal Fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p. 145-171.

PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHEMAANPERÄ. Xylanases and cellulases as feed additives. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd ed. London, UK, CAB International, p. 12-53, 2011.

PAUL, S.S.; KAMRA, D.N.; SASTRY, V.R.B.; SAHU, N.P.; AGARWAL, N. Effect of anaerobic fungi on *in vitro* feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. **Reproduction Nutrition Development**, 44:313-319, 2004.

PELL., A.N.; SCHOFIELD., P. Microbial and molecular mechanisms of cell wall degradation. In: **Forage cell wall structure and digestibility**. H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J Ralph, Eds. ASA CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 397-424. 1993.

PETRI, R. M.; FORSTER, R. J.; YANG, W.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, Canada, v. 112, p.1152-1162, 2012.

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

REIS, R.A.; MORAIS, J.A.S.; SIQUEIRA, G.R. ADITIVOS ALTERNATIVOS PARA A ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES. In: **II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (II CLANA)**, Palestra técnica, 2006.

REIS, R.A.; MOREIRA, A.L. **Conservação de forragem como estratégia para otimizar o manejo das pastagens**. FCAV/UNESP, Jaboticabal. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/>>, Acesso em: jun. 2019.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, p. 1119–1122, 2001.

RUSSELL, J. R.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 604-610, 1980.

RUSSELL, J. R.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**. v.68, n.7, p.1712-21. 1985.

SCHMIDT, P.; SOUZA, C.M.; BACH, B.C. Uso estratégico de aditivos em silagens: Quando e como usar? In: JOBIM, C.C., CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I (eds.), Simpósio: Produção e utilização de forragens conservadas, 5.ed., Maringá, 2014. **Anais do 5º Simpósio: Produção e utilização de forragens conservadas**, Maringá: UEM, p.243-264, 2014

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 149-158, 2003.

SELINGER, L. B.; FORSBERG, C. W.; CHENG, K.J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. **Anaerobe**, London, v.2, p.263- 284, 1996.

SELMEROLSEN, I.; HENDERSON, A.R.; ROBERTSON, S.; MCGINN, R. Cell-wall degrading enzymes for silage. 1. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. **Grass and Forage Science**. v.48, p.45-54. 1993.

SHINKAI, T.; KOBAYASHI, Y. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1646–1652, 2007.

SILVA, T. H. **Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação**. 2016. 121 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

SOSA, A.; GALINDO, J.; TEJIDO, M.L.; DÍAZ, A.; MARTÍNEZ, M.E.; SARO, C.; CARRO, M.D.; RANILLA, M.J. Effects of *Aspergillus oryzae* on in vitro ruminal fermentation. **Options Méditerranéennes**, (Série A), n.99, 2011.

SPOELSTRA, S. F., **Chemical and biological additives in forage conservation**. In: Conference Forage Conservation Towards 2000, p.48-70, 1991.

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

SUN, H.; WU, Y. M.; WANG, Y. M.; LIU, J. X.; MYUNG, K. H. Effects of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid on *in vitro* rumen fermentation and microbial populations between different roughage sources. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.27, n.9, p.1285-1292, 2014.

SUN, H.; WU, Y.; WANG, Y.; WANG, C.; LIU, J. Effects of addition of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxyl-4-(methylthio) butanoic acid on milk performance and rumen fermentation of dairy cows. **Animal Science Journal**. V.88, n.4, p.602-609. 2017.

SUNG, H. G.; KOBAYASHI, Y.; CHANG, J.; HA, A.; HWANG, H.; HA, J. K. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, p. 200–207, 2007.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2766–2774, 2001.

TOLEDO PINTO, A. C. R. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

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

TRICARICO, J.M., 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**, 85, 802–811, 2007.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 151-182.

VAN HORN, H. H.; HARRIS JR., B.; TAYLOR, M. J.; BACHMAN, K. C.; WILCOX, C. J. By-product feeds for lactating dairy cows: effects of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane bagasse, and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonate, and *aspergillus oryzae* product on milk production. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.12, p.2922-2938. 1984.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2. ed. London: Constock Publishing Associates, USA, 1994. 476 p.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. **Current Microbiology**, v. 58, p. 294–299, 2009.

WEIMER, P. J. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose fed continuous culture. **Archives of Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 288-294, 1993.

WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114–3122, 1998.

WIEDMEIER, R. D.; ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.2063–2068, 1987.

WILLIAMS, P. E. V. AND NEWBOLD, C. J. Rumen probiosis: the effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In **Recent advances in animal nutrition** (ed. Haresign, W. and Cole, D. J. A.), pp. 211. Butterworths, London. 1990.

WOOLFORD, M. **The silage fermentation**. New York., Marcel Deckker., p. 350, 1984.

XIMENES, E. A. **Cloning and sequencing of cDNAs encoding one beta-glucosidase, three cellulases, and one mannanase of the anaerobic fungus *Orpinomyces sp* Strain PC-2, and over-expression of the beta-glucosidase and mannanase in *Saccharomyces cerevisiae***. 1999. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1999.

XIMENES, E. A. Fungos anaeróbios. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v. 2, n. 2, p. 269-275, 2003.

XING, L., CHEN, L.J., HAN, L.J. The effect of an inoculant and enzymes on fermentation and nutritive value of sorghum straw silages. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 488-491, 2009.

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.

ZHANG, Y.H.P.; LYND L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology Bioengineering**., v. 88, p. 797-824, 2004.

ZILIO, E. M. C.; DEL VALLE, T. A.; GHIZZI, L. G.; TAKIYA, C. S.; DIAS, M. S. S.; NUNES, A. T.; SILVA, G. G.; RENNO, 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.1–11, 2018.

ZOBELL, D. R.; WIEDMEIER, R.D.; OLSON, K.C.; TREACHER, R.J. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.279–285, 2000.

5. EFEITO DA INCLUSÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PERFIL FERMENTATIVO DE SILAGENS

5.1. INTRODUÇÃO

A ensilagem é um método de preservação de forragem por meio de fermentação preferencialmente láctica, sob condições de anaerobiose, onde é importante que haja o controle das atividades microbianas, por meio de rápida acidificação (MCDONALD, 1981; KUNG JUNIOR, 2000).

Dessa forma, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de modificar o processo fermentativo, reduzindo perdas e/ou melhorando o valor nutritivo das silagens e, conseqüentemente, tornando o processo mais eficiente. Nesse contexto, uma grande variedade de aditivos, vem sendo objeto de estudo de várias pesquisas (SCHMIDT et al., 2014), dentre eles têm-se as enzimas fibrolíticas.

O mecanismo de ação das enzimas fibrolíticas no processo de ensilagem não está totalmente elucidado, contudo espera-se que estes aditivos atuem na digestão dos componentes estruturais da parede celular, criando sítios adicionais de digestão e a liberação de substrato para as bactérias ácido lácticas as quais produzem lactato e contribuem para redução do pH (CAI et al., 1999; CYSNEIROS et al., 2006). Concomitantemente, além desta redução de pH contribuir para restrição da atividade proteolítica, aumentando desta forma a estabilidade aeróbica (CYSNEIROS et al., 2006), a degradação dos componentes estruturais das plantas pelas enzimas pode elevar a taxa e a extensão da digestão das silagens no rúmen (COLOMBATTO et al., 2004).

A expectativa do efeito benéfico da enzima fibrolítica para ensilagem depende do estudo de fatores inerentes à: composição do volumoso (SELMEROLSEM et al., 1993) método de aplicação da enzima (YANG et al., 2000), dose (BEAUCHEMIN et al., 1997), ao tipo de volumoso, (KUNG JR., 2009) disponibilidade de substrato para fermentação láctica (ADESOGAN et al., 2004), tempo de ensilagem (LOURES, 2004) e teor de MS do material ensilado (SPOELSTRA, 1991). Neste contexto, essa gama de fatores que interferem na ação das enzimas na ensilagem pode justificar a inconsistência de resultados na literatura.

Contudo, estudos têm demonstrado alguns efeitos quando adicionado enzima fibrolítica no momento da ensilagem como: menor pH da silagem, maior concentração de ácido láctico e menor de butírico (DEHGHANI et al., 2012) e menor teor de FDN, porém sem alteração na digestibilidade da fibra (COLOMBATTO et al., 2004). Já Loures (2004) observou redução na

fração fibrosa do capim Tanzânia (*Panicum maximum*, Jacq. cv. Tanzânia) com o tratamento enzimático na ensilagem, contudo sem alterações significativas sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Kung (1996) observaram redução nos teores de FDN e FDA na silagem de milho quando ensilados com enzima fibrolítica, ao passo que Mandevbu et al. (1999) não encontraram efeito quando testado em silagem de capim. Li Ying et al. (2017) observaram redução do teor de FDN e aumento da digestibilidade *in vitro* desta fração fibrosa ao inocular silagem de milho com enzimas fibrolíticas (celulase, glucosidase e xilanase), além de relatarem aumento na concentração de ácido láctico e redução de nitrogênio amoniacal.

Embora os efeitos da adição de enzimas fibrolíticas venham sendo estudados, existem poucas informações sobre os efeitos de sua utilização na ensilagem de variedades de cana-de-açúcar, com diferente digestibilidade de fibra, em comparação à silagem de milho, uma vez a cana-de-açúcar apresenta características específicas, como alto teor de carboidratos solúveis, devido à sacarose, e baixo teor de proteína bruta associada à baixa digestibilidade da fibra (PEREIRA et al., 2001; MURATO et al., 2009), o que pode afetar diretamente a ação das enzimas fibrolíticas na ensilagem de volumosos com estas características. Selmerolsem (1993) demonstraram que a ensilagem de material com baixa disponibilidade de carboidratos solúveis como capins tropicais foi favorecida com a adição da enzima, em relação aos com alto teor de carboidratos solúveis, resultado semelhante foi encontrado por Adesogan et al. (2004).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de níveis crescentes de enzimas fibrolíticas na ensilagem de milho e duas variedades de cana-de-açúcar, com diferentes digestibilidade da fibra, sobre a composição química, digestibilidade *in vitro* da fibra e matéria seca, parâmetros fermentativos, perdas e recuperação de matéria seca, e estabilidade aeróbia, avaliados em diferentes tempos de ensilagem.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Tratamentos e Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC), do Departamento de Nutrição e Produção Animal VNP/FMVZ, Universidade de São Paulo, em Pirassununga, Brasil.

Os volumosos utilizados na ensilagem foram os seguintes: cana-de-açúcar de alta digestibilidade da FDN (ADFDN - IACSP93-3046), cana-de-açúcar de baixa digestibilidade da FDN (BDFDN - SP91-1049) e milho (AG8690). As variedades de cana foram colhidas com apropriado estágio de maturação (20° Brix). Cada fonte de volumoso foi submetida aos seguintes tratamentos: **E0** - ensilagem sem adição de enzima fibrolítica (Controle); **E1** - ensilagem com 1,3g/kg de MS de enzima fibrolítica (Fibrozyme®, Alltech); **E2** - ensilagem com 2,6g/kg de MS de enzima fibrolítica. Três períodos de armazenamento (30, 60 e 120 dias) foram utilizados, com três replicatas por tratamento, sendo que cada mini silo foi considerado uma unidade experimental.

O delineamento experimental foi em DIC, com arranjo fatorial de tratamentos 3x3x3, com três níveis do fator volumoso (cana ADFDN, cana BDFDN e milho), três níveis do fator enzima (0, 1,3 e 2,6g/kg de MS) e três níveis do fator tempo de ensilagem (30, 60 e 120d), totalizando 27 tratamentos.

5.2.2. Ensilagem e Amostragem

Os volumosos foram processados a 10mm, utilizando colheitadeira de forragem acoplada a um trator, e divididos em três lotes, de acordo com o respectivo tratamento enzimático. A enzima foi diluída em água e aplicada à forragem, sendo vigorosamente homogeneizado. O primeiro lote (**E0**) foi pulverizado apenas com água, enquanto que os outros dois lotes foram pulverizados com a respectiva quantidade de enzima fibrolítica (**E1** e **E2**), diluídos em água, totalizando os três tratamentos propostos para cada tipo de volumoso.

Como mini silos experimentais, foram utilizados baldes com capacidade de 15 litros, sendo três repetições por tratamento. Na parte inferior de cada balde foi adicionado areia fina e seca e, logo acima, colocada uma fina camada de TNT para evitar o contato da areia com a forragem e permitir o escoamento do efluente produzido.

Os baldes foram pesados antes e após o procedimento de ensilagem. Amostras da forragem fresca foram coletadas para completa caracterização de cada volumoso no momento da ensilagem (Dia 0). A compactação do material foi realizada manualmente, até atingir a densidade de aproximadamente 600 kg/m³, e em seguida fechados com tampas e lacrados com fita adesiva. Cada silo experimental contava com válvula (*AirLock*) para escape de gás, para posterior mensuração de perda de gases pela fermentação por diferença de peso. Posteriormente, os baldes foram armazenados em sala com temperatura controlada.

Após o período de armazenagem, os respectivos baldes foram pesados, abertos e amostras foram coletadas para mensuração de perdas e perfil fermentativo. Foi descartado uma camada (5cm) da parte superior de cada silo no momento da abertura, o restante foi homogeneizado.

Uma sub-amostra de cada silo foi coletada e congelada para posteriores análises laboratoriais, e 3 kg foram destinados para avaliação da estabilidade aeróbia. Outra subamostra de cada silagem foi destinada para extração do suco, por prensa hidráulica, com imediata avaliação do pH com o auxílio de um potenciômetro digital portátil, em seguida congelado para subsequente avaliação do teor de etanol e ácido láctico. Parte deste suco foi transferido à tubos contendo ácido sulfúrico (1,0 mL de ácido sulfúrico; 1 N para cada 2,0 mL de suco de silagem) e em seguida congelada para posterior análise de nitrogênio amoniacal. Outra parte do suco da silagem foi transferido a tubos contendo ácido fórmico (0,2 mL de ácido fórmico para cada 1,0 mL de suco de silagem) e congelados para posterior determinação dos ácidos orgânicos.

Ao final do período experimental, as sub-amostras de silagem coletadas de todos os mini-silos, assim como as amostras frescas no momento da ensilagem, foram secas em forno com ventilação forçada a 55°C durante 72h e posteriormente moídos em moinho de facas Wiley com peneira de 1mm, para posterior análise bromatológica.

5.2.3. Análises Bromatológicas e Cálculos

As amostras moídas foram destinadas às seguintes análises bromatológicas: matéria seca (MS; método 950.15), matéria mineral (MM; método 942.05), proteína bruta (PB, N × 6.25; método 984.13) e extrato etéreo (EE, método 920.39) de acordo com AOAC (2000). A fibra em detergente neutro (FDN, com amilase, sem sulfito de sódio) e fibra em detergente ácido (FDA, com amilase, sem sulfito de sódio) foram determinadas de acordo com Van Soest et al (1991). A análise de lignina foi realizada de acordo com Van Soest e Robertson (1985),

cuja mensuração ocorreu após hidrólise da celulose em ácido sulfúrico 72% no resíduo da amostra submetida ao detergente ácido.

A digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) das amostras de forragem úmida e silagens foram determinadas em dois tempos, 24 e 48h. Para tanto, foi utilizada uma fêmea da raça Holandesa, canulada no rúmen, previamente adaptada a uma dieta com 60:40 de relação volumoso concentrado a base de silagem de milho, para coleta de fluido ruminal, utilizado como inóculo para determinação da DIVMS e DIVFDN. Aproximadamente 4 kg de conteúdo ruminal foram coletados e filtrados em membrana de náilon (1 mm de tamanho de poro). Por volta de 1,5 L de líquido coletado foi transportado em um frasco pré-aquecido com água a 37 ° C. Foram utilizados bags F-57 (Ankom®), com 500 mg de amostra em cada bag, 4 repetições por amostra, e em seguida incubados no aparelho Daisy Incubator (ANKOM® Technology Corp., Fairpoint, NY, USA), de acordo com metodologia proposta pela ANKOM e descrita por Holden (1999).

As amostras congeladas do suco da silagem foram descongeladas a temperatura ambiente, e centrifugadas (500 xg por 15 min). O sobrenadante foi analisado para concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos orgânicos e etanol. O nitrogênio amoniacal foi avaliado por espectrofotometria seguindo metodologia de Foldager (1977), expresso como % do nitrogênio total (% NH₃-N). A concentração dos ácidos acético, propionico e butírico foi determinado por cromatografia gasosa (PALMQUIST, CONRAD, 1971). O ácido láctico (AL) foi determinado através do método colorimétrico (BARKER; SUMMERSON, 1941). A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa, de acordo com metodologia descrita por Erwin et al. (1961).

O teor de carboidratos totais (CHO) foi estimado a partir do cálculo descrito por Queiroz et al. (2008):

$$\text{CHO} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{MM})$$

Onde PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; e MM: matéria mineral.

O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi estimado a partir do cálculo descrito por Balieiro Neto et al. (2009):

$$\text{CNF} = 100 - (\text{FDN} + \text{PB} + \text{EE} + \text{MM})$$

Onde FDN: fibra em detergente neutro; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; e MM: matéria mineral.

Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados por meio da equação descrita por Rodrigues (2009):

$$\% \text{NDT} = 87,84 - (0,7 \times \% \text{FDA})$$

Onde FDA: fibra em detergente ácido.

As perdas de MS na forma de gases foram calculadas com base na diferença entre os pesos absolutos de MS inicial e final de cada mini silo (cheio e tampado), após o período de armazenamento; e as perdas de MS por efluente foi com base na diferença entre o peso inicial e final dos mini silos após a retirada da silagem, contendo no interior do balde apenas terra e o TNT (JOBIM et al., 2007; NOVINSKI et al., 2012). A recuperação de MS foi calculada de acordo com metodologia descrita por Jobim et al. (2007).

O ensaio de estabilidade aeróbia foi realizado imediatamente após a abertura dos silos, nos respectivos períodos de armazenamento, seguindo a metodologia de Kung Junior et al. (2000). Total de 3 kg de silagem de cada unidade experimental foi inserida em baldes de plástico, destampado, e mantidos em sala com temperatura controlada a 25 ± 1 °C por 120 horas. As temperaturas das silagens foram obtidas em intervalos de 6 horas, com auxílio de termômetro inserido a 10 cm no centro da massa de silagem.

As variáveis mensuradas foram: a estabilidade aeróbia, definida como o tempo observado para que a silagem, após a abertura do silo, apresente elevação em 2°C em relação à temperatura ambiente; temperatura máxima alcançada, em °C; Tempo (em horas) necessário para alcançar a temperatura máxima.

5.2.4. Forma de Análise dos Resultados

Os silos experimentais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de tratamentos 3x3x3, totalizando 27 tratamentos e três repetições por tratamento. Os dados foram verificados previamente para normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene.

Os dados foram analisados através do software SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + Ei + Vj + Tk + (EV)_{ij} + (ET)_{ik} + (VT)_{jk} + (EVT)_{ijk} + e_{ijk}$$

onde: Y_{ijk} é o valor da variável dependente;

μ é a media geral;

Ei é o efeito fixo do i-ésimo nível da enzima fibrolítica;

Vj é o efeito fixo da j-ésima tipo de volumoso;

Tk é o efeito fixo do k-ésimo tempo de ensilagem;

$(EV)_{ij}$ é a interação dupla entre enzima fibrolítica de ordem i com tipo de volumoso de ordem j;

$(ET)_{ik}$ é a interação dupla entre enzima fibrolítica de ordem i com tempo de ensilagem de ordem k;

$(VT)_{jk}$ é a interação dupla entre tipo de volumoso de ordem j com tempo de ensilagem de ordem k;

$(EVT)_{ijk}$ corresponde a interação tripla entre os fatores enzima fibrolítica de ordem i, tipo de volumoso de ordem j e tempo de ensilagem de ordem k;

e_{ijk} é o erro residual referente à observação da enzima fibrolítica i, da tipo de volumoso j e do tempo de ensilagem k.

Os graus de liberdade e testes foram ajustados usando a opção Kenward-Roger. As médias dos tratamentos foram comparadas com a Diferença Mínima Significativa de Fisher (LSD) e significância declarada no nível de probabilidade de 0,05. Quando a significância da interação entre os efeitos principais foi $\leq 0,10$, a interação foi decomposta e os efeitos dos tratamentos foram analisados usando a opção SLICE do PROC MIXED.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Pré-ensilagem

Na Tabela 1 está descrita a composição bromatológica das forrageiras utilizadas no estudo, evidenciando a diferença dentre os volumosos, e consequentemente, era esperado que o efeito das doses de enzima fosse afetado pelo volumoso ensilado.

Tabela 1. Composição química dos volumosos no momento da ensilagem com enzima fibrolítica.

Ítem ¹	Silagens		
	Milho	CA ²	CB ³
MS, %	34.00	26.32	26.67
	-----% da MS-----		
MM	4.25	2.56	2.89
MO	89.96	93.09	91.62
PB	7.76	2.60	1.48
EE	3.00	1.29	1.19
FDN	46.31	41.61	46.21
FDA	30.64	29.26	32.67
LIG	4.94	5.37	6.69
CHO	84.98	93.55	94.44
NFC	38.67	51.94	48.23
DIVMS24	56.96	61.62	54.76
DIVMS48	64.25	64.95	60.81
DIVFDN24	35.75	22.90	18.03
DIVFDN48	42.51	29.56	28.04

¹MS = matéria seca; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta. ²cana de ADFDN – 2480; ³cana de BDFDN – 1049.

5.3.2. Composição Química

Os resultados referentes à composição química estão apresentados na tabela 2. Observou-se interação tripla entre os fatores E*V*T para as variáveis MM, FDN, FDA, CHO, PB e MS (Tabela 2). A inclusão de enzima na ensilagem promoveu aumento do teor de FDN para a variedade de cana CA, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Já a CB apresentou resultado semelhante, com aumento no teor de FDN em função do tratamento enzimático, independentemente da dosagem, nos tempos T30 e T60, sendo que houve tendência

de aumento no T120 ($P=0,11$). De maneira semelhante, houve aumento no teor de FDA para a cana CA tratada com enzima fibrolítica nos tempos T30 e T120, sem efeito no T60, ao passo que este aumento de FDA também ocorreu na cana CB, independentemente do tempo de ensilagem e da dosagem da enzima fibrolítica. Não houve efeito da enzima fibrolítica sobre os teores de FDA e FDN para a silagem de milho, independentemente do tempo de ensilagem ($P>0,13$).

A dose da enzima fibrolítica E1 elevou a concentração de MM na CA apenas no T60, e no MILHO apenas no T120. Entretanto, foi observado redução no teor de MM na CA com o tratamento enzimático apenas no T120, independentemente da dosagem.

Observou-se redução do teor de CHO com a adição de enzima fibrolítica para CB, apenas no T120. Já para o milho, a dose da enzima fibrolítica E1 elevou a concentração de CHO apenas no T120, sem diferença entre Controle e a dose da enzima E2.

O tratamento enzimático na ensilagem das variedades da cana, CA e CB, elevou o teor de PB apenas nos tempos de ensilagem T30 e T60. Porém, houve redução significativa no teor de PB no tempo de ensilagem T120, em ambas as variedades da cana, em resposta a enzima fibrolítica, sem efeito sobre a silagem de milho.

A enzima fibrolítica promoveu redução no teor de MS na CA nos tempos de ensilagem T30 e T120, sem efeito no T60. De maneira semelhante, houve redução significativa no teor de MS na CB no tempo de ensilagem T30, e uma tendência de efeito no T120. Já para o milho, esta redução de MS ocorreu apenas no T120 com a maior dosagem da enzima fibrolítica.

Observou-se efeito de interação dupla entre os fatores E*V para as variáveis LIG e NFC. Independente da dose de enzima, o milho apresentou menor teor de LIG (3,52 vs. 9,17 e 9,20 %MS, para MILHO, CA e CB, respectivamente; $P<.001$) e maior NFC em comparação às variedades da cana-de-açúcar (40,79 vs. 21,88 e 21,20 %MS, para MILHO, CA e CB, respectivamente; $P<.001$). A inclusão da enzima aumentou o teor de LIG na CA (8,52 vs. 9,46 e 9,51 %MS, para CONT, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$) e na CB (CB: 8,49 vs. 9,55 e 9,55 %MS, para CONT, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$), sem efeito no Milho ($P=0,30$). A inclusão da enzima reduziu o NFC na CA (25,5 vs. 20,7 e 19,5 %MS, para CONT, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$) e na CB (CB: 26,1 vs. 18,8 e 18,8 %MS, para CONT, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$), sem efeito no Milho.

Além disso, observou-se efeito de interação dupla entre os fatores E*T para LIG., cujo teor aumentou em resposta ao tratamento enzimático nos tempos de ensilagem T30 (6,96 vs. 7,21 e 7,46 %MS, para CONT, E1 e E2, respectivamente) e T60 (6,15 vs. 7,43 e 7,85 %MS, para CONT, E1 e E2, respectivamente), sem efeito no T120.

Observou-se efeito de interação dupla entre os fatores V*T para NFC, onde o aumento do tempo reduziu NFC na CB e MILHO, sem efeito na CA. Independentemente do tempo, a silagem de MILHO apresentou maior NFC em comparação as variedades de cana.

Quanto aos parâmetros de digestibilidade, observou-se interação tripla entre os fatores E*V*T para DIVMS24 e DIVMS48. A inclusão de enzima na ensilagem promoveu redução da DIVMS24 em ambas variedades da cana, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Já para a silagem de milho, a E1 reduziu a DIVMS24 apenas no T30, sem diferença entre o CONT e E2. De maneira semelhante, a DIVMS48 das variedades de cana também foi afetada negativamente pelo aumento da dose de enzima, independentemente do tempo de ensilagem, com exceção da CB, onde houve tendência de efeito no T120. Não houve efeito significativo da ensilagem das forrageiras com enzima fibrolítica sobre a DIVFDN24, DIVFDN48 e EE.

Tabela 2. Composição química das silagens em resposta a doses crescentes de enzima fibrolítica em diferentes tempos de ensilagem, em %MS.

Item			MS	MM	FDN	FDA	LIG	PB	EE	CNF	CHO	DIVMS24	DIVFDN24	DIVMS48	DIVFDN48
T30 ¹	CA ²	E0 ⁵	24.70a	5.05	64.24b	46.55b	8.41	3.22b	1.30	26.18a	90.43	34.40a	16.30	42.24a	28.28
		E1	23.88a	5.44	68.22a	49.68a	9.09	3.65a	1.40	21.63b	89.86	31.18b	15.89	39.85b	27.30
		E2	22.75b	5.53	70.36a	49.55a	9.37	3.59a	1.30	19.51b	89.87	29.98b	16.74	37.79b	27.80
		EPM ⁷	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.08	0.06	1.10	0.30	0.83	1.42	1.05	1.82
		P ⁶	0.02	0.14	0.00	0.04	0.24	0.01	0.41	0.00	0.33	0.00	0.92	0.02	0.93
	CB ³	E0	24.37a	4.59	65.11b	47.61b	8.14b	3.13b	1.33	25.83a	90.95	34.13a	16.01	41.78a	25.45
		E1	22.80b	4.35	70.22a	52.12a	9.04ab	3.46a	1.38	20.58b	90.81	31.65b	17.50	37.55b	26.18
		E2	23.50ab	4.34	72.83a	52.94a	9.44a	3.36a	1.31	18.15c	90.99	28.41c	18.50	36.03b	26.65
		EPM	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.07085	0.06	1.10	0.30	0.83	1.42	1.05	1.82
		P	0.06	0.52	0.00	0.00	0.08	0.01	0.70	0.00	0.91	0.00	0.47	0.00	0.90
	M ⁴	E0	31.37	4.48b	41.64	28.88	4.33	8.53	3.07	41.94ab	83.58	56.96ab	29.44	63.72	39.75
		E1	30.32	4.49b	42.16	28.95	3.51	8.61	3.08	38.61b	83.77	55.28b	31.84	64.35	44.95
		E2	30.85	5.03a	41.01	27.09	3.57	8.59	3.04	42.32a	83.33	58.72a	31.43	65.16	42.45
		EPM	0.37	0.18	0.91	0.77	0.38	0.07	0.05	0.90	0.25	0.68	1.16	0.95	1.71
		P	0.21	0.06	0.13	0.28	0.21	0.67	0.92	0.04	0.59	0.02	0.37	0.57	0.10
T60	CA	E0	23.74	5.36b	66.08b	48.65	8.32b	3.18b	1.26	24.12a	90.20	33.10a	18.35a	39.78a	26.20
		E1	23.16	5.95a	68.46a	49.15	9.40a	3.16b	1.40	21.02b	89.49	29.01b	13.66b	36.56b	23.88
		E2	22.88	5.30b	70.95a	51.43	9.64a	3.40a	1.33	19.00b	89.96	27.60b	15.27ab	34.36b	24.32
		EPM	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.07085	0.06	1.10	0.30	0.83	1.42	1.05	1.82
		P	0.40	0.03	0.02	0.10	0.07	0.04	0.24	0.01	0.25	0.00	0.08	0.00	0.64
	CB	E0	23.50	4.46	61.93b	45.29b	7.93b	3.23b	1.43	28.93a	90.88	29.43a	15.13	40.93a	20.29
		E1	23.25	4.59	71.37a	53.43a	9.88a	3.51a	1.33	19.19b	90.57	26.15b	14.49	32.55b	23.00
		E2	22.86	4.43	70.56a	51.86a	9.95a	3.57a	1.33	20.09b	90.66	27.89ab	14.06	35.15b	22.88
		EPM	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.07085	0.06	1.10	0.30	1.17	1.62	1.05	1.82
		P	0.60	0.81	<.0001	<.0001	0.00	0.00	0.35	<.0001	0.76	0.08	0.91	<.0001	0.51
	M	E0	33.29	4.60	45.30	30.89	4.12	8.58	3.19	38.32	83.62	54.57	28.17	59.57	39.11
		E1	33.06	4.70	46.04	30.58	3.18	8.56	3.13	37.61	83.66	54.59	29.27	61.30	39.81
		E2	33.60	4.72	44.93	31.13	3.84	8.51	3.16	38.98	83.91	53.99	27.41	61.46	39.78
		EPM	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.07085	0.06	1.10	0.30	0.83	1.42	1.27	2.08
		P	0.70	0.88	0.77	0.92	0.25	0.75	0.72	0.68	0.76	0.85	0.66	0.56	0.97

Tabela 2. Composição química das silagens em resposta a doses crescentes de enzima fibrolítica em diferentes tempos de ensilagem, em %MS.

(conclusão)															
Itens			MS	MM	FDN	FDA	LIG	PB	EE	CNF	CHO	DIVMS24	DIVFDN24	DIVMS48	DIVFDN48
T120 ¹	CA ²	E0 ⁵	25.06a	5.79a	63.90b	46.35b	8.82	3.46a	1.23	26.10a	90.01	32.99a	14.58	42.86a	26.29
		E1	23.63b	5.22b	70.63a	51.55a	9.90	3.06b	1.32	19.51b	90.15	28.47b	14.94	36.10b	26.07
		E2	22.15c	5.09b	70.48a	52.23a	9.52	2.96b	1.28	19.87b	90.36	29.27b	16.13	35.73b	24.77
		EPM ⁷	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.07	0.06	1.10	0.30	0.83	1.42	1.05	1.82
		P ⁶	0.00	0.02	0.00	0.00	0.18	<.0001	0.59	0.00	0.71	0.00	0.73	<.0001	0.82
	CB ³	E0	24.21	4.33	68.49	50.06b	9.39	3.72a	1.45a	23.41a	91.90a	30.75a	14.06	37.06	22.73
		E1	23.23	4.34	73.88	53.88a	9.73	3.34b	1.42a	16.90b	90.79b	27.28b	17.46	34.13	25.60
		E2	22.96	4.47	72.51	52.03ab	9.26	3.21b	1.24b	18.05b	90.56b	27.27b	16.33	35.72	25.98
		EPM	0.45	0.18	1.11	0.94	0.40	0.07085	0.06	1.10	0.30	0.83	1.42	1.05	1.82
		P	0.10	0.83	0.11	0.03	0.70	<.0001	0.04	0.00	0.01	0.01	0.24	0.16	0.40
	M ⁴	E0	32.17a	4.16b	39.27	26.50	2.19	8.53	3.06	44.97	84.24a	57.93	29.91	65.21	38.09
		E1	29.73b	5.23a	40.81	26.71	3.02	8.68	3.03	42.04	82.85b	58.93	31.92	63.35	41.81
		E2	30.14b	4.36b	41.92	27.31	3.96	8.64	3.08	42.34	84.25a	57.29	27.14	63.84	41.37
		EPM	0.64	0.25	1.57	1.33	0.51	0.08	0.08	1.55	0.43	1.17	1.42	1.27	2.08
		P	0.01	0.00	0.40	0.85	0.11	0.49	0.83	0.29	0.01	0.39	0.08	0.60	0.48
Valor de p ⁸															
	E	<.0001	0.16	<.0001	<.0001	0.00	0.2395	0.28	<.0001	0.02	<.0001	0.70	<.0001	0.30	
	V	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
	T	0.00	0.70	<.0001	0.00	0.13	0.24	0.59	0.00	0.35	<.0001	0.03	<.0001	0.01	
	E*V	0.07	0.24	0.00	0.00	0.07	0.75	0.10	0.00	0.64	0.00	0.15	0.00	0.27	
	E*T	0.94	0.00	0.59	0.86	0.04	<.0001	0.77	0.65	0.24	0.98	0.25	0.29	1.00	
	V*T	<.0001	0.69	0.01	0.03	0.23	0.01	0.16	0.01	0.70	0.00	0.63	0.03	0.65	
	E*V*T	0.14	0.06	0.07	0.04	0.53	0.01	0.82	0.20	0.09	0.02	0.84	0.10	0.96	

¹Tempos de ensilagem (30, 60 e 120 dias); ²Cana-de-açúcar de alta digestibilidade; ³ Cana-de-açúcar de baixa digestibilidade; ⁴Silagem de milho; ⁵dose de enzima fibrolítica; ⁶valor de P do slice cana*tempo, onde letras minúsculas, na mesma coluna, comparam diferentes doses da enzima dentro da combinação cana*tempo; ⁷erro padrão da média; ⁸valor de p dos efeitos principais e das interações: E: enzima, V: volumoso; T: tempo de ensilagem; E*V: interação enzima*volumoso; E*T: interação Enzima*tempo; V*T: interação Volumoso*tempo; E*V*T: interação tripla enzima*volumoso*tempo.

5.3.3. Parâmetros Fermentativos

Os resultados referentes aos parâmetros fermentativos estão apresentados na tabela 3. Ocorreu interação tripla entre os fatores E*V*T para as concentrações de ácido acético, lático, etanol, nitrogênio amoniacal e também para o pH. O tratamento enzimático na ensilagem promoveu redução na concentração de ácido acético para as variedades de cana, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Já para a silagem de milho, a enzima fibrolítica elevou a concentração de acetato apenas no T120, independentemente da dosagem de enzima.

De maneira semelhante, a adição de enzima fibrolítica na ensilagem das variedades de cana-de-açúcar resultou em decréscimo da concentração de lactato, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Entretanto, este efeito não ocorreu para a silagem de milho, onde a enzima fibrolítica elevou a concentração de lactato, porém este efeito foi significativo apenas no T30.

O tratamento com enzima fibrolítica promoveu aumento na concentração de etanol nas silagens de cana-de-açúcar, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem, sem efeito sobre a silagem de milho.

Assim como ocorreu para etanol, foi observado aumento do pH para as silagens de cana-de-açúcar tratadas com enzima fibrolítica na ensilagem, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Entretanto, o tratamento enzimático reduziu o pH na silagem de milho apenas no T30.

Com relação ao N-NH₃, foi observado aumento desta variável em resposta ao tratamento enzimático para a silagens de cana CA nos tempos de ensilagem T60 e T120, e para a CB apenas no tempo T120, sem efeito significativo sobre a silagem de MILHO.

Tabela 3. Parâmetros fermentativos das silagens de milho e cana-de-açúcar em resposta a doses crescentes de enzima fibrolítica em diferentes tempos de ensilagem.

Itens			PH	N-NH3 (%Ntotal)	ACET (%MS)	PROP (%MS)	BUT (%MS)	LACT (%MS)	ETA (%MS)
T30	CA	E0	3.77b	2.73	4.66a	0.16a	-	3.52a	1.38c
		E1	3.83a	2.72	3.41c	0.14b	-	2.18b	1.97b
		E2	3.82a	2.77	3.83b	0.13b	-	2.21b	2.28a
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	0.01	0.62	<.0001	<.0001	-	<.0001	<.0001
	CB	E0	3.77b	2.69	4.68a	0.15a	-	3.59a	1.36c
		E1	3.83a	2.78	3.43b	0.13b	-	2.26c	2.00b
		E2	3.82a	2.76	3.34c	0.14b	-	2.54b	2.18a
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	0.01	0.15	<.0001	0.02	-	<.0001	<.0001
	M	E0	3.76a	4.73	3.73	0.16	-	5.12b	0.41
		E1	3.66b	4.72	3.70	0.16	-	5.82a	0.43
		E2	3.62b	4.70	3.69	0.16	-	5.74a	0.44
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	<.0001	0.98	0.47	0.78	-	0.02	0.72
T60	CA	E0	3.83b	2.70b	4.93a	0.16a	-	2.92a	1.44b
		E1	3.92a	2.75a	3.52c	0.14b	-	2.60b	2.26a
		E2	3.96a	2.74a	3.64b	0.14b	-	2.30c	2.29a
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	<.0001	<.0001	<.0001	0.01	-	<.0001	<.0001
	CB	E0	3.82b	2.67	4.80a	0.16a	-	2.97a	1.42b
		E1	3.94a	2.69	3.46b	0.14b	-	2.67b	2.15a
		E2	3.92a	2.65	3.60b	0.14b	-	2.44c	2.28a
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	<.0001	0.74	<.0001	0.03	-	<.0001	<.0001
	M	E0	3.78	4.81	4.09	0.15	-	5.77	0.45
		E1	3.75	4.70	3.96	0.15	-	5.71	0.46
		E2	3.73	4.79	4.06	0.15	-	5.66	0.49
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	0.10	0.71	0.13	0.77	-	0.69	0.56

Tabela 3. Parâmetros fermentativos das silagens de milho e cana-de-açúcar em resposta a doses crescentes de enzima fibrolítica em diferentes tempos de ensilagem.

(conclusão)

Itens			PH	N-NH3 (%Ntotal)	ACET (%MS)	PROP (%MS)	BUT (%MS)	LACT (%MS)	ETA (%MS)
T120 ¹	CA ²	E0 ⁵	3.85b	2.87c	6.33a	0.18a	0.03b	2.36a	1.78c
		E1	4.07a	4.65b	3.42b	0.14b	0.11a	1.50b	2.56b
		E2	4.22a	5.47a	3.33b	0.14b	0.15a	1.32c	2.95a
		EPM ⁷	0.01411	0.04	0.03	0.01	0.01	0.05	0.03
		P ⁶	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.00	<.0001	<.0001
	CB ³	E0	3.84b	3.04c	6.61a	0.19a	0.03c	2.54a	1.80c
		E1	4.04a	4.48b	3.46c	0.14b	0.09b	1.71b	2.47b
		E2	4.16a	5.10a	3.68b	0.13b	0.12a	1.63b	2.85a
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	0.01	0.05	0.03
		P	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.00	<.0001	<.0001
	M ⁴	E0	3.83	4.74	6.07c	0.15	-	5.62	0.39
		E1	3.82	4.86	6.17b	0.14	-	5.52	0.45
		E2	3.82	4.91	6.39a	0.14	-	5.59	0.43
		EPM	0.01	0.04	0.03	0.01	-	0.05	0.03
		P	0.69	0.50	<.0001	0.37	-	0.73	0.38
Valor de p ⁸									
	E	<.0001	<.0001	<.0001	0.47	0.10	<.0001	<.0001	
	V	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
	T	<.0001	<.0001	<.0001	0.75	-	<.0001	<.0001	
	E*V	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	-	<.0001	<.0001	
	E*T	<.0001	<.0001	<.0001	0.14	-	<.0001	<.0001	
	V*T	<.0001	<.0001	<.0001	0.13	-	<.0001	<.0001	
	E*V*T	<.0001	<.0001	<.0001	0.82	-	<.0001	<.0001	

¹Tempos de ensilagem (30, 60 e 120 dias); ²Cana-de-açúcar de alta digestibilidade; ³ Cana-de-açúcar de baixa digestibilidade; ⁴Silagem de milho; ⁵dose de enzima fibrolítica; ⁶valor de P do slice cana*tempo, onde letras minúsculas, na mesma coluna, comparam diferentes doses da enzima dentro da combinação cana*tempo; ⁷erro padrão da média; ⁸valor de p dos efeitos principais e das interações: E: enzima, V: volumoso; T: tempo de ensilagem; E*V: interação enzima*volumoso; E*T: interação Enzima*tempo; V*T: interação Volumoso*tempo; E*V*T: interação tripla enzima*volumoso*tempo. N-NH3: nitrogênio amoniacal; ACET: acetato; PROP: propionato; BUT: butirato; LACT: lactate; ETA: etanol.

Observou-se efeito de interação dupla entre os fatores E*V para a concentração de ácido propiônico, onde o tratamento enzimático reduziu a concentração de Propionato apenas nas variedades de cana-de-açúcar, na CA (0,167 vs. 0,139 e 0,135 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, P<.001) e na CB (0,166 vs. 0,137 e 0,139 %MS, para E0, E1 e E2,

respectivamente, $P < .001$), independentemente da dosagem, sem efeito sobre a silagem de milho.

A concentração de butirato foi afetada pela enzima fibrolítica apenas no tempo de ensilagem T120, onde foi reportado aumento nas concentrações deste ácido em ambas as variedades de cana de açúcar, independentemente da dosagem da enzima, sem efeito sobre a silagem de milho.

5.3.4. Perdas e Recuperação de MS

Os resultados de perdas fermentativas estão apresentados na tabela 4. Observou-se interação entre $E \times T \times V$ sobre a produção de efluente e RMS.

O tratamento enzimático na ensilagem aumentou as perdas de MS por efluente em ambas variedades de cana, independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Já para a silagem de milho, apenas a dose E1 de enzima fibrolítica elevou a produção de efluentes no T120, sem diferença entre o controle e a dose E2.

Concomitantemente, a RMS foi prejudicada pelo tratamento enzimático em função das perdas de MS. A utilização de enzima fibrolítica na ensilagem da cana-de-açúcar reduziu a RMS em ambas as variedades, sendo que esta redução na CA ocorreu independentemente da dosagem e do tempo de ensilagem. Já para a CB, a redução da RMS em resposta à adição de enzima ocorreu nos tempos de ensilagem T30 e T120. Resultado semelhante foi obtido para a silagem de MILHO, onde esta redução de RMS ocorreu apenas no T120, independentemente da dosagem da enzima.

Observou-se efeito de interação dupla entre os fatores $E \times V$ para produção de gases, onde o tratamento enzimático na ensilagem aumentou as perdas de MS por gases em ambas variedades de cana, na CA (15,01 vs. 17,98 e 20,09 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, $P < .001$) e na CB (13,56 vs. 16,52 e 18,37 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, $P < .001$), independentemente da dosagem, sem efeito sobre a silagem de milho.

Tabela 4. Perdas fermentativas, por gases (GAS) e efluente (EFLU), e a recuperação de matéria seca (RMS) das silagens de milho e cana-de-açúcar em resposta a doses crescentes de enzima fibrolítica em diferentes tempos de ensilagem.

Itens			GAS (%MS)	EFLU (%MS)	RMS (%MS)
T30	CA	E0	13.03 c	6.82 b	80,15 a
		E1	16.96 b	7.50 a	75,54 b
		E2	19.67 a	8.79 a	71,54 c
		EPM	0.80	0.23	1,64
		P	<.0001	<.0001	<.0001
	CB	E0	11.31 c	8.12 b	80,57 a
		E1	16.34 b	9.18 a	74,48 b
		E2	18.68 a	8.43 b	72,89 b
		EPM	0.70	0.23	1,64
		P	<.0001	0.01	0,01
	M	E0	3.93	3.21	92,86
		E1	3.92	3.12	92,96
		E2	3.92	3.20	92,88
		EPM	0.70	0.23	1,64
		P	1.00	0.96	0,38
T60	CA	E0	16.14 b	8.31 b	75,55 a
		E1	18.26 a	9.22 a	72,52 b
		E2	19.80 a	9.79 a	70,41 b
		EPM	0.70	0.23	0,05
		P	0.01	<.0001	0,05
	CB	E0	14.95 b	9.00 b	76,05
		E1	16.07 a	10.54 a	73,39
		E2	17.14 a	10.00 a	72,86
		EPM	0.70	0.23	1,64
		P	0.11	<.0001	0,32
	M	E0	3.01	3.79	93,2 a
		E1	3.88	3.36	92,76 b
		E2	3.80	3.33	92,87 b
		EPM	0.99	0.33	1,64
		P	0.79	0.54	0,83

Tabela 4. Perdas fermentativas, por gases (GAS) e efluente (EFLU), e a recuperação de matéria seca (RMS) das silagens de milho e cana-de-açúcar em resposta a doses crescentes de enzima fibrolítica em diferentes tempos de ensilagem.

(conclusão)

Itens			GAS (%MS)		EFLU (%MS)		RMS (%MS)	
T120 ¹	CA ²	E0 ⁵	15.88	b	9.46	b	74,66	a
		E1	18.73	a	10.21	a	71,06	b
		E2	20.80	a	10.63	a	68,57	b
		EPM ⁷	0.80		0.23		1.64	
		P ⁶	<.0001		0.01		<.0001	
	CB ³	E0	14.41	b	9.79	b	75,8	
		E1	17.14	a	10.89	a	71,97	
		E2	19.29	a	10.57	a	70,14	
		EPM	0.80		0.23		1.64	
		P	<.0001		0.01		0.06	
	M ⁴	E0	4.88		4.00	a	91,12	a
		E1	4.92		4.66	ab	90,42	b
		E2	3.95		5.37	b	90,68	b
		EPM	0.70		0.26		1.64	
		P	0.55		0.01		<.0001	
Valor de p ⁸								
E		<.0001		<.0001		<.0001		
V		<.0001		<.0001		<.0001		
T		0.00		<.0001		0.02		
E*V		<.0001		<.0001		0.17		
E*T		0.12		0.37		0.99		
V*T		0.37		<.0001		<.0001		
E*V*T		0.42		0.01		0.09		

¹Tempos de ensilagem (30, 60 e 120 dias); ²Cana-de-açúcar de alta digestibilidade; ³ Cana-de-açúcar de baixa digestibilidade; ⁴Silagem de milho; ⁵dose de enzima fibrolítica; ⁶valor de P do slice cana*tempo, onde letras minúsculas, na mesma coluna, comparam diferentes doses da enzima dentro da combinação cana*tempo; ⁷erro padrão da média; ⁸valor de p dos efeitos principais e das interações: E: enzima, V: volumoso; T: tempo de ensilagem; E*V: interação enzima*volumoso; E*T: interação Enzima*tempo; V*T: interação Volumoso*tempo; E*V*T: interação tripla enzima*volumoso*tempo.

5.3.5. Estabilidade Aeróbia

Observou-se efeito de interação dupla entre os fatores E*V para as variáveis de estabilidade aeróbia (EA) e horas para atingir a temperatura máxima (HtMax; Tabela 5). O tratamento enzimático aumentou a EA nas variedades de cana-de-açúcar, na CA (51,3 vs. 76 e 74 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$) e na CB (54 vs. 78,7 e 78,7 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$), independentemente da dosagem, sem efeito sobre a silagem de milho. A EA foi significativamente menor para a silagem de milho quando comparado com as variedades de cana-de-açúcar (34,3 vs. 67,1 e 70,4 horas, para silagem de milho, CA e CB, respectivamente; $P<.0001$).

Da mesma forma, a adição de enzima fibrolítica na ensilagem das variedades da cana aumentaram a HtMax, na CA (72,7 vs. 101,3 e 102 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$) e na CB (76 vs. 99,33 e 104 %MS, para E0, E1 e E2, respectivamente, $P<.001$), independentemente da dosagem, sem efeito sobre a silagem de milho. A média de HtMax foi significativamente menor para a silagem de milho quando comparado com as variedades de cana-de-açúcar (54,7 vs. 92 e 93,1 horas, para milho, CA e CB, respectivamente; $P<.0001$).

Com relação à temperatura máxima atingida (Tmax), foi observado efeito do tipo de forragem na ensilagem, onde a silagem de milho apresentou o maior valor de Tmax quando comparado às variedades de cana-de-açúcar (40,1 vs. 39,3 e 39,2 °C, para milho, CA e CB, respectivamente; $P<.0001$).

Tabela 5. Efeito das doses de enzima fibrolítica sobre os parâmetros de estabilidade aeróbia em função da forrageira ensilada.

Itens		EA ⁸ (hr)		Tmax (°C)	Htmax (hr)
CA ¹	E0 ⁴	51.33	b	39.14	72.67 b
	E1	76.00	a	39.33	101.33 a
	E2	74.00	a	39.28	102.00 a
	EPM ⁶	0.95		0.15	1.14
	P ⁵	<.0001		0.65	<.0001
CB ²	E0	54.00	b	39.19	76.00 c
	E1	78.67	a	39.19	99.33 b
	E2	78.67	a	39.22	104.00 a
	EPM	0.95		0.15	1.14
	P	<.0001		0.98	<.0001
M ³	E0	35.00		40.10	54.00
	E1	36.00		39.98	56.00
	E2	34.00		40.07	54.00
	EPM	1.16		0.18	1.40
	P	0.11		0.89	0.17
Valor de p ⁷					
V		<.0001		<.0001	<.0001
E		<.0001		0.94	<.0001
E*V		<.0001		0.92	<.0001

¹Cana-de-açúcar de alta digestibilidade; ²Cana-de-açúcar de baixa digestibilidade; ³Silagem de milho; ⁴dose de enzima fibrolítica; ⁵valor de P do slice cana*enzima, onde letras minúsculas, na mesma coluna, comparam diferentes doses da enzima dentro de cada volumoso; ⁶erro padrão da média; ⁷valor de p dos efeitos principais e das interações: E: enzima, V: volumoso; E*V: interação enzima*volumoso. ⁸EA: estabilidade aeróbia; Tmax: temperatura máxima; Htmax: horas para atingir a temperatura máxima.

O tempo de ensilagem afetou os parâmetros de estabilidade aeróbia. Os resultados de estabilidade aeróbia em função das forrageiras e do tempo de ensilagem estão apresentados na tabela 6. O tempo de ensilagem elevou a EA (57,22, 56 e 58,67 hr para T30, T60 e T120, respectivamente) e HtMax (73,3, 78,2 e 88,2 hr, para T30, T60 e T120, respectivamente), independentemente da fonte de volumoso. Não foi observado interação significativa entre E*T para as variáveis de estabilidade aeróbia.

Tabela 6. Efeito das doses de enzima fibrolítica sobre os parâmetros de estabilidade aeróbia em função do tempo de ensilagem.

Itens		EA ⁸ (hr)		Tmax (°C)	Htmax (hr)	
CA ¹	T30 ²	67.33	ab	39.21	86.00	c
	T60	64.67	b	39.31	90.67	b
	T120	69.33	a	39.23	99.33	a
	EPM ⁴	0.95		0.15	1.14	
	P ³	0.01		0.88	<.0001	
CB	T30 ²	69.33		39.17	88.00	c
	T60	69.33		39.14	92.00	b
	T120	72.67		39.29	99.33	a
	EPM	0.95		0.15	1.14	
	P	0.08		0.75	<.0001	
M	T30 ²	35.00		40.07	46.00	c
	T60	34.00		40.05	52.00	b
	T120	34.00		40.03	66.00	a
	EPM	1.16		0.18	1.40	
	P	0.50		0.99	<.0001	
Valor de p ⁵						
V		<.0001		<.0001	<.0001	
T		0.03		0.96	<.0001	
V*T		0.15		0.95	0.25	

¹Tempos de ensilagem (T30, T60 e T120 dias); ²dose de enzima fibrolítica; ³valor de P do slice tempo*enzima, onde letras minúsculas, na mesma coluna, comparam diferentes doses da enzima dentro de cada tempo de ensilagem; ⁴erro padrão da média; ⁵valor de p dos efeitos principais e das interações: V: volumoso; T: tempo de ensilagem; V*T: interação Volumoso*tempo. ⁸EA: estabilidade aeróbia; Tmáx: temperatura máxima; Htmax: horas para atingir a temperatura máxima.

5.4. DISCUSSÃO

5.4.1. Pré-ensilagem

As variedades de cana-de-açúcar utilizadas no presente estudo apresentaram em média BRIX 20% e 27% de MS no momento da ensilagem, cujo valor foi abaixo dos 30% de MS recomendados para uma adequada fermentação da silagem (MCDONALD et al., 1991). Entretanto, este conteúdo de MS na ensilagem da cana-de-açúcar é bem próximo a outros estudos reportado na literatura (CARVALHO et al. 2014). A composição química da cana-de-açúcar fresca foi semelhante à apresentada em outros trabalhos na literatura (CARVALHO et al. 2010), embora tenha apresentado valores de DIVMS48, DIVFDN48 e PB abaixo dos reportados por Sousa et al. (2014) (77,3, 38,7 e 4,5 %MS, respectivamente) para ambas as variedades.

Já para o milho, a concentração média de 34 %MS na ensilagem está dentro do intervalo adequado (32 a 38 %MS), assim como sua composição bromatológica, conforme estudos anteriores com ensilagem do milho (CYSNEIROS et al., 2006).

Dessa forma, é evidente a diferença em composição química entre as fontes volumosas utilizadas no estudo, fato que já era esperado. Consequentemente, a interpretação dos resultados da ensilagem com enzima fibrolítica deve levar em consideração primeiramente o tipo de volumoso utilizado, visto que características inerentes à própria forrageira interferem diretamente no padrão fermentativo da silagem.

5.4.2. Composição Química das silagens e Perdas de MS

De maneira geral, após o período de ensilagem, a silagem de milho apresentou concentração de nutrientes dentro de uma faixa típica, similar aos valores obtidos por Cysneiros et al. (2006), principalmente com relação ao teor de MS, PB, FDN e DIVMS, indicando que a fermentação durante o período de ensilagem ocorreu de forma adequada. O tratamento enzimático na ensilagem do milho não afetou as frações fibrosas e digestibilidade da fibra. Resultados semelhantes foram reportados por Mandebvu et al. (1999), onde o tratamento enzimático não afetou a DIVMS e DIVFDN da silagem.

Já para as silagens de cana, a composição química de ambas as variedades foi semelhante à apresentada por Sousa et al. (2014), ao ensilar cana com *L. buchneri*, obtendo

teores de FDN e FDA de 49,8 e 29,9 %MS, respectivamente, para a cana de alta digestibilidade. Entretanto, o tratamento enzimático na ensilagem da cana, independente da variedade, resultou em elevação do teor das frações fibrosas. Este acréscimo nos teores das frações fibrosas pode ser explicado pelo aumento nas perdas de MS em resposta ao tratamento enzimático na ensilagem da cana.

Houve uma redução significativa no conteúdo MS nas silagens em relação a cana fresca. Além disso, os componentes fibrosos, assim como PB e MM, aumentaram após a ensilagem. Apesar deste aumento dos componentes fibrosos seja algo esperado para silagens de cana, em decorrência do consumo dos carboidratos solúveis pelos microrganismos durante a ensilagem para produção dos AGCC, fato que altera a composição centesimal do volumoso (NOVINSKI et al., 2012), foi observado aumento das perdas de MS por efluente ao adotar o tratamento enzimático nesta forrageira. Provavelmente, tal fato ocorreu pela perda de carboidratos solúveis durante a fase fermentativa, devido a ação de leveduras, resultando em piores valores de RMS, afetando negativamente a DIVMS 24 e 48.

A produção de efluentes nas silagens pode ser afetada por vários fatores, dentre eles características bromatológicas relacionadas à própria forrageira, como teor de MS no momento da ensilagem, e grau de compactação do material, podendo resultar em formação de água durante a fermentação da glicose em etanol, reduzindo o conteúdo de MS por conta das perdas (ALLI et al., 1985; MCDONALD et al., 1991). Trabalhos com ensilagem de cana demonstram uma grande variabilidade nos resultados de perdas por efluente, cujos valores podem variar de 31.2 kg/t (SANTOS et al. 2008) a 115.6 kg/t (SIQUEIRA et al., 2010). No presente estudo, a produção de efluentes nas silagens de cana inoculadas com enzima fibrolítica foi bem elevada, podendo estar relacionada com a ação das leveduras.

A cana-de-açúcar possui algumas características específicas da cultura, como uma população epífita de leveduras (SIQUEIRA et al., 2011; PEREIRA, HERLING, 2015), além de seu elevado teor de carboidratos solúveis (40% MS), o que torna este volumoso altamente susceptível à ação das leveduras na ensilagem, promovendo perdas significativas de MS devido à conversão de sacarose à etanol e CO₂ (BALIEIRO NETO ET al., 2007; QUEIROZ et al., 2008). SCHMIDT et al. (2007), as perdas de MS na silagem de cana podem chegar a 490 g/kg de MS em resposta à ação de leveduras.

Entretanto, a utilização de aditivos na ensilagem da cana-de-açúcar vem se demonstrado uma estratégia eficiente no controle da proliferação das leveduras no silo. A bactéria homofermentativa *L. buchneri* vem apresentando resultados positivos sobre a qualidade da silagem de cana-de-açúcar (NUSSIO et al., 2003) e na silagem de milho (RANJIT, KUNG Jr.,

2000), visto que o produto final da fermentação dos carboidratos solúveis é o acetato, que tem ação inibitória sobre as leveduras (SCHMIDT et al., 2014; SILVA et al., 2019). Outra estratégia seria promover a liberação de carboidratos dos constituintes fibrosos afim de elevar a produção de lactato pelas bactérias ácido lácticas, promovendo rápida acidificação da silagem, evitando assim a proliferação de microrganismos indesejáveis (MUCK et al., 2018). Nesse contexto, as enzimas fibrolítica vem sendo objeto de estudo na ensilagem de volumosos, porém os resultados são inconsistentes.

Levando em consideração que o principal objetivo ao adicionar enzimas fibrolíticas ao processo de ensilagem consiste em degradar parcialmente a parede celular da planta e fornecer açúcares solúveis, podendo aumentar a taxa e a extensão da digestibilidade da silagem produzida, características inerentes à fonte forrageira, como o teor de CNF disponíveis nas forrageiras, é um fator que deve ser levado em consideração ao adotar um tratamento enzimático na ensilagem. Muck et al., 2018 descreve que a utilização de enzima fibrolítica na ensilagem justifica-se quando a forrageira tem limitações de concentrações de CNF para a fermentação adequada do silo, como é o caso de gramíneas. No caso da cana, que já apresenta grande quantidade de açúcares para a adequada fermentação, a utilização de enzima fibrolítica pode trazer prejuízos para a qualidade do produto final. A utilização de enzima fibrolítica na ensilagem de forragens ricas em CNF pode resultar em um excesso de liberação de carboidratos solúveis, promovendo aumento de leveduras e consequentemente de etanol, proporcionando piora na RMS (KUNG, MUCK, 2015). A cana apresenta grande quantidade de CNF, em função do alto teor de sacarose, dessa forma é possível supor que esse aumento nas perdas por efluentes tenha sido causado pelo metabolismo das leveduras, que por sua vez atuam consumindo carboidratos solúveis e lactato, resultando na produção de CO₂, água e etanol (MCDONALD et al., 1991; QUEIROZ et al., 2008).

No presente estudo, a enzima fibrolítica utilizada apresenta alta atividade de xilanase, dessa forma o composto enzimático pode ter atuado nas frações mais digestíveis da hemicelulose, uma vez que a xilana é o principal componente da hemicelulose (MENDOZA et al., 2014). Entretanto, não foi observado efeito da enzima fibrolítica sobre a DIVFDN, provavelmente pela solubilização parcial dos constituintes da parede celular, sem efeito significativo sobre a digestibilidade da fibra. Carvalho (2017) observou que a fração indigestível da FDN foi maior nas silagens inoculadas com enzima fibrolítica, pelo fato da degradação da fração mais solúvel da FDN. De maneira semelhante, Loures et al. (2005) observaram efeito reduzido sobre o teor de FDN e FDA ao ensilar capim Tanzânia com enzima fibrolítica, porém sem alterar a digestibilidade aparente da MS.

5.4.3. Parâmetros Fermentativos

Os maiores valores de pH foram observados para as silagens de cana ensiladas com enzima fibrolítica, independente da variedade, além de menores concentrações de lactato e acetato, e alta concentração de etanol. Tais valores foram maiores do que aqueles reportados por Schmidt et al. (2014), reforçando a hipótese da ação das leveduras, visto que o acetato, assim como o propionato, inibem a ação das leveduras (SCHMIDT et al., 2014; SILVA et al., 2019).

Além disso, foi observado aumento nos teores de N-NH₃, na produção de gases, porém tal resultado foi evidente aos 120 dias de ensilagem da cana, onde foi observado o maior valor de pH para este tratamento. Este aumento de N-NH₃ pode estar relacionado com a proteólise, resultado da ação de microrganismos indesejáveis no silo, como *Clostridium*, que atuam fermentando carboidratos ou lactato à butirato, CO₂ e H₂O, e/ou convertendo proteínas ou aminoácidos à N-NH₃, aminas biogênicas e CO₂ (PAHLOW et al., 2003). Consequentemente, o pH elevado contribui para a ação das leveduras, visto que as perdas por gases, principalmente CO₂, também estão correlacionadas com a produção de etanol (BORREANI et al., 2018).

É importante ressaltar que o aumento do tempo de ensilagem elevou os valores de pH para as silagens, independente do volumoso, cuja situação pode ser justificada pelo metabolismo secundário, onde os carboidratos solúveis presentes no silo foram metabolizados pelos microrganismos ao longo do tempo de armazenamento (KUNG, DERBEDROISAN, 2010; SARIÇİÇEK et al., 2016). Nesse contexto, fica evidente que o tempo de ensilagem exerce grande influência sobre os parâmetros fermentativos e composição química da silagem, e consequentemente sobre a estabilidade aeróbia. Schmidt et al. (2004) ao ensilar cana-de-açúcar durante diferentes tempos de ensilagem observaram redução da digestibilidade ao armazenar por 120, quando comparado ao período de 60 dias, possivelmente em função do maior consumo de carboidratos solúveis durante o tempo de armazenamento.

De maneira geral, o tratamento enzimático não afetou o pH e o teor dos ácidos orgânicos da silagem de milho. Assim como para a silagem de cana, esperava-se resposta positiva da enzima fibrolítica sobre a digestibilidade da fibra, consequentemente efeitos positivos sobre a produção de ácidos orgânicos, promovendo rápida queda de pH e contribuindo para melhora da fermentação.

Zopollatto et al., (2009) observaram que o possível efeito de enzimas fibrolíticas, atuando na redução das frações fibrosas, melhora da digestibilidade da MS, queda de pH e maior concentração da fração proteica na MS. Entretanto, pelo fato de depender de condições

favoráveis específicas para sua ação, tais como temperatura e pH (MORGAVI et al., 2000), as respostas positivas em função da utilização de enzimas na ensilagem dependem de fatores método de aplicação e doses, especificidade ao substrato e tipo de complexo enzimático utilizado (MEALE et al., 2014), além do tipo de forragem, já descrito anteriormente (ADESOGAN 2005).

Li Ying et al.(2017) utilizando enzima fibrolítica (celulase, glucosidase e xilanase) e inoculante microbiano (*L. rhamnosus*) na silagem de milho, observaram um aumento na concentração de ácido láctico e redução da produção de N-NH₃ e da FDN com a inclusão de ambos os aditivos. A enzima fibrolítica também foi capaz de diminuir o teor da FDN e aumentar a digestibilidade *in vitro* da FDN e PB. Entretanto, Cysneiros et al. (2006) não observaram resultados semelhantes com a utilização de enzima fibrolítica na ensilagem.

Dessa forma, pelo fato do mecanismo de ação, assim como o efeito dose-resposta, das enzimas na ensilagem não estar totalmente elucidado, poderia justificar a falta de resposta sobre a digestibilidade da fibra da silagem de milho. Dean et al (2005), ao avaliar o efeito da adição de diferentes enzimas fibrolíticas na ensilagem de capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*), relataram aumento da DIVFDN (48-h) para o tratamento com celulase, ao passo que não houve efeito sobre este parâmetro para a xilanase.

5.4.4. Estabilidade Aeróbia

As silagens de cana-de-açúcar apresentaram maior estabilidade aeróbia quando comparada à silagem de milho, em média 70 horas contra 30 horas da silagem de milho, semelhante às 90 horas relatado por Amaral et al. (2009), mas acima das 39 horas reportada por Schmidt et al. (2011), para cana-de-açúcar sem enzima.

Entretanto, nem sempre pode-se concluir que a menor temperatura obtida para estabilidade aeróbia indica uma silagem mais estável. Para Siqueira et al. (2005), a interpretação dos resultados deve levar em consideração, dentre outros fatores, a máxima temperatura observada e o tempo necessário para alcançar a temperatura máxima.

No presente estudo, foi observado efeito da enzima fibrolítica sobre a temperatura máxima, porém a silagem de milho apresentou menor tempo para atingir a temperatura máxima, quando comparada com as silagens de cana. A justificativa para este resultado se dá principalmente pelas perdas por efluentes observados nas silagens. Ao elevar as perdas de MS por efluentes, as silagens de cana-de-açúcar apresentaram menores teores de CHO solúveis residuais na abertura dos silos, reduzindo assim a disponibilidade de nutrientes para os

microrganismos aeróbios se desenvolverem, resultando em aumento do tempo necessário para atingir a temperatura máxima após a abertura dos silos (SIQUEIRA, 2005).

Ao contrário da cana-de-açúcar, a silagem de milho apresentou uma fermentação desejável, com alta concentração de lactato e carboidratos solúveis, e esta condição favorece o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis na abertura, como as leveduras, podendo desta forma apresentar baixa estabilidade aeróbia (TAYLOR et al., 2002; MUCK, 2010).

Assim como as perdas de MS, o tempo de ensilagem pode favorecer a redução de carboidratos solúveis no momento da abertura. Observou-se que o aumento do tempo de estocagem aumentou a estabilidade das silagens, assim como o tempo necessário para atingir a temperatura máxima, independente da do volumoso. O consumo de carboidratos solúveis pelos microrganismos durante a fermentação pode explicar este efeito do tempo de estocagem sobre as variáveis de estabilidade aeróbia.

Novinski et al. (2012) observaram que as silagens de cana-de-açúcar abertas com 30 dias apresentaram menor estabilidade aeróbica (35 horas) quando comparadas com a silagem aberta aos 60 e 90 dias (50,5 e 48,5 horas, respectivamente), ao passo que o tempo necessário para atingir a temperatura máxima aumentou com o aumento do tempo de ensilagem, possivelmente pelo aumento das perdas de carboidratos durante a fase fermentativa, em resposta à ação dos microrganismos ao longo do tempo de estocagem, reduzindo assim a disponibilidade de carboidratos residuais para o crescimento de microrganismos na abertura da silagem.

5.5. CONCLUSÕES

A adição de enzima fibrolítica na ensilagem da cana-de-açúcar não promoveu efeitos positivos sobre a digestibilidade da fibra, independentemente da variedade da cana de açúcar. O tratamento enzimático, assim como o tempo de ensilagem, promoveu o aumento nos conteúdos de FDN e FDA, e elevação nas perdas de MS por efluente e gases, prejudicando a recuperação de matéria seca nas silagens de cana-de-açúcar. Dessa forma, a inclusão de enzima na ensilagem de volumosos com alta concentração de carboidratos solúveis não foi benéfica, no presente estudo. Já na ensilagem do milho, a enzima fibrolítica não afetou significativamente a composição química, e a falta de resposta na ensilagem do milho pode estar relacionado a características específicas da própria enzima, necessitando de mais estudos quanto a dose resposta.

5.6. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.T. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. In: **Proceedings of 16th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**, Gainesville, p. 91–109, 2005.

ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.A.; SALAWU, M.B.; DEAN, D.B.; STAPLES, C.R. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. **Journal of Dairy Science**. v.87, p.3407-3416. 2004.

ALLI, I.; THIFFAULT C.; BAKER B. et al. A device for monitoring ensilage effluent produced in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.12, p.3355-3359, 1985.

AMARAL, R.C.; PIRES, A.V.; SUSIN, I. et al. Cana-de-açúcar ensilada com ou sem aditivos químicos: fermentação e composição química. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1413-1421, 2009.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed. Virginia, 2000.

AOAC, 1996. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

BALIEIRO NETO, G.; FERRARI JÚNIOR, E.; NOGUEIRA, J.R.; POSSENTI, R.; PAULINO, V.T.; BUENO, M.S. Perdas fermentativas, composição química, estabilidade aeróbia e digestibilidade aparente de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químico e microbiano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.6, p.621-630, 2009

BALIEIRO NETO, G.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A. Óxido de cálcio como aditivo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.1231-1239, 2007.

BARKER, S.B., SUMMERSON, W.H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. **The Journal of Biological Chemistry**. v.138, p.535–554. 1941.

BEAUCHEMIN, K.A., JONES, S.D.M., RODE, L.M., SEWALT, V.J.H. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**. v.77, p.645-653, 1997.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R.J.; HOLMES, B.J.; MUCK, R.E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.5, p.3952 – 3979. 2018

CAI, Y.M.; KUMAI, S.; ZHANG, J.G; BENNO, Y. Comparative studies of lactobacilli and enterococci associated with forage crops as silage inoculants. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 188–194, 1999.

CARVALHO M. V.; RODRIGUES, P. H. M.; LIMA, M. L. P.; ANJOS, I. A.; LANDELL, M. G. A.; SANTOS, M. V.; PRADA E SILVA, L. F. Composição bromatológica e digestibilidade de cana-de-açúcar colhida em duas épocas do ano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 47, n. 4, p. 298-306, 2010.

CARVALHO, B. F., AVILA, C. L. S., PINTO, J. C., NERI, J., SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.195, p.1-13. 2014.

CARVALHO, L R Q. **Adição de bactérias homofermentativas e celulase na ensilagem de cana-de-açúcar**. 2017. 46 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, 2017.

COLOMBATTO, D.; MOULDA, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Animal Feed Science and Technology**, v.111, p. 111–128, 2004.

CYSNEIROS, C.S.S.; FRANCO, G.L.; ULHOA, C.J.; DIOGO, J.M.S.; RAMOS, A.K.B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, p.339-348, 2006.

DEAN, D.B.; ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.; LITTELL, R.C. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of *bermudagrass* silage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 994-1003, 2005.

DEHGHANI, M.R.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T.; KRISTENSEN, N.B. Effect of enzyme addition to forage at ensiling on silage chemical composition and NDF degradation characteristics. **Livestock Science**, v. 150, p. 51-58, 2012.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, W.H.; Van WIKSELAAR, P.G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v.56, p.330-343, 2001.

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

FOLDAGER, J. **Protein requeriment and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. East Lansing: Michigan State University, 1977. 167p. Thesis (Ph.D. in Animal Science) - Michigan State University, 1977.

GOERING, H. K.; P. J. VAN SOEST. 1970. Forage fibre analysis. **Agricultural Handbook** no. 379. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Washington, USA.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.1791-1794, 1999.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.101-119. 2007.

KUNG JR., L. Side effects of microbial inoculants on silage fermentation In: International symposium on forage quality and conservation, 1, São Pedro. **Proceedings of 1st International symposium on forage quality and conservation**, Piracicaba: FEALQ, p.7-26, 2009.

KUNG JUNIOR, L.; ROBINSON, J.R.; RANJIT, N.K. et al. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn ensilage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1479-1486, 2000.

KUNG, L. JUNIOR. Aditivos microbianos e químicos para silagem – Efeitos na fermentação e resposta animal. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2. , Piracicaba, 2000. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.53–73.

KUNG, L., JR., MUCK. R. E. **Silage additives**: Where are we going? P. 72–81 in Proc. XVII Int. Silage Conf., Piracicaba, Sao Paulo, Brazil. J. L. P. Daniel, G. Morais, D. Junges, and L. G. Nussio, ed. University of Sao Paulo, Piracicaba, SP, Brazil. 2015.

KUNG, L., JR.; SANTOS, M.; DERBEDROSIAN. M. The effect of feeding cows corn silage with or without *L. buchneri* 40788 and supplemented with or without Levucell SC. **Lallemand Animal Nutrition Internal Report**. Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, 2010.

LARA, E.C. **Produção e avaliação de enzimas fibrolíticas exógenas na ensilagem de milho**. 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

LI YING, H.; BORJIGIN, N.; ZHU, Y. Effect of inoculants and fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, in vitro digestibility and aflatoxins accumulation of whole-crop corn silage. **Grassland Science**, v. 63, p. 69-78, 2017.

LOURES, D. R. S. **Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas da ensilagem e na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo silagem de capim tanzânia**. 2004. 167 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

LOURES, D. R. S.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. D. F.; et al. Efeito de enzimas fibrolíticas e do teor de matéria seca em silagens de capim-tanzânia sobre os parâmetros ruminais, o comportamento ingestivo e a digestão de nutrientes, em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 736-745, 2005.

MANDEBVU, P.; WEST, J.W.; FROETSCHER, M.A.; HATFIELD, R.D.; GATES, R.N.; HILL, G.M. Effect of enzyme or microbial treatments of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. **Animal Feed Science Technology**, v.77, p.317-329. 1999.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of ensilage**. 2.ed. Merlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.

MEALE, S.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; HRISTOV, A.N.; CHAVES, A.V.; MCALLISTER, T.A. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427–442, 2014.

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**. V.2014.

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.

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG JR. L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**. v.101, p.3980–4000. 2018.

MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.183-191, 2010.

MURARO, G.B.; ROSSI JR, P.; OLIVEIRA, V.C.; GRANZOTTO, P.M.C.; SCHOGOR, A.L.B. Efeito da idade de corte sobre a composição bromatológica e as características da silagem de cana-de-açúcar plantada em dois espaçamentos e três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.38, n.8, p.1525-1531, 2009

NADEAU, E. M. G.; BUXTON, D. R.; RUSSELL, J. R.; ALLISON, M. J.; YOUNG, J. W. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of *orchardgrass* and alfalfa. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1487-1502, 2000.

NELSON, N. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**. v.153, p.375-380. 1944.

NOVINSKI, C O; JUNGES, D; SCHMIDT, P; ROSSI JUNIOR, P; PAULO, J; CARVALHO, G; TEIXEIRA; R A. Methods of lab silos sealing and fermentation characteristics and aerobic stability of sugarcane silage treated with microbial additive. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.2, p.264-270, 2012

NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A. F. Silagem de cana-de-açúcar. In: Simpósio sobre manejo da pastagem: Produção animal em pastagens. 20., 2003, Piracicaba. **Anais do 20º Simpósio sobre manejo da pastagem**, Piracicaba: FEALQ, 2003.

PAHLOW G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.J.W.H.O.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p.31-93.

PALMQUIST, V.T.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v.54, p. 1025, 1971

PEREIRA, E.S.; QUEIROZ, A.C.; PAULINO, M.F. et al. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: Consumo digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.2, p.563-572, 2001.

PEREIRA, L. E. T.; HERLING, V. R. **Tecnologias para conservação de forragens**. Pirassununga: Grupo de Estudos em Forragicultura e Pastagens (GEFEP), 2015, 46 p. Disciplina: ZAZ 0328 – Forragicultura II.

PRITCHARD, G.; HUNT, J. T.; ALLEN, A.; TREACHER, R. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on digestion and growth performance in feed cattle. **Journal Animal Science**. vol.74, (supl. 1) p.296. 1996.(Abstr.)

QUEIROZ, M.A.A.; FUKUSHIMA, R.S.; GOMIDE, C.A. et al. Substitution of crude cell wall for neutral detergent fibre in the equations of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System that predict carbohydrate fractions: application to sunflower (*Helianthus annuus*L.). **Animal**, v.2, p.1087-1092, 2008.

RANJIT, N. K., KUNG JR. L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.526–535. 2000.

RODRIGUES, R.C. Avaliação químico-bromatológica de alimentos produzidos em terras baixas para nutrição animal. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -EMBRAPA**, Pelotas, 2009. 31p.

SANTOS, M. C.; NUSSIO, L. G.; MOURÃO, G. B.; et al. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 9, p. 1555-1563, 2008.

SARIÇİÇEK, B Z; YILDIRIM, B; KOCABAŞ, Z; ÖZGÜMÜŞ DEMİR, E. The Effects of Storage Time on Nutrient Composition and Silage Quality Parameters of Corn Silage Made in Plastic Mini Silo in Laboratory Conditions. **Iğdir University Journal of the Institute of Science and Technology**, v.6, n.3, p.177-183, 2016.

SCHMIDT, P.; MARI, L.J.; NUSSIO, L.G. et al. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1666-1675, 2007.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, C.M.B.; RODRIGUES, A.A.; NUSSIO, L.G.; SANTOS, P.M.; SILVA, C.E. Produtividade, composição morfológica, digestibilidade e perdas no processo de ensilagem de duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem adição de ureia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 41, 2004. Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.1 CD ROM.

SCHMIDT, P.; ROSSI JUNIOR, P.; JUNGES, D. et al. Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.3, p.543-549, 2011.

SCHMIDT, P.; SOUZA, C.M.; BACH, B.C. Uso estratégico de aditivos em silagens: Quando e como usar? In: JOBIM, C.C., CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I (eds.), Simpósio: Produção e utilização de forragens conservadas, 5.ed., Maringá, 2014. **Anais do 5º Simpósio: Produção e utilização de forragens conservadas**, Maringá: UEM, p.243-264, 2014

SELMEROLSEN, I.; HENDERSON, A.R.; ROBERTSON, S.; MCGINN, R. Cell-wall degrading enzymes for silage. 1. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. **Grass and Forage Science**. v. 48, p.45-54. 1993.

SHEPERD, A. C.; KUNG, L. JUNIOR. Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p.1767-1773, 1996.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. 2002. Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed.Viçosa: UFV.

SILVA, LD; PEREIRA OG, ROSEIRA JPS, AGARUSSI MCN, SILVA VP, SILVA TC, LEANDRO ES, PAULA RA, SANTOS SA, RIBEIRO KG, VALADARES FILHO SC. Effect of Wild *Lactobacillus buchneri* Strains on the Fermentation Profile and Microbial Populations of Sugarcane Silage. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, Vol. 10, No. 0 . 2019.

SIQUEIRA, G R; REIS, R A; ITURRINO, R P S; ROTH, A P T P; ROTH, M T P; RESENDE, F D. Perfil fermentativo de silagens de cana-de-açúcar *in natura* ou queimada e tratadas ou não com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.8, p.1651-1661, 2011.

SIQUEIRA, G.R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada com aditivos químicos e microbianos**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKENITURRINO, R.P. et al. Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem da cana-de- açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.103-112, 2010.

SOUSA, D. O.; MESQUITA, B. S.; DINIZ-MAGALHÃES, J.; BUENO, I. C. S.; MESQUITA, L. G. SILVA, L. F. P. Effect of fiber digestibility and conservation method on feed intake and the ruminal ecosystem of growing steers. **Journal of Animal Science**. v.92, p.5622–5634, 2014.

SPOELSTRA, S. F., **Chemical and biological additives in forage conservation**. In: Conference Forage Conservation Towards 2000, p.48-70, 1991.

SPOELSTRA, S. F.; VAN WIKSELAAR, P.G.. The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the chemical composition of the resulting silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.60, p.223-228, 1992.

TAYLOR, C. C.; RANJIT, N. J.; MILLS, J. A.; NEYLON, J. M.; KUNG JR., L. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.85, p.1793–1800. 2002.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

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

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. **Analysis of forages and fibrous foods**. Ithaca: Cornell University, 202p. 1985.

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.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, Suplemento Especial, p.170-189, 2009.

6. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA FIBRA DE VOLUMOSOS, PRODUÇÃO DE GASES, DEGRADABILIDADE DA MATÉRIA SECA E CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA E ÁCIDOS GRAXOS.

6.1. INTRODUÇÃO

Entre os maiores desafios da nutrição de ruminantes, estão o aumento da eficiência alimentar e a redução de custos com alimentação. Visto a importância da fibra em promover a saúde ruminal via estímulo à ruminação e tamponamento ruminal, assim como sua utilização como substrato para fermentação ruminais (MERTENS, 2001), pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de elevar sua digestibilidade. Entre os resultados esperados estão o aumento da eficiência de utilização dos alimentos fibrosos e, consequentemente, benefícios ao desempenho animal. Neste contexto, tem surgido estratégias onde a suplementação com aditivos pode trazer benefícios sobre a degradação da fibra e aumento da eficiência alimentar, como as enzimas fibrolíticas exógenas (BEAUCHEMIN et al., 2001).

É crescente o interesse na utilização de enzima fibrolítica na alimentação de ruminantes, principalmente considerando os elevados custos com alimentação e acesso a enzimas de melhor qualidade (ADESOGAN et al. 2014; HE et al. 2014). O aumento da quantidade de enzimas fibrolíticas presentes no rúmen podem atuar na remoção de barreiras estruturais da fibra que atrasam a colonização microbiana das frações digestíveis (COLOMBATTO et al. 2003), maximizando a degradação da fibra.

Foram reportados resultados positivos em resposta à utilização de enzima fibrolítica sobre ganho de peso médio diário (McALLISTER et al., 1999), digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro (ELWAKEEL et al., 2007), melhora do potencial de produção de gases *in vitro* e cinética fermentativa de alimentos fibrosos (ELGHANDOUR et al. 2013). Entretanto, a eficiência dos produtos enzimáticos é altamente variável (COLOMBATTO et al. 2003; MEALE et al. 2014; MENDOZA et al. 2014), uma vez que a resposta à adição de enzimas fibrolíticas pode ser afetada por vários fatores, como a composição da dieta, tipo de enzima e seu modo de ação específico, modo de aplicação e nível das doses (YANG et al. 2000; MORGAVI et al. 2001; WALLACE et al. 2001; MENDOZA et al. 2014). Além disso, as condições ruminais, tais como temperatura, pH e tempo de retenção, bem como a susceptibilidade a proteólise, podem afetar diretamente a estabilidade ruminal das enzimas e seu tempo de ação, limitando sua atividade sobre a digestibilidade da fibra (MORGAVI et al.,

2000; MEALE et al., 2014). Tais fatos podem justificar a inconsistência nos resultados encontrados em resposta a utilização de enzima fibrolítica.

Neste contexto, uma alternativa a esses problemas seria a utilização de microrganismos vivos, como o fungo *Aspergillus oryzae*, uma vez que se desenvolve no ambiente ruminal, produzindo uma gama de enzimas (e não apresenta tantas restrições para sua ação, como a enzima). O *A. oryzae* aumenta a degradação da parede celular (NEWBOLD et al., 1992), atua indiretamente sobre a fermentação ruminal, facilitando o acesso e aderência dos microrganismos à fibra, elevando a digestibilidade da fração fibrosa por estímulo às bactérias fibrolíticas (NEWBOLD, 1997; SOSA et al., 2011; SUN et al., 2014).

Resultados positivos sobre o desempenho de ruminantes em resposta à utilização de *A. oryzae* foram reportados, como aumento do consumo de MS (VAN HORN et al., 1984; GOMEZ-ALARCON et al., 1991; CATON et al., 1993; LATIF et al., 2014), ganho de peso (TRICARICO et al., 2007) e produção de leite (HUBER et al., 1985; KELLEMS et al., 1987; DENIGAN et al., 1992). Entretanto, seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado (CHIQUELLE, 1995; LATIF et al., 2014; SUN et al., 2014).

Ambos os aditivos apresentam potencial em modular a fermentação ruminal, elevando a digestibilidade da fibra. Dessa forma, uma estratégia seria a combinação destes aditivos, com o intuito de potencializar a digestibilidade da fibra, uma vez que sua ação proporcionaria uma ação sinérgica sobre a redução do tempo de colonização e melhora da digestibilidade. Ao conhecimento dos autores, não há trabalhos na literatura avaliando o efeito da combinação de ambos os aditivos, enzima fibrolítica e culturas vivas de *A. oryzae*, sobre a digestibilidade e produção de gases *in vitro* de volumosos.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito de doses de culturas vivas de *Aspergillus oryzae*, enzima fibrolítica e a combinação de ambos sobre a digestibilidade de volumosos, fermentação e produção de gases *in vitro*. Foi levantada a hipótese de que o fungo apresentaria maiores valores para produção de gases e digestibilidade em comparação com a enzima, e que a combinação entre ambos poderia apresentar uma resposta sinérgica sobre os parâmetros de digestibilidade e produção de gases *in vitro*.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal (LFR), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus da USP, na cidade de Pirassununga/SP.

6.2.1. Animais

Seis fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), foram utilizadas como doadoras de inóculo para os ensaios *in vitro*. Todos os animais eram canulados, mantidos em baias do tipo free-stall, com livre acesso à água, recebendo uma dieta formulada com 60% de silagem de milho e 40% de concentrado para atingir o requerimento nutricional. Os animais utilizados estavam adaptados a esta dieta por pelo menos 21 dias antes do início dos ensaios.

6.2.2. Substrato

Para testar o efeito da adição de culturas vivas do fungo *A. oryzae* (AO) e enzima fibrolítica (Fibrozime, Alltech®) sobre a produção de gases e digestibilidade *in vitro* da MS e do FDN, duas fontes volumosas foram utilizadas: silagem de milho e silagem de cana-de-açúcar (Tabela 7).

Os volumosos foram caracterizados para sua composição química de acordo com a AOAC (2000), para determinação dos seguintes parâmetros: matéria seca (MS; ID 950.15), matéria mineral (MM; ID 942.05), proteína bruta (PB; ID 984.13), extrato etéreo (EE, ID 920.39), fibra em detergente neutro (FDN; ID 973.18, com amilase, sem sulfito de sódio; MERTENS, 2002) e fibra em detergente ácido (FDA; ID 973.18; MERTENS, 2002). O teor de lignina foi determinado de acordo com Van Soest e Robertson (1985), cuja mensuração ocorreu após hidrólise da celulose em ácido sulfúrico 72% no resíduo da amostra submetida ao detergente ácido.

Tabela 7. Composição química dos volumosos utilizados no ensaio de degradabilidade e produção de gases *in vitro*.

Ítem ¹	Silagens	
	Milho	Cana
MS, %	31,84	30,01
	-----% da MS-----	
MM	5,17	5,1
MO	88,96	93,09
PB	7,39	3,1
EE	3,64	1,29
FDN	41,60	51,61
FDA	30,64	47,26
LIG	4,94	5,37
CHO	84,98	93,55
NFC	38,67	51,94
DIVMS24	56,96	61,62
DIVMS48	64,25	64,95
DIVFDN24	35,75	22,90
DIVFDN48	42,51	29,56

¹MS = matéria seca; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta. cana ADFDN – 2480

6.2.3. Preparação do inócuo

No dia do início dos ensaios *in vitro*, antes do primeiro trato da manhã, o conteúdo ruminal foi coletado separadamente para cada animal, e em seguida filtrado manualmente em pano dessorados para obtenção das fases líquida e sólida. A fase líquida foi armazenada em garrafas térmicas pré-aquecidas e a fase sólida em sacos plásticos, mantidos em caixa térmica previamente aquecido a 39°C até o término da coleta. Após a coleta, todo o material foi enviado imediatamente ao laboratório, onde o inóculo foi preparado para cada doador separadamente. Para cada inóculo, proporções iguais de líquido e sólido foram homogeneizadas em liquidificador por 10 segundos, previamente insuflado com CO₂, e em seguida filtrado em três camadas de tecido de algodão (BUENO et al., 2005). O material filtrado foi mantido em banho maria (39°C) sob saturação de CO₂ até sua utilização.

6.2.4. Biosaos de metanogênese e cinética fermentativa

A técnica de produção de gases *in vitro* foi executada de acordo com a metodologia descrita por Theodorou et al. (1994), Mauricio et al. (1998) e adaptada por Bueno et al. (2005). Foi utilizado um branco para cada inóculo e todas as amostras foram utilizadas em triplicata.

Foram realizados dois bioensaos de produção de gases, executados simultaneamente: um ensaio de curto período de incubação (24 h) definido como bioensaio de metanogênese; e outro de longo período de incubação (96 h) definido como bioensaio de cinética fermentativa.

Para o bioensaio de metanogênese, aproximadamente 500mg de amostra moída (1-mm sieve) foram pesadas e inseridas em bags (Ankom, F57), e posteriormente inseridas em frascos de fermentação (160 ml de capacidade), submetidos aos seguintes tratamentos: doses do fungo *A. oryzae* (**F0** – sem adição de AO; **F1** – 1g de AO; **F3** – 3g de AO e **F5** – 5g de AO), doses da enzima fibrolítica (**E0** – sem adição de enzima; **E8** – 8g de enzima; **E16** – 16g de enzima; **E24** – 24g de enzima), e a combinação de ambas, totalizando 32 tratamentos. As doses foram corrigidas para um volume ruminal de 60L, sendo que a quantidade de cada aditivo adicionado foi de 100uL/frasco, a fim de não alterar o *headspace* para a produção de gases nos frascos.

O *A. oryzae*, adquirido através da Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropical, foi cultivado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose 4% (Acumidia®), e mantidas em Incubadora BOD Microprocessada (MarqLabor®), sob temperatura controlada por termostato à 28°C, para total crescimento do fungo. Após o crescimento total, foi realizada uma análise morfológica, por meio de microcultivo para confirmação do fungo cultivado. A produção em larga escala foi realizada no Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto. Para tanto, o fungo foi cultivado em erlenmeyers de 1L de capacidade, contendo ágar Sabouraud dextrose 4% (Acumidia®), e incubado à 28°C para aumentar a quantidade de esporos viáveis. Posteriormente, a porção vegetativa, juntamente com os esporos foram coletados e incorporados em uma solução nutritiva, contendo (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, FeSO₄.7H₂O, ZnSO₄, e MnSO₄. Esta solução foi incorporada em uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo, em uma proporção de 3:1, e em seguida transferidas para o biorreator. O processo de fermentação teve duração total de 7 dias. Após este período, o biorreator foi aberto e uma amostra foi coletada para contagem de UFC, e todo o conteúdo fermentado foi retirado e congelado, e posteriormente destinados à liofilização (Liofilizador Semi-Industrial LJI010) (SOSA et al., 2011).

Após a adição dos aditivos aos frascos, 25 ml do inóculo foi diluído em 75 ml de solução tampão mineral e imediatamente transferido para cada frasco. Todos os frascos foram selados e mantidos em estufa com ventilação forçada a 39°C.

Após 4, 8, 12, 16 e 24 h de incubação, a pressão interna dos gases foi mensurada utilizando um transdutor e um *datalogger* (PressDATA 800®) para posterior estimativa do volume de gas produzido durante o período de incubação. Em seguida, foram coletados cerca de 2ml de gases para mensuração da produção de metano de cada frasco, através de tubos de *vacuntainer*, sendo obtido um acumulado de 24 horas de fermentação. Após a mensuração da pressão e coleta da amostra de gás, a pressão interna de cada frasco foi liberada em cada período de incubação, com auxílio de uma seringa, igualando-se as pressões do frasco e da atmosfera, para não superestimar a produção de gases da coleta subsequente. Em seguida, os frascos eram agitados para homogeneização do conteúdo antes do retorno para a incubadora.

Após o final do bioensaio (24 h), foi realizada a abertura dos frascos para a retirada dos bags, para posterior determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS24) e da fibra em detergente neutro após 24 h de incubação (DIVFDN24).

Com relação ao bioensaio de cinética fermentativa e produção de gases, a quantidade de substrato, assim como de inóculo, são diferentes dos apresentados no ensaio anterior. Aproximadamente 1g de amostra moída (1-mm sieve) foram pesadas e inseridas em bags (Ankom, F57), e posteriormente inseridas em frascos de fermentação (160 ml de capacidade), submetidos aos mesmos tratamentos utilizados no bioensaio de metanogênese.

Em seguida, 10 ml do inóculo foi diluído em 90 ml de solução tampão mineral e transferido para os respectivos frasco. Assim como no ensaio anterior, todos os frascos foram selados e mantidos em estufa com ventilação forçada a 39°C.

A medição da pressão dos gases foi realizada nos tempos 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 e 96 horas de incubação, com auxílio de um transdutor e um *datalogger* (PressDATA 800®) para avaliação do perfil cumulativo de gases.

Ao final do período de incubação (96 h), os frascos foram abertos para coleta de amostras. Foram coletados 2 ml de líquido de cada frasco e transferidos para recipiente contendo 0,4 ml de ácido fórmico, para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e concentração do N-amoniaco (N-NH₃). Os bags também foram retirados dos frascos para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS96) e da fibra em detergente neutro após 96 h de incubação (DIVFDN96).

6.2.5. Análises laboratoriais

As amostras coletadas no bioensaio de metanogênese foram submetidas à mensuração de metano através de cromatografia gasosa, segundo metodologia descrita por Sallam et al. (2010), representando um acumulado de 24 horas de fermentação.

A determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi realizada por colorimetria, segundo método descrito por Weatherburn (1967). Já a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi quantificada através de cromatografia gasosa, segundo Erwin et al. (1961), adaptado por Getachew et al. (2002).

Para determinação da DIVMS e DIVFDN, os bags foram lavados em água corrente até total clareamento, e transferidos para estufa de ventilação forçada, à 55°C, e mantidos por 72 horas. Sequencialmente, foram secos em estufa não-ventilada, à 105°C por 45 minutos. Em seguida, foram acondicionados em dessecador e devidamente pesados para obtenção da MS não-digerida). Posteriormente, os sacos foram destinados à análise de FDN, em equipamento analisador de fibra (Ankom®), à 90°C por 1 hora, e sequencialmente lavados com água quente e acetona, secos à 60°C por 72 horas e posteriormente pesados, conforme metodologia anterior (DETMANN et al., 2001; CASALI et al., 2008).

O modelo matemático usado para expressar a cinética fermentativa foi o de France et al. (1993):

$$A = Af * \{1 - e^{(-b*(t-L)-c*(\sqrt{t}-\sqrt{L}))}\}$$

Onde A é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo t ; Af é o volume assintótico dos gases produzidos; b e c são constantes do modelo; e L representa o tempo de colonização discreto (*lag time*).

6.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de tratamentos 4x4x2, com quatro níveis do fator fungo (0, 1, 3 e 5g), quatro níveis do fator enzima (0, 8, 16 e 24g) e dois níveis do fator volumoso (silagem de cana e de milho), totalizando 32 tratamentos e 3 repetições (inóculos), submetidos à análise de regressão simples polinomial. Os dados foram verificados previamente para normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene.

Os dados foram analisados através do software SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + Ei + Vj + Fk + (EV)_{ij} + (EF)_{ik} + (VF)_{jk} + (EVF)_{ijk} + e_{ijk}$$

onde: Y_{ijk} = valor da variável dependente; μ = média geral;

Ei , efeito fixo do i -ésimo nível da enzima fibrolítica;

Vj , o efeito fixo da j -ésima tipo de volumoso;

Fk , efeito fixo do k -ésimo nível do fungo;

$(EV)_{ij}$, interação dupla entre enzima fibrolítica de ordem i com tipo de volumoso de ordem j ;

$(EF)_{ik}$, interação dupla entre enzima fibrolítica de ordem i com fungo de ordem k ;

$(VF)_{jk}$, interação dupla entre tipo de volumoso de ordem j com fungo de ordem k ;

$(EVF)_{ijk}$, interação tripla entre os fatores enzima fibrolítica de ordem i , fonte volumosa de ordem j e fungo de ordem k ;

E_{ijk} , erro residual referente à observação da enzima fibrolítica i , da tipo de volumoso j e do fungo k .

Os graus de liberdade e testes foram ajustados usando a opção Kenward-Roger. As médias dos tratamentos foram comparadas com PDIFF (LSMEANS) e significância declarada no nível de probabilidade de 0,05. Quando a significância da interação entre os efeitos principais foi $\leq 0,10$, a interação foi decomposta e os efeitos dos tratamentos foram analisados usando a opção SLICE do PROC MIXED.

6.3. RESULTADOS

Não foi observado efeito de interação tripla entre os fatores $E \times F \times V$, assim como para a interação entre os aditivos ($E \times F$), no presente estudo. Dessa forma, os resultados obtidos para cada aditivo, em função dos volumosos, serão apresentados separadamente.

Quanto ao ensaio de cinética fermentativa e produção de gases, observa-se que o tipo de volumoso afetou significativamente todas as variáveis de digestibilidade e os parâmetros do modelo de France, onde o milho apresentou os maiores valores para potencial de produção de gases (193,0 vs. 171,9 ml.g-1MS), *lag-time* (3,1 vs. 0,9 h), DIVMS96 (59,3 vs. 44,7 %) e DIVFDN96 (37,7 vs. 27,0 %) quando comparado com a cana-de-açúcar (Tabela 8).

Com relação aos parâmetros de digestibilidade, observa-se que a inclusão de doses crescentes do fungo *A. oryzae* elevou linearmente a DIVMS96, independentemente do

volumoso, sendo que a maior dosagem de *A. oryzae* apresentou o melhor resultado (51,56, 51,81, 51,95 e 52,71 %, para F0, F1, F3 e F5, respectivamente). Da mesma forma, doses elevadas de *A. oryzae* promoveram aumento linear da DIVFDN, independentemente do volumoso, cujo maior valor obtido também foi para a maior dose de AO (31,55, 31,95, 32,36 e 33,52 %, para F0, F1, F3 e F5, respectivamente). Já para os parâmetros de degradabilidade obtidos pelo modelo de France, houve um aumento linear no potencial de produção de gases em resposta a maior dose do *A. oryzae* em ambos os volumosos. Não foi observado efeito do fungo sobre o lag time.

Assim como para o *A. oryzae*, o aumento das doses de enzima fibrolítica elevou linearmente a DIVMS96 e DIVFDN96, porém este efeito foi significativo apenas para a silagem de milho (Tabela 9), onde houve aumento da DIVFDN96 ocorreu apenas na maior dosagem da enzima fibrolítica. Além disso, houve aumento linear no potencial de produção de gases em resposta ao aumento das doses de enzima, independentemente do volumoso (173,05, 184,79, 187,21 e 184,83 ml/g MS, para E0, E12, E16 e E24, respectivamente). Além disso, houve uma tendência de redução linear do *lag-time* com o tratamento enzimático em ambos os volumosos (2,27, 1,91, 1,89 e 1,90 h, para E0, E12, E16 e E24, respectivamente).

De maneira geral, a silagem de milho apresentou maior produção de gases em todos os tempos de incubação avaliados quando comparada a silagem de cana-de-açúcar, com exceção dos tempos PG4 e PG8, onde a cana-de-açúcar apresentou maior produção de gases em comparação à silagem de milho (Tabelas 10 e 11).

Observou-se que o tratamento enzimático elevou a produção de gases em ambos os volumosos, independentemente da dosagem. De maneira semelhante, o tratamento com doses crescente do fungo também elevaram a produção de gases, contudo este efeito foi dependente do volumoso. Na silagem de cana-de-açúcar, as doses do *A. oryzae* elevaram a produção de gases quando comparado ao controle, sendo que a maior dosagem resultou no maior valor observado de produção de gases. Já na silagem de milho, este efeito foi significativo apenas na maior dose do *A. oryzae*. Tais resultados estão representados graficamente na Figura 2, cuja curva de produção de gases foi gerada com base nos dados obtidos a partir do modelo de France, onde é possível verificar a produção de gases em todos os tempos de incubação em função dos tratamentos para cada volumoso.

Tabela 8. Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases em função da utilização de *A. oryzae*.

Variáveis	S. Milho				S. Cana				EPM	Valor <i>p</i>				
	F0	F1	F3	F5	F0	F1	F3	F5		V	F	F*V	L	Q
<i>Digestibilidade</i>														
DIVMS96 (%)	58.82	59.24	59.33	59.84	44.31	44.39	44.56	45.58	0.41	<.001	0.03	0.75	0.01	0.63
DIVFDN96 (%)	36.70	37.16	37.93	38.89	26.39	26.74	26.79	28.14	0.47	<.001	0.00	0.82	0.10	0.66
<i>Parâmetros de produção de gases</i>														
A (ml.g ⁻¹ MS)	190.95	190.13	188.64	202.30	162.22b	167.73b	162.13b	195.68a	3.30	<.001	<.001	0.09	<.001	0.07
b (h ⁻¹)	0.022	0.023	0.024	0.022	0.018	0.017	0.018	0.014	0.001	<.001	0.14	0.55	0.39	0.20
c (h ^{-1/2})	0.003	-0.001	-0.008	0.013	-0.037	-0.026	-0.028	0.005	0.005	<.001	<.001	0.12	0.01	0.10
L (h)	1.05	0.83	0.68	1.17	2.76	3.19	2.97	3.28	0.14	<.001	0.14	0.27	0.44	0.70

¹ * A: volume final ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da MS após 96horas de incubação; DIVFDN: digestibilidade *in vitro* da FDN após 96horas de incubação. ²Doses do fungo *A. oryzae*; ³V:efeito volumoso; F: efeito fungo; V*F: efeito interação volumoso x fungo.

Tabela 9. Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases em função da utilização de enzima fibrolítica.

Variáveis	S. Milho				S. Cana				EPM	Valor <i>p</i>				
	E0	E12	E16	E24	E0	E12	E16	E24		V	E	E*V	L	Q
<i>Digestibilidade</i>														
DIVMS96 (%)	58.99b	59.19ab	59.35a	59.68a	44.60	44.64	44.68	44.91	0.41	<.001	0.12	0.10	0.03	0.41
DIVFDN96 (%)	36.93b	37.29b	37.35b	39.09a	27.15	26.89	26.93	27.10	0.47	<.001	0.08	0.09	0.01	0.21
<i>Parâmetros de produção de gases</i>														
A (ml.g ⁻¹ MS)	190.95	190.13	188.64	202.30	162.22	167.73	162.13	195.68	3.30	<.001	0.02	0.55	0.05	0.11
b (h ⁻¹)	0.023	0.023	0.021	0.024	0.020	0.015	0.016	0.017	0.00	<.001	0.17	0.40	0.47	0.94
c (h ^{-1/2})	-0.001	0.002	0.006	0.000	-0.039	-0.014	-0.015	-0.019	0.01	<.001	0.11	0.34	0.23	0.13
L (h)	1.200	0.816	0.880	0.829	3.335	2.991	2.904	2.978	0.14	<.001	0.09	0.98	0.05	0.61

¹ * A: volume final ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da MS após 96horas de incubação; DIVFDN: digestibilidade *in vitro* da FDN após 96horas de incubação. ²Doses do fungo *A. oryzae*; ³V:efeito volumoso; F: efeito fungo; V*F: efeito interação volumoso x fungo.

Tabela 10. Produção de gases totais (PG expressa em mL.g⁻¹MS) em função do tratamento com fungo *A. oryzae*.

Variáveis		S. Milho				S. Cana				EPM ²	Valor <i>p</i> ³				
		F0	F1	F3	F5	F0	F1	F3	F5		V	F	F*V	L	Q
PG ¹	4h	6.51	5.44	5.99	5.88	7.43	7.92	8.18	8.50	0.382	<.001	0.59	0.12	0.51	0.58
	8h	17.63b	15.32b	16.12b	17.58a	16.16c	18.27b	18.23b	21.44a	0.698	<.001	<.001	<.001	<.001	0.04
	12h	35.15b	33.43b	33.99b	37.84a	22.21c	25.43b	26.10b	32.91a	0.742	<.001	<.001	<.001	<.001	0.08
	18h	56.21	56.28	57.03	62.99	29.05	33.47	35.48	45.62	1.149	<.001	<.001	<.001	<.001	0.25
	24h	71.80b	71.83b	72.83b	78.64a	36.91c	41.32b	43.67b	55.63a	1.586	<.001	<.001	<.001	0.01	0.31
	48h	119.79b	120.23b	121.90b	128.80a	74.41c	78.74bc	81.18b	96.98a	2.353	<.001	<.001	0.04	0.02	0.32
	72h	147.78	148.39	150.19	150.05	103.97	108.30	110.18	126.65	2.785	<.001	<.001	0.16	0.01	0.28
	96h	166.02	166.81	168.08	176.22	123.23	126.42	127.27	142.96	2.828	<.001	<.001	0.36	0.03	0.28

¹PG: produção de gases em diferentes tempos de incubação. ²EPM: erro-padrão da média; ³V:efeito volumoso; F: efeito fungo; V*F: efeito interação volumoso x fungo; L: efeito linear; Q: efeito quadrático.

Tabela 11. Produção de gases totais (PG expressa em mL.g⁻¹MS), em função do tratamento com enzima fibrolítica.

Variáveis		S. Milho				S. Cana				EPM ²	Valor <i>p</i> ³				
		E0	E12	E16	E24	E0	E12	E16	E24		V	E	E*V	L	Q
PG ¹	4h	4.84	6.32	6.15	6.51	6.98	8.02	8.08	8.95	0.382	<.001	<.001	0.80	<.001	0.33
	8h	14.64	16.83	17.27	17.90	16.35	18.77	19.53	19.45	0.698	<.001	<.001	0.96	<.001	0.08
	12h	32.80	35.55	35.27	36.79	23.54	27.09	27.94	28.08	0.742	<.001	<.001	0.62	0.02	0.33
	18h	55.25	59.14	57.23	60.88	32.53	36.19	37.11	37.80	1.149	<.001	<.001	0.53	0.18	0.76
	24h	70.83	74.79	72.27	77.21	41.14	44.18	45.90	46.31	1.586	<.001	0.01	0.47	0.05	0.90
	48h	118.14	123.97	121.12	127.49	80.36	81.63	84.59	84.72	2.353	<.001	0.04	0.44	0.07	0.32
	72h	152.14	150.16	156.33	145.79	111.22	114.34	114.26	109.29	2.785	<.001	0.05	0.60	0.09	0.91
	96h	163.77	170.79	168.26	174.31	126.44	128.84	132.55	132.06	2.828	<.001	0.05	0.57	0.08	0.84

¹PG: produção de gases em diferentes tempos de incubação. ²EPM: erro-padrão da média; ³V:efeito volumoso; F: efeito fungo; V*F: efeito interação volumoso x fungo; L: efeito linear; Q: efeito quadrático.

Figura 2. Produção de gases acumulativa (ml/g de MS) da fermentação *in vitro* de diferentes volumosos em resposta à adição de aditivos: (A) interação entre doses de enzima fibrolítica e silagem de milho; (B) doses de enzima fibrolítica e silagem de cana-de-açúcar; (C) doses do fungo *A. oryzae* e silagem de milho; (D) doses do fungo *A. oryzae* e silagem de cana. Gráficos obtidos através dos parâmetros obtidos do modelo de France.

Com relação ao ensaio de metanogênese, não foi observado efeito significativo do uso dos aditivos sobre os parâmetros de produção de metano ($P > 0.24$; Tabelas 12 e 13). Da mesma forma, não foi observado efeito dos aditivos sobre a DIVMS24 e DIVFDN24 ($P > 0.69$). Contudo, observou-se que a silagem de milho apresentou os maiores valores para DIVMS24 (45.6 vs. 26.2 %; $P < .001$), DIVFDN24 (19.6 vs. 12.6 %; $P < .001$) e produção líquida de metano (Net CH₄; 6.4 vs. 4.5 ml; $P < .001$) em relação à silagem de cana-de-açúcar, respectivamente.

Foi observada redução linear da concentração de N-NH₃ em resposta ao aumento da dose de AO, independentemente do volumoso (15,4, 14,7, 14,6, e 14,64 mg/dL, para F0, F1, F3 e F5, respectivamente). Além disso, a maior dose do fungo (F5) elevou a concentração de ácido acético, independentemente do volumoso (23,38, 23,36, 23,18 e 25,02, para F0, F1, F3 e F5, respectivamente). Não foi observado efeito significativo do fungo sobre os demais parâmetros fermentativos (Tabela 14). De maneira semelhante ao fungo, a enzima fibrolítica também promoveu redução linear na concentração de NH₃, entretanto este efeito foi significativo apenas na silagem de milho (Tabela 15). Além disso, houve uma tendência de aumento na concentração de ácido acético em função do tratamento enzimático, cuja dose E24 apresentou o maior valor para esta variável em ambos os volumosos (23,6, 22,9, 23,4 e 25,0 μ M, para E0, E12, E16 e E24, respectivamente).

Tabela 12. Efeito de *A. oryzae* sobre a digestibilidades e produção de metano, através de um bioensaio de metanogênese.

Variáveis	S. Milho				S. Cana				EPM ³	Valor P ⁴				
	F0	F1	F3	F5	F0	F1	F3	F5		V	F	F*V	L	Q
<i>Digestibilidade¹</i>														
DIVMS24 (%)	45.93	45.20	45.04	45.66	25.92	26.76	26.11	25.95	0.362	<.001	0.69	0.12	0.91	0.95
DIVFDN24 (%)	19.58	19.61	19.61	19.63	12.60	12.60	12.60	12.61	0.320	<.001	0.99	0.99	0.97	1.00
<i>Metanogênese²</i>														
PG (ml/g IVDMD)	268.08	251.97	268.47	272.42	249.43	267.41	279.31	295.05	14.086	0.45	0.24	0.50	0.04	0.58
CH4 (%)	6.06	5.79	5.38	5.77	5.75	5.70	5.96	5.96	0.194	0.51	0.60	0.12	0.75	0.83
CH4 ajustado (ml/g DIVMS)	14.18	12.29	11.78	13.55	12.44	12.94	14.41	15.46	1.029	0.24	0.31	0.18	0.21	0.12
Net CH4 (ml)	7.27	6.13	5.57	6.74	4.10	4.12	4.74	5.00	0.467	<.001	0.29	0.11	0.82	0.46
CH4 efíc. (mL/100 PG)	5.29	4.88	4.39	4.97	4.99	4.84	5.16	5.24	0.256	0.36	0.46	0.14	0.87	0.11

¹DIVMS24: digestibilidade *in vitro* da MS após 24 h de incubação; DIVFDN24: digestibilidade *in vitro* da FDN após 24 h de incubação. ² parâmetros do bioensaio de metanogênese: PG = produção de gas por grama de MS degradada, após 24 h de incubação; CH4 eficiência = [100 * (Net CH4/GP)]. ³ Erro padrão da média. ⁴F: doses de *A. oryzae*; V: efeito de volumoso; F * V: interação entre *A. oryzae* x volumoso.

Tabela 13. Efeito de enzima fibrolítica sobre a digestibilidades e produção de metano, através de um bioensaio de metanogênese.

Variáveis	S. Milho				S. Cana				EPM ³	Valor P ⁴				
	E0	E12	E16	E24	E0	E12	E16	E24		V	E	E*V	L	Q
<i>Digestibilidade¹</i>														
DIVMS24 (%)	45.45	45.92	45.14	45.31	26.04	25.85	26.51	26.34	0.362	<.001	0.99	0.22	0.98	0.96
DIVFDN24 (%)	19.60	19.61	19.60	19.62	12.60	12.60	12.61	12.61	0.320	<.001	1.00	1.00	0.98	1.00
<i>Methanogenesis²</i>														
GP (ml/g IVDMD)	260.30	258.36	267.65	274.62	263.49	267.81	271.01	288.89	14.086	0.45	0.48	0.98	0.12	0.60
CH4 (%)	5.47	5.91	6.09	5.53	5.92	5.82	5.70	5.92	0.194	0.51	0.67	0.10	0.83	0.23
CH4 ajustado (ml/g IVDMD)	11.87	13.08	14.30	12.56	13.46	13.71	13.10	14.98	1.029	0.24	0.70	0.34	0.26	0.61
Net CH4 (ml)	5.70	6.67	7.27	6.08	4.43	4.51	4.16	4.86	0.467	<.001	0.54	0.15	0.46	0.29
CH4 efíc (mL/100 GP)	4.56	5.06	5.34	4.57	5.11	5.12	4.84	5.19	0.256	0.36	0.60	0.11	0.61	0.22

¹DIVMS24: digestibilidade *in vitro* da MS após 24 h de incubação; DIVFDN24: digestibilidade *in vitro* da FDN após 24 h de incubação. ² parâmetros do bioensaio de metanogênese: PG = produção de gas por grama de MS degradada, após 24 h de incubação; CH4 eficiência = [100 * (Net CH4/GP)]. ³ Erro padrão da média. ⁴E: doses de enzima fibrolítica; V: efeito de volumoso; E * V: interação entre enzima x volumoso.

Tabela 14. Concentrações de nitrogênio amoniacal (mg/dL) e dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada (mM) após 24 horas de incubação em resposta à adição de *Aspergillus oryzae*.

Variáveis	S. Milho				S. Cana				EPM	Valor <i>p</i>				
	F0	F1	F3	F5	F0	F1	F3	F5		V	F	F*V	L	Q
N-NH3	15.48	14.75	14.72	14.73	15.32	14.74	14.54	14.55	0.45	0.68	0.06	1.00	0.08	0.26
Acético	24.82	25.15	24.96	25.71	21.94	21.57	21.41	24.34	0.87	<.0001	0.03	0.39	0.03	0.09
Propiônico	17.22	17.41	18.33	17.36	15.26	14.98	14.60	15.25	0.57	<.0001	0.97	0.39	0.82	0.91
Iso-butírico	0.70	0.65	0.65	0.69	0.51	0.53	0.52	0.53	0.08	0.01	0.98	0.96	0.91	0.62
Butírico	6.74	6.53	6.98	6.31	4.93	4.91	4.70	4.83	0.21	<.0001	0.53	0.24	0.53	0.73
Iso-valérico	1.11	1.05	1.10	1.07	0.87	0.89	0.86	0.89	0.06	<.0001	0.99	0.90	0.98	0.86
Valérico	1.68	1.60	1.65	1.56	0.95	0.92	0.90	0.90	0.06	<.0001	0.59	0.87	0.85	0.56

²EPM: erro-padrão da média; V:efeito volumoso; F: efeito fungo; V*F: efeito interação volumoso x fungo.

Tabela 15. Concentrações de nitrogênio amoniacal (mg/dL) e dos ácidos graxos de cadeia curta e ramificada (mM) após 24 horas de incubação em resposta à adição de enzima fibrolítica.

Variáveis	S. Milho				S. Cana				EPM	Valor <i>p</i>				
	E0	E12	E16	E24	E0	E12	E16	E24		V	E	E*V	L	Q
N-NH3	15.44a	14.80b	14.75b	14.70b	15.02	14.75	14.57	14.81	0.45	0.68	0.27	0.11	0.11	0.55
Acético	24.34	24.62	25.02	26.66	22.77	21.35	21.78	23.36	0.87	<.0001	0.10	0.52	0.24	0.15
Propiônico	17.37	17.36	17.49	18.11	14.73	14.60	15.31	15.44	0.57	<.0001	0.48	0.96	0.22	0.63
Iso-butírico	0.63	0.71	0.69	0.66	0.52	0.49	0.56	0.52	0.08	0.01	0.92	0.86	0.71	0.53
Butírico	6.52	6.71	6.51	6.82	4.70	4.74	4.95	4.98	0.21	<.0001	0.57	0.80	0.40	0.91
Iso-valérico	1.06	1.08	1.10	1.10	0.87	0.86	0.89	0.89	0.06	<.0001	0.96	1.00	0.60	0.92
Valérico	1.53	1.62	1.65	1.68	0.89	0.89	0.94	0.95	0.06	<.0001	0.31	0.90	0.85	0.65

²EPM: erro-padrão da média; V:efeito volumoso; E: efeito enzima; V*F: efeito interação volumoso x enzima.

6.4. DISCUSSÃO

No ensaio de produção de gases *in vitro*, técnica baseada na degradação dos alimentos pelos microrganismos ruminais, a produção de gás pode ser considerada como um indicador de degradação de carboidratos, uma vez que o volume de gás produzido está diretamente relacionado à taxa e extensão de degradação dos substratos (BUENO, 2002; AKINFEMI et al., 2009). Concomitantemente, a produção de gases *in vitro* é proporcional ao ataque microbiano, e desta forma a medição dos gases produzidos em intervalos frequentes possibilita estimar a quantidade de substrato que foi digerida (BUENO, 2002).

Estudos descrevem a alta correlação existente entre a produção de gases, a digestibilidade e a degradabilidade do alimento (MENKE et al., 1979; THEODOROU et al., 1994; BLÜMEL et al., 1997; MAURICIO et al., 1998; BUENO et al., 1999). Sendo assim, produção potencial de gases em um ensaio *in vitro* está diretamente relacionada com a composição química dos alimentos, principalmente quanto ao teor dos constituintes fibrosos e polissacáridos estruturais (JALILVAND et al. 2008).

Musco et al. (2016) reportaram uma correlação negativa entre o teor de FDN e a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, assim como para a taxa de produção de gases. No presente estudo, a silagem de cana de açúcar apresentou 51,6 %FDN, já a silagem de milho 41,6 %FDN, o que pode justificar a diferença de produção potencial de gases observada dentre as fontes volumosas, sendo maior para a silagem de milho, reflexo da maior digestibilidade da fibra observada para este volumoso (42 vs. 29%DIVFDN para silagem de milho e cana, respectivamente).

Neste contexto, ao utilizar um aditivo com o intuito de elevar a digestibilidade da fração fibrosa deve se levar em consideração as características inerentes ao volumoso. No presente estudo, os aditivos elevaram a PG em todos os tempos de fermentação, independentemente do volumoso.

Este resultado observado para o fungo AO é semelhante a outros reportados na literatura, onde o aditivo microbiano pode aumentar a atividade fibrolítica por estímulo ao crescimento da população de microrganismos ruminais, em função da ação mecânica sobre a fibra favorecendo o acesso e colonização bacteriana à fração fibrosa (NSEREKO et al. 2002; MORGAVI et al. 2004), resultando em melhora na digestibilidade da fibra (GIRALDO et al. 2008). Vale ressaltar que, além da ação mecânica, o fungo pode produzir uma gama de enzimas, fibrolítica e amilolíticas, que também podem promover melhoras sobre a digestibilidade da fibra (HARRISON, TRICARICO 2007).

Da mesma forma, resultados reportados na literatura indicam que a adição de enzima fibrolítica pode aumentar a atividade fibrolítica por estímulo ao crescimento dos microrganismos ruminais através da liberação de compostos da parede celular, estimulando o crescimento das bactérias ruminais (COLOMBATTO et al. 2003). Ao realizar um ensaio in vitro de produção de gases, Aguirre et al (2016) observaram que a adição de enzima fibrolítica à dieta de cordeiros em crescimento aumentaram a produção de gases durante o período final da fermentação (72 e 96 horas), o que pode ser reflexo do aumento da população de bactérias fibrolítica. Entretanto, Nsereko et al. (2002) observaram aumento no número de bactérias amilolíticas, como *Ruminobacter amylophilus*, ao utilizar enzima fibrolítica, porém sem efeito sobre a população de bactérias fibrolítica. Chung et al. (2012) observaram que o aumento das doses de enzima fibrolítica promoveram o aumento linear da população de *Selenomonas ruminantium*.

Apesar do aumento da PG observado em todos os períodos de incubação, o efeito sobre a digestibilidade da fibra diferiu dentre os aditivos. O AO elevou a DIVFDN e DIVMS, independentemente do tipo de volumoso, ao passo que a enzima fibrolítica afetou a digestibilidade apenas na silagem de milho. A possível explicação para este fato pode estar relacionada às características bromatológicas do próprio volumoso, visto que a qualidade do volumoso, quanto à proporção de FDN potencialmente digestível no rúmen, podem afetar a resposta à adição de enzima fibrolítica (MENDOZA et al. (2014). Mendoza et al. (2014) descrevem que a adição de enzimas exógenas promove melhoras nos parâmetros de digestibilidade dos volumosos que apresentam alta proporção de fração potencialmente digestível da fibra. No presente estudo, a enzima fibrolítica apresenta alta atividade de xilanase, que por sua vez pode ter atuado nas frações mais digestíveis da cana-de-açúcar, alterando ou enfraquecendo a estrutura da parede celular, sem refletir em efeito significativo sobre a DIVFDN (NSEREKO et al. 2002; MORGAVI et al. 2004; GIRALDO et al. 2008).

Neste contexto, outros fatores podem influenciar os resultados ao utilizar enzima fibrolítica com o intuito de modular a fermentação ruminal, como o efeito dose- resposta, assim como o princípio ativo. As principais enzimas fibrolíticas são as celulasas e as xilanases, que atuam principalmente na degradação da celulose e hemicelulose, respectivamente. López-Aguirre et al. (2016), ao avaliar diferentes tipos de enzimas fibrolíticas (celulase, xilanase e a combinação de ambas) em diferentes dosagens, observaram que a celulase apresentou os melhores parâmetros de cinética fermentativa para produção de gases, visto que a maior dose da enzima fibrolítica com atividade xilanase reduziu a produção de gases em todos os tempos de incubação. Dessa forma, a alta dosagem de xilanase pode ter afetado a ligação de enzimas

aos receptores presentes no substrato, e consequentemente reduzindo proporcionalmente a ligação dos microrganismos fibrolíticos à fibra (BEAUCHEMIN et al. 2001). Entretanto, Togtokhbayar et al. (2015) descreveram que a adição de enzima fibrolítica, com alta atividade de xilanase em diferentes doses, baixa e moderada, em um ensaio *in vitro* utilizando palha de trigo como substrato, promoveram aumento na produção de gases em todos os tempos de incubação avaliados. Estes resultados claramente demonstram que as características da dieta influenciam as respostas à inclusão de enzima fibrolítica exógena, assim como as doses e do tipo de enzima utilizado.

Há indícios de que enzimas produzidas por fungos, como o fungo AO, possam atuar na degradação de materiais lignocelulósicos, porém se faz necessário um tempo de retenção ruminal maior para ação efetiva dos microrganismos fibrolíticos (KUMAR et al. 2009). Dessa forma, supõe-se que a adição das enzimas fibrolítica exógena possa promover redução no lag-time (tempo de colonização), visto que as enzimas podem degradar carboidratos complexos do substrato à formas simples em uma etapa inicial da fermentação, permitindo assim rápido crescimento da população bacteriana, e consequente colonização e fermentação da fibra (COLOMBATTO et al., 2003). No presente estudo, a silagem de milho apresentou menor valor de *lag time* em comparação à cana-de-açúcar. Vale ressaltar que quanto menor o tempo de colonização, mais rapidamente será o início da degradação dos volumosos e, consequentemente, da produção de gases oriundos da fermentação, já que o tempo de colonização (L) representa o tempo compreendido entre o início da incubação e o da produção de produtos da fermentação microbiana (RIBAS et al., 2007).

Pelo fato de afetar a digestibilidade dos alimentos, a inclusão de aditivos afeta diretamente a produção de metano e parâmetros fermentativos. No presente estudo, foi observada redução linear no teor de NH_3 em resposta à adição dos aditivos, sendo que para o AO esta redução ocorreu independentemente do volumoso, ao passo que a ENZ reduziu NH_3 apenas na S. Milho. Além disso, foi observado aumento na concentração de acetato em resposta à adição dos aditivos, independente do volumoso. A produção de acetato está relacionada à ação de microrganismos fibrolíticos, que fermentam os carboidratos a acetato. Estes microrganismos utilizam N-NH_3 como fonte de N, o que pode justificar a redução de NH_3 no presente estudo (RUSSEL et al., 1996). Dessa forma, os aditivos estimularam a microbiota fibrolítica, aumentando a DIVFDN, e aumentando o acetato como produto final da fermentação.

De maneira semelhante ao acetato, no presente estudo foi observado aumento na produção de metano em resposta à adição de doses crescentes de AO independente do volumoso, exceção para enzima fibrolítica que tal resultado ocorreu apenas na silagem de

milho, justamente nos tratamentos que apresentaram efeito positivo sobre a digestibilidade da fibra e, conseqüentemente, maior produção de gases.

A síntese de acetato está intimamente relacionada à produção de metano, visto a metanogênese envolve a conversão de acetato, H₂ e CO₂ em metano pelos microrganismos metanogênicos. Dessa forma, uma alta relação acetato:propionato está relacionada à alta emissão de metano, e o inverso também é verdadeiro (JOHNSON E JOHNSON, 2005). Importante ressaltar que a metanogênese é importante para manutenção da fermentação ruminal, visto que o metano é o principal escape de H₂ do ambiente ruminal, evitando assim o acúmulo de H₂ (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000; LIU, WHITMAN, 2008; MCALLISTER, NEWBOLD, 2008).

Importante ressaltar que no presente estudo foi avaliado a produção de metano por unidade de MS degradada, e o aumento da concentração deste parâmetro no estudo deve ser interpretado com atenção. Os microrganismos metanogênicos são sensíveis à queda de pH, dessa forma é evidente que a inclusão de concentrado eleva a eficiência do crescimento microbiano, uma vez que aumenta a eficiência do processo fermentativo devido a redução da atividade metanogênica. Entretanto, há uma maior produção de metano por animal, devido a maior quantidade de matéria orgânica fermentada (COTTLE et al., 2011). Contudo, a quantidade de metano produzido por kg de produto (carne, por exemplo) é menor, pelo fato do sistema se tornar mais eficiente. Dessa forma, o fornecimento de alimentos de melhor qualidade, juntamente com estratégias que visam melhoria da eficiência fermentativa, como aditivos, são alternativas para intensificação do sistema produtivo, podendo resultar em redução de até 10% na emissão de metano por quilo de carne produzida (ZEN et al., 2008). Conseqüentemente, no presente estudo os aditivos podem ter elevado a quantidade de metano por MS digerida, entretanto proporcionaram melhora na digestibilidade da fibra e aumento na produção de AGCC, evidenciando melhora no processo fermentativo, que por ventura poderiam afetar de maneira positiva o desempenho animal.

6.5. CONCLUSÕES

Os aditivos não apresentaram efeito sinérgico sobre a produção de gases e digestibilidade, contrariando as hipóteses iniciais, de que a ação conjunta dos aditivos potencializara a digestibilidade da fibra. Entretanto, os aditivos foram eficientes em alterar o padrão fermentativo e produção de gases, demonstrando o potencial em elevar a degradação da fibra, onde o *A. oryzae* aumentou a digestibilidade da FDN e da MS, independentemente do

volumoso. A enzima apresentou o mesmo efeito sobre os parâmetros de digestibilidade, entretanto, apenas para a silagem de milho, além de reduzir o tempo de colonização, independente da dose.

6.6. REFERÊNCIAS

ADESOGAN AT, MA ZX, ROMERO JJ, ARRIOLA KG.. Ruminant nutrition symposium: improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**. v.92, p.1317–1330. 2014.

AKINFEMI, A; ADESANYA, AO; AYA, VE. Use of an *in vitro* gas production technique to evaluate some nigerian feed- stuffs. **American-Eurasian Journal of Scientific Research** v.4, n.4, p.240–245. 2009.

AOAC, 1996. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed. Virginia, 2000.

BALIEIRO NETO, G.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A. *et al.* Óxido de cálcio como aditivo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.1231-1239, 2007.

BEAUCHEMIN KA, MORGAVI DP, MCALLISTER TA, YANG WZ, RODE LM. **The use of enzymes in ruminant diets**. In: Garnsworthy PC, Wiseman J, editors. Recent advances in animal nutrition. Loughborough (UK): Nottingham University Press. p. 297–322. 2001.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG., W Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**.v.81: p.37-47. 2003.

BLÜMMEL, M.; STEINGAB, H.; BECKER, K. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, v. 77, p. 911-921, 1997.

BUENO, I. C. S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com feno de três qualidades distintas**. 97 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

BUENO, I. C. S. et al. A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 153-170, 2008.

BUENO, I. C. S. et al. Comparison of inocula from sheep and cattle for the in vitro gas production under tropical conditions. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, Scarbourough, 1999a. Penicuik **Proceedings...** Penicuik: BSAS, p. 151. 1999.

BUENO, I.C.S., CABRAL FILHO, S.L.S., GOBBO, S.P., LOUVANDINI, H., VITTI, D.M.S.S., ABALLA, A.L., Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123, p.95-105, 2005.

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

CHIQUELLE, J. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science** v.75, p.405-415, 1995.

CHUNG YH, ZHOU M, HOLTSHAUSEN L, ALEXANDER TW, MCALLISTER TA, GUAN LL, OBA M, BEAUCHEMIN KA. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.1419–1427. 2012.

COLOMBATTO D, MORGAVI DP, FURTADO AF, BEAUCHEMIN KA. 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. 2003.

COLOMBATTO D, MOULD FL, BHAT MK, MORGAVI DP, BEAUCHEMIN KA, OWEN E. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**. v.81, p.1040–1050. 2003.

COTTLE, D.J.; NOLAN, J.V.; WIEDEMANN, S.G. Ruminant enteric methane mitigation : a review. **Animal Production Science**, v.51, p.491-514, 2011.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1600-1609, 2001.

ELGHANDOUR MMY, SALEM AZM, GONZALEZ-RONQUILLO M, BORQUEZ JL, GADO HM, ODONGO NE, PE~NUELAS CG. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.179, p.46–53. 2013.

ELWAKEEL, E. A.; TITGEMEYER, E. C.; JOHNSON, B. J.; ARMENDARIZ, C. K.; SHIRLEY, J. E. Fibrolytic Enzymes to Increase the Nutritive Value of Dairy Feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.5226–5236, 2007.

FRANCE, J.; DHANOA, M. S.; THEODOROU, M. K. A model to interpret gas accumulation profiles with in vitro degradation of ruminants feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v. 163, p. 99-111, 1993.

GETACHEW, G., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K., Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. **Journal of Agricultural Science**, v.139, p.341–352, 2002.

GIRALDO LA, TEJIDO ML, RANILLA MJ, CARRO MD. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**. v.141, p.306–325. 2008.

HARRISON GA, TRICARICO JM. Case study: Effects of na *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on lactational performance in commercial dairy herds. **The Professional Animal Scientist** v.23, p.291–294. 2007.

HE ZX, HE ML, WALKER ND, MCALLISTER TA, YANG WZ. Using a fibrolytic enzyme in barley-based diets containing wheat dried distillers grains with solubles: ruminal fermentation, digestibility, and growth performance of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v.92, p.3978–3987, 2014.

JALILVAND G, ODONGO NE, L_OPEZ S, NASERIAN A, VALIZADEH R, EFTEKHAR SHAHRODI F, KEBREAB E, FRANCE J. Effects of different levels of an enzyme mixture on in vitro gas production parameters of contrasting forages. **Animal Feed Science and Technology**. v.146, p.289–301. 2008.

JOHNSON K. A, JOHNSON D. E. Methane Emissions from Cattle. **Journal of animal science**. v.73, p.2483-2492; 1995.

KRUEGER, N.A.; ADESOGAN, A.T.; STAPLES, C.R.; KRUEGER, W.K.; DEANA, D.B.; LITTELL, R.C. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.95–108, 2008.

KUMAR P, BARRETT DM, DELWICHE MJ, STROEVE P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. v.48, p.3713–3729. 2009.

LATIF, M. R.; ZAHRAN, S. M.; AHMED, M. H.; ZEWEIL, H. S.; SALLAM, S. M. A. Effect of Feeding *Saccharomyces cerevisiae* and/or *Aspergillus oryzae* on Nutrient Utilization and Rumen Fermentation Characteristics of Sheep. Alex. **Journal of agricultural research**, v.59, n.2, p.121-127, 2014.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals Nova York Academy of Sciences**, v. 1125, p.171-189, 2008.

LÓPEZ-AGUIRRE, D; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J; ROJO, R; SÁNCHEZ-DÁVILA, F; LÓPEZ-VILLALOBOS, N; SALEM, ABDEL-FATTAH Z. M; ;VÁZQUEZ-ARMIJO, J F RUÍZ, S; ;JOAQUIN, S. In vitro gas production kinetics and degradability of a diet for growing lambs: effect of fibrolytic enzyme products at different dose levels. **Italian Journal of Animal Science**, V.15, N.3, 453–460. 2016

MAURICIO, R. M. et al. Uso de líquido ruminal e fezes como fonte de inóculo para técnica *in vitro* de produção de gases. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998. Botucatu, **Anais...** Botucatu-SP: SBZ, p. 314-316, 1998.

MENDOZA GD, LOERA-CORRAL O, PLATA-PEREZ F, HERNANDEZ-GARCIA P, RAMIREZ-MELLA M. Considerations on the use of exogenous fibrolytic enzymes to improve forage utilization. **The Scientific World Journal**, 2014.

McALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J.; POPP, J. D.; MIR, Z.; YANKE, L. J.; HRISTOV, A. N.; TREACHER, R. J.; CHENG. K.J. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, p.353–360, 1999.

MCALLISTER, T.A. NEWBOLD, C.J. Redirecting Rumen Fermentation to Reduce Methanogenesis. **Animal Production Science**, 48, 7-13. 2008.

MEALE, S.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; HRISTOV, A.N.; CHAVES, A.V.; MCALLISTER, T.A. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427–442, 2014.

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**. v. 2014.

MENKE, K. H. et al. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal Agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.

MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA-FAEPE, 2001. p.25-36.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v.85, p.1217–1240, 2002.

MORGAVI DP, BEAUCHEMIN KA, NSEREKO VL, RODE LM, MCALLISTER TA, WANG Y. *Trichoderma* enzymes promote *Fibrobacter succinogenes* S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.84, p.1083–1090. 2004

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.

MOSS A.R., JOUANY J, NEWBOLD J. Methaneproduction by ruminants: its contribution to globalwarming. **Annales De Zootechnie** v.49, p.231-253. 2000.

NEWBOLD, C., FRUMHOLTZ, P., WALLACE, R. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. **The Journal of Agricultural Science**, v.119, n.3, p.423-427. 1992.

NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: Florida Ruminant Nutrition Symposium, 1997, Gainesville. **Proceedings...** University of Florida, Gainesville, January, 16-17, 1997.

NSEREKO VL, BEAUCHEMIN KA, MORGAVI DP, RODE LM, FURTADO AF, MCALLISTER TA, IWAASA AD, YANG WZ, WANG Y. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Canadian Journal of Microbiology**. v.48, p.14–20. 2002.

QUEIROZ, M.A.A.; FUKUSHIMA, R.S.; GOMIDE, C.A. et al. Substitution of crude cell wall for neutral detergent fiber in the equations of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System that predict carbohydrate fractions: application to sunflower (*Helianthus annuus L.*). **Animal**, v.2, p.1087-1092, 2008.

REIS, R.A.; MORAIS, J.A.S.; SIQUEIRA, G.R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In: **II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (II CLANA)**, Palestra técnica, 2006.

RIBAS, R.G.; MEUNIER-SALUN, M.C.; DOURMAD, J.Y. Hihg-fiber diets in pregnant sows: digestive utilization and effects on the behavior of the animals. **Journal of Animal Science**., v.274, p.2399-2408, 2007.

RIBAS, R.G.; MOYLE, C.Y.; MIYAKI, E.J.L. The assembly of montane biotas: linking Andean tectonics and climatic oscillations to independent regimes of diversification in Pionus parrots. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**; v.274, n.1624, p.2399-2408, 2007.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1503–1509, 1996.
SOSA, A.; GALINDO, J.; TEJIDO, M.L.; DÍAZ, A.; MARTÍNEZ, M.E.; SARO, C.; CARRO, M.D.; RANILLA, M.J. Effects of *Aspergillus oryzae* on in vitro ruminal fermentation. **Options Méditerranéennes**, (Série A), n.99, 2011.

SUN, H.; WU, Y. M.; WANG, Y. M.; LIU, J. X.; MYUNG, K. H. Effects of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid on *in vitro* rumen fermentation and microbial populations between different roughage sources. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.27, n.9, p.1285-1292, 2014.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

TOGTOKHBAYAR N, CERRILLO MA, RODRIGUEZ GB, ELGHADOUR MMY, SALEM AZM, URANKHAICH C, JIGJIDPUREV S, ODONGO NE, KHOLIF AD. Effect of exogenous xylanase on rumen in vitro gas production and degradability of wheat straw. **Animal Science Journal**. v.86, p.765–771. 2015.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. **Analysis of forages and fibrous foods**. Ithaca: Cornell University, 202p. 1985.

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

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p. 971-974, 1967.

ZEN, S.; BARIONI, L.G.; BONATO, D.B.B.; ALMEIDA, M.H.S.P.; RITLL, T.F. 2008. **Pecuária de corte brasileira: impactos ambientais e emissões de gases efeito estufa (GEE)**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/>>

ZOBELL, D. R.; WIEDMEIER, R.D.; OLSON, K.C.; & TREACHER, R.J. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.279–285, 2000.

7. CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E CINÉTICA RUMINAL DE BOVINOS DE LEITE ALIMENTADOS COM SILAGEM DE MILHO, COM OU SEM INCLUSÃO DE CULTURAS DE *ASPERGILLUS ORYZAE* OU ENZIMA FIBROLÍTICA.

7.1. INTRODUÇÃO

Estratégias vêm sendo desenvolvidas com o intuito de elevar a disponibilidade dos nutrientes por meio de manipulação da fermentação ruminal, como por exemplo a utilização de aditivos, possibilitando melhoras de desempenho nos ruminantes. Dentre os aditivos, destacam-se as enzimas fibrolíticas, cujo interesse em sua utilização na dieta de ruminantes vem crescendo com o objetivo de se elevar a eficiência alimentar (ADESOGAN et al. 2014; LÓPEZ-AGUIRRE et al., 2016), uma vez que a elevação na quantidade de enzimas fibrolíticas presentes no rúmen, celulasas e hemicelulasas, poderia maximizar a utilização do alimento fibroso (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Estudos relatam melhorias em ganho médio diário (McALLISTER et al., 1999), digestibilidade da matéria seca e FDN *in vitro* (ELWAKEEL et al., 2007) em resposta ao tratamento com enzimas fibrolíticas. Entretanto, alguns estudos não apresentaram resultados positivos similares com a utilização destas enzimas (ZOBELL et al., 2000; KRUEGER et al., 2008). Dessa forma, existe uma grande variabilidade de resultados quanto à eficácia dos produtos enzimáticos (COLOMBATTO et al. 2003; MEALE et al. 2014; MENDOZA et al. 2014), tornando inconsistente os resultados sobre a digestibilidade da fibra.

Nesse contexto, pelo fato de depender de condições favoráveis específicas para sua ação, tais como temperatura e pH (MORGAVI et al., 2000), composição da dieta, método de aplicação e doses, especificidade ao substrato e tipo de complexo enzimático utilizado (MEALE et al., 2014), uma alternativa seria a utilização de probiótico, cuja utilização vem crescendo em função da demanda por substâncias “naturais” na alimentação de bovinos. Além de bactérias, culturas vivas de fungos, como *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*, também são utilizados como probiótico visando a manipulação da fermentação ruminal.

A utilização de *A. oryzae* na dieta tem gerado muito interesse nos seus efeitos sobre o desempenho de vacas em lactação (HIGGINBOTHAM et al. 1993; KIM et al. 2006), uma vez que podem elevar a produção de leite (HARRISON, TRICARICO 2007) entretanto seu modo de ação não está completamente elucidado (REIS et al., 2006). Há relatos de sua ação na degradação da parede celular (NEWBOLD et al., 1992), e ação indireta sobre a fermentação

ruminal, facilitando o acesso e aderência dos microrganismos a fibra, elevando a digestibilidade da fração fibrosa por estímulo à microbiota fibrolítica (NEWBOLD, 1997, SOSA et al., 2011, SUN et al., 2014). Entretanto, assim como a enzima fibrolítica, o mecanismo de ação deste fungo não está totalmente elucidado, e os resultados em função de sua utilização são inconsistente (CHIQUELLE, 1995; LATIF et al., 2014; SUN et al., 2014). Sun et al. (2017) observaram aumento da população relativa de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*, além de aumento na síntese de proteína microbiana e ácidos graxos de cadeia curta. Entretanto, Higginbotham et al. (2004) relataram que a suplementação com culturas do fungo *A. oryzae* não afetaram o desempenho da lactação e parâmetros ruminais em vacas holandesas.

Dessa forma, tanto a enzima fibrolítica quanto extratos e culturas vivas do fungo *A. oryzae* apresentam resultados positivos sobre a digestibilidade da fibra, embora exista inconsistência nos resultados. Dessa forma, justifica-se estudos envolvendo a utilização destes aditivos, visto que o mecanismo de ação, e a especificidade do substrato, bem como efeito dose resposta, são pouco compreendidos para ambos aditivos. A hipótese do presente estudo é que a adição de enzima fibrolítica, juntamente com o fungo *A. oryzae*, promovam melhoras no desempenho das vacas em lactação, pelo fato de atuarem sinergicamente sobre a digestibilidade da fibra, estimulando a população de microrganismos ruminais, maximizando o consumo e utilização da fibra e proteína. Além disso, de acordo com nosso conhecimento, estudos avaliando o fluxo de nutrientes, bem como a cinética de degradação da fibra no ambiente ruminal, são escassos, e não há trabalhos avaliando ambos os aditivos em conjunto.

Portanto, o objetivo do presente estudo consiste em avaliar o efeito de culturas vivas de *Aspergillus oryzae*, enzima fibrolítica e a combinação de ambos sobre o consumo, digestibilidade, metabolismo, cinética ruminal, fluxo de nutrientes e microbiota ruminal de vacas em lactação.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZUSP), em Pirassununga. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais na Experimentação da FMVZ/USP (número de protocolo: 7551070817).

7.2.1. Animais, delineamento e dietas experimentais

Foram utilizadas 8 vacas em lactação da raça Holandesa, canuladas no rúmen. Os animais foram alojados em estábulo tipo “free-stall”, com ventilação forçada, em baias individuais de 17,5m² de área provida de camas de areia, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h00min e às 16h00min. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois quadrados latinos 4x4 contemporâneos, visando a determinação da cinética ruminal dos componentes nutricionais e parâmetros ruminais. Os períodos experimentais tiveram duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação (MACHADO et al., 2016) e sete dias, do D15 ao D21, para a coleta de amostras e dados.

Os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: um grupo sem inclusão (Controle); inclusão de *A. oryzae* (FUN, 5 g de AO/vaca/dia); e inclusão de enzima fibrolítica (ENZ; 24 g/vaca/dia), e combinação Fungo e Enzima (EF; 5 g de AO/vaca/dia e 24 g/vaca/dia) perfazendo desta forma 4 tratamentos. Os tratamentos foram oferecidos diretamente via cânula, diariamente após o fornecimento do alimento pela manhã, durante os períodos experimentais.

A dieta experimental foi formulada de forma a atender as exigências nutricionais de uma vaca em lactação com aproximadamente 640 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 21,0 kg e com 3,5% de gordura e 300 dias em lactação, conforme recomendações do NRC (2001). A proporção volumoso:concentrado utilizada foi de 61:39, sendo que o volumoso utilizado foi silagem de milho (Tabela 16). O concentrado foi composto por milho moído, farelo de soja, grão de soja, ureia, mistura mineral e sal comum (18,91; 12,0; 5,8; 0,48; 1,35 e 0,40 % da MS, respectivamente). O alimento foi fornecido à vontade, duas vezes por dia, e as sobras foram pesadas diariamente para medição do consumo e ajuste do consumo de matéria seca. Os animais foram pesados no início e no final de cada período experimental.

Tabela 16. Composição química da dieta experimental.

Ingredientes	Dieta experimental¹
<i>Composição, %MS</i>	
Silagem de Milho	61.06
Milho moído	18.91
Farelo de soja	12.00
Grão de soja	5.80
Ureia	0.48
Núcleo mineral ²	1.35
Sal Branco	0.40
<i>Composição Química, %MS</i>	
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	38,7
Fibra em Detergente Neutro (FDN de Forragem)	33,7
Fibra em Detergente Ácido FDA	21,2
Carboidratos não Fibrosos (CNF)	36,9
Proteína Bruta (PB)	15,8
Proteína Degradável no Rúmen (PDR)	10,5
Proteína não Degradável no Rúmen (PNDR)	5,3
Extrato Etéreo (EE)	3,8
NEL (Mcal/kg) ³	1,58

¹valores em % da MS; ²Composição por kg de mistura mineral: 88g de Ca; 42g de P; 18g de S; 45g de Mg; 20g de K; 123g de Na; 14mg de Co; 500mg de Cu; 20mg de Cr; 1050mg de Fe; 28mg de I; 1400mg de Mn; 18 de Se; 2800mg de Zn; 80mg de Biotina; 200000 UI de Vitamina A; 40000 UI de vitamina D3; 1200 UI de Vitamina E; 420 mg de F.³Energia líquida de lactação, em Mcal/kg.

7.2.2. Procedimentos experimentais e coleta de amostras

Do D15 ao D19 de cada período experimental, foram realizadas coletas de cada ingrediente (silagem de milho e cada ingrediente do concentrado) para caracterização da dieta, imediatamente armazenados em freezer -20°C para posterior análise. Amostras das sobras foram coletadas, do D15 ao D19 de cada período experimental, armazenados a -20-°C, e ao final de cada período foi feito um pool/vaca/período para posterior análise química. No D15 e D16 foi realizada a separação de partículas das sobras, da silagem de milho e da TMR pelo conjunto de peneiras *Penn State*.

A produção de leite foi mensurada e amostras foram coletadas em cada período experimental, entre D15 ao D17, nas ordenhas da manhã e da tarde. As amostras foram armazenadas a -20°C para posteriores análises de compostos nitrogenados totais, alantoína e ureia. Para a análise de ureia no leite, 10ml de leite foram desproteinizados com 5ml de ácido tricloroacético, filtrado e armazenado a -20°C até as análises. Para composição do leite, a

determinação da gordura, proteína bruta e lactose no leite foram utilizadas amostras à fresco utilizando o equipamento LACTOSCAN® no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP.

A digestibilidade aparente total (DAT) e a síntese de proteína microbiana foram estimadas através de 8 coletas *spot* de fezes e urina, respectivamente, entre os dias D16 ao D18 de cada período experimental, em um intervalo de 9 horas (8 amostras por vaca/período). As amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto, armazenadas a -20°C, e ao final de cada período foi realizado um pool de amostra/vaca/período, em seguida secos a 55°C por 72 horas e armazenados. Já as amostras de urina foram coletadas com estimulação na região da vulva, nos mesmos horários da coleta das fezes, e 10ml de amostra foi imediatamente diluída em 40ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1M), e em seguida armazenada a -20°C. ao final, obteve-se uma pool de amostra/vaca/dia, assim como para as fezes.

Para avaliação do fluxo de nutrientes, foi realizada a infusão de indicador Co-EDTA, preparado de acordo com Udén et al. (1980), do dia D13 ao D18, afim de assegurar no mínimo 60 horas antes da primeira coleta reticular, com o intuito de estabilizar a concentração do indicador no rúmen. O indicador foi administrado via canula, no total de 20g/vaca/dia de Co-EDTA, dividido em quatro vezes ao dia, a cada 6 horas (00:00, 06:00, 12:00 e 18:00h). A concentração dos marcadores e o fluxo de nutrientes será estimado através de coletas reticulares descrita por Krizsan et al. (2010), realizadas a cada 9 horas, entre os dias D16 ao D18, nos mesmos horários das coletas de fezes e urina. Uma subamostra foi filtrada em pano dessorador para separação das frações e secas a 55°C, e feito uma amostra pool/vaca/período. O fluxo de nutrientes foi estimado por meio dos marcadores da fase sólida, que foi a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), e da fase líquida, o Co-EDTA. Outra subamostra foi armazenada a -20°C, para posterior isolamento do pellet bacteriano, por meio da técnica de Reynal et al. (2005), modificado por Krizsan et al. (2010), para estimar a razão N-RNA:N-total. As amostras reticulares foram descongeladas (2°C), e realizado um pool/vaca/período imediatamente antes das análises.

No D19 foi realizada um total de 9 coletas de líquido ruminal, a cada 2 horas, para verificação de pH ruminal e coleta de amostras para quantificação de N-amoniacal e AGCC. Uma alíquota de 50 mL foi centrifugada a 3.500 rpm por 15 minutos e à 1 mL do sobrenadante foi adicionado 0,2 mL de ácido fórmico para determinação dos ácidos graxos voláteis. À outro 2 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico solução 1N e congelado a -20°C para determinação do nitrogênio amoniacal, conforme proposto por Preston (1995). O pH do fluido ruminal foi medido com potenciômetro digital portátil imediatamente após a coleta de

uma amostra de 50 ml. As amostras foram congeladas a -20°C até o início das análises, sendo uma amostra pool/vaca/período.

Para avaliação da cinética ruminal, o conteúdo ruminal foi evacuado manualmente através da cânula ruminal às 11:00 h (2 h após a alimentação no D20) e às 07:00 h (2 h antes da alimentação no D21). A massa total do conteúdo ruminal e volume foram determinados. Durante a evacuação, uma alíquota de 10% da digesta foi separada para facilidade de sub-amostragem. Uma alíquota de 600g foi retirada e secas a 55°C para determinação da MS e composição bromatológica. Uma segunda amostra foi filtrada através de uma membrana de náilon (1 mm de tamanho de poro) para separar as fases sólidas e líquidas. Amostras foram retiradas de ambas as fases para determinação do tamanho do compartimento ruminal (pool) de componentes da digesta. Foram separadas e congeladas a -80°C alíquotas das amostras de conteúdo ruminal para determinação posterior da população bacteriana.

Amostras de sangue foram coletadas no D17, em tubos com vacum (BD Vacutainer SST II Advance, Juiz de Fora, Brasil; 8.5 mL), imediatamente centrifugados (3000 xg, 15 min). O soro foi coletado do sobrenadante e armazenado a -20°C para posteriores análises. A observação de comportamento ingestivo foi realizado nos dias D14 e D15 de cada período experimental.

7.2.3. Análises laboratoriais

Amostras de alimentos, sobras, conteúdo ruminal, amostras de retículo (sólido e líquido) e fezes foram secas a 55°C e moídas, a 2 e 1 mm, para posteriores análises. As amostras de pellet bacteriano foram liofilizadas e moídas manualmente, com auxílio de cadinho e pistilo, e peneirados em uma peneira de 100 mesh (150micras).

As análises de MS e MO foram determinadas de acordo com a AOAC (2005; método 930.15 e 942.05, respectivamente). O conteúdo de nitrogênio foi determinado pela metodologia descrita pela AOAC (2005; método 984.13), considerando 6,25 como fator para converter o N para valores de PB. A fibra em detergente neutro (FDN, sem amilase, sem sódio) e fibra em detergente ácido (FDA, sem amilase, sem sódio) foram determinadas de acordo com Van Soest et al (1991). A análise de lignina foi realizada de acordo com Van Soest e Robertson (1985), cuja mensuração ocorreu após hidrólise da celulose em ácido sulfúrico 72% no resíduo da amostra submetida ao detergente ácido. A determinação do teor de FDNi foi dada pelo conteúdo de FDN das amostras após incubação e fermentação in vivo por 288 horas, utilizando bags F57 (Ankom Technology) segundo adaptação de técnica descrita por Casali (2008). O Cobalto foi analisado por espectrofotômetro de absorção atômica.

A determinação dos AGCC foi realizada através de cromatografia gasosa segundo metodologia de Erwin et al (1961). A determinação de nitrogênio amoniacal foi determinado por método colorimétrico (PRESTON, 1995), por absorbância a 630nm por espectrofotômetro.

As determinações de creatinina foram realizadas por meio de kits comerciais (Bioclin®); as concentrações de ácido úrico e alantoína na urina e alantoína no leite foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987) descrita por Chen e Gomes (1992). A relação RNA-N:N no pellet bacteriano foi estimado pela análise de bases de purinas, de acordo com Ushida et al. (1985). A concentração de glicose no soro foi mensurada usando kit comerciais (Bioclin®, K082). A concentração de ureia no leite, sangue e urina foi mensurado por kits da Bioclin (K056).

Três microrganismos ruminais importantes para a degradação da celulose (*F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*), dois microrganismos importantes na degradação de amido e na produção de ácido láctico (*S. bovis* e *R. amylophilus*) foram quantificados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) para determinação do efeito da mudança do ambiente ruminal sobre a população de microrganismos. Foi realizada uma quantificação relativa destas bactérias em relação ao total de bactérias presentes na amostra de conteúdo ruminal.

O DNA total foi extraído das amostras de conteúdo ruminal, de cada fase (líquido e sólido) após degelo. Uma amostra representativa (10 g) foi homogeneizada, centrifugada a 6.500 x g por 30 minutos, e o DNA total foi extraído do precipitado de conteúdo ruminal de acordo com Yu & Morrison (2004). O DNA extraído foi utilizado como molde em reação de PCR em tempo real utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para as bactérias ruminais desejadas, juntamente com oligonucleotídeo universal para eubactérias (Tabela 17).

Tabela 17. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na quantificação de bactérias ruminais.

Espécie de bactéria	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Anelamento/ tamanho produto
<i>F. succinogenes</i> ¹	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCCTGAACTATC	60°C/445 pb
<i>R. albus</i> ²	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	55°C/175 pb
<i>R. flavefaciens</i> ³	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	60°C/295 pb
<i>S. bovis</i> ⁴	CTAATACCGCATAACAGCAT	AGAAACTTCCTATCTCTAGG	57°C/127 pb
<i>R. amylophilus</i> ¹	CAACCAGTCGCATTGAGA	CACTACTCATGGCAACAT	57°C/642 pb
<i>Eubacteria</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	58°C/193 pb
<i>Universal</i> ⁵			

Fonte: ¹Tajima et al. (2001); ²Wang et al. (1997); ³Koike e Kobaishi (2001); ⁴Stevenson e Weimer (2007); ⁵Muyzer et al. (1993).

O PCR em tempo real foi feito em equipamento StepOne™ e tecnologia SYBR Green (Applied Biosystems ®), seguindo as condições de amplificação descritas por Tajima et al. (2001). Controles negativos sem DNA serão incluídos em cada ensaio para avaliação da especificidade geral.

7.2.4. Cálculos

A composição da dieta foi estimada usando a composição química analisada para cada ingrediente e suas proporções na TMR. O consumo de matéria seca, assim como para cada nutriente, foram calculados com base na composição química da dieta ofertada e sobras. A excreção total de fezes de cada nutriente foi estimada a partir da concentração do indicador interno FDNi. A digestibilidade aparente total de cada nutriente foi calculada da seguinte forma:

$$\text{DAT} = 100 \times (\text{ingestão (g)} - \text{excreção (g)}) / \text{ingestão (g)}.$$

A digestibilidade da matéria orgânica foi estimada multiplicando a ingestão de MO pela sua digestibilidade. A concentração de CNF foi calculado da seguinte forma:

$$\text{CNF} = \text{MO} - (\text{PB} + \text{FDN} + \text{EE}).$$

Onde MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; EE: extrato etéreo. Já a fração da FDN potencialmente digestível (FDNpd) foi calculada pela diferença **FDN – FDNi**.

O leite corrigido para energia (LCE) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{LCE (kg/d)} = \text{PL} \times [(38,3 \times \text{gordura}) + (24,2 \times \text{proteína}) + (38,3 \times \text{lactose} + 20,7)] / 3,14$$

Onde, PL: produção de leite (kg/d); gordura, proteína e lactose expressos em g/kg (SJAUNA et al., 1990).

O fluxo de nutrientes reticular foi calculado segundo modelo proposto por Faichney (1975) de duplo marcadores. O Cobalto foi utilizado como marcador da fase líquida, e o FDNi como marcador interno da fase sólida. A excreção total de urina foi baseada na estimativa de excreção urinária de creatinina de 1,06 mmol/kg de peso metabólico ($\text{BW}^{0,75}$, CHIZZOTTI et al., 2008). A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada a partir da quantificação dos derivados de purinas na urina e no leite, de acordo com metodologia descrita por Chen e Gomes (1992), considerando-se a absorção de purinas a partir da fórmula sugerida por Verbic et al. (1990).

A matéria orgânica fermentada no rúmen (MOFR) foi calculada da seguinte forma:

$$\text{MOFR} = \text{ingestão MO (kg)} - [\text{fluxo MO (kg)} - \text{fluxo MO bactéria (kg)}]$$

Onde o fluxo de MO da bactéria foi estimado usando a razão de N e MO no pellet bacteriano isolado do conteúdo reticular.

O fluxo de proteína não degradável no rúmen (PNDR) e proteína degradável no rúmen (PDR) foram calculados segundo metodologia descrita por Reynal e Broderick (2005).

A cinética fermentativa ruminal foi calculada de acordo com Robinson et al. (1987), onde:

$$k_i (\%/h) = (100/24) \times (\text{ingestão}/\text{pool ruminal})$$

$$k_p (\%/h) = (100/24) \times (\text{fluxo reticular}/\text{pool ruminal})$$

$$k_d (\%/h) = k_i - k_p$$

Em que k_i : taxa de ingestão; k_p : taxa de passagem; k_d : taxa de degradação

7.2.5. Forma de análise dos resultados

O delineamento experimental foi em DQL, com dois quadrados 4x4 contemporâneos, com o total de quatro tratamentos (Controle, Grupo Fungo, Enzima ou Combinação Fungo:Enzima). Foram no total 4 períodos experimentais, com duração de 21 dias, sendo 14 de adaptação e 7 de coleta. Os dados foram verificados previamente para normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. Os dados foram analisados através do software SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC), considerando o efeito fixo de tratamento, e efeito aleatório de período, quadrado e animal (quadrado). A significância será declarada a 5% de significância.

O efeito de tratamento foi decomposto em três contrastes ortogonais: C1:efeito dos aditivos (CON vs. ENZ + FUN + EF); C2: efeito da enzima contra o fungo (ENZ vs. FUN); C3: efeito da combinação contra os aditivos isolados (EF vs. E + F). Os graus de liberdade e testes foram ajustados usando a opção Kenward-Roger. As médias dos tratamentos foram comparadas com PDIF (LSMEANS) e significância declarada no nível de probabilidade de 0,05.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Consumo e produção de leite

Houve aumento no consumo de matéria seca e FDN potencialmente digestível ($P < 0,05$) nos animais tratados com enzima fibrolítica e *A. oryzae* (Tabela 18), sem efeito de interação significativo ($P < 0,11$). O tratamento com o *A. oryzae* elevou o consumo de FDN ($P = 0,05$), sendo que não foi observado efeitos significativos sobre o consumo de MO, PB e EE ($P > 0,25$).

Tabela 18. Consumo de matéria seca e nutrientes em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Consumo, kg/d</i>								
Matéria seca	19,20	20,45	20,52	20,42	0,90	0,04	0,03	0,11
Matéria orgânica	17,09	17,72	17,79	17,7	0,79	0,34	0,29	0,36
FDN ⁴	7,06	7,17	7,35	7,29	0,23	0,45	0,05	0,41
Proteína bruta	3,13	3,26	3,27	3,26	0,16	0,28	0,25	0,30
FDNpd ⁵	4,18	4,33	4,37	4,30	0,15	0,05	0,05	0,38
Extrato etéreo	0,85	0,89	0,89	0,89	0,04	0,27	0,26	0,24

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média. ⁴Fibra em detergente neutro. ⁵FDN potencialmente digestível.

A produção de leite e o leite corrigido para energia não foram afetados pela utilização dos aditivos ($P > 0,12$, Tabela 19). Contudo, houve tendência ($P < 0,10$) de aumento na produção de gordura, em kg/d e em porcentagem, nos animais recebendo *A. oryzae* na dieta, sem efeito significativo para enzima fibrolítica e interação. Não foi observado efeito dos tratamentos sobre as concentrações de proteína, lactose e ureia do leite ($P > 0,11$), bem como sobre a eficiência alimentar ($P > 0,46$).

Tabela 19. Produção e composição de leite em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Orçã e Enzima Horontica) na dieta de vacas em lactação.								
Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Produção (kg/d)</i>								
Leite	17,97	18,69	19,14	19,02	1,49	0,31	0,12	0,47
LCG ⁴	21,26	21,30	22,06	22,03	0,66	0,29	0,12	0,34
gordura	0,62	0,64	0,67	0,69	0,07	0,58	0,31	0,59
proteína	0,51	0,52	0,52	0,47	0,08	0,69	0,82	0,20
lactose	0,77	0,78	0,78	0,71	0,12	0,73	0,76	0,18
<i>Composição do leite (%)</i>								
gordura	4,13	4,24	4,49	4,31	0,19	0,64	0,09	0,44
proteína	3,30	3,43	3,48	3,44	0,12	0,78	0,69	0,39
lactose	5,16	5,15	5,13	5,15	0,14	0,95	0,84	0,27
ureia (mg/dL)	12,44	13,87	13,25	12,62	0,98	0,11	0,35	0,84
<i>Eficiência alimentar</i>								
kg de LCG/kg de CMS	1,11	1,04	1,08	1,08	0,05	0,85	0,46	0,76

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média. ⁴leite corrigido para gordura.

7.3.2. Parâmetros fermentativos e metabólitos sanguíneos

Houve aumento do pH ($P < 0,05$) nos animais tratados com enzima fibrolítica e *A. oryzae* (Tabela 20), sem efeito de interação significativo ($P < 0,11$). Houve tendência de redução da concentração de nitrogênio amoniacal ($P < 0,08$) em resposta aos tratamentos, sem efeito significativo de interação ($P = 0,24$). De maneira semelhante, houve aumento ($P=0,05$) da concentração de acetato ruminal, bem como do total de AGCC e AGCR, em resposta ao tratamento com *Aspergillus oryzae*. Não foi observado efeito dos tratamentos sobre a concentração de propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato ($P > 0,14$). Da mesma forma, os tratamentos não afetaram a relação acetato:propionato ($P > 0,21$).

Tabela 20. Parâmetros de fermentação ruminal em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Metabolismo ruminal</i>								
pH	6,16	6,25	6,27	6,21	0,11	0,05	0,03	0,11
N-NH ₃ , mg/dL ⁴	16,78	16,12	15,85	15,71	0,59	0,08	0,07	0,24
AGCC ⁵ , mM								
Acetato	66,54	67,91	69,48	69,58	1,88	0,10	0,05	0,19
Propionato	21,38	21,56	23,13	23,28	1,82	0,91	0,27	0,24
Butirato	12,25	12,11	12,38	11,11	1,04	0,85	0,87	0,17
Total AGCC	100,29	101,44	105,00	103,97	4,46	0,74	0,05	0,29
AGCR ⁶ , mM								
Isobutirato	1,46	1,42	1,55	1,56	0,13	0,61	0,26	0,24
Valerato	1,48	1,55	1,55	1,48	0,14	0,63	0,50	0,96
Isovalerato	2,31	2,37	2,51	2,44	0,19	0,64	0,14	0,33
Total AGCR	5,25	5,32	5,61	5,47	0,35	0,81	0,05	0,44
Acet:Prop ⁷	3,17	3,22	3,11	3,12	0,27	0,77	0,73	0,73

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

⁴Nitrogênio amoniacal. ⁵Ácido graxo de cadeia curta. ⁶Ácido graxo de cadeia ramificada. ⁷Relação acetato:propionato.

Com relação aos metabólitos sanguíneos, não foi observado efeito dos tratamentos sobre os parâmetros sanguíneos ($P > 0,21$; Tabela 21).

Tabela 21. Glicose e ureia séricos em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Metabólitos, mg/dL</i>								
Glicose	73,05	74,99	73,79	75,22	2,28	0,47	0,79	0,42
Ureia	36,78	37,32	35,58	34,11	2,82	0,79	0,58	0,21

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

7.3.3. Índice de seleção

Os tratamentos elevaram ($P < 0,03$) o índice de seleção de partículas grandes (>19 mm) quando comparado ao controle, sendo que foi observado efeito de interação ($P < 0,001$) para esta variável, cujo índice de seleção para partículas grandes foi superior para os animais

recebendo os tratamentos com *A. oryzae*, separadamente ou em combinação com enzima fibrolítica (Tabela 22).

Tabela 22. Índice de seleção por tamanho de partículas de vacas em lactação em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Partículas</i>								
Longas	0,88c	0,94b	1,03a	1,02a	0,02	0,01	<.0001	<.0001
Médias	0,99	0,99	0,99	0,99	0,01	0,72	0,61	0,99
Curtas	0,99	0,99	0,99	0,98	0,01	0,75	0,78	0,07
Finas	1,03	1,04	1,02	1,04	0,01	0,35	0,55	0,44

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

7.3.4. Comportamento ingestivo

Houve aumento do tempo de alimentação e ruminação ($P < 0,05$) nos animais recebendo enzima fibrolítica e *A. oryzae*, sem efeito de interação significativo ($P > 0,61$; Tabela 23). Não foi observado efeito ($P > 0,43$) dos tratamentos sobre o tempo de ruminação e alimentação por kg de FDN consumido.

Tabela 23. Comportamento ingestivo em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON,	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Comportamento, horas</i>								
Alimentando	8,35	9,08	9,15	8,40	0,88	0,05	0,04	0,90
Ruminando	9,14	9,55	9,40	9,23	0,56	0,04	0,06	0,61
A+R	17,49	18,63	18,55	17,63	1,39	0,01	0,02	0,75
Alimentação/kg FDN	1,20	1,25	1,24	1,16	0,13	0,95	0,59	0,53
Ruminação/kg FDN	1,32	1,31	1,28	1,28	0,03	0,01	0,02	0,75

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

7.3.5. Fluxo de nutrientes e digestibilidade aparente ruminal e total

Foi observado efeito de interação ($P < 0,05$) sobre o fluxo de FDN potencialmente digestível e da FDN (Tabela 24), cujo fluxo destas variáveis foi superior para os animais

recebendo os tratamentos com *A. oryzae*, separadamente ou em combinação com enzima fibrolítica. Não houve efeito dos tratamentos sobre o fluxo de MS, MO e PB ($P > 0,11$).

Foi observado efeito de interação ($P < 0,05$) para as variáveis de digestibilidade aparente ruminal (DAR) da FDN e da FDN potencialmente digestível, onde os tratamentos com *A. oryzae* elevaram a DAR para estas variáveis, sem efeito ($P > 0,12$) sobre a DAR da MS e MO. Da mesma forma, os tratamentos com o fungo elevaram ($P < 0,05$) a digestibilidade aparente total (DAT) da MS e FDN, com tendência ($P < 0,07$) de efeito sobre a DAT da MO e da FDNpd. O tratamento exclusivamente com enzima fibrolítica, isoladamente, não afetou os parâmetros de digestibilidade.

Tabela 24. Fluxo reticular, digestibilidade aparente ruminal (DAR) e digestibilidade aparente total (DAT) da MS, MO, FDN e FDNpd em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON,	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>Fluxo reticular, kg/d</i>								
Matéria seca	13,86	14,8	14,51	14,89	0,81	0,29	0,51	0,35
Matéria orgânica	9,91	9,82	9,55	9,27	0,59	0,18	0,29	0,31
FDN ⁶	4,49a	4,17a	3,77b	3,77b	0,48	0,39	0,03	0,05
Proteína bruta	2,26	2,34	2,31	2,30	0,23	0,38	0,92	0,11
FDNpd	2,71a	2,67a	2,4b	2,23b	0,25	0,26	0,06	0,05
<i>Digestibilidade aparente ruminal, %</i>								
Matéria seca	29,65	25,94	29,41	31,48	3,51	0,41	0,95	0,66
Matéria orgânica	47,59	42,69	45,17	46,81	2,92	0,12	0,53	0,93
FDN ⁶	29,81b	30,20b	32,09a	32,26a	2,37	0,96	0,05	0,04
FDNpd	40,71b	41,24b	42,61a	42,71a	2,07	0,77	0,05	0,05
<i>Digestibilidade aparente total, %</i>								
Matéria seca	64,41b	66,79b	67,59a	67,12a	1,73	0,06	0,02	0,03
Matéria orgânica	68,29b	70,70b	71,02a	70,57a	2,45	0,11	0,07	0,09
FDN ⁶	37,79b	39,90b	43,36a	41,24a	2,88	0,27	0,01	0,05
FDNpd	58,94b	63,97b	66,82a	65,60a	4,76	0,17	0,04	0,07

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

7.3.6. Dinâmica ruminal e microbiota ruminal

Foi observado efeito de interação ($P = 0,05$) sobre a taxa de ingestão (ki) da FDN, onde os tratamentos com *A. oryzae* elevaram a ki da FDN (Tabela 25). Todos os tratamentos reduziram ($P < 0,05$) a taxa de passagem (kp) da FDN. Consequentemente, foi observado efeito

de interação ($P = 0,01$) sobre a taxa de degradação (kd) da FDN, onde os tratamentos com *A. oryzae* elevaram a kd da FDN. Além disso, os aditivos elevaram ($P < 0,05$) a ki e a kd da FDNpd quando comparado ao controle, sem afetar a kp ($P > 0,46$). Não foi observado efeito dos tratamentos ($P > 0,32$) sobre o *pool* ruminal dos nutrientes.

Tabela 25. Dinâmica ruminal de vacas em lactação em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta.

Orçate e Enzima Polonarca, na área.								
Item	Tratamentos ¹				EPM ³	P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF		Enz	Fun	E*F
Pool, kg								
Total								
MS	10,11	10,33	10,34	10,31	0,45	0,52	0,52	0,41
FDN	6,17	6,31	6,17	6,30	0,30	0,34	0,96	0,73
FDNi	2,08	2,26	2,06	2,03	0,15	0,32	0,91	0,77
FDNpd	4,09	4,06	4,11	4,27	0,26	0,86	0,86	0,63
MO	8,49	8,66	8,69	8,67	0,38	0,49	0,41	0,76
PB	1,24	1,19	1,26	1,20	0,07	0,55	0,79	0,51
Cinética, %/h								
FDN								
ki	4,81b	4,82b	4,99a	4,92a	0,14	0,57	0,11	0,05
kp	2,99	2,78	2,54	2,77	0,17	0,05	0,02	0,22
kd	1,82b	2,04b	2,45a	2,15a	0,22	0,42	0,06	0,01
Cinética, %/h								
FDNpd								
ki	4,29	4,45	4,54	4,37	0,28	0,05	0,04	0,71
kp	2,56	2,55	2,83	2,48	0,72	0,46	0,47	0,92
kd	1,73	1,90	2,01	1,89	0,15	0,05	0,04	0,31

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

Com relação à composição da microbiota ruminal, foi observado que a fração sólida do conteúdo ruminal apresentou maior população de microrganismos fibrolíticos, ao passo que na fase líquida destacou-se os microrganismos amilolíticos. Os aditivos afetaram diretamente a composição da população de microrganismos ruminais, sendo que na fração sólida (Tabela 26) o tratamento com *A. oryzae* elevou a população de *F. succinogenes* ($P = 0,05$). De maneira semelhante, foi observado aumento ($P < 0,05$) da população de *R. flavefaciens* em resposta à utilização dos aditivos, sem efeito para *R. albus*, *S. bovis* e *R. amylophilus* ($P > 0,10$).

Tabela 26. Efeito dos tratamentos sobre a população relativa⁴ das bactérias ruminais na fração sólida do conteúdo ruminal.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
<i>F. succinogenes</i>	0.7736b	0.8903b	0.9251a	0.9739a	0.141	0,30	0,08	0,05
<i>R. albus</i>	0.0105	0.0106	0.0108	0.0145	0.011	0,95	0,88	0,13
<i>R. flavefaciens</i>	0.2625	0.3372	0.3470	0.3208	0.091	0,05	0,05	0,09
<i>S. bovis</i>	0.0004	0.0003	0.0004	0.0005	0.051	0,17	0,56	0,89
<i>R. amylophilus</i>	0.0019	0.0021	0.0023	0.0020	0.002	0,17	0,09	0,56

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média. ⁴A população relativa está representada como porcentagem da população microbiana total.

Já na fração líquida do conteúdo ruminal, foi observado efeito significativo em resposta aos aditivos apenas para os microrganismos amilolíticos, onde aos tratamentos elevaram ($P < 0,05$) a população relativa de *S. bovis* e *R. amylophilus*, (Tabela 27).

Tabela 27. Efeito dos tratamentos sobre a população relativa³ das bactérias ruminais na fração líquida do conteúdo ruminal.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF	EPM	Enz	Fun	E*F
<i>F. succinogenes</i>	0.1192	0.1332	0.1270	0.1140	0.157	0,69	0,82	0,79
<i>R. albus</i>	0.0028	0.0028	0.0021	0.0054	0.033	0,79	0,61	0,15
<i>R. flavefaciens</i>	0.0102	0.0078	0.0062	0.0098	0.032	0,16	0,13	0,43
<i>S. bovis</i>	0.0073	0.0080	0.0085	0.0084	0.001	0,05	0,04	0,89
<i>R. amylophilus</i>	0.0083	0.0092	0.0096	0.0091	0.001	0,05	0,05	0,77

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média. ⁴A população relativa está representada como porcentagem da população microbiana total.

7.3.7. Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Não foi observado efeito dos tratamentos ($P > 0,25$) sobre o consumo de nitrogênio diário e fluxo reticular de N (Tabela 28). Contudo, foi observado que todos os tratamentos elevaram ($P < 0,05$) o desaparecimento de nitrogênio ruminal em comparação ao controle.

Todos os tratamentos reduziram ($P < 0,05$) o consumo de PDR, tanto em kg/d quanto em relação percentual ao consumo de PB. De maneira semelhante, os aditivos elevaram ($P < 0,05$) o fluxo pós-ruminal de PNDR em relação ao controle, tanto em kg/d quanto em relação percentual ao consumo de PB. Não foi observado efeito dos tratamentos ($P > 0,66$) sobre a matéria orgânica fermentada no rúmen. Foi observada interação ($P = 0,05$) para síntese de proteína microbiana (Pmic), onde os tratamentos com o fungo *A. oryzae* elevaram a síntese de

P_{mic}, tanto em g/d quanto em % do fluxo de N. Concomitantemente, os tratamentos com o *A. oryzae* elevaram ($P=0,05$) a eficiência microbiana (g de N/kg de MOFR) quando comparado ao tratamento enzimático.

Tabela 28. Síntese de proteína microbiana em vacas em lactação em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta.

Item	Tratamentos ¹				EPM ³	P ²		
	CON	ENZ	FUN	EF		Enz	Fun	E*F
Consumo, g de N/d	500,8	521,6	523,2	521,6	19,03	0,27	0,22	0,32
Fluxo reticular, g de N/d	361,6	374,4	369,6	368,0	22,61	0,38	0,92	0,11
DRN ⁴ , % da ingestão de N	27,80	28,22	29,36	29,45	1,27	0,05	0,04	0,11
Consumo PB, kg/d	3,13	3,26	3,27	3,26	0,15	0,28	0,25	0,30
PDR, kg de PB/d	2,14	2,07	2,03	2,01	0,12	0,05	0,03	0,16
% da ingestão de PB	68,37	63,50	62,08	61,66	2,73	0,04	0,03	0,12
PNDR, kg de PB/d	0,99	1,19	1,24	1,25	0,12	0,05	0,04	0,16
% da ingestão de PB	31,63	36,50	37,92	38,34	2,73	0,05	0,05	0,06
MOFR ⁵ , kg/d	9,68	9,7	9,75	9,85	0,56	0,66	0,99	0,72
P _{mic} ⁶ , g de N/d	285,87b	288,54b	300,08a	314,62a	11,87	0,91	0,06	0,05
% do fluxo de N	79,06b	77,07b	81,19a	85,49a	3,85	0,11	0,05	0,04
EM ⁷ , g de N/kg de MOFR	29,53b	29,75b	30,78a	31,94a	0,92	0,74	0,07	0,05

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média. ⁴DRN: desaparecimento ruminal de N. ⁵MOFR: matéria orgânica fermentada no rúmen. ⁶Proteína microbiana. ⁷EM=eficiência microbiana

Com relação ao balanço de nitrogênio, observou-se que os tratamentos reduziram ($P < 0,06$) a excreção de N, em porcentagem do consumo de N (%CN), pelas fezes e urina. Não foi observado efeito ($P > 0,11$) sobre a excreção de N pelo leite. Consequentemente, os tratamentos elevaram ($P < 0,05$) o balanço de N, em relação ao controle, tanto em g/d quanto em %CN (Tabela 29).

Tabela 29. Balanço de nitrogênio em resposta à adição de diferentes aditivos (*A. oryzae* e enzima fibrolítica) na dieta de vacas em lactação.

Item	Tratamentos ¹					P ²		
	CON,	ENZ	FUN	EF	EPM ³	Enz	Fun	E*F
Consumo, g de N/d	500,8	521,6	523,2	521,6	19,03	0,27	0,22	0,32
Fecal								
g/d	169,96	159,74	159,41	158,94	13,92	0,24	0,13	0,21
%CN	33,94	30,63	30,47	30,47	2,76	0,07	0,03	0,06
Urinário								
g/d	160,02	154,34	154,34	155,28	12,58	0,86	0,74	0,22
%CN	31,95	29,59	29,50	29,77	2,68	0,06	0,05	0,04
Volume, L/d	20,78	19,95	20,94	20,02	1,18	0,56	0,92	0,59
Leite								
g/d	81,6	83,2	83,2	75,2	6,20	0,11	0,38	0,90
%CN	16,29	15,95	15,90	14,42	1,49	0,67	0,81	0,54
Balanço								
g/d	89,22	124,32	126,25	132,18	20,52	0,06	0,04	0,15
%CN	17,82	23,83	24,13	25,34	3,45	0,04	0,05	0,16

¹CON: controle; ENZ: enzima fibrolítica (Fibrozyme ® Alltech); FUN: fungo *Aspergillus oryzae*; EF: combinação entre ENZ e FUN. ²Valor de P para os efeitos principais e interação entre os fatores. ³Erro padrão da média.

7.4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observado aumento significativo do consumo de matéria seca e da fração potencialmente degradável da FDN nas vacas em lactação recebendo os aditivos, enzima fibrolítica, o fungo AO e a combinação de ambos. Este aumento no consumo de MS pode estar relacionado ao maior consumo de FDN em resposta à adição dos aditivos, uma vez que houve aumento no consumo de partículas longas, evidenciado pelo índice de seleção de partículas. Dessa forma, o aumento no consumo de FDN proporcionou o maior consumo de matéria seca, e tal fato pode ter ocorrido pelo aumento da taxa de digestão ruminal da fibra. Beauchemin et al. (2003) relataram que o aumento no consumo de MS pode estar relacionado com o aumento da digestibilidade da forragem, e também pelo aumento da taxa de passagem pelo trato digestório (FENG et al., 1996).

Existe uma grande variabilidade de resultados de consumo de matéria seca em resposta à utilização de enzima fibrolítica exógenas na dieta de ruminantes. Lewis et al. (1999) e Gado et al. (2009), observaram maior consumo de matéria seca quando adicionaram doses crescentes de enzimas fibrolíticas exógenas às dietas. Entretanto, outros estudos não apresentaram diferenças no consumo de matéria seca em resposta ao tratamento enzimático, apresentando

atividade celulase e xilanase (ELWAKEEL et al., 2007; HRISTOV et al., 2007; REDDISH; KUNG JR., 2007).

Associado à maior seleção de partículas grandes, conforme o índice de seleção descrito anteriormente, foi observado que os tratamentos com fungo e sua associação com a enzima fibrolítica reduziram o tempo de ruminação, evidenciando a capacidade dos aditivos em alterar o comportamento alimentar através do aumento da degradação ruminal da fibra, permitindo que os animais gastem menos tempo ruminando, possibilitando maior consumo de nutrientes e, possivelmente, melhoras de desempenho (BEAUCHEMIN et al. 2000).

Silva (2014) observou que a inclusão de enzimas fibrolíticas (0, 12, 16 e 24g/vaca/dia) a dieta de vacas em lactação promoveu efeito quadrático no tempo de ruminação e mastigação, com maiores valores observados para as doses intermediárias de enzima fibrolíticas (8 e 16 g/vaca/dia). Beauchemin et al. (2000) observaram menor tempo perdido alimentando por unidade de FDN ingerida, quando suplementaram enzimas fibrolíticas às dietas, sugerindo que este aditivo tem a capacidade de alterar a fragilidade dos ingredientes ainda no comedouro fazendo com que degrade mais rapidamente diminuindo a necessidade de mastigação. Entretanto, Bowman et al. (2003) não observaram diferenças no comportamento ingestivo com a adição de enzimas fibrolíticas exógenas à dieta.

Evidentemente, a digestibilidade da forragem exerce grande influência sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2007), pelo fato de estar diretamente relacionado a regulação do consumo. Dentre os mecanismos de controle do consumo, tem-se a regulação física, que está associado à capacidade de distensão e enchimento ruminal (MERTENS, 1994), que por sua vez está diretamente relacionado ao teor de FDN da dieta e suas características digestivas, como fragilidade da partícula, taxa de digestão e passagem (ALLEN; PIANTONI, 2014). Dessa forma, animais recebendo dietas com alta inclusão de fibra apresentam consumo limitado fisicamente, onde o CMS máximo é limitado pela capacidade de enchimento ruminal. Nesse sentido, estratégias que visam elevar a digestibilidade da fibra, como utilização de aditivos, podem promover melhora do CMS, uma vez que podem elevar a taxa de digestão ruminal.

No presente estudo, os aditivos elevaram a taxa de digestão ruminal da fibra, elevando o consumo de matéria seca, indicando que os animais que não receberam o aditivo estavam com limitação física de consumo provocado pela alta inclusão de volumoso à dieta. Entretanto, importante ressaltar que os melhores valores de digestibilidade ruminal foram obtidos nos animais tratados com a combinação entre enzima fibrolítica e fungo. A hipótese deste estudo seria que a combinação entre estes aditivos potencializaria a digestibilidade ruminal da fibra, uma vez que o probiótico apresenta ação física sobre a fibra, estimulando acesso aos microrganismos

fibrolíticos (NSEREKO et al. 2002; MORGAVI et al. 2004), e a enzima poderia atuar enfraquecendo a partícula fibrosa e/ou facilitando a aderência das bactérias à fibra (COLOMBATTO et al. 2003). Consequentemente ambos os aditivos estimulariam a microbiota fibrolítica de maneira indireta, elevando desta forma a taxa de digestibilidade ruminal. Entretanto, com base em nosso conhecimento, não há relatos da utilização da combinação de ambos os aditivos sobre o desempenho de vacas leiteiras.

A utilização de enzima fibrolítica tem apresentado resultados positivos sobre a digestibilidade da fibra em ensaios *in vitro* (EUN et al., 2007; BALA et al., 2009; FACCHINI et al., 2012), e *in vivo* (RODE et al., 1999; YANG et al., 1999; PINOS-RODRÍGUEZ et al., 2002; SHEKHAR et al., 2010). Entretanto, Zilio et al. (2018) não observaram efeitos sobre a ingestão e digestibilidade de nutrientes para vacas em lactação suplementadas com enzima fibrolítica.

Da mesma forma, existe inconsistência nos resultados com *Aspergillus oryzae*. Wallace (1994) relata que a suplementação com culturas vivas de *A. oryzae*, bem como *Saccharomyces cerevisiae*, e/ou seus respectivos extratos podem elevar o consumo de matéria seca e, consequentemente, trazer benefícios para o desempenho. Schmidt et al. (2004) observaram um aumento de três vezes a população de zoósporos de *N. frontalis*, demonstrando o potencial de elevar a degradação da fibra, uma vez que estudos demonstraram a intensa atividade celulolíticas destes microrganismos no ambiente ruminal (OYELEKEE OKUSANMI, 2008). Sun et al. (2017) observaram aumento na proteína microbiana e produção total de AGCC, sem efeitos sobre o consumo de matéria seca em vacas leiteiras recebendo culturas de *A. oryzae*. Caton et al. (1993) observaram aumento no consumo de forragens ao suplementar com *A. oryzae*, sem efeitos significativos sobre a DIVMS, AGCC e pH ruminal.

No presente estudo, os tratamentos com fungo e sua combinação com a enzima fibrolítica reduziram o fluxo reticular de FDN e FDNpd, o que pode estar associado à maior taxa de degradação ruminal observada para este tratamento, assim como a maior digestibilidade aparente ruminal, demonstrando o potencial que estes tratamentos em estimular a população de microrganismos fibrolíticos e, consequentemente, a digestibilidade ruminal da fibra. Entretanto, os aditivos não alteraram a digestibilidade ruminal e a total da matéria seca, onde o aumento foi apenas numérico, apresentando tendência de efeito.

Estudos têm demonstrado aumento na digestibilidade aparente total dos nutrientes (BEAUCHEMIN et al., 2000; YANG et al., 2000; GADO et al., 2009; ARRIOLA et al., 2011) ou tendência de aumento (KNOWLTON et al., 2002). Entretanto, Knowlton et al. (2002) e Peters et al. (2010) não observaram efeito na digestibilidade aparente total da matéria seca, o

que pode estar relacionado à potencial ação da enzima em degradar sítios que já seriam degradados pelos microrganismos e não aumentar estes sítios, ou seja, ela aumenta a taxa de degradação e não a sua extensão (BEAUCHEMIN et al., 2003a).

Nesse sentido, vários fatores podem interferir nos resultados obtidos em função da utilização de enzimas fibrolíticas, como método de aplicação e doses, especificidade ao substrato e tipo de complexo enzimático utilizado (MEALE et al., 2014), além de características inerentes à dieta, como o tipo de volumoso (ADESOGAN 2005), ou até mesmo o modelo experimental adotado pode afetar os resultados. Giraldo et al. (2008a) suplementando ovelhas diretamente no rúmen com enzimas fibrolíticas encontram maior digestibilidade da fração insolúvel potencialmente degradável, bem como, aumento na taxa de degradação tanto da matéria seca como da FDN no rúmen. Entretanto, Wallace et al. (2001), os quais suplementaram enzimas diretamente no rúmen, não encontraram diferenças nos resultados de produção de gás, recomendando aplicação prévia nos alimentos para que se obtenha eficiência na utilização das enzimas fibrolíticas. Dessa forma, pelo fato do mecanismo de ação, assim como o efeito dose-resposta, não estar totalmente elucidado, pode justificar a grande variabilidade de resultados encontrados na literatura.

Evidentemente, a utilização de aditivos tem reflexo no padrão fermentativo ruminal. No presente estudo, os aditivos não afetaram significativamente os valores de pH, os quais ficaram dentro de uma faixa adequada, entre 6 e 6,2 (BOWMAN et al., 2003). A redução do pH abaixo de 6,2 prejudica o crescimento e atividade das bactérias fibrolíticas (RUSSELL; WILSON, 1996), afetando negativamente a digestão da fibra, podendo reduzir em cerca de 7 a 22% a degradabilidade da MS e FDN, respectivamente (PLAIZIER et al., 2001). Contudo, esperava-se valores elevados de pH ruminal no presente estudo, uma vez que a inclusão de volumoso foi elevada (relação 60:40). De maneira semelhante, outros trabalhos na literatura não observaram efeito da enzima fibrolítica sobre o pH ruminal (YANG et al., 1999; BEAUCHEMIN et al., 2000; BOWMAN et al., 2003).

Apesar do aumento da concentração de acetato observada no estudo em função dos tratamentos contendo o fungo e sua combinação com a enzima fibrolítica, não houve alterações no pH ruminal. Este aumento no ácido acético está relacionado à ação dos microrganismos fibrolíticos e, conseqüentemente, a digestibilidade da fibra. Estes resultados sugerem que houve melhora no perfil de fermentação da fibra devido ao aumento da hidrólise da parede celular (ROMERO et al., 2015) e conseqüente maior colonização da fibra pelos microrganismos (GIRALDO et al., 2008). Concomitantemente, houve redução da concentração de NH₃ ruminal nestes tratamentos, confirmando a hipótese de maior atividade de bactérias fibrolíticas, uma

vez que estes microrganismos utilizam o N-amoniaco como fonte principal de nitrogênio para seu desenvolvimento (RUSSEL et al., 1996). Giraldo et al. (2008) relataram aumento da concentração de acetato, propionato e AGCC total in vitro em resposta à adição de enzima fibrolítica.

Com relação aos outros AGCC, não foi observada diferença na concentração de propionato em resposta à adição dos aditivos. O ácido propiônico está relacionado com a produção de leite, pelo fato deste AGCC ser precursor de glicose no fígado, através da gliconeogênese. No presente estudo, apesar do aumento numérico do propionato, não houve aumento significativo da concentração de glicose sanguínea, embora tenha sido observado aumento na produção de leite nos animais recebendo os aditivos. Alguns estudos observaram aumento na produção de leite (ADESOGAN et al., 2007; GADO et al., 2009; ARRIOLA et al., 2011; ROMERO et al., 2013), entretanto outros não detectaram nenhum efeito em desempenho (BERNARD et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; CHUNG et al., 2012).

Dessa forma, pode-se inferir que os aditivos, em especial o fungo e sua combinação com a enzima, elevaram a fermentação ruminal da fibra, através do estímulo à população de microrganismos fibrolíticos. Consequentemente, este aumento na população microbiana poderia afetar a produção de proteína microbiana. No presente estudo, foi observado aumento na produção de proteína microbiana em resposta à adição dos aditivos. Yang et al. (1999) observaram maior produção de proteína microbiana associada à maior taxa de desaparecimento da FDN em resposta ao tratamento enzimático, sugerindo que os aditivos possam elevar a solubilidade da FDN, facilitando e elevando a adesão dos microrganismos à fibra, elevando consequentemente a síntese de proteína microbiana (MIRON et al., 1991).

De acordo com Bach et al. (2005), a síntese de proteína microbiana ruminal é dependente da disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen. Segundo Bowman et al. (2002) a inclusão de aditivos, como a enzima fibrolítica, pode elevar o aporte energético no rúmen, podendo afetar positivamente o metabolismo proteico e energético ruminal, elevando consequentemente a síntese de proteína microbiana. Entretanto, Peters et al. (2010) não observaram diferença na síntese de proteína microbiana em resposta à suplementação com enzimas fibrolíticas às dietas de vacas leiteiras.

Nesse sentido, o aumento da síntese de proteína microbiana favoreceu a queda de nitrogênio amoniacal no rúmen, uma vez que os microrganismos utilizaram o NH₃ como fonte de nitrogênio para seu desenvolvimento. Consequentemente, este fato pode estar associado ao maior desaparecimento ruminal de N em função da maior atividade celulolíticas nos animais tratados com *A. oryzae* ou em combinação com a enzima fibrolítica, indica maior eficiência de

uso do nitrogênio. No presente estudo, houve redução da excreção fecal e urinário de N em resposta à utilização dos aditivos, sem efeito significativo sobre a excreção de N pelo leite, resultando em balanço positivo de nitrogênio.

Os resultados de consumo e balanço de nitrogênio obtidos no presente estudo foram semelhantes ao apresentado por Spanghero e Kowalski (1997) que, ao realizarem uma meta-análise, verificaram valores médios de balanço de nitrogênio de $38,8 \pm 52,2$ g/dia, com consumo entre 231 e 784 g de nitrogênio/dia. Cardozo et al. (2002) observaram maior atividade proteolítica no conteúdo ruminal de animais recebendo maior inclusão de volumoso na dieta. Em contrapartida, Cardozo et al. (2000) observaram que em dietas com alta inclusão de amido a proteólise foi menor, mostrando que a composição da microbiota ruminal é influenciado, dentre outros fatores, pelo substrato disponível à fermentação. Dessa forma, levando em consideração a alta inclusão de volumoso na dieta, supõe-se que os aditivos estimularam o crescimento da população de microrganismos fibrolíticos, e aumentaram o potencial de degradação das proteínas no ambiente ruminal, aumentando o pool de nitrogênio para o desenvolvimento da microbiota, consequentemente elevando a síntese de proteína microbiana. Concomitantemente, houve melhora da eficiência de utilização do nitrogênio devido ao maior aporte de aminoácidos chegando no intestino delgado, o que pode ter proporcionado maior retenção de nitrogênio.

7.5. CONCLUSÕES

A suplementação de enzima fibrolítica em conjunto com o *Aspergillus oryzae* apresentou resultados satisfatório sobre a digestibilidade ruminal da fibra, porém sem efeitos significativos sobre a produção de leite e consumo de nutrientes. Os aditivos afetaram significativamente os parâmetros fermentativos, bem como o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana, ficando evidente o potencial que estes produtos apresentam em modular a fermentação ruminal.

7.6. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A. T.; KIM, S. C.; ARRIOLA, K. G.; DEAN, D. B.; STAPLES, C. R. Strategic addition of dietary fibrolytic enzymes for improved. Performance of lactating dairy cows. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 18., 2007, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2007. p. 92-110.

ADESOGAN, A.T., MA, Z.X.; ROMERO, J.J.; ARRIOLA, K.G. Ruminant nutrition symposium: improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**. v.92, p.1317–1330. 2014.

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

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

ALLEN, M. S.; VOELKER, L. J. A. In vivo methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2007, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2007. p. 72-89.

ALLEN, M.S.; MERTENS, D.R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **Journal of Nutrition**, v.118, n.1, p.261-270. 1988.

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

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9–E21, 2005.

BALA, P., MALIK, R. SRINIVAS, B. Effect of fortifying concentrate supplement with fibrolytic enzymes on nutrient utilization, milk yield and composition in lactating goats. **Journal of Animal Science** v.80, p.265-272. 2009.

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

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D. P.; KAMPEN, R. Evaluation of a non-starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 543–553, 2000.

BERNARD, J. K.; CASTRO, J. J.; MULLIS, N. A.; ADESOGAN, A. T.; WEST, J. W.; MORANTES, G. Effect of feeding alfalfa hay or Tifton 85 bermudagrass haylage with or

without a cellulase enzyme on performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5280–5285, 2010.

BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 565–575, 2003.

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

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculums source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

CARDOZO, P.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 265, 2000. Supplement, 1.

CARDOZO, P.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 182, 2002. Supplement, 1.

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

CATON, J. S.; ERICKSON, D. O.; CAREY, D. A.; ULMER, D. L. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site of digestion, *in situ* degradability, and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 779-787, 1993.

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

CHIQUELLE, J. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science** v.75, p.405-415, 1995.

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

CHUNG, Y. H.; ZHOU, M.; HOLTSHAUSEN, L.; ALEXANDER, T. W.; MCALLISTER, T. A.; GUAN, L. L.; OBA, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1419-1427, 2012.

COLOMBATTO D, MORGAVI DP, FURTADO AF, BEAUCHEMIN KA. 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. 2003.

ELWAKEEL, E. A.; TITGEMEYER, E. C.; JOHNSON, B. J.; ARMENDARIZ, C.K.; SHIRLEY. J.E. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5226-5236, 2007.

EUN J S, BEAUCHEMIN K A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, p.298–315. 2007.

FACCHINI, F. D. A.; REIS, V. R. A. ; ROTH, A. P. ; MAGALHAES, K. A. ; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. ; CASAGRANDE, D. R. ; Reis, Ricardo Andrade ; Polizeli, Maria de Lourdes T. M. . Effects of *Aspergillus* spp.exogenous fibrolytic enzymes on in vitro fermentation of tropical forages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.2569–2573. 2012.

FENG, P.; HUNT, C. W.; PRITCHARD, G. T.; JULIEN. W. E. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1349-1357, 1996.

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 ilk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, p. 36-46, 2009.

GIRALDO, L. A.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 306–325, 2008.

GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; RANILLA, M. J.; RAMOS, S.; CARRO, M. D. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1617-1623, 2008.

HARRISON GA, TRICARICO JM. Case study: Effects of na *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on lactational performance in commercial dairy herds. **The Professional Animal Scientist** v.23, p.291–294. 2007.

HIGGINBOTHAM GE, BATH DL, BUTLER LJ. Effect of feeding an *Aspergillus oryzae* extract on milk production and related responses in a commercial dairy herd. **Journal of Dairy Science** v.76, p.1484–1489. 1993.

HIGGINBOTHAM GE, SANTOS JEP, JUCHEM SO, DEPETERS EJ. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* extract on milk production and rumen parameters. **Livestock Production Science** v.86, p.55–59. 2004.

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.

KIM HS, AHN BS, CHUNG SG, MOON YH, HA JK, SEO IJ, et al. Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. **Animal Feed Science and Technology**, v.26, p.23–29. 2006.

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

KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; VOLDEN, H.; BRODERICK, G. A. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. **Journal of Dairy Science**. v.93, p.1138–1147. 2010.

KRUEGER, N.A.; ADESOGAN, A.T.; STAPLES, C.R.; KRUEGER, W.K.; DEANA, D.B.; LITTELL, R.C. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.95–108, 2008.

LATIF, M. R.; ZAHRAN, S. M.; AHMED, M. H.; ZEWEIL, H. S.; SALLAM, S. M. A. Effect of Feeding *Saccharomyces cerevisiae* and/or *Aspergillus oryzae* on Nutrient Utilization

and Rumen Fermentation Characteristics of Sheep. Alex. **Journal of agricultural research**, v.59, n.2, p.121-127, 2014.

LEWIS, G. E.; SANCHEZ, W. K.; HUNT, C. W.; GUY, M. A.; PRITCHARD, G. T.; SWANSON, B. I.; TREACHER, R. J. Effect of Direct-Fed Fibrolytic Enzymes on the Lactational Performance of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 611-617, 1999.

LÓPEZ-AGUIRRE, D; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J; ROJO, R; SÁNCHEZ-DÁVILA, F; LÓPEZ-VILLALOBOS, N; SALEM, ABDEL-FATTAH Z. M; ;VÁZQUEZ-ARMIJO, J F RUÍZ, S; ;JOAQUIN, S In vitro gas production kinetics and degradability of a diet for growing lambs: effect of fibrolytic enzyme products at different dose levels. **Italian Journal of Animal Science**, V.15, N.3, 453–460. 2016

MACHADO, M. G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; BENTO, C. P. B.; MARCONDES, M. I.; ASSUNÇÃO, A. S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, n. 12, p. 132-148, 2016.

MERTENS, DR. REGULATION OF FORAGE INTAKE. IN: FAHEY JUNIOR GC, MOSER LE, MERTENS DR. (Eds.). Forage quality, evaluation and utilization. **American Society of Agronomy**, Crop Science of America, Soil Science of America, Madison, WI. p.450-493. 1994

McALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J.; POPP, J. D.; MIR, Z.; YANKE, L. J.; HRISTOV, A. N.; TREACHER, R. J.; CHENG, K.J. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, p.353–360, 1999.

MEALE, S.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; HRISTOV, A.N.; CHAVES, A.V.; MCALLISTER, T.A. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427–442, 2014.

MENDOZA GD, LOERA-CORRAL O, PLATA-PEREZ F, HERNANDEZ- GARCIA P, RAMIREZ-MELLA M. Considerations on the use of exogenous fibrolytic enzymes to improve forage utilization. **Sci World J**. doi: 10.1155/2014/247437. 2014.

MIRON, J. The hydrolysis of lucerne cell-wall monosaccharide components by monocultures or pair combinations of defined ruminal bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 245–252, 1991.

MORGAVI, D.P.; BEAUCHEMIN, K.A.; NSEREKO, V.L.; RODE, L.M.; IWAASA, A.D.; YANG, W.Z.; MCALLISTER, T.A.; WANG, Y. Synergy between ruminal fibrolytic

enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1310-1321, 2000.

MORGAVI DP, BEAUCHEMIN KA, NSEREKO VL, RODE LM, MCALLISTER TA, WANG Y. Trichoderma enzymes promote Fibrobacter succinogenes S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.84, p.1083–1090. 2004

NEWBOLD, C., FRUMHOLTZ, P., WALLACE, R. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. **The Journal of Agricultural Science**, v.119, n.3, p.423-427. 1992.

NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: Florida Ruminant Nutrition Symposium, 1997, Gainesville. **Proceedings...** University of Florida, Gainesville, January, 16-17, 1997.

NSEREKO VL, BEAUCHEMIN KA, MORGAVI DP, RODE LM, FURTADO AF, MCALLISTER TA, IWAASA AD, YANG WZ, WANG Y. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Canadian Journal of Microbiology**. v.48, p.14–20. 2002.

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.

OYELEKE, S.B.; OKUSANMI, T.A. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. **African Journal of Biotechnology** ,v.7, p.1530-1504, 2008.

PETERS, A.; LEBZIEN, P.; MEYER, U.; BORCHERT, U.; BULANG, M.; FLACHOWSKY, G. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, p. 221–237, 2010.

PINOS-RODRIGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, S. S.; MENDOZA, G. D.; BÁRCENA, R.; COBOS, M. A.; HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA, M. E. Effects of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3016–3020, 2002.

PLAIZIER, J. C., KEUNEN, J.; WALTON, J. P.; DUFFIELD, T.; MCBRIDE, B. W. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ digestion of mixed hay in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 421–423, 2001.

QUEIROZ, O. C. M.; ADESOGAN, A. T.; DANIEL, J. L. P.; ROMERO, J. J.; SHIN, J. H.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P. Effects of adding fibrolytic enzymes to diets containing bermudagrass silage harvested at two maturity stages on the performance of lactating Holstein cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 378, 2011. Supplement, 1. Trabalho apresentado no American Dairy Science Association & American Society of Animal Science Joint Annual Meeting. Proceedings...New Orleans, Louisiana, USA.

REDDISH, M. A.; KUNG JR., L. The effect of feeding a dry enzyme mixture with fibrolytic activity on the performance of lactating cows and digestibility of a diet for sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4724–4729, 2007.

REIS, R.A.; MORAIS, J.A.S.; SIQUEIRA, G.R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In: **II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (II CLANA)**, Palestra técnica, 2006.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.4045–4064. 2005.

RINNE, M.; HUHTANEN, P.; JAAKKOLA, S. Digestive processes of dairy cows fed silages harvested at four stages of grass maturity. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 7, p. 1986–1998, 2002.

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

ROMERO, J. J. **Improving the potency and reliability of exogenous fibrolytic enzymes for enhancing forage utilization by dairy cattle**, 2013. 198 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - Department of Animal Science, University of Florida, Gainesville, 2013.

ROMERO, J. J.; ZARATE, M. A.; ADESOGAN, A. T. Effect of the dose of exogenous fibrolytic enzyme preparations on preingestive fiber hydrolysis, ruminal fermentation, and in vitro digestibility of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 406–417, 2015.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1503–1509, 1996.

SCHMIDT, J.A.; ALBRIGHT, S.; TSAI, K.P. et al. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 422-430, 2004.

SHEKHAR, C.; THAKUR, S. S.; SHELKE, S. K. Effect of exogenous fibrolytic enzymes supplementation on milk production and nutrient utilization in Murrah buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1465–1470, 2010.

SILVA, T. H. **Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação**. [Exogenous fibrolytic enzyme in dairy cows diets]. 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

SJAUNA, L. O., L. BAEVRE, L. JUNKKARINEN, J. PEDERSEN, J. SETÄLÄ. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. Pages 156–157 in 27th Session International Committee of Recording and Productivity of Milk Animal. **Centre for Agricultural Publishing and Documentation**, Paris, France. 1990.

SOSA A., GALIN DO J., TEJIDO M.L., D ÍAZ A., MARTÍNEZ M.E., SARO C., CARRO M.D ., RANILLA M.J. Effects of *Aspergillus oryzae* on *in vitro* ruminal fermentation . In: Ranilla M.J. (ed.), Carro M.D . (ed.), Ben Salem H. (ed.), Moran d-Feh r P. (ed.). **Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context**. Zaragoza: CIHEAM / CSIC / Universidad de León/FAO, 2011 . p. 15-179 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n . 99).

SPANGHERO, M.; KOWALSKI, Z. M. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. **Livestock Production Science**, v. 52, p. 113-122, 1997.

SUN, H.; WU, Y. M.; WANG, Y. M.; LIU, J. X.; MYUNG, K. H. Effects of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid on *in vitro* rumen fermentation and microbial populations between different roughage sources. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.27, n.9, p.1285-1292, 2014.

SUN, H.; WU, Y.; WANG, Y.; WANG, C.; LIU, J. Effects of addition of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxyl-4-(methylthio) butanoic acid on milk performance and rumen fermentation of dairy cows. **Animal Science Journal**. V.88, n.4, p.602-609. 2017.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2766–2774, 2001.

UDÉN, P., COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J.; UDEN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta: Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 31, p.625–632. 1980.

VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243-248, 1990.

WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, L.E. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.1, p.125-129. 1972.

WALLACE, R. J. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, 1994.

WALLACE, R. J.; WALLACE, S. J. A.; MCKAIN, N.; NSEREKO, V. L.; HARTNELL, G. F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1905–1916, 2001.

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.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 391-403, 1999.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

YUAN, J.S, REED, A.; CHEN, F.; STEWART, C.N. JR. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics** 7:85- 97.

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.1–11, 2018.

ZOBELL, D. R.; WIEDMEIER, R.D.; OLSON, K.C.; & TREACHER, R.J. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.279–285, 2000.