UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GLEISON DE SOUZA

Cultivo de fungos basidiomicetos visando aumento na degradabilidade de forrageiras para ruminantes

PIRACICABA

2017

GLEISON DE SOUZA

Cultivo de fungos basidiomicetos visando aumento na degradabilidade de forrageiras para ruminantes

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro

Piracicaba

2017

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Souza, Gleison de
Cultivo de fungos basidiomicetos visando aumento na degradabilidade de forrageiras para ruminantes / Gleison de Souza; orientadora Regina Teresa Rosim Monteiro. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.
129 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ácidos graxos 2. Bagaço 3. Efeito estufa 4. Gases 5. Gramíneas forrageiras 6. Indústria sucro-alcooleira 7. Lignina 8. Nutrição animal 9. Subprodutos para animais 10. Vinhaça I. Título

CDU 577.151 : (591.13 + 599.735)

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus Pais, Nadir Otavio e Maria Angelina, pelo amor e alegrias em toda minha vida.

Aos meus saudosos avôs Nicolino Nardo e Luiza Bergamin Nardo & Luiz de Souza e Amabili P. de Souza (in memoriam), presentes na minha vida e com a certeza de Deus vivo no nosso amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço A DEUS pelo milagre da vida.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, na pessoa da Diretora Profa. Dra. Tsai S. Mui e ao Vice Diretor Prof. Dr. José A. Bendassolli, em especial ao Laboratório de Ecologia Aplicada por proporcionar excelente condição de pesquisa.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e pela reserva técnica (Processo 2012/21961-6) que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

A professora Dra. Regina T. R. Monteiro, pela orientação, amizade e principalmente pelo exemplo de profissional competente que realiza tudo com muito amor e respeito, um exemplo a ser seguido.

Agradeço a Sandra O. Ducatti, por todo o incentivo, carinho, companheirismo durante todo este longo percurso.

Em especial as amigas Gislayne A. Bitencourt, Djanira Negrão e ao amigo João Paulo Apolari, por estes quatro anos juntos dividindo momentos impares de superação, felicidades e proporcionando a formamos um alicerce de amizade que levaremos por toda vida.

Aos colegas da Ecologia Aplicada: Luís Eduardo, Gabriela H. Silva, Gilda M. Silva, Joyce R. P. Santos, Jacqueline Franzol, Natália M. Martins, Vinicius Mello, André Carvalho Patrick N. Silva, Gabriel Teodoro, Cássia e Laura Piacentini Casarin pela ajuda no trabalho, momentos de amizade e convívio compartilhados nestes anos.

Agradeço ao Prof. Adibe Luiz Abdalla e ao Prof. Helder Louvandini pela estrutura física do LANA e pelos ensinamentos para realização deste trabalho, muito obrigado.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio A. Castilho e Everaldo M. Santos, assim como todas colegas de laboratório, Adibe Luiz Abdalla Filho, Alline Mariá Schumann, Samy Emanuelle, Thiago Bompadre, Gabriel Sakita, Patrícia Righetto, Andressa S. Natel, Ana C. Koki S. Issakowicz, Juliano Issakowicz, Linander Campos, Natasha Mantuan, Paulo M. T. Lima, Guilherme Moreira, Érika B. Canova, Dinesh Dhanasekaran, Fernanda Campos, Leticia A. Faria, Nathalia Maciel, Ronaldo Lucas, Tatiane Lissoni, Egon H. Ieda, Carina Nazato, Carolina Jimenez, Tairon Pannunzio, Wilian Costa e Rafael Cesar.

A amiga Alessandra Cássia Romero, Sra. Fatima Gomes Romero e Daniele Romero De Nadai pela amizade, que talvez uma frase resuma "nenhum caminho é longo demais quando uma amiga nos acompanha".

Aos Laboratórios de Biogeoquímica Ambiental e Isótopos Estáveis e na pessoa da Profa. Brigitte J. Feigl, Prof. Carlos C. Cerri e ao Prof. José A. Bendassolli, pelas iniciações cientificas, sendo alicerce para minha pós-graduação.

Ao amigo Dr. Glauco A. Tavares pelos ensinamentos, durante a época de iniciação até os dias de hoje.

As amigas Graziela M. de Moraes e Karine G. Campos pela sincera amizade e ajuda nos momentos essências deste trabalho.

À querida Marília R. G. Henyei, pela amizade, atenção e profissionalismo na realização da normatização das referências bibliográficas, a Renata e Adriana pela amizade.

Aos colegas João Geraldo, Silvana, Gabriel, Silvia, Alexandre e Emílio, Sonia M. C. de Jesus Storer, Maria L. Z. Costa "Lia", Benedita Inês F. P. Rodrigues, Michele Sanches, Renata Maziero, Moysés, Eliete, Lourdes, Merzel, Lieni, Fernando Perencin, Paulo César, Claudio, Luiz, Ademir, Bola, Daki, Douglas, Beco, Ósmio, José Marques, Abacate, Pimenta, Serginho, Juscelino, Israel, Luciana F. Nascimento, Sueli A. Mendes e Denise pela amizade e por todas as contribuições na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação e seus funcionários (Gilson, Raquel, Magali, Alzira, Daiane, Fábio, Mara, Cleide, Marcos e Daniel) por toda a contribuição durante estes anos.

Aos meus familiares Alberto G. Nardo, Antônio Nardo, Vera Lucia, Mariana N. Bertoncello (in memoriam), Nivaldo Bertoncello, Maria do C. Nardo Furlan, Edison R. Furlan, Pedro Libardi, Lurdes S. Libardi, Antônio Danelon (in memoriam), Neuza S. Danelon e aos primos Fabricio Libardi, Viviane B. Dias, Fabio Dias, Arthur Dias, Henrique Bertoncello, Carim Bertoncello, as irmãs Lorena e Luiza Bertoncello, Carolina B.Lemos, Marcelo S. Lemos, Cauã S. Lemos, Marcelo Danelon, Luciana M. Danelon, Vitor M. Danelon e Mauricio Danelon.

Agradeço my mother in law Suzete e father in law Nelson "Japão" (in memoriam), pouco tempo de convivência, deixou saudades entre nós.

Aos amigos Alexandre, Viviane e Gabriel Menuzzo, Irandir, Ana e João Felipe Menegatti, Juciney Sant'Ana, Noedir O. Prado, Rafael e Carolina Camuzzi, agradeço, pois sempre podendo contar com presença de cada um, menos para jogar um futebol.

Aos professores que se disponibilizaram em participar como titular ou suplente da banca, agradeço antecipadamente.

Ao Santuário N. Sra. dos Prazeres, representado pelo Pe. Edivaldo que desde sua vinda nesta estação "Piracicaba", estivemos sintonizados pelas orações, fé e amor.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Meu muito obrigado!

“A coisa mais bela que o homem
pode experimentar é o mistério.
É essa emoção fundamental que está
na raiz de toda ciência e toda arte.”

Albert Einstein

RESUMO

SOUZA, G. **Cultivo de fungos basidiomicetos visando aumento na degradabilidade de forrageiras para ruminantes.** 2017. 129 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

A inoculação de forrageiras com fungos lignocelulolíticos é uma alternativa para melhorar a qualidade destas sem adição de substâncias químicas. Este projeto visa melhorar a degradabilidade de seis forrageiras: *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, *Panicum maximum* cv. Aruana, *Cenchrus ciliares* cv. Buffel, bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada por meio do cultivo de quatro fungos do gênero *Pleurotus*. Outrossim, extrato enzimático, nas concentrações de 2, 4 e 6 mL, produzido pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020 crescido em vinhaça, durante 6º, 12º e 18º dias, foram aplicados às mesmas forrageiras. As avaliações das dietas foram pela técnica de produção de gases, degradabilidade *in vitro* e análise bromatológica do substrato. As atividades das enzimas Lacase, Peroxidase, Manganês Peroxidase, Endoglucanase, Exoglucanase e Xilanase foram determinadas, por um período de 24 dias. Os resultados foram estatisticamente avaliados, utilizando SAS® (Statistical Analysis System Inst., Cary, North Carolina). Os fungos crescidos nas forrageiras, produziram enzimas hidrolíticas e oxidativas durante o processo de fermentação, que atuaram na transformação das forrageiras. A quantidade de proteínas aumentou significativamente na cana-de-açúcar picada e capim Buffel, inoculados com os fungos *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068. A forrageira Aruana foi a que melhor respondeu ao tratamento com fungo, sendo que com *P. sajor-caju*, ao 18º dia de incubação, teve a concentração de acetato 1,24 vezes maior, em relação a amostra controle, e as demais concentrações de AGCC, como propionato e butirato, diminuir e a razão C2:C3 aumentou. A cana-de-açúcar incubada com *P. albidus* CCB 068, ao 18º dia, diminuiu as concentrações de acetato, propionato e butirato e aumentou a razão C2:C3 em 0,86 – 0,58 – 0,71 – 1,48 vezes, respectivamente. O bagaço inoculado ao 24º dia com *P. albidus* provocou aumento nas concentrações de acetato, propionato e butirato e diminuição na razão C2:C3, em 1,14 – 1,75 – 1,32 – 0,64 vezes, respectivamente, e com *P. ostreatus* mostrou o mesmo comportamento. Com os demais tratamentos nenhum efeito significativo foi observado, pelo teste de Tukey a 5%, entretanto ocorre tendência de aumentar a razão C2:C3 com o tratamento com os fungos. Na produção de gases e degradabilidade *in vitro* das forrageiras, utilizando os extratos enzimáticos, ocorreu aumento com a concentração aplicada. Efeitos significativos foram observados para as

forrageiras Brachiaria, Napier e Aruana, já as forrageiras Buffel, bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada não mostraram diferenças significativas, pelo teste de Tukey a 5%. Diferenças nas análises de AGCC não foram significativas, pelo teste de Tukey a 5%, dentro das concentrações ou período de incubação do fungo, nas seis forrageiras, entretanto há uma interação com as atividades das enzimas e pela razão C2:C3 a maior concentração testada de 6 mL, do extrato com o fungo, incubado durante 12º dias, possam ser recomendadas para obtenção de ganho nutricional das dietas. Conclui-se que tanto os fungos inoculados nas forrageiras, como seus extratos enzimáticos foram capazes de modificar a composição bromatológica original das forrageiras. A degradabilidade, ganho nutricional e sustentabilidade ambiental, podem variar substancialmente para os diferentes tipos de forrageiras, espécie de fungo e tempo de incubação. Os resultados obtidos sugerem que os *Pleurotus*, é um fungo apropriado para melhorar o valor nutritivo das forragerias como alimento para ruminates, melhorando a composição bromatoligica, mas também aumentando a degradabilidade.

Palavras-chave: Tratamento biológico. Enzimas lignocelulolíticas. Forrageiras tropicais. Composição química. Fibras. Degradabilidade. Produção de gases.

ABSTRACT

SOUZA, G. **Cultivation of Basidiomycetes to Enhance the Degradability of Forages to Ruminants** 2017. 129 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

The inoculation of forages with lignocellulolytic fungi is an option for improving quality without adding chemical products. This project aims to improve the degradability of six forages: *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Pennisetum purpureum* Schum. Cv. Napier, *Panicum maximum* cv. Aruana, *Cenchrus ciliares* cv. Buffel, sugarcane bagasse and chopped sugarcane by cultivating four fungi of the genus *Pleurotus*. In addition, enzymatic extract, at concentrations of 2, 4 and 6 mL, produced by *P. sajor-caju* CCB 020, developed in vinasse, during 6, 12 and 18 days were applied to the same forages. The evaluations of the diets were by in vitro technique of gas production and bromatological analysis of the substrate. The activities of the enzymes Lacase, Peroxidase, Manganese Peroxidase, Endoglucanase, Exoglucanase and Xylanase were determined, for a period of 24 days. The results were statistically evaluated by SAS® analysis (Statistical Analysis System Inst., Cary, North Carolina). The fungi grown in the forages, produced hydrolytic and oxidative enzymes during the fermentation process that worked in forage transformation. The amount of proteins increased significantly in the chopped sugarcane and Buffel, inoculated with *P. ostreatus* and *P. albidus* CCB 068 fungi. The Aruana grass was the one that responded better to fungi treatments. With *P. sajor-caju* at the 18th day of incubation, the concentration of acetate was 1.24 times higher than the control sample, and the concentrations of other short chain fatty acids (SCFA), such as propionate and butyrate, tended to decrease and the C2:C3 ratio increased. Sugarcane incubated with *P. albidus* CCB068 at day 18 decreased acetate, propionate and butyrate concentrations and increased the C2:C3 ratio in 0.86, 0.58, and 0.71 - 1.48 fold, respectively. The bagasse inoculated at the 24th day with *P. albidus* caused an increase in acetate, propionate and butyrate concentrations and a decrease in the C2:C3 ratio in 1.14, 1.75, and 1.32 - 0.64 fold, respectively, and with *P. ostreatus* showed the same behavior. With the other treatments, no significant effect was observed by the Tukey test. However, there is a tendency to increase the C2:C3 ratio with the fungus treatment. In the production of gases and in vitro degradability of forages, using the enzymatic extracts, an increase with the applied concentrations occurred. Significant effects were observed for the Brachiaria forage at 5%, while forage Buffel, sugarcane bagasse and chopped sugarcane did not show significant

differences by Tukey's test at 5%. Differences in the SCFA analyzes were not significant, by the Tukey's test at 5%, within the concentrations or incubation period of the fungus, in the six forages studied. However there is an interaction with the activities of the enzymes and the C2:C3, the highest concentration tested (6 mL) of the fungi extracts, incubated for 12 days, can be recommended to obtain increase in nutritional value of the diets. It is concluded that both the fungi inoculated on the forage and their enzymatic extracts were able to modify the original bromatological composition of the forage. The degradability, increase of nutritional value and environmental sustainability, can vary substantially for different types of forages, species of fungus and incubation time. The results suggest that *Pleurotus* is an appropriate fungus for improving the nutritive value of forage crops as feed for ruminates, improving the bromatoligic composition, but also enhancing the degradability.

Keywords: biological treatment. lignocellulolytic enzymes. tropical forages. chemical composition. fiber. degradability. gas production

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
CH_4	Metano
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
E.C.	Enzyme Committee (Classificação bioquímica de enzimas)
MnP	Manganês Peroxidase ou Peroxidase Dependente do Manganês
UI	Unidade Internacional
ϕ	Diâmetro
FES	Fermentação em Estado Sólidos
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
MS	Matéria Seca
MO	Matéria Orgânica
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDA	Fibra em Detergente Ácido
Lig	Lignina
C2	Ácido Acético
C3	Ácido Propiônico
C2:C3	Razão Acetato:Propionato
CF	Carboidratos Fibrosos
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
ATP	Adenosina Trifosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 19
2. OBJETIVOS..... 21
2.1. Objetivos Gerais..... 21
2.2. Objetivos Específicos..... 21
3.REVISÃO DE LITERATURA..... 22
3.1. Biomassa lignocelulósica..... 22
3.1.1. Celulose..... 23
3.1.2. Hemicelulose..... 24
3.1.3. Lignina..... 24
3.2. Resíduos e subprodutos agroindustriais..... 25
3.2.1. Vinhaça..... 25
3.2.2. Bagaço de cana-de-açucar..... 26
3.3. Fungos lignocelulolíticos..... 28
3.3.1. Fungos de degradação branda..... 29
3.3.2. Fungos de degradação marrom..... 29
3.3.3. Fungos de degradação branca..... 30
3.4. Enzimas lignocelulolíticas..... 31
3.4.1. Lacase (E.C. 1.10.3.2)..... 31
3.4.2. Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)..... 32
3.4.3. Manganês Peroxidase (E.C. 1.11.1.13) 32
3.4.4. Endoglucanase (E.C. 3.2.1.4)..... 32
3.4.5. Exoglucanase (E.C. 3.2.1.91)..... 33
3.4.6. Xilanase (E.C. 3.2.1.8)..... 33
3.5. Forrageiras tropicais..... 34
3.6. Ovinocultura..... 35
3.7. Produção de gases *in vitro*..... 39
3.8. Relação ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano (CH4)..... 39
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 41
4.1. Microrganismos..... 41
4.2. Manutenção das culturas dos fungos em grãos de trigo..... 41
4.3. Forrageiras..... 41

4.4. Vinhaça, bagaço e cana-de-açúcar..... 42
4.4.1. Caracterização da vinhaça..... 42
4.4.2. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar..... 42
4.5. Produção de enzimas em vinhaça *in natura*..... 42
4.6. Produção de enzimas em forrageiras..... 43
4.6.1. Substratos para a cultivo de fungo no estado solido..... 43
4.7. Determinação das atividades enzimáticas ligninolíticas..... 43
4.7.1. Preparo dos Reagentes..... 43
4.7.2. Determinação da atividade enzimática da Lacase (E.C. 1.10.3.2)..... 44
4.7.3. Determinação da atividade enzimática da Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)..... 44
4.7.4. Determinação da atividade enzimática da MnP (E.C. 1.11.1.13)..... 45
4.7.5. Cálculo das atividades enzimática..... 45
4.8. Determinação das atividades enzimáticas Celulolíticas e Xilanolíticas..... 46
4.8.1. Determinação das atividades enzimáticas de Endoglucanase, (E.C. 3.2.1.4) e Exoglucanase (E.C. 3.2.1.91) 46
4.8.2.Determinação da atividade enzimática da Xilanase (E.C. 3.2.1.8)..... 46
4.9. Avaliação bromatológica das forrageiras tratadas com os fungos..... 46
4.9.1. Determinação da matéria seca (MS)..... 46
4.9.1.1. Calculo (MS)..... 47
4.9.2. Determinação da matéria orgânica (MO)..... 47
4.9.3. Determinação da fibra em detergente neutro (FDN)..... 47
4.9.4. Determinação da fibra em detergente ácido (FDA)..... 47
4.9.5. Determinação da lignina..... 47
4.9.6. Determinação da proteína bruta (PB)..... 48
4.9.6.1. Digestão da amostra..... 48
4.9.6.2. Destilação da amostra..... 48
4.9.6.3. Titulação da amostra..... 48
4.9.6.3.1. Calculo (N)..... 49
4.10. Ensaio in vitro de produção de gases..... 49
4.10.1. Produção de metano (CH_4)..... 51
4.11. Características da fermentação e da degradação ruminal..... 52
4.12. Avaliação da dose enzimática na digestibilidade in vitro das fibras vegetais pela produção de gases..... 52

4.13. Avaliação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)..... 53

4.14. Análise Estatística..... 53

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 54

5.1. Produção de enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP) produzidas por fungos crescidos nas forrageiras..... 54

5.2. Produção de enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP) por *P. sajor-caju* CCB 020 crescido em vinhaça..... 63

5.3. Atividade enzimática de celulases e xilanases produzidas por *P. sajor-caju* CCB 020 crescido em vinhaça..... 64

5.4. Análise físico-química da vinhaça *in natura*..... 66

5.5. Caracterização do bagaço cana-de-açúcar..... 68

5.6. Caracterização bromatológica das forrageiras..... 70

5.7. Avaliação bromatológica das fibras vegetais das forrageiras tratadas com os fungos..... 71

5.8. Avaliação da produção de gases e degradabilidade *in vitro* pós tratamento biológico..... 83

5.9. Produção de ácidos graxos de cadeia curta, das forrageiras submetidas ao tratamento biológico com cultivo de quatro espécies de fungos..... 93

5.10. Avaliação da produção de gases e degradabilidade in vitro com adição de enzimas..... 99

5.11. Produção de ácidos graxos de cadeia curta com aplicação de enzimas..... 109

6. CONCLUSÕES..... 113

REFERÊNCIAS..... 115

1. INTRODUÇÃO

Cogumelos são apreciados como alimento, pelo seu sabor, valor econômico e medicinal, no mundo todo, desde a antiguidade. Cerca de 300 espécies de cogumelos são comestíveis, entretanto cerca de dez são importantes comercialmente (BARNEY, 2009). Possuem composição química atraente sob o ponto de vista nutricional, com cerca de 30% de proteínas, sais minerais, vitaminas do complexo B, fibras, baixo teor de gorduras e carboidratos, com valor calórico entre 250 a 350 cal kg^{-1} (LABORDE, 1995; SÁNCHEZ, 2004). Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são o segundo mais cultivados, depois de *Agaricus bisporus* (SÁNCHEZ, 2004), são do grupo dos basidiomicetos conhecidos como da podridão-branca, os quais apresentam um sistema enzimático ligninolítico capaz de colonizar e degradar vários substratos, inclusive são utilizados em processos de biorremediação de substâncias tóxicas poluentes (FERREIRA et al., 2010; GASSARA et al., 2010).

As forrageiras apresentam alta concentração de carboidratos estruturais e baixos níveis de proteína, bem como alto teor de lignina e tecidos lignificados. Estas características acarretam baixa digestibilidade da matéria seca e consumo suficiente apenas para mantença dos animais, dependendo do estado de amadurecimento da planta no momento da colheita e do processo de fenação (REIS; GARCIA; SILVA, 1990). A lignina é resistente à degradação química, não sendo digerida pelas bactérias do rúmen; integrando complexas associações com a celulose e a hemicelulose, reduzindo a digestibilidade das fibras (VAN SOEST, 1994). Segundo Souza e Santos (2004) a digestibilidade de materiais lignocelulósicos pode ser melhorada submetendo-os a tratamentos físicos, químicos ou biológicos.

Devido à praticidade do uso de enzimas na transformação de produtos, o desenvolvimento de tecnologias dos processos enzimáticos, sua utilização estão disponíveis no mercado em diferentes graus de pureza e apresentam as mais variadas aplicações e estão presentes nos mais diversos setores da indústria, tais como: detergentes e polpação, celulose e têxteis, farmacêutica, alimentos e rações (BON et al., 2008).

Como uma tecnologia voltada para aplicação na indústria de ração, as enzimas podem ser empregadas visando melhorias na qualidade e na digestibilidade dos alimentos reduzindo os efeitos antinutricionais de substâncias contidos nos alimentos tais como: taninos, alcalóides, alguns inibidores de amilase e outras substâncias tóxicas. Também podem minimizar a geração de subprodutos e resíduos. Na nutrição de ruminantes o papel das enzimas é de potencializar a utilização dos alimentos fibrosos, aumentando sua digestibilidade e aproveitamento da fração

de carboidratos, assim o alimento será melhor aproveitado, fornecendo energia e aumentando a eficiência do processo de fermentação ruminal (SCHMIDT et al., 2003a).

A biomassa vegetal é constituída de células com parede que são formadas durante a fotossíntese. O citoplasma das células vegetais é prontamente digerido pelos ruminantes, entretanto a parede celular é constituída de material lignocelulósico, ou seja, de celulose, hemicelulose e lignina de difícil digestão. As paredes celulares das plantas superiores possuem esses polímeros fortemente interligados e quimicamente unidos por forças não covalentes e por ligações covalentes cruzadas (SÁNCHEZ, 2009).

Os fungos filamentos são considerados melhor adaptados ao processo de degradação das fibras ligninocelulósicas porque têm facilidade de acesso ao substrato, sendo que as hifas do micélio penetram mais facilmente, nos tecidos vegetais melhor do que bactérias e actinomicetos e dessa forma, têm acesso ao conteúdo celular indisponível para outros microrganismos do mesmo ambiente.

Dessa forma, a pesquisa da produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal, a partir de basidiomicetos, em resíduos agroindustriais, para utilização em dietas de ruminantes pode ser um processo vantajoso. Primeiro, porque pode vir melhorar a degradabilidade da forrageira consumida ou transformar o substrato lignocelulósico em alimento de alta qualidade para ruminantes e segundo, converter resíduos em produtos de maior valor agregado (EL-NASSER; HELMY; EL-GAMMAL, 1997).

Neste contexto, as forrageiras e os subprodutos agroindustriais, tais como: *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, *Panicum maximum* cv. Aruana, cana-de-açúcar picada e bagaço de cana-de-açúcar podem ser aprimorados com tratamentos biológicos e oferecer excelente opção como alimentação alternativa para os ruminantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi de aumentar a degradabilidade das frações fibrosas das forrageiras: *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, *Panicum maximum* cv. Aruana, bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada, por meio de enzimas lignocelulolíticas produzidas por fungos do gênero *Pleurotus*, crescidos nas forrageiras;

Em uma segunda etapa, o fungo *P. sajor caju* foi selecionado, a partir da sua eficiência na produção de enzimas, para ser cultivado em meio submerso, utilizando a vinhaça. As enzimas produzidas foram analisadas quanto a atividade enzimáticas e para verificar a sua utilização na transformação das forrageiras produzindo possíveis mudanças na produção de gases e degradabilidade *in vitro e* AGCC.

2.2. Objetivos Específicos

Para alcançar os objetivos foram realizados os seguintes experimentos:

- avaliação bromatológica das forrageiras tratadas ou não-tratadas com fungos;
- avaliação da produção de gases e degradabilidade *in vitro* pós tratamento biológico com cultivo das quatro espécies de fungos;
- avaliação de ácidos graxos de cadeia curta, das forrageiras submetidas ao tratamento biológico com cultivo das quatro espécies de fungos;
- avaliação da produção de gases e degradabilidade *in vitro* com adição de enzimas produzida pelo *P. sajor-caju* em vinhaça;
- avaliação de ácidos graxos de cadeia curta, das forrageiras com adição de enzimas produzida pelo *P. sajor-caju* em vinhaça.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biomassa lignocelulósica

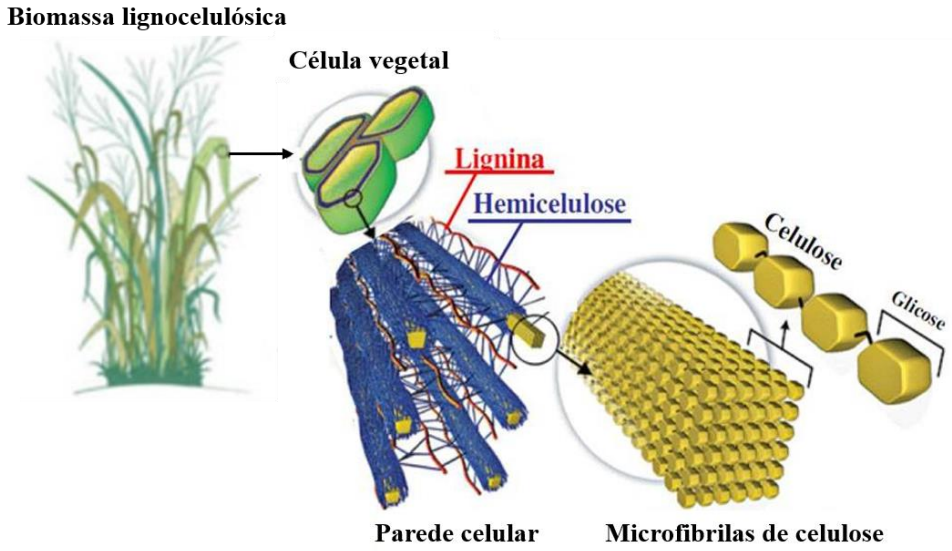
O aumento da demanda energética e fontes renováveis de energia pelo mundo têm atraído a atenção de todos. Motivo pelo qual, os materiais de origem lignocelulolíticos provenientes da agricultura como o bagaço de cana-de-açúcar, vinhaça, palha, madeira e culturas de grãos, têm sido aproveitados visando à utilização nos processos para renovação energética.

A potência outorgada pela Agencia Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) de julho de 2016 informa que na matriz elétrica do Brasil indica que a biomassa é responsável por 8,83% do total nacional, o equivalente a 14.019.781 kW. Das fontes de biomassa o bagaço da cana-de-açúcar representa 78,2% do total com 11.008.691 kW.

Segundo a União da Industria de cana-de-açúcar (UNICA, 2016), indica uma moagem de 590,00 milhões de toneladas na safra de 2015/2016, sendo produzido, aproximadamente, 27,3 bilhões de litros de etanol, alta de 4,33% no comparativo da safra anterior.

A biomassa lignocelulósica é essencialmente constituído por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). A parede celular das plantas são compostas por diferentes camadas, que diferem uma das outras em respeito à estrutura e a composição química. A celulose forma um esqueleto que é formado por fibras de estruturas (hemicelulose) e envoltórias (lignina); essas fibras estão fortemente associadas e ligadas covalentemente (FENGEL; WEGENER, 1989; TAIZ; ZEIGER, 2004; CANILHA et al., 2010).

Figura 1 – Estrutura da biomassa lignocelulósica

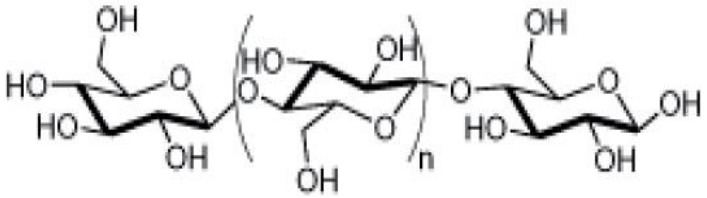


Fonte: Ritter (2008).

3.1.1. Celulose

A celulose é um polímero linear de unidades de D-glicose unidas entre si através de ligação β-1,4 com grau de polimerização que pode variar de 2.000 a 25.000 (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). De uma forma mais detalhada, as cadeias de celulose são mantidas por inúmeras ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares as quais são responsáveis pela formação de microfibrilas rígidas, insolúveis e cristalinas, podendo ser observada na Figura 2. Os compostos celulósicos são estruturalmente heterogêneos e possuem regiões tanto amorfas quanto cristalinas em sua cadeia (WYMAN, 2003). A cristalinidade da celulose está inteiramente relacionada com o elevado número de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose.

Figura 2 – Estrutura química parcial da celulose

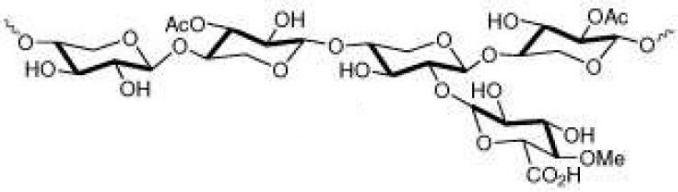


Fonte: Ferreira e Rocha (2009).

3.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico, (Figura 3). Porém, sua natureza química varia de acordo com tipo de tecido vegetal e espécie da planta. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 3 – Estrutura química parcial da hemicelulose

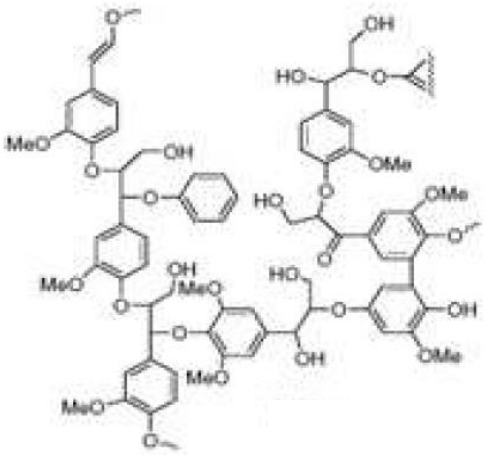


Fonte: Ferreira e Rocha (2009).

3.1.3. Lignina

Já lignina é um polímero vegetal derivado dos compostos fenólicos álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico (Figura 4). A lignina, juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular (FERRAZ, 2001).

Figura 4 – Estrutura química parcial da lignina



Fonte: Ferreira e Rocha (2009).

Segundo Vitti (1988), uma variedade de fungos e bactérias conseguem degradar o material lignocelulósico usando enzimas hidrolíticas e oxidativas. A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas formando açúcares que são posteriormente convertidos quimicamente ou por microrganismos, em etanol ou butanol e ácidos orgânicos (WYMAN, 2003).

Em adição, dois grupos de enzimas são responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês peroxidases e lignina peroxidase, atuam na degradação da lignina e destoxificam o meio de crescimento alterando os metabolismo gerados. A degradação e/ou biotransformação da lignina permitem que as enzimas hidrolíticas, como a celulose e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para a formação das frutificações (KAMIDA et al., 2005).

3.2. Resíduos e subprodutos agroindustriais

3.2.1. Vinhaça

A vinhaça é um resíduo gerado na produção do etanol, aproximadamente de oito a 18 litros de vinhaça é obtido por 1 litro de álcool produzido e sua composição varia de acordo com o material de origem e dos equipamentos utilizados no processo de obtenção do etanol (KUMAR et al., 1998; WADT, 2008).

Anterior ao advento do Proálcool em 1975, a vinhaça era lançada como efluente em rios e poluindo as águas e lençóis freáticos de alguns munícipios. Após três anos, normas e legislações estadual e federal foram aprimoradas a fim de minimizar o impacto do lançamento da vinhaça em corpos de águas, com alto potencial DBO e DQO. Com o conhecimento de sua composição mineral, nos dias atuais a vinhaça é aplicada ao solo como fertilizante organomineral ou em fertirrigação.

Em 2016 foram produzidos 28,2 milhões m^3 ano^{-1} de etanol (UNICA, 2016) e consequentemente mais de 280 bilhões de litros de vinhaça resultante da destilação do vinho obtido do processo de fermentação do caldo de cana. O volume sugere alternativas na melhora do processo fermentativo e outros tipos de utilidade além da adubação.

Uma maneira de reaproveitamento da vinhaça que é submetida ao processo de biodegradação e a sua utilização no reuso de água para os processos de lavagem da cana, irrigação de cultura e outras atividades intrínsecas ao processo industrial, bem como para a produção de metabolitos de interesse comercial. Por outro lado, reduz-se a contaminação de

solos e corpos hídricos principalmente pelo seu armazenamento em zonas de sacrifício em regiões que apresentam lençol freático próximo a superfície (FREIRE; CORTEZ, 2000).

Ferreira et al. (2011) e Souza (2012), mostraram que a vinhaça serve de meio de cultura para fungos, com aumento da produção de enzimas ligninolíticas, sendo a vinhaça transformada em uma possível água de reuso.

3.2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil na década de 30 e sempre teve importância destacada na economia brasileira (CONAB, 2015). A partir do programa Proálcool, a cultura da cana-de-açúcar recebeu atenção especial, avançando em tecnologias e lançamento de variedades com grande potencial de produção de biomassa e açúcar, observando-se difusão desta cultura para regiões tradicionais na produção de grãos e pecuária, viabilizando sua utilização como forrageira na alimentação de ruminantes. De forma geral, o calendário de colheita da cana-de-açúcar coincide com o período de escassez de forrageiras no Brasil, o que beneficia sua utilização para a alimentação animal, bem como de seus subprodutos.

O Brasil não é só o maior produtor de cana-de-açúcar, seguido por Índia e China, mas também o maior produtor de açúcar e etanol de cana-de-açúcar. A produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2015/2016 obteve, aproximadamente, 590 milhões de toneladas (UNICA, 2016). Deste total, estima-se que 10 % seja destinada diretamente para a alimentação animal (LANDELL et al., 2002), o que representa aproximadamente 59 milhões de toneladas de massa verde. No entanto, no que tange a alimentação de ruminantes, deve-se considerar também a possibilidade de utilização dos subprodutos provenientes do processamento da cana-de-açúcar.

O bagaço *in natura* é obtido após a moagem da cana-de-açúcar e extração dos açúcares, tendo como resultado um resíduo rico em parede celular com reduzida digestibilidade, proteína bruta, carboidratos de reserva e energia (Tabela 1), verifica-se que o bagaço *in natura* não apresenta potencial nutritivo para ser utilizado em grandes proporções na dieta de ruminantes quando se visa desempenho animal de moderado a alto. O baixo valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar pode ser atribuído à composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar, diferenças nutricionais entre as variedades de cana-de-açúcar, condições climáticas, manejo e condições de cultivo, idade e número de cortes da cana-de-açúcar, e com as etapas que envolvem o processamento da cana-de-açúcar junto à indústria.

Tabela 1 – Composição nutricional do bagaço *in natura* obtido pelo método convencional

Autores	**Características nutricionais, % da matéria seca**					
	MS	MO	PB	FDN	FDA	Lig
Carvalho et al. (2006)	40,1	–	2,3	59,0	38,3	7,3
Carvalho et al. (2009)	41,7	–	2,4	63,3	54,8	6,5
Ezequiel et al. (2006)	91,9	97,3	1,2	90,5	64,4	–
Manzano et al. (2000)	42,0	–	0,8	88,3	54,4	12,6
Rodrigues e Peixoto (1993)	15,6	–	2,6	75,6	52,9	8,5
Pires et al. (2004)	50,0	–	1,8	94,3	62,7	16,5
Pires et al. (2006)	58,8	–	–	97,4	81,1	15,5
Valadares Filho et al. (2006)	48,2	92,6	1,8	89,1	61,2	13,4

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; Lig = lignina. Fonte: Missio (2016).

O bagaço de cana-de-açúcar pode ser definido como fonte de fibra íntegra, já que, de forma geral, é composto basicamente por componentes da parede celular. Segundo Karp et al. (2013) o bagaço de cana de açúcar apresenta em torno de 32 – 44 % de celulose, 27 – 32% de hemicelulose e 19 – 24% de lignina. Na prática, esta característica se torna importante para formulação de dietas com elevadas proporções de concentrado. O grande mérito da utilização do bagaço *in natura* da cana-de-açúcar neste tipo de dieta é incentivar a atividade de ruminação (MENDES et al., 2010) e, por consequência, manter condições favoráveis do ambiente ruminal para digestão dos alimentos (BULLE et al., 2002).

Levando em consideração as características nutricionais do bagaço de cana-de-açúcar, deve-se ficar claro que sua utilização não deve ser encarada como opção para substituição integral de volumosos tradicionais como a silagem de milho ou sorgo. A inclusão deste subproduto em dietas para ruminantes deve ser encarada como alternativa para redução de custos, através da substituição parcial destes volumosos em dietas com baixas proporções de concentrado e/ou como fonte de fibra de baixo custo em dietas com elevados teores de grãos para o período de terminação. A inviabilidade do uso do bagaço *in natura* da cana-de-açúcar em elevadas proporções em dietas para ruminantes ocorre em razão de seu alto teor em fibra, baixo teor de proteína (inferior a 2 % na matéria seca) e alto teor de lignina, que determinam baixa digestibilidade (25 a 35 %), associados a outros fatores não menos importantes como a baixa densidade e os baixos teores de minerais, que levam a redução do consumo e desempenho animal (TORRES et al., 2003; SOARES et al., 2015).

Desta maneira várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de melhorar a utilização do bagaço de cana-de-açúcar, de outros subprodutos vegetais, e aplicações de enzimas lignocelulolíticas para utilização na nutrição animal (PIRES et al., 2006; GERON et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

3.3. Fungos lignocelulolíticos

Espécies de *Pleurotus* são relatadas como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulases, ß-glicosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (PALMIERI et al., 2000; QINNGHE et al., 2003).

Os fungos formadores de cogumelos comestíveis formam um grupo altamente degradativo que atuam sobre constituintes de resíduos ligninocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (SHISHIDO, 1992).

Atualmente, os maiores usos da celulose concentram-se nas polpas e indústrias de papéis e celuloses, em meios tecnológicos de alimentação, além de terem enorme potencial para a geração de energia como o da produção de etanol. Os fungos do gênero *Pleurotus* realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração de diversas enzimas lignocelulolíticas, formando um grupo altamente degradativo, que atuam sobre os constituintes maiores de resíduos ligninocelulósicos. Estas enzimas possuem grande valor para o mercado biotecnológico, devido á sua aplicação direta nos processos de biopolpação como também para a indústria de alimentos e de produção de etanol (MENEZES, 2007).

Os fungos lignolíticos, capazes de colonizar diferentes resíduos e aumentar a digestibilidade dos substratos são classificados em três principais grupos: fungos da podridão branda, fungos da podridão marrom e fungos da podridão branca. Esses fungos degradadores pertencem a taxonomia dos Basidiomycotina (SZKLARZ et al., 1989; MELO; AZEVEDO, 2008; MISSIO, 2016).

Fungos de podridão marrom atacam principalmente a celulose, enquanto os de podridão branca atacam a celulose e a lignina. Sendo os de podridão branca os basidiomicetos mais eficazes para pré-tratamento de material lignocelulósicos (FAN; GHARPURAY; LEE, 1987).

O fungo *P. sajor-caju* CCB 020, possui propriedades nutricionais e terapêuticas, podem ser cultivados em resíduos agrícolas, entre eles o bagaço de cana-de-açúcar (DIAS et al., 2003). Estes fungos secretam exoenzimas durante seu desenvolvimento degradando compostos para

obtenção de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes necessário ao seu crescimento, incluindo a glicose, resultante da degradação da celulose pelas enzimas lignocelulolíticas excretadas pelo fungo (DONINI et al., 2005).

3.3.1. Fungos de degradação branda

Pertencente à classe Ascomicetos, que decompõem eficientemente a celulose, mas degradam a lignina lenta e incompletamente. Frequentemente encontra-se este ataque em lugares úmidos, contato com solo ou diretamente com água, exemplo as madeira dos porões, sótão, postes de matéria, entre outros. Os gêneros que provocam este tipo de degradação são os *Chaetomium* e os *Cephalosporium* (MERINO, 1998).

3.3.2. Fungos de degradação marrom

Os fungos de degradação marrom promovem a degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, sem alterar a lignina (COWLING, 1961). Esses fungos representam apenas 6% da classe Basidiomycotina degradadores de madeira (DURÁN; ESPOSITO, 2008). Esses fungos realizam modificações na lignina, resultando em decréscimo dos grupos metioxilas, fazendo com que os fenóis aumentem significativamente, alterando a lignina para uma biodegradação subsequente. Acredita-se que a ação de glicoproteínas contendo ferro participe na modificação da lignina por via da produção de radicais hidroxilas (MELO; AZEVEDO, 2008).

De acordo com Lee e Moon (2003) e Melo e Azevedo (2008), as células das paredes da madeira são atacadas por esses fungos formando poros e erosões, devido à quebra das microfibrilas da celulose. Devido a essa ação, as hifas dos fungos de degradação marrom pode se dividir em duas categorias: a que degrada os componentes da parede celular, e a que somente modifica a lignina enquanto degrada a celulose e/ou hemicelulose.

3.3.3. Fungos de degradação branca

Os basidiomicetos, responsáveis pela degradação branca, degradam a lignina presente na parede celular, sem afetar muito o conteúdo de celulose e hemicelulose de alimentos lignocelulósicos. Estes fungos degradam polissacarídeos a partir de enzimas hidrolíticas como as celulases e xilanases, e a lignina por enzimas ligninolíticas oxidativas, tais como: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), peroxidases e lacase (KARP et al., 2013; MAHESH; MOLHINI, 2013). Os fungos do gênero *Pleurotus* produzem MnP, peroxidases e lacase, mas não produz LiP (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002). Recentemente análises mais enfáticas estão sendo na MnP, por que essa enzima é produzida pela maioria dos fungos de degradação branca.

A degradação seletiva de lignina pelos fungos da podridão branca ocorre durante a fase inicial da colonização, seguido por um estádio de frutificação em que polissacárideos são degradados. Durante o crescimento dos fungos, o nitrogênio da biomassa lignocelulósica é incorporado nas proteínas fúngicas, que juntamente com a degradação de outros nutrientes, causam um enriquecimento de nitrogênio do resíduo tratado, e assim, uma elevação do conteúdo de proteína bruta pode ser encontrada. Os tratamentos biológicos, no entanto, levam a inevitáveis perdas de matéria orgânica, o que implica na necessidade de aumento da digestibilidade da matéria orgânica para compensar estas perdas (MAHESH; MOLHINI, 2013). O período de tratamento, neste sentido, segundo Owen, Smith e Makkar (2012), deve ser entre 6-8 dias a fim de reduzir perdas de massa seca. Entretanto, o elevado período de tratamento, segundo Karp et al. (2013), é uma das principais desvantagens da deslignificação pelo tratamento biológico.

Quanto à utilização para a alimentação de ruminantes, grande parte das pesquisas com animais alimentados com alimentos fibrosos tratados com fungos relataram resposta positiva em termos de utilização de nutrientes, balanço de nitrogênio e ganho de peso corporal, embora estas respostas não sejam compatíveis com todos os tipos de fungos de podridão branca (MAHESH; MOLHINI, 2013). A título de exemplo, Mahrous e El-Shafie, Abdel-Khalek (2011) avaliaram o tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com fungos *Trichoderma viride* sobre a composição nutricional dos alimentos e dietas, bem como sobre o desempenho de cordeiros. Estes autores verificaram que o tratamento biológico elevou o teor de proteína bruta e reduziu o teor de fibra bruta do bagaço tratado. Segundo estes pesquisadores a substituição do concentrado por até 50 % de bagaço tratado com fungos, poderia, apesar dos menores coeficientes de digestibilidade e do desempenho animal, apresentar maior lucro em razão do

menor custo com alimentação nas dietas com bagaço tratado. Estes pesquisadores chamaram atenção também para a ausência de efeitos adversos para a saúde dos animais. No entanto, segundo Mahesh e Molhini (2013), embora ocorra melhoria do valor nutricional dos alimentos fibrosos tratados biologicamente, muitos processos não são econômicos e ainda não foram adaptados às condições de campo. Dessa forma, para a consolidação desta tecnologia é importante que as pesquisas busquem isolar e identificar novos fungos lignolíticos na natureza. É importante também o desenvolvimento de biotecnologias para manipulação genética de fungos, de forma que se possam produzir fungos estritamente lignolíticos, ou seja, que não degradem nenhum hidrato de carbono da parede celular (MAHESH; MOLHINI, 2013).

3.4. Enzimas lignocelulolíticas

3.4.1. Lacase (E.C. 1.10.3.2)

As lacases são polifenóis oxidantes produzidos por fungos, na grande maioria fungos basidiomicetos e por bactérias, algas e plantas, numa menor proporção, suas massas moleculares estão entre 60 – 100 kDa. As lacases catalisam oxidações por extrato de um elétron (e^-) de substratos fenólicos gerando radicais que, de acordo com as condições do meio, se envolvem em reações não catalíticas que resultam em polimerizações, oxidações, desmetilações e quebras alquil-arílicas. A habilidade da lacase de quebrar substratos fenólicos pode ter surgido como um mecanismo de defesa contra moléculas aromáticas altamente reativas, ocasionando a polimerização destas moléculas, elas se tornam menos reativas, consequentemente, produzem menos radicais de oxigênio e diminuem o estresse oxidativo nos organismos (LANG; ELLER; ZADRAZIL, 1997; GIARDINA et al., 1999; DURÁN et al., 2002; AZEVEDO, 2004).

A atividade da lacase em cultivos de fungos pode ser aumentada com a adição de diferentes compostos no meio e também diferentes espécies de fungos produtores de lacase secretam diferentes formas de lacase devido a suplementação de compostos aromáticos, como toluidina, ácidos vanílico, ácido *p*-hidrobenzoico e anilina (FÄHREUS, 1962).

3.4.2. Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)

As peroxidases são um grupo de enzimas oxidoredutases, capazes de fragmentar uma variedade de substratos, que catalisam a redução do peróxido (H_2O_2) e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (NAKAYAMA; AMACHI, 1999; IKEHATA; BUCHANAN; SMITH, 2004).

São enzimas extracelulares dependentes de H_2O_2 para atuarem sobre a lignina, desempenhando importantes papel durante a degradação do substrato (POMPEU, 2010).

As mesmas possuem como grupo prostético, uma protoporfirina que contém Fe^{+3}. No primeiro estádio da catálise, o Fe^{+3} sofre oxidação pelo H_2O_2, originando um intermediário instável (composto I) e a uma molécula de água (H_2O) por sofrer redução do H_2O_2. Na etapa seguinte, o composto I oxida e substrato, dando origem ao composto II e liberando um radical livre. Posteriormente, o composto II sofre redução por um segundo substrato, o que permite a regeneração do Fe^{+3}, provocando a liberação de mais um radical livre (HAMID; REHMAN, 2009).

3.4.3. Manganês Peroxidase (E.C. 1.11.1.13)

A manganês peroxidase (MnP) é uma enzima extracelular, glicosilada de massa molecular de 45 – 47 kDa e possui um grupo prostético heme (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). É dependente de peroxido (H_2O_2) e do íon Mn^{+2} e α-cetoácidos com lactato são responsáveis por estabilizar sua atividade (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997; AZEVEDO, 2004).

Outra característica é de catalisar a oxidação de Mn^{+2} à Mn^{+3}, necessitando de ácidos orgânicos como quelantes do instável Mn^{+3}, (ácidos málico ou oxálico). O complexo Mn^{+3} quelante é capaz de oxidar diretamente a lignina ou ácidos graxos insaturados e seus hidro peróxidos, gerando radicais acil e peroxil, respectivamente, consequentemente aumentando a taxa de degradação de lignina, denominado como peroxidação lipídica (SZKLARZ et al., 1989).

3.4.4. Endoglucanase (E.C. 3.2.1.4)

As endoglucanases (1,4-b-D-glucana-4-glucano-hidrolase), são as enzimas do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise; não atacam as celobioses, mas hidrolisam as celodextrinas, combinações de celulose e ácido fosfórico e outros substitutos de

celulose, por isso sua especificidade não pode ser definida perfeitamente. As ligações glicosídicas são quebradas nas regiões amorfas da celulose, assim abrindo espaço para as celobio-hidrolases (ZHANG; LYND, 2006; CASTRO; JUNIOR, 2010). O sítio ativo das endoglucanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o grau de polimerização de maneira considerável. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando consequentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (ELISASHVILI, 1993).

3.4.5. Exoglucanase (E.C. 3.2.1.91)

O grupo das exoglucanases é constituído por 1,4-b-D-glucana-glucano-hidrolase e 1,4-b-D-glucana-celobio-hidrolase, que atacam unidades de celobiose nas terminações deixadas pelas endoglucanases. A enzima não ataca outros substitutos de celulose, refletindo numa alta especifidade da molécula em comparação com as endoglucanases, tornando as celobiohidrolases enzimas de maior afinidade com a celulose. Essa enzima também é capaz de hidrolisar moléculas cristalinas de celulose com, aproximadamente, 80% de degradação, em um meio contendo celobiohidrolases pura (ZHANG; LYND, 2006; CASTRO; JUNIOR, 2010).

O sítio ativo das celobio-hidrolase possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando celobiose. As ligações do substrato é constituída por 40 aminoácidos e tem a finalidade de promover a adsorção da proteína ao substrato, atribuindo estabilidade ao agregado e admitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo. A adsorção ocorre através da interação de resíduos de tirosina presente no domínio de ligação com as unidades de glucopiranose presente na superfície da celulose (AWAFO, 1997; ZHANG; LYND, 2004).

3.4.6. Xilanase (E.C. 3.2.1.8)

As xilanases são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por bactérias e fungos, que fazem a hidrólise das ligações β 1,4 na xilana principalmente. A xilana é composta por resíduos de β-xilopiranose, unidos por ligações β 1,4, com graus variáveis de substituições em suas cadeias laterais. Os produtos da hidrólise das xilanases são constituídos de monômeros D-xilose e xilo-oligossacarídeos de diferentes tamanhos (HECK, 2006; JÄNIS et al., 2007).

As xilanases apresentam vasto emprego industrial, sua aplicabilidade no setor alimentício e processamento do papel (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002; JIANG; BAIL; WU, 2008; BAE; KIM; KIM, 2008). A aplicação biotecnológica das xilanases termoestáveis têm sido usadas na indústria de panificação, aumentando a maciez e o volume a firmeza da migalha e diminuindo a recristalização da amilopectina (JIANG; BAIL; WU, 2008). Sendo assim, as xilanases termoestáveis se colocam como boa estratégia para a aditivação de produtos panificados nas etapas de produção e armazenamento (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002; JIANG; BAIL; WU, 2008).

3.5. Forrageiras tropicais

No Brasil, a grande maioria das áreas de pastagem é constituída por plantas forrageiras tropicais, destacando-se as dos gêneros *Brachiaria, Cynodon, Panicum e Pennisetum,* (EUCLIDES; MEDEIROS, 2005). Essas plantas podem atingir produções de, aproximadamente, 80 toneladas MS ha^{-1} ano^{-1}, sendo encontrada, na maior nas parte região sul, sudeste e centro-oeste do País, concentrando sua produção em estação chuvosa e quente e queda de produção na estação seca ou fria do ano, precisando desta forma buscar alternativas para suprir a falta de forrageiras (SANTOS et al., 2003).

As forrageiras são os componentes mais importante na dieta dos ruminantes; é através da ingestão de matéria seca que os nutrientes essenciais, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, são metabolizados no trato gástrico intestinal e absorvidos para corrente sanguínea através de mecanismos químicos e fisiológicos ao nível do sistema digestório dos ruminantes. Desta forma, é necessário adotar nas propriedades destinadas a produção animal o manejo de pastagem, pois é através da ingestão de matéria seca do pasto, que os animais conseguem maximizar o seu desempenho produtivo e reprodutivo.

A fração fibrosa das forrageiras é constituída, principalmente, por três componentes ligados entre si: celulose, hemicelulose e a lignina, sendo a lignina considerada o principal fator limitante à digestibilidade das forrageiras (VAN SOEST, 1994).

A elevação do valor nutritivo da forragem é possível mediante tratamento físico, químico ou biológico, que tem como finalidade principal torná-la mais aproveitável no rúmen, mediante alterações de parede celular. Entre os tratamentos químicos destaca-se a amonização, com amônia anidra ou ureia como fonte de amônia. A amonização promove alterações na composição química do volumoso, solubilizando a hemicelulose e aumentando o conteúdo do composto nitrogenado (REIS; RODRIGUES; PEREIRA, 1996).

Outros trabalhos químicos encontrado constituem em utilizar o hidróxido de sódio (NaOH), o que entretanto, pode gerar danos ao meio ambiente (LENDOWSKI et al., 2015). No que tange à alimentação animal, alguns cuidados devem ser tomados, dentre os quais àqueles relacionados com a quantidade de sódio na dieta, uma vez que o tratamento com doses crescentes de NaOH, pode elevar o conteúdo de sódio do bagaço da cana-de-açúcar (PIRES et al., 2006). Sendo assim, presume-se que o tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com NaOH deve estar associado ao ajuste da quantidade de cloreto de sódio (NaCl), da dieta. Além disso, a utilização do NaOH tem ação corrosiva sobre os equipamentos, o que pode levar ao aumento dos custos com depreciação. Devido aos problemas relacionados à utilização do NaOH, tem sido pesquisado outros agentes hidrolizantes, como a cal virgem e hidratada.

O tratamento biológico de forrageiras de baixa qualidade surge como alternativa ao tratamento químico, em tempos onde os "produtos orgânicos" estão em alta, pois não necessita da adição de substâncias químicas, nem acarreta poluição do ambiente. Este tratamento consiste em inocular microrganismos que degradam a fração fibrosa e aumentam a digestibilidade do material. Os fungos basidiomicetos do gênero *Pleurotus* degradam celulose, hemicelulose e lignina, sendo a lignina preferencialmente atacada, em comparação aos polissacarídeos (MOYSON; VERACHTERT, 1991).

A utilização de tratamento biológico para melhoria do valor nutritivo de forrageiras de baixa qualidade ainda não é muito utilizado até o presente momento, mas podem vir a ser um dos mais promissores métodos no futuro. A evolução desta tecnologia depende da identificação e cultivo de novos fungos lignolíticos na natureza, que não utilizem os componentes da parede celular importantes para a nutrição de ruminantes.

3.6. Ovinocultura

Em 2014 o rebanho mundial ovinos era da ordem de 1,2 bilhões (FAO, 2015). A evolução da ovinocultura mundial num período recente, apresenta uma taxa de 1,5% de crescimento anual nos últimos 5 anos. Observa-se que o cenário mundial para 2016 aponta para uma tendência de uma pequeno crescimento para os ovinos.

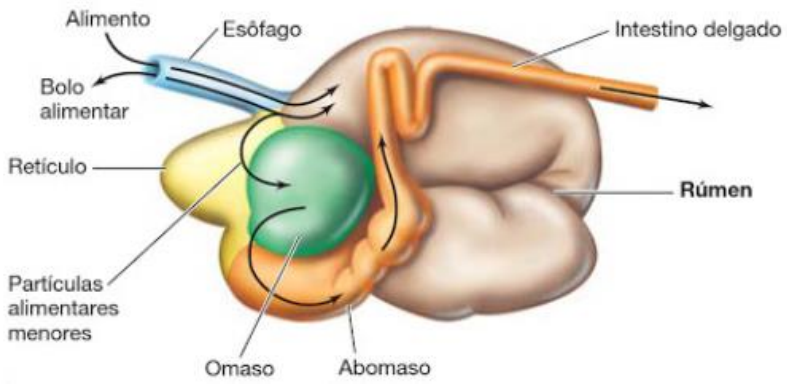
No Brasil, o efetivo de ovinos apurado em 2014 pelo IBGE foi de 17.614.454 milhões de cabeças. A maior concentração do rebanho está na região nordeste 57,5% e na região sul 29,3%, o Brasil aparece como o 18º rebanho mundial de ovinos.

Os ruminantes se adaptam em função do tipo de alimento disponível e não são capazes de produzir as enzimas necessárias para o processo de digestão de fibra no rúmen, mas

proporcionam o desenvolvimento de importantes populações de microrganismos que realizam essa função (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006).

O rúmen, Figura 5 é um ecossistema anaeróbio, definido como uma câmara de fermentação estável capaz de fornecer nutrientes na forma de alimento e água recém ingeridos, resultado da atividade física e microbiológica do rúmen, e tem como principais produtos finais a amônia, proteínas microbiana, ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas do complexo B e vitaminas K e produtos não desejáveis para o animal e para a microbiota ruminal como o nitrato e gás hidrogênio, gás carbônico e metano (OWENS; GOETSCH, 1993).

Figura 5 – Diagrama esquemático do rúmen e sistema gastrintestinal



Fonte: Madigan et al. (2016)

A composição e proporção de microrganismos no rúmen variam de acordo com a dieta, com a interação microrganismo versos animal hospedeiro e habitat (CHEN et al., 2008). A microbiota ruminal é constituída de três importantes microrganismos: protozoários, bactérias e fungos.

Os protozoários foram os primeiros microrganismos identificados no rúmen, sua presença aumenta diretamente a digestão da celulose e hemicelulose (FONDEVILA, 1998). Os protozoários presentes no rúmen são organismos eucariotos unicelulares, anaeróbios, não patogênicos, que tem as bactérias como a fonte principal de nitrogênio (HUNGATE, 1966; OGIMOTO; IMAI, 1981; OLIVEIRA; ZANINE; SANTOS, 2007). As bactérias constituem a fonte preferida de nitrogênio para os protozoários (WILLIAMS, 1986). Esta predação reduz significamente o número de bactérias no líquido ruminal (HUNGATE, 1966). Alguns protozoários são celulolíticos, entretanto, os açúcares solúveis e amido são os principais

substratos utilizados, os quais são assimilados e estocados na forma de amilopectina (LENG; NOLAN, 1984).

A predação por grandes populações de protozoários reduz a biomassa bacteriana livre no líquido ruminal; aumenta a reciclagem intra-ruminal e a perda de N pelo hospedeiro e reduz o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado do hospedeiro, tanto pela menor população bacteriana quanto pela retenção dos protozoários no rúmen (LENG; NOLAN, 1984). A defaunação, que nutricionalmente é definida como a eliminação dos protozoários do rúmen, pode trazer alguns benefícios. Em alguns programas de alimentação, como em dietas com alta energia e ricas em nitrogênio não protéico a ausência dos protozoários resulta numa melhoria da performance do animal. Mas contrapondo a presença de protozoários no rúmen parece ser um fator fundamental para o processo fermentativo, pois através da ingestão de partículas alimentares e pelo armazenamento de amido, eles podem controlar o nível de substrato disponível, uniformizando a fermentação entre os intervalos de alimentação. Os protozoários podem servir também como uma fonte contínua de nitrogênio para as bactérias após sua morte e degradação, pois grande parte da proteína do protozoário foi formada a partir da proteína das bactérias (TEIXEIRA, 1991).

A população bacteriana é a mais diversificada no rúmen (número de espécies e tipos metabólicos). No processo de degradação da fibra vegetal estão relacionados os principais grupos de bactérias ruminais:

- **Bactérias celulolíticas** têm a habilidade bioquímica de produzir a enzima extracelular celulase, através da hidrólise da celulose. As celulases da maioria dos microrganismos celulolíticos estão associadas às células aderidas firmemente às partículas fibrosas do conteúdo ruminal. A adesão inicial é feita através do glicocálice, à medida que a celulase vai degradando a fibra, fragmentos do envelope celular passam a compor a matriz de glicocálice, dentro da quais as celulases continuam a digerir a celulose (CHENG; COSTERTON, 1986). Os ácidos graxos de cadeia ramificada são necessários ou estimulatórios para o crescimento das bactérias celulolíticas (DEHORITY, 1987);

As espécies celulolíticas produzem, principalmente, acetato, propionato, butirato, succinato, formato, CO_2 e H_2; são liberados também etanol e lactato (HUNGATE, 1966; BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006). Segundo Dehority (1987) e Van Soest (1982), as principais espécies celulolíticas são *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Bacteroides succinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens*.

- **Bactérias Amilolíticas** são as responsáveis pela degradação do amido (que se dá pela enzima amilase), que é fermentado por espécies do gênero *Bacteroides*, dentre estas, *Bacteroides amylophilus* que utiliza amido, mas é incapaz de utilizar glicose ou outros monossacarídeos. Já *Streptococus bovis* e *Selenomonas ruminantium* fermentam amido e açúcares solúveis produzindo acetato, quando estes carboidratos são abundantes mudam para acetato, formato e etanol ou acetato e propionato, quando a concentração de substrato prontamente fermentável decresce. Esta última rota metabólica maximiza a produção de Adenosina Trifosfato (ATP), (RUSSELL, 1988);
- **Bactérias Proteolíticas** presentes no rúmen são capazes de degradar proteína. Existem, no entanto, bactérias essencialmente proteolíticas, que utilizam aminoácidos como fonte de energia primária (*Bacteroides amylophilus* e *Bacteroides ruminicola*). A proteína contida no alimento do animal pode ser degradada pelos microrganismos do rúmen, com liberação de amônia e ácidos graxos voláteis. A excessiva degradação protéica no rúmen causa redução na retenção de N pelo hospedeiro (TEIXEIRA, 1991; VAN SOEST, 1982);
- **Bactérias Metanogênicas** (anaeróbias estritas) são organismos capazes de produzir metano. Estas bactérias são especialmente importantes para o ecossistema ruminal, pois tem um papel importante na regulação de fermentação pela remoção das moléculas de H_2 (TEIXEIRA, 1991). Praticamente todo o metano é produzido pelas reações de redução de CO_2 acoplada ao fornecimento de elétrons pelo H_2. O gênero *Methanobacterium* desempenha importante papel no equilíbrio químico no ecossistema ruminal ao utilizar o H_2 presente no meio, contribuindo para a regeneração de co-fatores, como NAD^+ e $NADP^+$ (ARCURI; MATOS, 1992; BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006).
- **Fungos Anaeróbios** presentes no rúmen desenvolvem a degradação da fibra, degradação parcial da lignina, hemicelulose e pectinas (MADIGAN et al., 2016). A ação dos fungos sobre a parede vegetal diminui a rigidez estrutural das forragens e favorece sua ruptura em partículas aumentando também a superfície acessível para a ação das bactérias, sendo capazes de fermentar a celulose em AVGs (FONDEVILA, 1998).

Segundo Berchielli, Pires e Oliveira (2006) a microbiota é composta basicamente pela população do líquido ruminal onde são aptos a colonizarem alimentos recém ingeridos ou superfícies de tecidos recém expostos, acarretando grande atividade metabólica, e uma outra população aderente à fração sólida está relacionada a degradação dos alimentos fibrosos e a população ligada à parede do rúmen, microrganismos anaeróbios facultativos, que digerem

células epiteliais mortas e apresentam importante atividade ureolítica, num ambiente situado na interface entre o tecido bem oxigenado e o conteúdo ruminal anaeróbio.

3.7. Produção de gases *in vitro*

A técnica *in vitro* de produção de gases se baseia na degradação dos alimentos pelos microrganismos ruminais tornando possível mensurar o desaparecimento de material no decorrer do tempo assim visualizar a cinética fermentativa, e medir a formação de subprodutos da ação microbiana durante o processo de degradação (BUENO, 2002). Desta forma a degradabilidade do alimento é estimada por correlação entre a produção microbiana de gás e a matéria orgânica fermentada (BERCHIELLI; VEJA-GARCIA; OLVEIRA, 2011).

O ensaio é feito pela simulação do ambiente ruminal, utilizando alimentos moídos, meio anaeróbio e inóculo preparado a partir de uma mistura de microrganismos ruminais (WILLIAMS, 2000). O volume de gases produzidos pode ser aferido por predições do volume a partir de dados de pressão, com o uso de um transdutor (THEODOROU et al., 1994).

Embora a técnica *in vitro* de produção de gases permite simular o ambiente ruminal, está exclusivamente relacionada à fermentação que ocorre no rúmen e não à digestibilidade que ocorre em todo o trato gastrintestinal. Também não considera as condições comportamentais do animal podendo, um alimento, apresentar ótimo resultado em relação à sua degradação pelos microrganismos ruminais, mas não ser aceito pelos animas para o consumo. Sem dúvida alguma, a melhor forma de avaliar a introdução de um alimento na dieta do ruminante é pelo ensaio de desempenho animal (CAMPOS, 2014).

3.8. Relação ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano (CH_4)

Outro aspecto importante da fisiologia ruminal é a formação dos AGCC pelos microrganismos ruminais, pois sendo energéticos, suprem de 60 a 80% da energia dietética dos ruminantes (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2011). Os principais AGCC encontrados no ambiente ruminal são ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, 2-metil-butírico, hexanóico e heptanóico e são produzidos a partir de pequena quantidade de compostos orgânicos, mediante o padrão microbiano específico. Sendo absorvidos continuamente no rúmen, os ácidos acético, propiônico e butírico são os AGCC predominante produzidos principalmente na fermentação de carboidratos como celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares. O acetato é a principal fonte de energia metabolizável para o

ruminante, por ser o principal AGCC produzido no rúmen, enquanto que o propionato é o principal substrato gliconeogênico, importante para a manutenção dos níveis plasmático de glicose (BERGMAN, 1990).

A razão acetato:propionato (C2:C3) é principalmente influenciada pela relação volumoso:concentrado das dietas, sendo indicativo do valor nutricional destas (ANTUNES; RODRIGUEZ; SALIBA, 2011). O excesso de concentrado na dieta favorece a formação de ácidos láctico favorecendo a queda do pH e inibição de microrganismos importantes para a digestão das fibras, entretanto, dietas baseadas em níveis ótimos de concentrado favorecem a redução do H_2 pela formação de propionato, reduzindo assim a razão C2:C3. Em contrapartida dietas baseadas em alimento volumosos favorecem a produção de ácidos acéticos, aumento da razão C2:C3 e excesso de H_2 no rúmen (ANDRIGUETTO et al., 2002). Para o reequilíbrio das condições de fermentação no rúmen, as arqueias metanogênicas utilizam o excesso de H_2 para redução do CO_2 transformando-os em CH_4, que será totalmente eliminado pelos processos de eructação e expiração, resultando em perdas energéticas que podem variar de 2 a 12% da energia bruta consumida (JOHNSON; JOHNSON, 1995) e prejuízo econômico, uma vez que parte da energia fornecida pelo alimento, acaba não sendo utilizada pelo animal e é desviada para o ambiente (REIS; MORAIS; SIQUEIRA, 2006).

Sendo assim, o conhecimento de como ocorre e quão eficiente é a degradação dos alimento pelos microrganismo ruminais é de extrema importância em estudos de nutrição para ruminantes. As técnicas *in vitro* são altamente viáveis, pois são capazes de representar o processo de fermentação que ocorre no rúmen e estimam quantitativamente a taxa e o grau de degradação, similar aos resultado obtidos *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

Foram utilizadas quatro espécies de basidiomicetos *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus albidus* CCB 068, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus ostreatus var. shimeji*, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo – CENA/USP, Piracicaba, São Paulo. As culturas foram mantidas por repiques sucessivos em meio sólido de extrato de malte (30 g L^{-1} extrato de malte, 3 g L^{-1} peptona e 15 g L^{-1} agar) crescidas em incubadora tipo B.O.D. por 7 – 14 dias, a 28ºC. Os estoques das culturas foram mantidos em grãos de trigo conforme descrito por Bononi et al. (1995).

4.2. Manutenção das culturas dos fungos em grãos de trigo

Os fungos foram mantidos em grãos de trigo previamente cozidos com água por 30 minutos em autoclave somente tampada, na proporção de 1:2 (peso/volume). Após o cozimento, os grãos foram escorridos e acrescentou-se 0,2% de carbonato de cálcio e 0,8% de sulfato de cálcio na proporção do peso dos grãos (BONONI et al., 1995). Amostras de 75 g foram separadas em saquinhos de polietileno (10 x 15 cm) fechados com espuma e barbante e esterilizados em autoclave por 30 minutos, a 121ºC. Então, os saquinhos contendo as amostras foram colocados em câmara de fluxo, sob luz ultravioleta, até esfriarem. Em seguida, foi realizada a inoculação com o fungo desejado. Os saquinhos inoculados foram incubados em estufa por 20 dias, na temperatura de 28ºC e tendo os micélios crescidos foram armazenados sob refrigeração a 4ºC e renovados a cada 6 meses. Esta metodologia é utilizada tanto para a manutenção quanto para ativação das culturas dos microrganismos.

4.3. Forrageiras

Quatro amostras de forrageiras tropicais, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, *Panicum maximum* cv. Aruana e *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo – CENA/USP, Piracicaba, São Paulo.

4.4. Vinhaça, bagaço e cana-de-açúcar

As amostras de vinhaça, a variedade da cana-de-açúcar (*Sacchararum* spp.) RB 867515, picada a 30 mm e o bagaço de cana-de-açúcar foram fornecidas pela Usina Iracema, pertencente ao grupo São Martinho, localizada em Iracemápolis / São Paulo.

4.4.1. Caracterização da vinhaça

A vinhaça foi enviada para análise quanto ao conteúdo de: cálcio; fósforo; índice de fenóis; magnésio; potássio; sódio; sólidos dissolvidos totais; sólidos suspensos totais; sulfato; demanda biológica de oxigênio; demanda química de oxigênio; N-Kjeldahi; nitrato; nitrito e nitrogênio total, conforme as metodologias para efluentes descritas no Ensaio NBR ISSO/IEC 17025 de 2005. Os resultados estão disponíveis na Tabela 5.

4.4.2. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram secas em estufa de aeração forçada a 35°C. Foram utilizadas 250 mg da amostra seca para a análise físico e química pelo método de material orgânico, no Laboratório de Análises de Solos na ESALQ/USP, conforme metodologia descrita no manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos IN 28 SP-5189-6 (BRASIL, 2013), Tabela 7.

4.5. Produção de enzimas em vinhaça *in natura*

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 100 mL de vinhaça *in natura* com o pH ajustado para 6,0 e fechados com rolha de algodão. Em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 121ºC. Depois de atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo, os frascos foram inoculados com três discos (1,0 cm diâmetro) de meio de cultura contendo o micélio dos fungos, crescidos em meio MEA, por sete dias. Os frascos foram incubados por 24 dias em incubadora Tecnal modelo TE-420 com agitação orbital de 180 rpm, a 28ºC (± 2ºC), sob condição de escuro. O controle consistiu em material sem a inoculação dos microrganismos. Após desenvolvimento dos fungos, o meio líquido foi separado por filtração a vácuo e, o sobrenadante foi utilizado para avaliação da atividade enzimática.

4.6. Produção de enzimas em forrageiras

4.6.1. Substratos para a cultivo de fungo no estado sólido

Foram utilizados seis substratos para o cultivo: *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, *Panicum maximum* cv. Aruana e *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, cana-de-açúcar picada e bagaço de cana-de-açúcar. Os materiais foram secos a 40ºC até peso constante, moídos e peneirados em granulometria de aproximadamente 5 mm. Os materiais foram esterilizados em autoclave a 121ºC, por 30 minutos e utilizados como controle e como substrato para o cultivo dos fungos.

O cultivo de fungo foi realizado em sacos plásticos contendo 50 g do substrato (peso seco), a umidade em cada amostra foi corrigido com a adição de vinhaça para 60%, condições ideal para o crescimento do fungo segundo recomendações (KIEHL, 2012), como fonte de nitrogênio (N). O material foi inoculado com 3 discos (1,0 cm diâmetro) de cultura pura obtida através do crescimento do micélio por sete dias em MEA, em placas de Petri, a 28ºC, (crescimento visível e amplo do micélio). A cada seis dias, por um período de 24 dias, três sacos de cada forrageira foram retirados da incubadora. Cada amostra foi, tratada com nitrogênio líquido para rápido congelamento, transformado em pó em almofariz sob nitrogênio líquido, e congelada -18°C por no mínimo 4 h, quando então foi liofilizado e mantido em freezer. A atividade enzimática foi determinada na fração líquida obtida a partir de 0,1 g do material com adição de 10 mL de água destilada, após homogeneização e centrifugação a 4.000 rpm, durante 10 min. O melhor tempo de incubação do substrato com o fungo foi determinado após medidas das atividades enzimáticas produzidas, como observado e descritos nos itens a seguir.

4.7. Determinação das atividades enzimáticas ligninolíticas

4.7.1. Preparo dos reagentes

- **Tampão Citrato-Fosfato:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,48 g de ácido cítrico e 0,67 g de fosfato de sódio dibasico e ajustou-se o pH para 5,0.
- **Siringaldazina:** adicionou-se 0,05 g siringaldazina (SIGMA) em 50 mL de etanol.
- **Peróxido de hidrogênio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 33µL de H_2O_2.

- **Lactato de sódio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 1,2 mL de lactato de sódio.
- **Albumina bovina:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,25 g de albumina bovina (Albumin Bovine Fraction V, MP Biomecals).
- **Peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 2,7 g de succinato de sódio, ajustou-se o pH para 4,5 e acrescentou-se 33µL de H_2O_2.
- **Sulfato de Manganês:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,017 g de $MnSO_4$.
- **Vermelho de fenol:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 0,05 g de vermelho de fenol.
- **Hidróxido de sódio:** em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 4,0 g de NaOH.

Todos os reagentes foram estocados em refrigerador a 4ºC.

4.7.2. Determinação da atividade enzimática da Lacase (E.C. 1.10.3.2)

A atividade da enzima lacase foi determinada segundo a metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona. Em tubos de ensaio foram colocados 0,6 mL de sobrenadante, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0) e 0,1 mL de solução de siringaldazina 0,1% (em etanol), considerada o iniciador da reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 525 nm, no início da reação (chamado de T0) e após 10 min (T10). Para o branco, o sobrenadante foi fervido a 100°C, por 20 min e em seguida foi realizada a leitura. A atividade enzimática é determinada em µmol min litro^{-1} (UI L^{-1}), pela equação descrita no item 4.7.5. considerando o valor do coeficiente de absorção molar (ε) de 65.000 L M^{-1} cm^{-1}.

4.7.3. Determinação da atividade enzimática da Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada segundo a metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona, na presença de H_2O_2 exógeno no meio de reação. Adicionou-se 0,6 mL de sobrenadante, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0), 0,1 mL de solução de H_2O_2 0,002 Molar (em água destilada) e 0,1 mL de solução de siringaldazina 0,1% (em etanol), considerada o iniciador da reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com

absorbância de 460 nm, no início da reação (T0) e após 10 min (T10). Para o branco, o sobrenadante foi fervido a 100°C, por 20 min e em seguida foi realizada a leitura. A atividade enzimática foi determinada em µmol min litro^{-1} (UI L^{-1}), pela equação descrita no item 4.7.5. considerando o valor do coeficiente de absorção molar (ε) de 29.400 L M^{-1} cm^{-1}.

4.7.4. Determinação da atividade enzimática da MnP (E.C. 1.11.1.13)

A atividade da enzima MnP foi determinada segundo a metodologia de Kuwahara et al. (1984), quantificada através da oxidação do vermelho de fenol na presença de Mn^{+2} e H_2O_2.

Para esta reação, foram adicionados em 0,6 mL de sobrenadante; 0,1 mL de solução de lactato de sódio 0,25 Molar; 0,1 mL de solução de albumina bovina 0,5% (em água destilada); 0,1 mL de tampão succinato de sódio 0,2 Molar (pH 4,5); 0,05 mL de solução de $MnSO_4$ 0,002 Molar; 0,05 mL de H_2O_2 0,002 Molar e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% (em água destilada), considerado o iniciador da reação. Para o branco, o sobrenadante foi fervido a 100°C, por 20 min e em seguida foi realizada a leitura como descrito anteriormente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, absorbância de 610 nm, no início da reação (T0) e após 10 min a reação é interrompida pela adição de 0,04 mL da solução de NaOH 2,0 N, sendo realizada nova leitura (T10). A atividade enzimática foi determinada em µmol min^{-1} litro^{-1} (UI L^{-1}), pela equação descrita no item 4.7.5. considerando o valor do coeficiente de absorção molar (ε) de 4.460 L M^{-1} cm^{-1}.

4.7.5. Cálculo das atividades enzimática

$$\text{Atividade Enzimática (UI L}^{-1}\text{)} = \left(\frac{\dfrac{(\Delta\ \text{Abs})}{\varepsilon}}{\text{R x T}} \right) \text{x } 10^6$$

Onde:

Δ Abs. = absorbância [Abs. $_{final}$ (T10) – Abs. $_{inicial}$ (T0)]

ε = coeficiente de absorção molar (L M^{-1} cm^{-1})

R = volume do caldo enzimático (mL)

T = tempo da reação (minutos)

4.8. Determinação das atividades enzimáticas Celulolíticas e Xilanolíticas

4.8.1. Determinação das atividades enzimáticas de Endoglucanase, (E.C. 3.2.1.4) e Exoglucanase (E.C. 3.2.1.91)

As atividades das enzimas celulolícas endoglucanase e exoglucanases foram determinadas de acordo com metodologia descrita por Wood e Bhat (1988). Como substrato foi utilizado a carboximetilcelulase e as atividade encontradas foram emitidas em 1,45 µmoles de glicose min^{-1} mL^{-1} liberada da carboximetilcelulose. As atividades foram medidas em 39ºC, pH 6,6 nas condições consideradas ideais para o ambiente ruminal.

4.8.2.Determinação da atividade enzimática da Xilanase (E.C. 3.2.1.8)

A atividade enzimática da xilanase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). A xilana foi utilizada como substrato e a atividade encontrada foi de 102,5 µmoles de xilose min^{-1} mL^{-1} liberado de xilana. A atividade foi medida em 39ºC e pH 6,6 condições consideradas ideais para o ambiente ruminal.

4.9. Avaliação bromatológica das forrageiras tratadas ou não-tratadas com fungos

As análises de composição bromatológica das forrageiras utilizadas foram realizadas de acordo com procedimentos da AOAC (2011), nos quais foram determinados teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), fibras em detergente neutro (FDN), fibras em detergente ácida (FDA), lignina (Lig) e proteína bruta (PB). As amostras, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, dotado de peneira com malha com furos com 1 mm de diâmetro, e acondicionadas em potes plásticos de 80 mL para então serem avaliados.

4.9.1 Determinação da matéria seca (MS)

Foi pesado 1 g das amostras de cada substrato em cadinhos de porcelana, previamente tarados e levados para estufa a temperatura de 100ºC até peso constante. Em seguida as

amostras foram novamente pesadas, obtendo-se a quantidade de matéria seca através da diferença entre os pesos. O cálculo da MS está representado no item 4.9.1.1.

4.9.1.1. Cálculo

$$\% \text{ MS} = \frac{[(\text{peso cadinho} + \text{amostra seca}) - \textit{tara cadinho}] \text{ x } 100}{\text{peso amostra (g)}}$$

4.9.2. Determinação da matéria orgânica (MO)

A matéria orgânica foi estimada pelas diferenças entre a matéria seca e matéria mineral.

4.9.3. Determinação da fibra em detergente neutro (FDN)

Para determinação da FDN foram pesados 0,5000 g das amostras secas e moídas a 1 mm em saquinhos previamente tarados. Os saquinhos foram colocados no aparelho ANKON e adicionados 2 ml de solução de amilase aos substratos que apresentavam elevado teor de amido. Em seguida, os saquinhos foram lavados com solução aquecida de FDN por 1 hora, logo após a solução foi escoada. Depois, os sacos foram lavados com água destilada aquecida por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido até totalizar 4 lavagens.

Foi retirado o excesso de umidade dos saquinhos com auxílio de papel absorvente, e depois os mesmos foram imersos por 5 minutos em solução de acetona PA. Após este tempo os saquinhos foram retirados e colocados em estufa 105ºC “overnight”, sendo posteriormente pesados.

4.9.4. Determinação da fibra em detergente ácido (FDA)

Os resíduos da determinação do FDA foram submetidos ao mesmo procedimento do item 4.9.3., sendo substituída a solução de FDN pela solução de FDA.

4.9.5. Determinação da lignina

Os resíduos da determinação sequencial de FDN e FDA foram colocados em contato com solução de ácido sulfúrico 72%, por 3 horas. Em seguida, os saquinhos foram lavados com

água destilada aquecida. Então, foram deixados por cinco minutos em água fervida e escoados em seguida, repetindo a operação por mais três vezes. Novamente os saquinhos foram lavados com água destilada aquecida por 5 minutos, repetindo o procedimento até totalizar quatro lavagens. Foi retirado o excesso de umidade dos saquinhos com auxílio de papel absorvente, e então os mesmos foram imersos por 5 minutos em solução acetona PA. Após este tempo, os saquinhos foram retirados e colocados em estufa 105ºC "overnight". Posteriormente foram pesados e colocados em cadinhos previamente tarados e posteriormente levados para a mufla, a 500°C, por 4 horas e seus pesos determinados.

4.9.6. Determinação da proteína bruta (PB)

A determinação da proteína bruta foi realizada de acordo com o método micro-Kjeldahl. Esse procedimento se baseia na quantificação do nitrogênio total em 3 etapas: digestão, destilação e titulação.

4.9.6.1. Digestão da amostra

Foram pesados 100 mg dos substratos, em tubos de ensaio e levados ao bloco digestor. Em seguida, foram adicionados 5 mL de solução digestora. A temperatura inicial da digestão foi 150ºC, sendo aumentada gradativamente até alcançar 350°C. Ao término da digestão, iniciou-se o processo de destilação.

4.9.6.2. Destilação da amostra

Foram adicionados 15 mL de hidróxido de sódio 10 N em cada tubo de ensaio com as amostras já digeridas. A solução receptora utilizada foi o ácido bórico, no volume de 10 mL, onde recebia o NH_3 liberado.

4.9.6.3. Titulação da amostra

As amostras destiladas foram tituladas com ácido sulfúrico 0,05N. Para o cálculo do N total em % foi utilizado a fórmula apresentada no item 4.9.7.3.1. e a proteína bruta multiplicando o valor encontrado por 6,25.

4.9.6.3.1. Cálculo (N):

% N = Normalidade do ácido sulfúrico usado na titulação x miliequivalente do nitrogênio x (100/peso amostra) x mL de ácidos gastos na titulação

4.10. Ensaio *in vitro* de produção de gases

A degradação ruminal e os produtos da fermentação ruminal foram estimados pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, segundo Bueno et al. (2005), utilizando um transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA-USP, Piracicaba, Brasil).

Em garrafas de vidro com capacidade para 160 mL e *head space* de 85 mL foram inseridos saquinhos secos pré-pesados (Ankom # F57; sacos 50 x 40 mm, tamanho do poro 25±10 µm; ANKOM, Technology Corporation, Fairport, EUA) contendo 0,5 g dos substratos a serem avaliados. Nas garrafas foram adicionados 25 mL de inóculo ruminal com 50 mL de solução nutritiva. Em seguida as garrafas foram vedadas com rolhas de borracha (Bello Glass Inc. Vineland, NJ, EUA), homogeneizadas manualmente e mantidas em estufa (Marconi MA35) a 39ºC, por 24 horas. A pressão do gases no *head space* foi medida às 4, 8, 12 e 24 horas após incubação.

No dia anterior à incubação preparou-se o meio de cultivo tamponado (THEODOROU et al., 1994), apresentado nas Tabelas 2 e 3, que foi mantido em estufa a 39ºC.

Tabela 2 – Composição do meio tamponado para a produção de gases *in vitro*

Reagentes	Quantidades (mL)
Solução de macrominerais	2497,20
Solução de microminerais	1,32
Solução tampão	2497,20
Solução de rezasurim	12,00
Agente redutor	748,80
Água destilada	6243,60

Tabela 3 – Composição das soluções do meio tamponado

Reagentes	Quantidades (g L^{-1})
Solução de macrominerais	
Na_2HPO_4	3,75
KH_2PO_4	3,32
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,60
Solução de microminerais	
$CaCl_2\ 2H_2O$	132,00
$MnCl_2\ 4H_2O$	100,00
$CoCl_2\ 6H_2O$	10,00
$FeCl_3\ 6H_2O$	80,00
Solução tampão	
NH_4HCO_3	4,00
$NaHCO_3$	35,00
Rezasurim	0,1
Agente redutor	
Cisteína HCl	625,00[a]
Água deionizada	95,00[b]
NaOH 1M	4,00[b]
Na_2SO_3	328,13[a]

a = mg/100 mL; b = mL/100 mL

As soluções foram misturas em uma garrafa de 20 litros na seguinte ordem e proporção: 6243,60 mL de água deionizada; 2497,20 mL de solução tampão; 2497,20 mL de solução de macrominerais; 1,32 de mL solução de macrominerais; 12,00 mL de solução de rezasurim; 748,80 mL do agente redutor ao meio de cultivo tamponado, totalizando 12000 mL de meio de cultivo, que foi devidamente agitado para que as soluções se homogeneízem e em seguida saturado com CO_2 por, aproximadamente, 3 horas até que o pH atingisse 6,8 (solução de cor rosa).

Foi utilizado como inóculo o material do rúmen coletado de seis ovinos machos adultos, castrados, da raça Santa Inês, providos de cânula permanente no rúmen, e alimentados a pasto com a suplementação diária de 500 g de concentrado comercial, que pertence ao Laboratório de Nutrição Animal do CENA/USP, Piracicaba/SP.

4.10.1. Produção de metano (CH_4)

Para análise da produção de metano (CH_4), foram coletados 2,5 mL de gases de cada garrafa às 4, 8, 12 e 24 horas após o início da incubação e foi armazenado em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL. A coleta foi realizada com auxílio de uma seringa de 5 mL (Beaton Dickson Ind. Cirúrgica Ltda, Curitiba-PR). Após cada coleta, a pressão interna das garrafas foi liberada com auxílio de uma agulha, agitadas e recolocadas na estufa.

O metano foi determinado por cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC2014, Tokyo, Japan), equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (1,5875 milímetros OD, 1,0 mm ID, 1 m de comprimento; Ref 19.809; Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, injetor e detector de ionização de chama foram 60, 200 e 240ºC, respectivamente. O gás de arraste foi o Hélio (10 mL min^{-1}) e a concentração de CH_4 foi determinada por calibração externa com curva analítica (0, 3, 6, 9 e 12%) obtida com CH_4 puro (White Martins PRAXAIR Gases Indutriais Ltda. Osasco – SP; 99,5% pureza). O metano produzido durante a incubação foi calculado de acordo com Longo et al. (2006):

$$CH_4 \text{ mL} = (\text{gases total, mL} + \textit{head space}, 85 \text{ mL}) \times CH_4\%$$

Após as leituras de pressão, foi subtraído do total de gases produzido nas garrafas com as amostras daquele obtido nas garrafas sem o alimento (branco). A quantidade de gases foi calculada de acordo com Araújo et al. (2011):

$$V = 7{,}365 \times p,$$

Onde V é o volume de gases produzido (mL) e p é a pressão medida (psi).

4.11. Características da fermentação e da degradação ruminal

Após o período de incubação (24 horas), as garrafas de 160 mL foram colocadas em bandejas com água e gelo para cessar a atividade microbiana. Os saquinhos de cada garrafa foram retirados, lavados em água corrente, tratados com solução detergente neutro por uma hora e depois lavados com água destilada quente e acetona. Os saquinhos foram colocados na capela para evaporação da acetona, depois em estufa a 105ºC, por 16 h e incinerados em mufla a 550ºC, por quatro horas. Foram determinados os teores de matéria orgânica verdadeiramente degradável (MOVD) e o fator de partição (FP) – calculado pela razão entre mg de MOVD e volume de gases (mL) em 24 h de incubação (BLÜMMEL; MAKKAR; BECKER, 1997).

No conteúdo liquido restante das garrafas foram realizados a medição de pH em peagâmetro digital (Tecnal® modelo TEC-2).

4.12. Avaliação da dose enzimática na digestibilidade *in vitro* das fibras vegetais pela produção de gases

Foram utilizados três concentrações de extrato enzimático em três períodos para avaliar a digestibilidade dos substratos. As concentrações das soluções enzimáticas foram 2, 4 e 6 mL (Tabela 4), e os períodos em dias foram 6, 12 e 18. Esses períodos foram os dias de maior atividade das enzimas (lacase, peroxidase e MnP) de acordo com Souza (2012).

A técnica utilizada foi a de produção de gases *in vitro* (item 4.10), descrita por Maurício, Mould e Dhanoa (1999), a qual apresenta comprovado potencial para descrever a cinética de fermentação no rúmen, mostrando a proporção da degradação das forrageiras com medidas da formação dos produtos solúveis e insolúveis, a partir do substrato, pela fermentação.

Tabela 4 – Concentrações do extrato enzimático em ensaio *in vitro* de produção de gases

Grupo	Concentrações de Extrato Enzimático
G	0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo
G 1	0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo
G 2	0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo
G 3	0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo

4.13. Avaliação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), foram separados e quantificados por meio da técnica de cromatografia gasosa, como descrito por Nocek, Hart e Polan (1987); Palmiquist e Conrad (1971), com modificações na programação da temperatura da coluna (temperatura inicial de 115ºC, mantido por 3,20 min., 123ºC mantido por 1,25 min. e 126ºC mantido por 5 min.). Primeiramente, a amostra do fluido ruminal foi centrifugada a 11.000 rpm por 30 min. a 4ºC. Em seguida foram coletados 800 µL do sobrenadante e adicionados 100 µL de ácido 2-etil-butilico (padrão interno) e 200 µL de ácido fórmico (PA). Da mesma maneira, foi preparada a solução de padrão externo contendo concentrações conhecidas de cada AGCC (ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) para calibração do integrador. Foram injetadas amostras de 1 µL em cromatógrafo a gases Shimadzu (HP7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA – 2014), acoplado a um detector de Ionização de Chama (FID) com uma coluna GP 10% SP-1200/1 H_3PO_4 80/100 Chromosorb WAW.

4.14. Análise Estatística

Foram realizados dois estudos separadamente: o primeiro delineamento estatístico do estudo foi um fatorial 5x4 (5 dias observados e 4 fungos); e o segundo delineamento estatístico foi um fatorial 4x3 (4 concentrações enzimática e 3 dias observados) todas as variáveis foram analisadas utilizando o software SAS® v. 9.4 (Statistical Analysis System Inst., Cary, North Carolina). Foram testados os parâmetros de produção de gases (PG), análise bromatógica e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Dados onde o resíduo estudentizado externalizado estava fora do intervalo -3 a 3 foram considerados como outlier ou valores influentes e por sua vez foram descartados da estatística, as variáveis foram testadas de forma isolada para cada um dos substratos avaliados e foram considerados os efeitos principais (fungo e dias), (concentração enzimática e dias) e suas interações, sendo considerado significativamente diferente médias com $p<0,05$ a partir do teste Tukey. As variáveis significativamente distintas de produção de gases para os parâmetros de dia e dose foram submetidos ao teste de contraste ortogonal (linear e quadrático).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP) produzidas por fungos crescidos nas forrageiras

Os perfis de produção de enzimas das forrageiras foram traçados ao longo de 24 dias de cultivo. Os fungos foram capazes de crescer e de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas durante o processo de fermentação dos substratos lignocelulósicos. Os resultados são apresentados em gráficos, nas Figuras de 6 a 11, mostrando os valores encontrados nos cinco dias analisados, para os quatro fungos, para as enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase, com os substratos Brachiaria, Napier, Buffel, Aruana, cana-de-açúcar e bagaço de cana-de-açúcar.

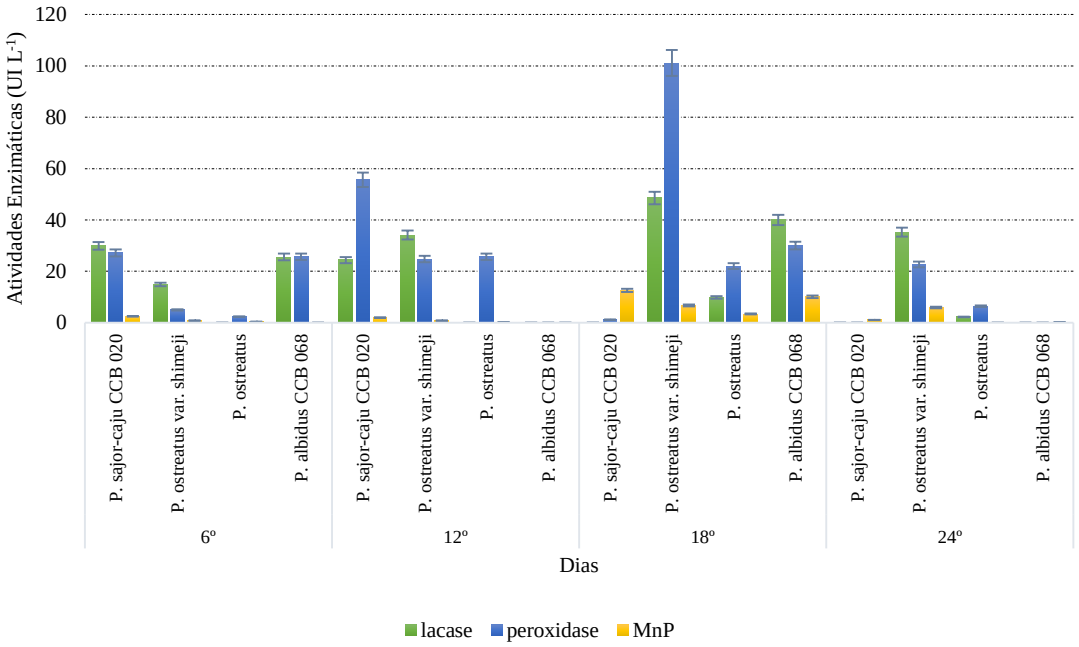
Foram observados crescimento dos fungos e as atividades enzimáticas em todas forrageiras e pelo menos uma enzima no período analisado, para cada espécie de fungo.

As atividades enzimaticas da lacase, peroxidase e MnP, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, na forrageira *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, foram bastante expressivas como mostra a Figura 6. O fungo *P. sajor-caju* CCB 020 (29,92 UI L^{-1}), teve pico ao sexto dia, de incubação e o fungo *P. ostreatus var. shimeji* apresentou atividade em todos períodos analisados, com pico ao 18º dia de incubação (48,55 UI L^{-1}). Para o *P. albidus* CCB 068 apresentou atividade no sexto e no 18º dia de incubação (40,04 UI L^{-1}). Já o *P. ostreatus* apresentou o início e pico da atividade ao 18º dia de cultivo (9,85 UI L^{-1}).

Para a atividade enzimática da peroxidase, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, tiveram início ao sexto dia incubação. Os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus* tiveram pico da atividade ao 12º dia de cultivo (55,63 – 25,66 UI L^{-1}, respectivamente), para o *P. ostreatus var. shimeji* e *P. albidus* CCB 068 apresentaram pico de atividade ao 18º dia (101,12 – 30,03 UI L^{-1}, respectivamente).

A atividade enzimática da manganês peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji* e *P. ostreatus*, tiveram início ao sexto dia de incubação, exceção para *P. albidus* CCB 068 que teve início e pico das suas atividades ao 18º dia (10,02 UI L^{-1}). Para o fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji* e *P. ostreatus* tiveram picos ao 12º dia (12,51 – 6,71 – 3,39 UI L, respectivamente).

Figura 6 – Atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e manganês peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus P. albidus* CCB 068, cultivado na forrageira *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



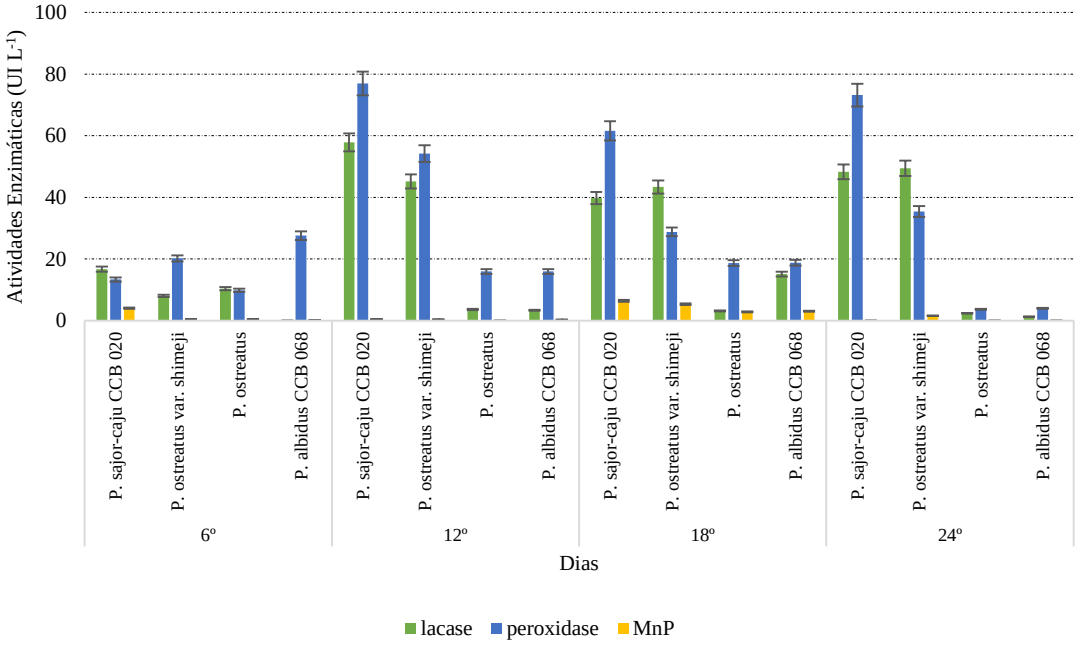
Para as atividades enzimaticas da lacase, peroxidase e MnP, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, na forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, como mostra a Figura 7. Para o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 observou atividade enzimática da lacase inicial ao sexto dia de incubação, com picos das atividades, aos 12º e 24º dias, (57,87 – 48,55 UI L^{-1}, respectivamente). Para o fungo *P. albidus* CCB 068 teve início e pico da atividade ao 12º dia de cultivo (3,38 UI L^{-1}). Já com o fungo *P. ostreatus var. shimeji* a atividade foi detectada ao sexto, com picos aos 12º e 24º dias (49,44 UI L^{-1} respectivamente). O pico da atividade para *P. ostreatus* foi ao sexto dia (10,36 UI L^{-1}) e, manteve a presença da enzima durante o período de incubação.

Para a atividade enzimática da peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, tiveram início ao sexto dia de incubação. Os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus var. shimeji* tiveram pico da atividade ao 12º dia de cultivo (76,98 – 54,20 UI L^{-1}, respectivamente). Já o fungo *P. ostreatus* teve pico na atividade ao 18º dia (18,69 UI L^{-1}) e o *P. albidus* CCB 068 apresentou pico de atividade ao sexto dia (27,57 UI L^{-1}).

Já a atividade enzimática da manganês peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram início ao sexto

dia de incubação e pico das suas atividades ao 18º dia (6,45 – 5,29 – 2,86 – 3,09 UI L^{-1}, respectivamente).

Figura 7 – Atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e manganês peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, cultivado na forrageira *Pennisetum purpureum* Schum cv. Napier, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



Para as atividades enzimaticas da lacase, peroxidase e MnP, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, na forrageira *Panicum maximum* cv. Aruana, observado na Figura 8.

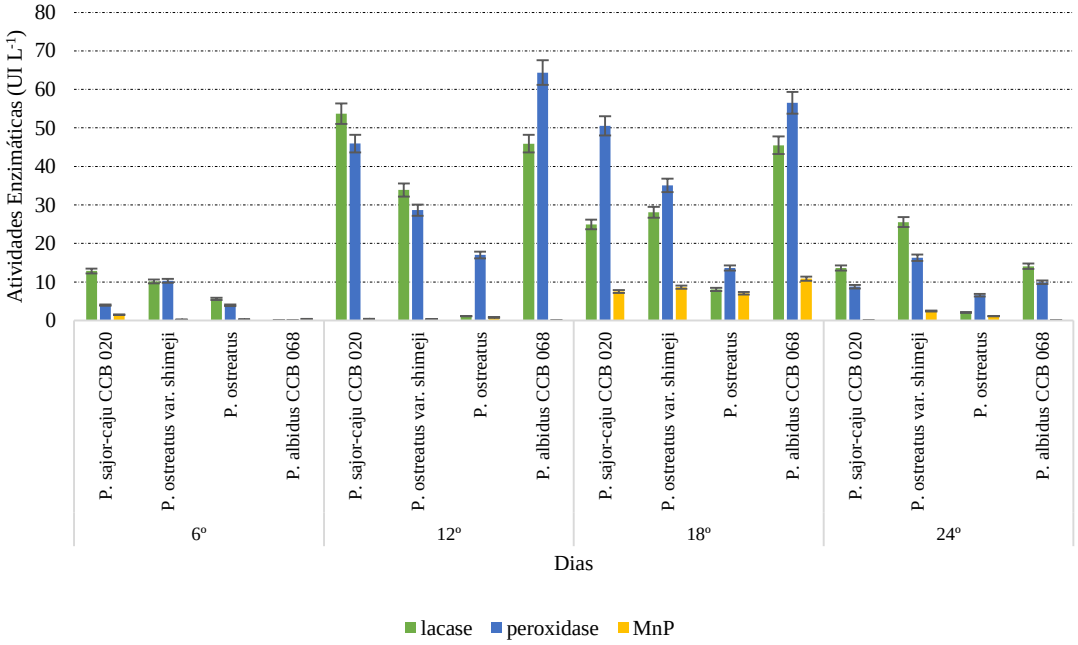
Os resultados mostraram que as atividades enzimáticas da lacase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, e *P. ostreatus* na forrageira *Panicum maximum* cv. Aruana, tiveram início ao sexto dia, exceto para *P. albidus* CCB 068 que teve início e pico da atividade ao 12º dia de cultivo (45,91 UI L^{-1}), para os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus var. shimeji* apresentaram pico de atividade ao 12º (53,68 – 33,88 UI L^{-1}, respectivamente) e *P. ostreatus* apresentou pico de atividade ao 18º dia de incubação (8,07 UI L^{-1}).

Na atividade enzimática da peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji* e *P. ostreatus*, tiveram início ao sexto dia de incubação. Para o fungo *P. albidus* CCB 068 teve início e pico da sua atividade ao 12º dia (64,36 UI L^{-1}). Já com os

fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus var. shimeji* tiveram picos das atividades ao 18º dia de cultivo (50,54 – 35,07 UI L^{-1} respectivamente) e, *P. ostreatus* teve pico na atividade ao 12º dia (17,01 UI L^{-1}).

Entretanto para a atividade enzimática da manganês peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram início ao sexto dia de incubação e com pico das suas atividades ao 18º dia (7,54 – 8,64 – 7,03 – 10,85 UI L^{-1}, respectivamente).

Figura 8 – Atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e manganês peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, cultivado na forrageira *Panicuim maximum* cv. Aruana, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



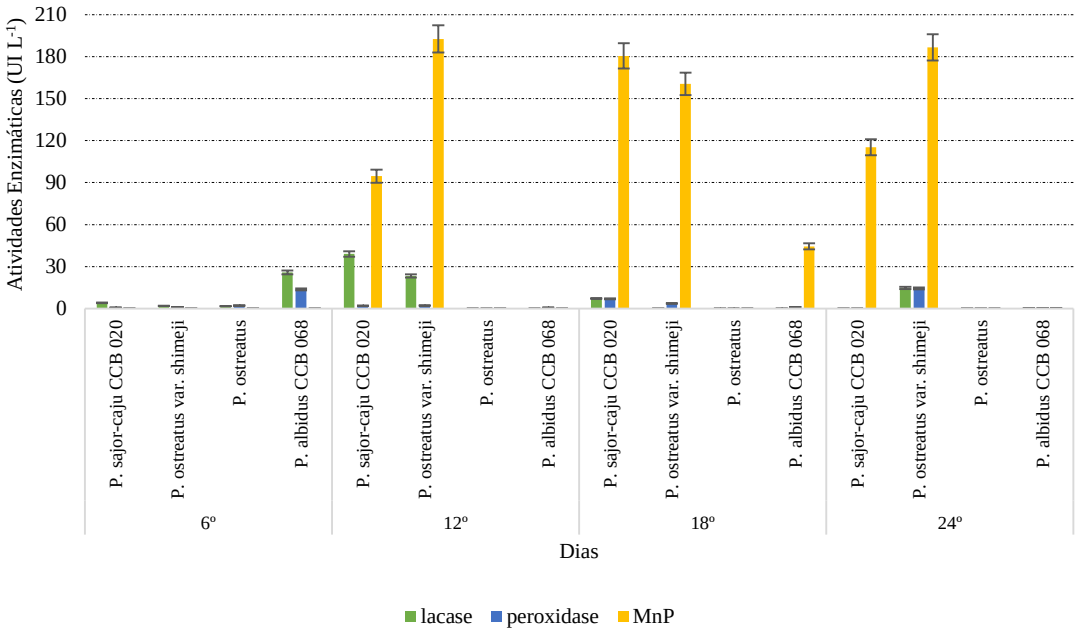
Para as atividades enzimaticas da lacase, peroxidase e MnP, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, na forrageira *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, estão demosntrados na Figura 9.

Observaram que as atividades enzimáticas da lacase no cultivo dos fungos na forrageira *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel tiveram início ao sexto dia, para os fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* (4,11 – 1,91 – 1,75 – 25,85 UI L^{-1}, respectivamente). Para *P. sajor-caju* CCB 020 *e P. ostreatus var. shimeji* os picos das suas atividades foram ao 12º dia (39,02 – 23,28 UI L^{-1}, respectivamente). Para *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 os picos foram ao sexto dia (0,14 e 25,85 UI L^{-1}, respectivamente).

Para a atividade enzimática da peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji* e *P. ostreatus* tiveram início ao sexto dia de incubação, para o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 a maior atividade foi ao 12º dia de (2,09 UI L^{-1}), para o *P. ostreatus var. shimeji* a maior atividade foi ao 24º dia (14,45 UI L^{-1}) e *P. ostreatus* teve atividade somente no sexto dia (2,32 UI L^{-1}). Já com o fungo *P. albidus* CCB 068 teve início e maior atividade ao sexto dia de incubação (13,80 UI L^{-1}).

Para a atividade enzimática da manganês peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram início ao 12º dia de incubação, sendo que somente o *P. sajor-caju* CCB 020 com maior atividade no 18º dia de (180,50 UI L^{-1}) e *P. ostreatus var. shimeji* tiveram atividades do 12º dia até ao final do período. *P. ostreatus var. shimeji* manteve a atividade alta ao redor de (192,00 UI L^{-1}). *P. albidus* CCB 068 apresentou atividade somente ao 18º dia (44,44 UI L^{-1}) e *P. ostreatus* não apresentou atividade da MnP.

Figura 9 – Atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e manganês peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, cultivado na forrageira *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



Para os resultados sobre as atividades enzimaticas da lacase, peroxidase e MnP, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, na forrageira bagaço de cana-de-açúcar, como mostra a Figura 10.

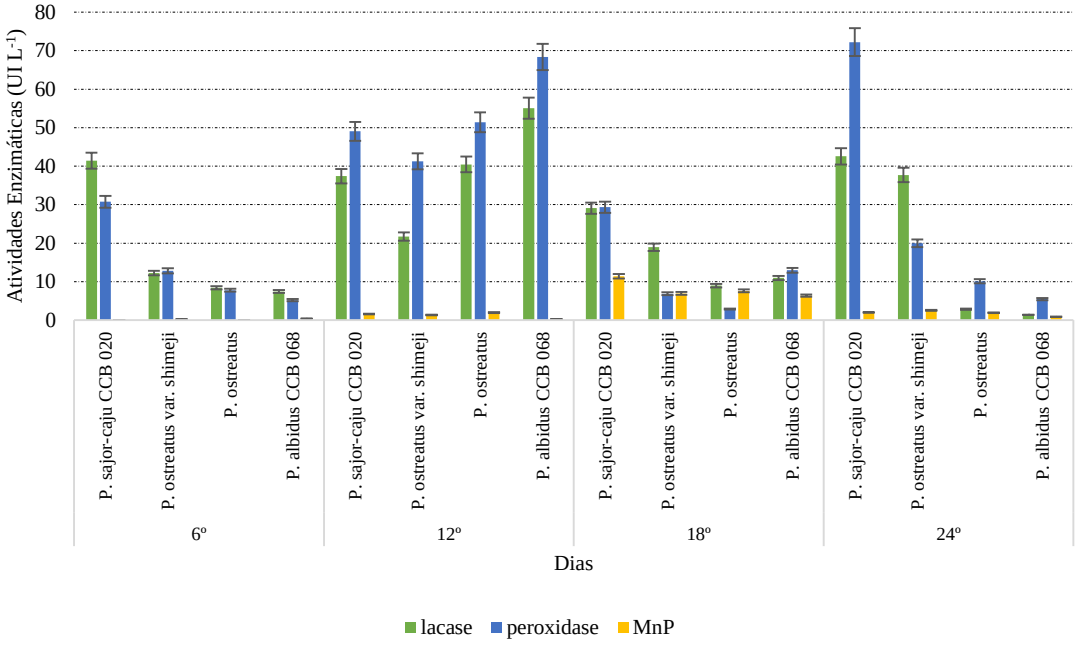
A atividade enzimática da lacase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 em bagaço de cana-de-açúcar tiveram início ao sexto dia de incubação, para os fungos *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram pico da atividade ao 12º dia de cultivo (40,45 – 55,05 UI L^{-1}, respectivamente), já os fungos *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus var. shimeji* apresentaram pico de atividade ao 18º dia (42,581 – 37,71 UI L^{-1}), respectivamente.

Entretanto para a atividade enzimática da peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji* e *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 tiveram início ao sexto dia, com pico das suas atividades ao 12º dia de incubação (49,06 – 41,27 – 51,44 e 68,35 UI L^{-1}, respectivamente). Exceção para *P. sajor-caju* CCB 020 que teve seu maior pico de atividade ao 24º dia de cultivo (72,22 UI L^{-1}).

Para a atividade enzimática da manganês peroxidase no cultivo de fungos *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 e *P. sajor-caju* CCB 020 tiveram início ao sexto

dia, com valores abaixo de (1 UI L^{-1}) e seus picos ao 18º dia (6,96 – 7,63 – 6,39 – 11,40 UI L^{-1}), respectivamente.

Figura 10 – Atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e manganês peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, cultivado na forrageira bagaço de cana-de-açúcar, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



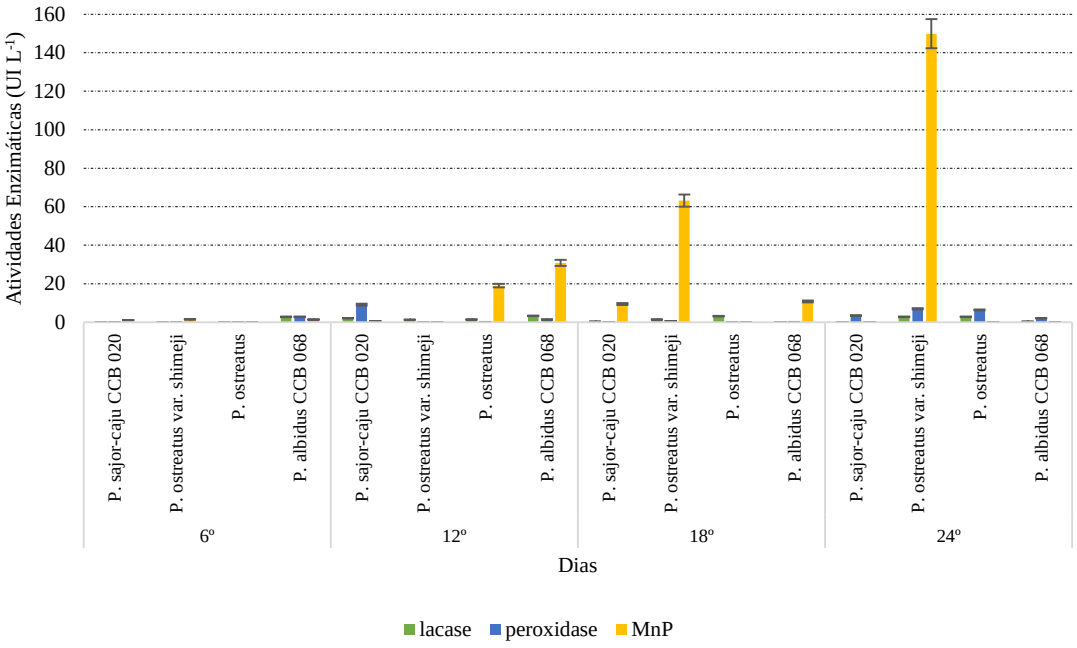
As atividades enzimaticas da lacase, peroxidase e MnP, no cultivo dos fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, na forrageira cana-de-açúcar picada, demosntrado na Figura 11.

Para a atividades enzimáticas da lacase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068 sob cana-de-açúcar picada, tiveram início ao sexto dia de incubação, para o fungo *P. albidus* CCB 068 a maior atividade ao 12º dia de cultivo (3,38 UI L^{-1}), enquanto que para *P. sajor-caju* CCB 020, teve início e maior atividade ao 12º dia de (2,05 UI L^{-1}) o mesmo ocorrendo para *P. ostreatus var. shimeji* com início no 12º e pico da atividade (2,79 UI L^{-1}) e para *P. ostreatus* início das atividades ao 12º dia e maior atividade ao 18º dia de (3,15 UI L^{-1}).

A atividade enzimática da peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, tiveram início ao sexto dia de incubação. Para o fungo *P. albidus* CCB 068 a maior atividade manteve no sexto dia cultivo (2,86 UI L^{-1}), enquanto que para *P. sajor-caju* CCB 020, teve início e maior atividade ao 12º dia de (9,16 UI L^{-1}). Para o fungo *P. ostreatus var. shimeji* teve início no 12º e pico da atividade ao 24º dia de (6,97 UI L^{-1}), o mesmo ocorrendo para *P. ostreatus* com pico de atividade 24º dia de (6,40 UI L^{-1}).

Para a atividade enzimática da manganês peroxidase no cultivo de fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. ostreatus* e *P. albidus* CCB 068, verificaram início ao sexto dia de incubação. Os picos de atividades ocorreram ao 18º dia para *P. sajor-caju* CCB 020 (9,53 UI L^{-1}) e *P. albidus* CCB 068 (30,80 UI L^{-1}), para *P. ostreatus var. shimeji* o pico foi ao 24º dia incubação (149,88 UI L^{-1}) e o *P. ostreatus*, observou atividade somente ao 12º dia (19,01 UI L^{-1}).

Figura 11 – Atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e manganês peroxidase por *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus*, cultivado na forrageira cana-de-açúcar picada, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



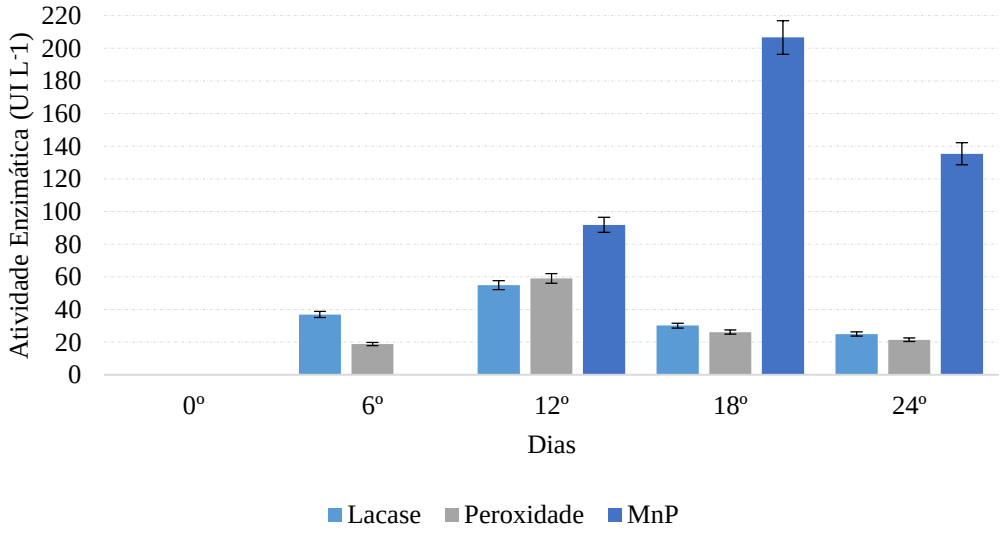
Todos os fungos exibiram respostas diferentes quanto ao crescimento e produção de enzimas em relação aos substratos lignocelulósicos utilizados, sendo observado o crescimento do micélio mais acentuado em algumas espécies de forrageiras. As enzimas tiveram seus picos de atividade em dias diferentes na mesma forrageira, variando ao redor de 30-60 UI L^{-1} para lacase. Para peroxidase os picos ficaram ao redor de 9-100 UI L^{-1} e MnP entre 6-200 UI L^{-1}. Os maiores picos de atividade enzimática de lacase foram observados em Napier com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020, e o menor para a cana-de-açúcar. Para peroxidase a maior atividade enzimática ocorreu ao 18º dia de incubação com *P. ostreatus var. shimeji* para Brachiaria e a menor para cana-de-açúcar. Para MnP a forrageira Buffel com *P. sajor-caju* CCB 020 e *P. ostreatus var. shimeji*, também ao 18º dia tiveram as maiores atividades. Na cana-de-açúcar a MnP apresentou picos maiores do que observados para Brachiaria, Napier, Aruana e bagaço, foram produzidas por quase todos os fungos, durante todo o período analisado. As possíveis explicações para as diferenças encontradas na atividade das enzimas produzidas podem estar relacionadas: à compactação do substrato que diminui a transferência de oxigênio e calor entre as partículas; à composição relativa dos polissacarídeos (quantidade de celulose e hemicelulose); à forma como esses polissacarídeos estão arranjados na parede celular vegetal (interações, tipos de ligações); à quantidade de lignina presente em cada resíduo e à forma como ela interage com a celulose e hemicelulose e à presença de compostos aromáticos nos materiais lignocelulósicos que atuam como indutores naturais na síntese e secreção de ligninases (ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINCKX, 2008).

Com estas mesmas forrageiras onde os quatros fungos cresceram e produziram enzimas em meio fermentação de estado solido FES e foram realizados posteriormente ensaio de bromatologia, produção de gases e degradabilidade *in vitro*. Foi escolhido o fungo *P. sajor-caju* CCB 020, por sua atuação nas forrageiras, para produção de enzimas em meio submerso, utilizando a vinhaça. As enzimas produzidas foram analisadas quanto as atividade enzimática e para verificar a sua utilização na transformação das forrageiras produzindo possíveis mudanças na produção de gases e degradabilidade *in vitro e* AGCC.

5.2. Produção de enzimas lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP) por *P. sajor-caju* CCB 020 crescido em vinhaça

O fungo *P. sajor-caju* CCB 020 foi cultivado em vinhaça *in natura*, durante 24 dias e as atividades enzimáticas da lacase, peroxidase e MnP, foram determinadas. Esta espécie de fungo vem sendo estudada em trabalhos anteriores no mesmo laboratório, sendo observado que a vinhaça proporciona bom crescimento do micélio, aumenta os valores das atividades enzimáticas, no período de seis a 24 dias de incubação (FERREIRA et al., 2011; SOUZA, 2012). Os resultados apresentados na Figura 12, mostram atividades enzimáticas de lacase e peroxidase e MnP. Ao 6º dia foram observados o inicio das atividades de lacase e peroxidase e tiveram maiores atividades enzimaticas no 12º dia (54,83 – 58,95 UI L^{-1}, respectivamente). Nos 12º, 18º e 24º dias de incubação, as três enzimas ligninolíticas apresentaram a MnP que teve maior atividade ao 18º dia (206,65 UI L^{-1}). Desta maneira foram utilizados os extratos enzimáticos obtidos do 6º ao 18º dia de incubação para degradação das fibras das forrageiras, verificação da produção de gases *in vitro* e AGCC.

Figura 12 – Atividades enzimáticas produzidas pelo *P. sajor-caju* CCB 020, cultivado em vinhaça *in natura*, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



A literatura confirma os dados obtidos onde se observa diferenças quanto ao perfil enzimático variando com o tempo, organismo empregado, meio e condições de cultivo (RODRIGUEZ et al. 2003).

Para Aguiar Filho (2008) as atividades de lacase e MnP em meio com bagaço de cana-de-açúcar umedecido com vinhaça, *P. sajor-caju* CCB 020, teve pico de atividade ao sexto dia e caiu próximo a zero ao nono dia, enquanto que MnP teve início no sexto dia e pico máximo ao 12º dia, com atividades de ambas as enzimas com valores bem menores (10 – 17 UI L^{-1}) que encontradas aqui. Por outro lado, as atividades encontradas por Ferreira (2009) para lacase em vinhaça *in natura*, com o pH corrigido para próximo de 7,0 e em meios com vinhaça + glicose; e vinhaça + meio sintético, aos nove dias de cultivo, com *P. sajor-caju* CCB 020, foram duas vezes superiores (400 – 450 UI L^{-1}) as encontradas aqui. No mesmo estudo, Ferreira (2009) encontrou o máximo de atividade para MnP ao 12º dia (60 – 80 UI L^{-1}) para os tratamentos de vinhaça *in natura*, vinhaça + MSF e vinhaça + glicose, indicando que o fator de estresse nutricional é um dos responsáveis para a síntese desta enzima que é comprovadamente produzida durante o metabolismo secundário dos fungos, mantendo a atividade por todo o período de avaliação (FERREIRA, 2009).

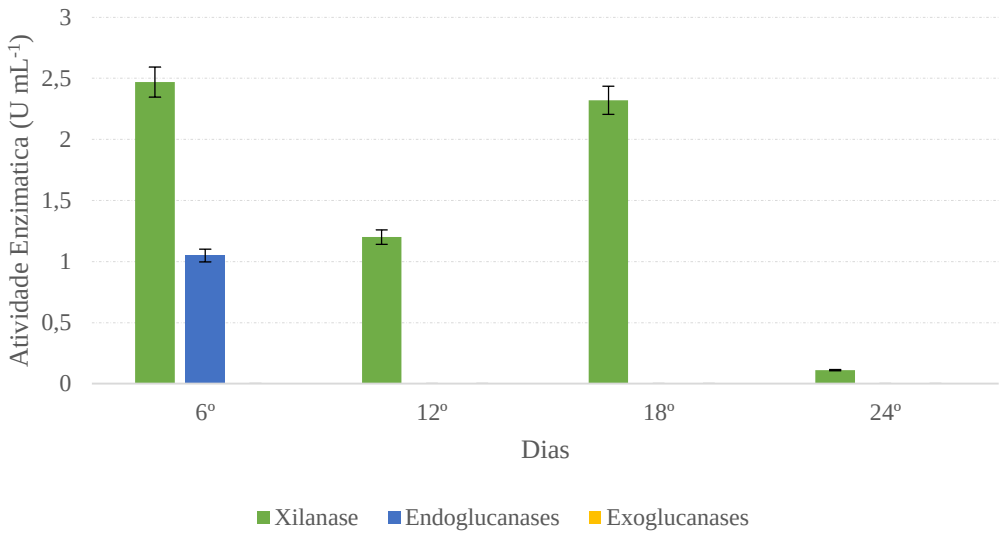
Estudos realizados por Silva (2014) utilizando o fungo *P. sajor-caju* CCB 020, cultivado em vinhaça *in natura* ao 12º dia para lacase e MnP, encontraram valores variando de (0,55±0,28 – 1,87±1,14 UI L^{-1}, respectivamente). Bitencourt (2016) avaliou a atividade enzimática de *P. sajor-caju* CCB 020, em uma 1:2 (lodo de ETA/bagaço de cana-de-açúcar, v/v), com início e pico ao 12º dia de lacase e MnP (7,53 – 3,35 UI L^{-1}). A enzima MnP aumentou a atividade ao 24º dia (9,21 UI L^{-1}) e reduziu ao 48º dia (0,32 UI L^{-1}).

5.3. Atividade enzimática de celulases e xilanases produzidas por *P. sajor-caju* CCB 020 crescido em vinhaça

Com relação à produção de enzimas extracelulares hidrolíticas, foram quantificadas a endoglucanase, exoglucanase e xilanase. O uso dessas enzimas é uma das formas de se melhorar o aproveitamento das forrageiras tropicais. O tratamento enzimático desses alimentos favorece a liberação dos açúcares fermentescíveis e, consequentemente, pode haver um aumento nos microrganismos ruminais e melhora no processo de digestão por disponibilizar mais energia metabolizável.

O fungo *P. sajor-caju* CCB 020, cultivado em vinhaça *in natura*, mostrou a presença de enzimas fibrolíticas no período analisado de 6º a 24º dias, sendo que aos seis dias foi observado atividade da enzima endoglucanase (1,05 UI mL^{-1} ±0,04) e no período todo a xilanase, demonstrado na Figura 13.

Figura 13 – Atividades enzimáticas hidrolíticas produzidas pelo *P. sajor-caju* CCB 020, cultivado em vinhaça *in natura*, durante 24 dias de cultivo, pH 6,0 a 28ºC±2



Não foi observada atividade enzimática de exoglucanase em *P. sajor-caju* CCB 020 cultivado em vinhaça *in natura*. Como a vinhaça é um composto altamente rico em nutrientes e com alto teor de fenóis, acredita-se que esses compostos possam ter inibido a atividade enzimática do fungo, como citado por Aguiar Filho (2008).

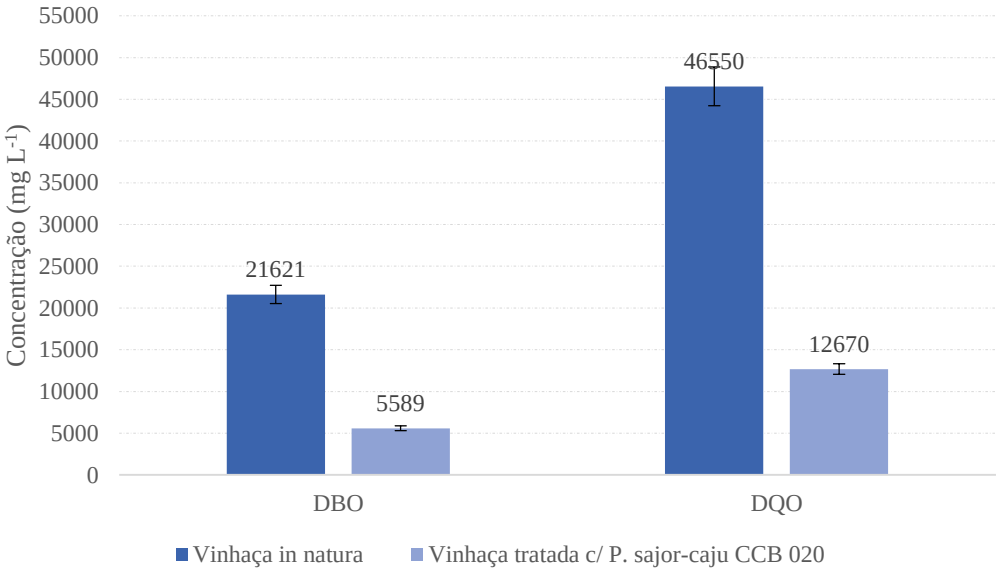
Já a atividade da xilanase produzida pelo *P. sajor-caju* CCB 020 cultivado na vinhaça *in natura* teve pico de sua atividade aos sexto e 18º dias de incubação de 2,47 e 2,32 UI mL^{-1} (±0,11), respectivamente e, a partir do 24º dia um decaimento da mesma, chegando a 0,11 UI mL^{-1} (±0,05).

Poucos estudos foram publicados com relação aos possíveis efeitos de enzimas ligninolíticas sobre a degradabilidade das fibras vegetais e testaram a adição direta dessas enzimas em dietas de ruminantes. Alguns estudos foram conduzidos para identificar basidiomicetos da decomposição branca que podem degradar as ligações entre a lignina preservando as fibras de celulose, e desse modo melhorar a qualidade dos substratos lignocelulósicos para alimentação de ruminantes (KARUNANANDAA; VARGA, 1996). São, também, poucos os estudos realizados com a utilização de enzimas em forrageiras tropicais, e tais pesquisas envolvem os mecanismos de ação de celulase e xilanase (KRUEGER; ADESOGAN, 2008). Em adição, pouca atenção tem sido dada ao estudo simultâneo de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas por estes fungos (RODRIGUES et al. 2008).

5.4. Análise físico-química da *vinhaça in natura*

A incubação de *P. sajor-caju* CCB 020 em vinhaça *in natura*, resultou em uma redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) em cultivo submerso, após incubação a 28 ºC±2, por 24 dias (Figura 14).

Figura 14 – Análise de demanda biológica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) antes e após 24º dia de tratamento da vinhaça *in natura* com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 a 28 ºC ±2



O processo de biodegradação pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020 resultou em alterações nas características físico-químicas da vinhaça quando comparada com a vinhaça *in natura*, (Tabela 5). Os parâmetros analisados ao 24º dia obtiveram redução na maioria dos parâmetros analisados, tais como N-Kjeldahi (97%), sólidos suspensos totais (96%), fenóis (87%), nitrogênio total (78%), DBO (74%), DQO (73%), cálcio (69%), potássio (48%), fósforo (41%) e nitrito (8%). Por último a quantidade de magnésio, sólidos dissolvidos totais, sulfato e nitroato apresentaram-se 14, 1,02, 4,21 e 1,23 vezes maior quando comparado com a vinhaça *in natura*. O sódio apresentou maior quando comparada com vinhaça *in natura*, característica na qual se teve a adição de NaOH, para o ajuste do pH 6,0 da vinhaça.

Segundo Freire e Cortez (2000), o potássio é o mineral mais abundande presente na vinhaça, seguidos de sulfato, nitrogênio, cálcio, magnésio, nitato, fosforo e nitrito. Estes dados estão de acordo coma composição mineral presente na vinhaça utilizada no presente trabalho.

A concentração de fósforo em vinhaça tratada foi 1,70 vezes menor quando compadado a não tratada e a vinhaça proveniente do mosto de caldo de cana relatada por Freire e Cortez (2000), enquanto so valores de cálcio e potássio foram 3,2 e 1,91 vezes menor que a vinhaça *in natura*.

Tabela 5 – Caracterização de resíduo de vinhaça *in natura* e vinhaça tratada com *P. sajor-caju* CCB 020, por 24 dias, 28 ºC±2

Parâmetros	**Vinhaça *in natura***	**Vinhaça tratada**
pH (20ºC)	4,27	5,94
Condutividade (µS cm^{-1})	13,04	13,10
DBO (mg L^{-1})	21621	5589
DQO (mg L^{-1})	46550	12670
Cálcio (mg L^{-1})	98,2	30,6
Fósforo (mg L^{-1})	1,96	1,16
Índice de Fenóis (mg L^{-1})	0,54	0,07
Magnésio (mg L^{-1})	35,8	497
Potássio (mg L^{-1})	12434	6487
Sódio (mg L^{-1})	22,4	1112
Sólidos Dissolvidos Totais (ppm)	20820	21310
Sólidos Suspensos Totais (ppm)	16400	586
Sulfato (mg L^{-1})	1128	4752
N-Kjeldahi (mg L^{-1})	161	4,45
Nitrato (mg L^{-1})	30,5	37,7
Nitrito (mg L^{-1})	1,19	1,09
Nitrogênio total (mg L^{-1})	193	43,2

O tratamento de vinhaça safra (2007/2008), realizado por Ferreira et al. (2011), com a mesma linhagem de fungo obteve redução nos parâmetros de DBO (75,29%), DQO (82,76%) e potássio (7,87%). Provavelmente, ocorre esta diferença na porcentagem de eficiência do tratamento, por se tratar de vinhaça, um subproduto que possui composição química variável, sendo dependente do mosto utilizado durante o processo industrial.

Na realização do processo de biodegradação pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020 no tratamento da vinhaça *in natura*, safra (2015/2016), por Bitencourt (2016), foi observado redução da condutividade$_{(Inicial)}$ = 13,04 µS cm^{-1} para 1,54 µS cm^{-1}, DBO$_{(Inicial)}$ = 31128 mg L^{-1} para uma DBO$_{(Final)}$ = 6135 mg L^{-1} com eficiência (80%) e DQO$_{(Inicial)}$ = 50500 mg L^{-1}

para uma $DQO_{(Final)}$ = 6400 mg L^{-1} com eficiência (88%), $Potássio_{(Inicial)}$ = 12434 mg L^{-1} para um $Potássio_{(Final)}$ = 5567 mg L^{-1} com eficiência (53%) e $Sódio_{(Inicial)}$ = 52,7 mg L^{-1} para $Sódio_{(Final)}$ = 501 mg L^{-1} devido ao ajuste de pH 4,2 para pH 6,0.

De acordo com Chang e Miles (1989) e Wadt (2008), os minerais mais abundantes dos cogumelos são sódio, potássio, fósforo e magnésio, sendo os minerais absorvidos do substrato pelo micélio e transferidos para os corpos de frutificação, o que mostra a importância do uso da vinhaça como substrato para o crescimento do *Pleurotus.*

Sendo assim os valores de sódio e potássio disponíveis foram avaliados nos micélios do *P. sajor-caju* CCB 020 e foram de 10 e 77 g kg^{-1}, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Minerais absorvidos pelo micélio do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, período de 24 dias 28 ºC± 2

Parâmetros	**Vinhaça *in natura***	**Elementos absorvidos pelo micélio**
Potássio (g kg^{-1})	6217	77
Sódio (g kg^{-1})	53	10

Com os resultados obtidos da vinhaça tratada, o uso sistema vinhaça *in natura* com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 pode ser aplicada em processos de remoção de cor e na degradação de compostos, ocorrendo destoxificação e melhora na sua qualidade podendo ser indicada como água de reuso e produção de enzimas de interesse biotecnológico ambiental, viabilizando a degradação da fração fibrosa das forrageiras corroborando com aumento no consumo das forragerias.

5.5. Caracterização do bagaço cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado, apresentou um pH próximo na neutralidade; alta relação C/N e vários elementos essenciais para desenvolvimento de outros organismos (Tabela 7).

Tabela 7 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

Parâmetros	**Bagaço de cana-de-açúcar**
pH	6,70
Umidade (%)	38,19
Matéria Orgânica (%)	79,13
C (%)	45,90
N (%)	0,80
P_2O_5 (g kg^{-1})	3,80
K_2O (g kg^{-1})	4,00
CaO (g kg^{-1})	1,54
MgO (g kg^{-1})	2,00
SO_4 (g kg^{-1})	2,00
Cu (mg kg^{-1})	9,70
Fe (mg kg^{-1})	1044,20
Mn (mg kg^{-1})	75,80
Zn (mg kg^{-1})	16,40
C/N (C e N total) (%)	57,38

Fonte: Bitencourt (2016)

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido utilizado como “suporte” ou “estrutura” para o desenvolvimento de fungos, sendo fonte de carbono e aeração. Tem sido utilizado na produção de enzimas, descoloração de corantes de indústrias têxteis, descoloração de vinhaça e inóculo do fungo para produção comercial de cogumelos do tipo shimeji e shitake (DELLAMATRICE, 2005; POMPEU, 2010; FERREIRA et al., 2010; SOUZA, 2012; SILVA, 2014; SANTOS, 2014). Santos (2014) e Bitencourt (2016) utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar inoculado com *P. sajor-caju* CCB 020 para biorremediação do lodo de Estação de Tratamento de Água (ETA).

5.6. Caracterização bromatológica das forrageiras

O estudo da composição química e bromatológica dos alimentos é o ponto de partida para o entendimento dos processos fisiológicos responsáveis pela transformação dos compostos complexos até a formação de produtos de origem animal, principalmente em função da disponibilidade de energia e de outros nutrientes (LIMA, 2004).

A composição química das forrageiras Buffel, bagaço de cana-de-açúcar, Aruana, Napier, cana e Brachiaria apresentaram grande variação dos valores analisados em g kg^{-1} de MS, sendo significativamente diferentes (Tabela 8). Os maiores valores para MS foram para Buffel, para MO a cana, para FDN o bagaço, para FDA o maior valor foi para bagaço e o menor valor para Brachiaria, para Lignina o bagaço, para proteínas o Napier, para celulose o Napier e para hemicelulose a Aruana. Os pequenos valores da porcentagem de proteína bruta e minerais e alto conteúdo em fibras evidenciam o baixo valor nutritivo das forrageiras tropicais. As altas temperaturas promovem rápido crescimento das plantas o que aumenta o teor dos componentes da parede celular e, portanto, aumenta o teor das fibras e consequentemente o teor de FDN e da matéria seca (ALENCAR et al., 2014). Segundo Van Soest, Robertson e Lewis (1991) o conteúdo de FDN é considerado um dos principais fatores limitante no consumo dos volumosos, corresponde ao conteúdo total dos constituintes da parede celular e quando presentes em valores superiores a 55 – 60% da MS correlacionam de modo negativo com o consumo da forrageira. Os teores de proteína bruta inferiores a 7% da MS promovem redução na digestibilidade, devido níveis inadequados para o bom desenvolvimento da comunidade microbiana ruminal (VAN SOEST 1994). A porcentagem de FDA em relação a matéria seca foi avaliada em ordem decrescente Bagaço 93%, Aruana 80%, Buffel 76%, Napier 70%, Brachiaria 64% e cana 45%. A porcentagem de proteínas em relação a MS foi Napier 17,80%, Brachiaria 15,64%, Aruana 15,28%, bagaço 4,31% e cana picada 3,11%. Pode-se concluir que das forrageira avaliadas o capim Napier é o que apresenta maior quantidade de proteína e portanto, maior promoção de crescimento, além de favorável quantidade de FDN/FDA. O capim Aruana seria o segundo e Brachiaria o terceiro considerando a composição química total avaliada.

Tabela 8 – Composição química dos diferentes volumosos em (g kg^{-1} MS)

Parâmetros	Aruana	Bagaço	Brachiaria	Buffel	Cana	Napier
Matéria Seca	940,68	954,27	906,56	958,55	916,63	938,44
Matéria Orgânica	897,58	932,00	880,46	879,58	984,57	885,78
Fibra em Detergente Neutro	749,35	887,12	581,31	726,00	414,25	659,83
Fibra em Detergente Ácida	480,24	676,80	343,50	525,90	292,50	410,88
Lignina	138,49	263,60	74,78	131,32	73,61	102,12
Proteína Bruta	143,78	41,14	141,80	59,08	28,51	167,00
Celulose	341,75	410,16	268,70	394,57	218,90	308,74
Hemicelulose	269,11	213,35	237,82	200,10	121,75	248,95

5.7. Avaliação bromatológica das fibras vegetais das forrageiras tratadas com os fungos

Em estudos observados por Schimidt et al. (2003b), relatam a importância do tratamento biológico de subprodutos e resíduos agroindustriais, principalmente pela utilização de fungos basidiomicetos. Esse tratamento tem por finalidade alterar a parede celular, química e estruturalmente, permitindo que haja maior ação das enzimas produzidas pela microbiota ruminal. Estudos recentes indicam que o pré-tratamento biológico pode melhorar a hidrólise enzimática da lignocelulose além de ter vantagens como o baixo consumo de energia (YU et al., 2009). Os basidiomicetos, especialmente os fungos da decomposição branca, que podem degradar eficientemente a lignina, são frequentemente usados no pré tratamento biológico da lignocelulose, com algumas variações na taxa relativa de degradação dos carboidratos e da lignina (HATAKKA, 2001). Essas modificações são refletidas nas propriedades bromatológicas do material fermentado.

Os basidiomicetos de decomposição branca possuem habilidade para degradar celulose, hemicelulose e lignina em compostos de baixo peso molecular, devido a sua capacidade para sintetizar enzimas extracelulares hidrolíticas e oxidativas (ELISASHVILI et al., 2008; ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINCKX, 2008) que podem ser assimilados pelos fungos para nutrição, crescimento e obtenção de energia (KIRK; FARRELL, 1987; ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990).

As Tabelas 9 à 12 apresentam os dados da composição bromatológica das forrageiras tropicais com os fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var. shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus* crescidos por 24 dias. Após o tratamento, nos diferentes dias, foi constatado mudanças na composição química do material tratado em relação à composição original.

O material avaliado foi retirado a cada seis dias de incubação, quando as forrageiras estavam cobertas com micélio dos fungos inoculados. O desenvolvimento dos micélios é peculiar para cada fungo, sendo também importante o tempo de incubação na análise. Em geral, as modificações de interesse, (proteina e carbohidratos), observadas nas fibras ocorreram do sexto ao 24º dia. É importante salientar que o fungo secreta enzimas para o meio extracelular com o intuito de despolimerizar as fibras, celulose, hemicelulose e lignina, para utilizar os produtos da reação, como fonte de energia e nutrientes para seu crescimento e manutenção.

Sendo assim foi possível observar que houve aumento da matéria seca, isto é aumento na composição (forrageira + fungo), pois não é possível aumentar a biomassa, uma vez que, não houve entrada de fonte de carbono no sistema, bem como os demais parâmetros apresentam transformação na composição.

As características químicas das forrageiras inoculadas com os fungos foram comparadas com o controle e foi observado o aumento e/ou diminuição com o passar dos dias de incubação. Com os fungos *P. sajor-caju CCB 020* e *P. ostreatus var. shimeji* houve aumento da MS, MO, FDA e diminuição de FDN, lignina e proteínas. *P. albidus* CCB 068, diferente de outros fungos, aumentou consideravelmente a quantidade de proteínas das forrageiras e principalmente na cana-de-açúcar picada, com diminuição na quantidade nos capins Napier e Buffel. *P. ostreatus* também aumentou a quantidade de proteínas na cana-de-açúcar com diminuição nos capins Napier, Aruana e bagaço de cana-de-açúcar ($p<0,05$).

Na Tabela 9 observa-se o resultado do tratamento com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020, após o 24º dia de incubação, em relação com a amostra controle, sobre a *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk apresentaram reduções de aproximadamente 3% no teor de FDN, 8 % de FDA, 29% de Lig, 8% de PB, 2% de Cel e um aumento de 5% no teor de H-cel. Para o *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier observaram reduções de aproximadamente 4% no teor de FDN, 5% de FDA, 2% de Lig, 12% de PB, 6% de Cel e 3% de H-cel. Para o *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel ocorreram reduções em 5% de FDA, 12% de Lig, 20% de PB e 3% de Cel e aumentos aproximados de 1% de FDN e 14% no teor de H-cel. Para o *Panicum maximum* cv. Aruana apresentaram reduções em 8% no teor de FDN, 21% de Lig, 10% de PB e 27% de H-cel e aumentos de 3% de FDA e 12 % no teor de Cel. No bagaço de cana-de-açúcar observaram reduções de 11% de FDN, 3% de FDA, 51% de Lig, 15% de PB e 35 % de H-cel e um aumento de 21% de Cel. E com a cana-de-açúcar picada ocorreram reduções em 16% de PB e 9% no teor de H-cel e aumentos de 6% de FDN, 11% de FDA, 19% de Lig e 9% no teor de Cel.

Tabela 9 – Avaliação da composição química dos capins submetido ao tratamento biológico com fungo *P. sajor-caju* CCB 020, por 24 dias. Os resultados foram expressos em (g kg^{-1} MS)

	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**								
Controle	906,57 ^{B}	880,46 ^{A}	581,32 ^{C}	343,50 ^{A}	74,78 ^{A}	141,79 ^{A}	268,71 ^{A}	237,82 ^{D}
6º	911,26 ^{B}	888,30 ^{A}	578,76 ^{C}	339,31 ^{BC}	61,89 ^{A}	112,38 ^{C}	277,42 ^{A}	239,45 ^{C}
12º	944,57 ^{A}	888,35 ^{A}	618,46 ^{A}	336,40 ^{C}	73,79 ^{A}	117,17 ^{C}	262,61 ^{A}	282,06 ^{A}
18º	947,16 ^{A}	873,13 ^{A}	589,43 ^{B}	341,39 ^{BA}	79,02 ^{A}	122,05 ^{BC}	262,37 ^{A}	248,04 ^{B}
24º	944,57 ^{A}	869,40 ^{A}	565,01 ^{D}	315,64 ^{D}	52,92 ^{A}	130,76 ^{BA}	262,71 ^{A}	249,38 ^{B}
E. P. M.	2,52	9,82	1,78	1,28	389,85	4,03	389,92	0,51
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	1,000	<0,01
***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	938,44 ^{B}	885,78 ^{A}	659,83 ^{B}	410,88 ^{C}	102,13 ^{A}	167,00 ^{A}	308,74 ^{A}	248,95 ^{B}
6º	930,97 ^{C}	899,98 ^{A}	692,28 ^{A}	426,70 ^{A}	75,72 ^{A}	139,93 ^{B}	350,97 ^{A}	265,59 ^{A}
12º	948,12 ^{A}	897,84 ^{A}	652,25 ^{C}	415,32 ^{B}	80,66 ^{A}	135,44 ^{B}	334,65 ^{A}	236,93 ^{D}
18º	944,31 ^{BA}	896,13 ^{A}	576,30 ^{E}	335,70 ^{E}	55,49 ^{A}	137,88 ^{B}	280,21 ^{A}	240,60 ^{C}
24º	945,41 ^{BA}	890,33 ^{A}	632,61 ^{D}	390,65 ^{D}	100,00 ^{A}	147,13 ^{B}	289,76 ^{A}	241,96 ^{C}
E. P. M.	2,52	9,82	1,78	1,28	389,85	4,03	389,92	0,51
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	1,000	<0,01
***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	958,56 ^{A}	879,58 ^{A}	726,00 ^{CD}	525,89 ^{A}	131,32 ^{A}	59,08 ^{A}	394,58 ^{A}	200,10 ^{D}
6º	935,97 ^{C}	903,60 ^{A}	756,87 ^{B}	507,71 ^{B}	154,71 ^{A}	49,00 ^{A}	353,01 ^{A}	249,16 ^{A}
12º	959,66 ^{A}	898,90 ^{A}	777,63 ^{A}	527,98 ^{A}	133,87 ^{A}	52,24 ^{A}	394,12 ^{A}	249,65 ^{A}
18º	948,48 ^{B}	893,93 ^{A}	725,57 ^{D}	484,70 ^{D}	97,15 ^{A}	53,02 ^{A}	387,55 ^{A}	240,87 ^{B}
24º	964,06 ^{A}	883,77 ^{A}	730,76 ^{C}	496,78 ^{C}	114,82 ^{A}	47,40 ^{A}	381,96 ^{A}	233,98 ^{C}
E. P. M.	2,52	9,82	1,78	1,28	389,85	4,03	389,92	0,51
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	1,000	<0,01
***Panicum maximum* cv. Aruana**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	940,68 ^{C}	897,58 ^{A}	749,35 ^{A}	480,24 ^{D}	138,49 ^{A}	143,18 ^{A}	341,75 ^{A}	269,11 ^{A}
6º	951,52 ^{B}	896,58 ^{A}	726,28 ^{B}	516,44 ^{A}	148,75 ^{A}	119,01 ^{CB}	367,68 ^{A}	212,84 ^{C}
12º	953,83 ^{B}	891,15 ^{A}	722,63 ^{C}	503,55 ^{B}	171,07 ^{A}	120,93 ^{CB}	332,49 ^{A}	219,07 ^{B}
18º	981,91 ^{A}	889,27 ^{A}	638,80 ^{E}	448,18 ^{E}	83,61 ^{A}	115,25 ^{C}	364,57 ^{A}	190,62 ^{E}
24º	929,89 ^{D}	909,65 ^{A}	690,93 ^{D}	495,79 ^{C}	108,53 ^{A}	128,62 ^{B}	387,26 ^{A}	195,14 ^{D}
E. P. M.	2,52	9,82	1,78	1,28	389,85	4,03	389,92	0,51
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	1,000	<0,01
Bagaço de cana-de-açúcar								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	954,27 ^{A}	931,91 ^{A}	887,12 ^{A}	673,77 ^{B}	263,60 ^{A}	41,13 ^{A}	410,17 ^{A}	213,35 ^{A}
6º	947,66 ^{AB}	949,25 ^{A}	878,06 ^{B}	696,04 ^{A}	225,62 ^{A}	22,98 ^{B}	470,42 ^{A}	182,02 ^{B}
12º	954,60 ^{A}	940,16 ^{A}	828,68 ^{C}	653,11 ^{C}	160,71 ^{A}	29,64 ^{AB}	492,40 ^{A}	175,57 ^{C}
18º	946,31 ^{B}	932,01 ^{A}	737,19 ^{E}	592,62 ^{D}	77,56 ^{A}	30,00 ^{AB}	515,06 ^{A}	144,56 ^{D}
24º	933,12 ^{C}	935,51 ^{A}	787,58 ^{D}	649,60 ^{C}	130,48 ^{A}	35,03 ^{A}	519,12 ^{A}	137,98 ^{E}
E. P. M.	2,52	9,82	1,78	1,28	389,85	4,03	389,92	0,51
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	1,000	<0,01
Cana-de-açúcar picada								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	916,64 ^{B}	984,57 ^{A}	414,25 ^{D}	292,50 ^{E}	73,61 ^{A}	28,50 ^{A}	218,89 ^{A}	121,75 ^{C}
6º	919,38 ^{B}	981,68 ^{A}	427,42 ^{C}	312,20 ^{C}	128,49 ^{A}	25,96 ^{A}	183,71 ^{A}	115,23 ^{D}
12º	932,82 ^{A}	886,89 ^{B}	573,30 ^{A}	358,12 ^{A}	98,73 ^{A}	23,22 ^{A}	259,39 ^{A}	215,17 ^{B}
18º	938,13 ^{A}	869,75 ^{B}	572,27 ^{A}	299,66 ^{D}	100,30 ^{A}	23,08 ^{A}	199,36 ^{A}	272,61 ^{A}
24º	900,01 ^{C}	884,02 ^{B}	440,01 ^{B}	328,89 ^{B}	90,66 ^{A}	24,03 ^{A}	238,23 ^{A}	111,11 ^{E}
E. P. M. †	2,52	9,82	1,78	1,28	389,85	4,03	389,92	0,51
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	1,000	1,000	1,000	<0,01

† E.P.M. = erro padrão da média

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%

Na Tabela 10 observa-se o resultado do tratamento com o fungo *P. ostreatus var. shimeji*, após 24 dia de incubação, em relação com a amostra controle. Sobre a *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk apresentaram reduções em 10% de FDN, 16% de FDA, 32% de Lig, 7% de PB, 12% de Cel e 0,05% no teor de H-cel. Para a forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier observaram reduções em 15% de FDN, 16% de FDA, 35% de Lig, 8% de PB, 9% de Cel e 14% no teor da H-cel. No *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel ocorreram reduções em 3% de FDA, 15% de Lig e 14% de no teor de PB e um aumento nos teores em 1% de FDN, 0,5% de Cel e 11% no teor de H-cel. Para a *Panicum maximum* cv. Aruana apresentaram reduções em 16% de FDN, 7% de FDA, 1% de Lig, 3% de PB, 9% de Cel e 34% no teor de H-cel. No bagaço de cana-de-açúcar observaram reduções em 14% de FDN, 6% de FDA, 73% de Lig e 40% no teor de H-cel e um aumento nos teores em 6% de PB e 27% da Cel. Para a cana-de-açúcar picada ocorreram reduções em 16% de Lig e 18% no teor de PB e um aumento nos teores em 31% de FDN, 11% de FDA, 19% de Cel e 56% no teor de H-cel.

Tabela 10 – Avaliação da composição química dos capins submetido ao tratamento biológico com fungo *P. ostreatus var. shimeji*, por 24 dias. Os resultados foram expressos em (g Kg^{-1} MS)

	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
				***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**				
Controle	906,57 ^{C}	880,46 ^{A}	581,32 ^{C}	343,50 ^{A}	74,78 ^{B}	141,79 ^{A}	268,71 ^{A}	237,82 ^{D}
6º	886,56 ^{D}	887,49 ^{A}	591,59 ^{A}	326,56 ^{C}	99,38 ^{A}	123,00 ^{A}	227,17 ^{D}	265,03 ^{A}
12º	922,77 ^{B}	885,64 ^{A}	574,42 ^{D}	313,18 ^{D}	65,58 ^{D}	59,11 ^{B}	247,60 ^{B}	261,24 ^{B}
18º	952,60 ^{A}	877,61 ^{A}	586,16 ^{B}	335,79 ^{B}	68,62 ^{C}	114,42 ^{A}	267,16 ^{A}	250,37 ^{C}
24º	925,41 ^{B}	869,87 ^{A}	525,73 ^{E}	288,02 ^{E}	50,52 ^{E}	132,24 ^{A}	237,50 ^{C}	237,71 ^{D}
E. P. M. †	2,34	84,64	1,67	1,11	0,28	15,82	0,83	0,58
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
				***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**				
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	938,44 ^{B}	885,78 ^{A}	659,83 ^{B}	410,88 ^{C}	102,13 ^{B}	167,00 ^{B}	308,74 ^{C}	248,95 ^{B}
6º	906,87 ^{C}	894,01 ^{A}	671,62 ^{A}	425,79 ^{B}	84,80 ^{D}	146,33 ^{B}	340,98 ^{B}	245,83 ^{C}
12º	941,32 ^{B}	810,41 ^{A}	650,00 ^{C}	675,08 ^{A}	165,72 ^{A}	253,69 ^{A}	509,35 ^{A}	392,35 ^{A}
18º	943,17 ^{B}	885,47 ^{A}	635,18 ^{D}	410,46 ^{C}	100,60 ^{C}	147,42 ^{B}	309,86 ^{C}	224,72 ^{D}
24º	964,66 ^{A}	869,59 ^{A}	559,30 ^{E}	345,68 ^{D}	66,03 ^{E}	154,21 ^{B}	279,65 ^{D}	213,62 ^{E}
E. P. M. †	2,34	84,64	1,67	1,11	0,28	15,82	0,83	0,58
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
				***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**				
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	958,56 ^{A}	879,58 ^{A}	726,00 ^{E}	525,89 ^{A}	131,32 ^{B}	59,08 ^{A}	394,58 ^{B}	200,10 ^{D}
6º	919,85 ^{C}	895,53 ^{A}	755,98 ^{B}	493,92 ^{D}	131,25 ^{B}	40,23 ^{A}	362,67 ^{D}	262,06 ^{A}
12º	955,84 ^{A}	896,51 ^{A}	743,44 ^{C}	520,28 ^{B}	132,47 ^{A}	45,61 ^{A}	387,81 ^{C}	223,16 ^{C}
18º	944,72 ^{B}	896,10 ^{A}	771,71 ^{A}	527,03 ^{A}	122,76 ^{C}	43,59 ^{A}	404,27 ^{A}	244,68 ^{B}
24º	942,67 ^{B}	886,16 ^{A}	732,59 ^{D}	507,83 ^{C}	111,53 ^{D}	50,82 ^{A}	396,30 ^{B}	224,76 ^{C}
E. P. M. †	2,34	84,64	1,67	1,11	0,28	15,82	0,83	0,58
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	<0,01
				***Panicum maximum* cv. Aruana**				
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	940,68 ^{B}	897,58 ^{A}	749,35 ^{A}	480,24 ^{D}	138,49 ^{C}	143,18 ^{A}	341,75 ^{C}	269,11 ^{A}
6º	917,37 ^{C}	891,83 ^{A}	739,50 ^{B}	509,85 ^{A}	108,53 ^{D}	125,75 ^{A}	352,10 ^{AB}	229,65 ^{B}
12º	951,07 ^{A}	884,23 ^{A}	684,08 ^{D}	496,92 ^{B}	157,75 ^{A}	116,90 ^{A}	353,92 ^{A}	187,16 ^{C}
18º	954,81 ^{A}	876,87 ^{A}	696,55 ^{C}	488,13 ^{C}	143,00 ^{B}	132,80 ^{A}	350,16 ^{B}	208,42 ^{D}
24º	950,27 ^{A}	866,83 ^{A}	626,99 ^{E}	448,93 ^{E}	137,97 ^{C}	139,30 ^{A}	312,55 ^{D}	178,06 ^{E}
E. P. M. †	2,34	84,64	1,67	1,11	0,28	15,82	0,83	0,58
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	<0,01
				Bagaço de cana-de-açúcar				
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	954,27 ^{AB}	931,91 ^{A}	887,12 ^{B}	673,77 ^{B}	263,60 ^{A}	41,13 ^{A}	410,17 ^{E}	213,35 ^{A}
6º	927,08 ^{D}	946,15 ^{A}	904,41 ^{A}	698,07 ^{A}	204,19 ^{B}	23,47 ^{A}	493,88 ^{C}	206,34 ^{B}
12º	956,52 ^{A}	940,96 ^{A}	823,88 ^{C}	660,99 ^{C}	189,63 ^{C}	31,98 ^{A}	471,36 ^{D}	162,90 ^{C}
18º	944,42 ^{C}	935,38 ^{A}	780,65 ^{D}	633,41 ^{D}	114,45 ^{D}	27,58 ^{A}	518,95 ^{B}	147,24 ^{D}
24º	947,53 ^{BC}	913,03 ^{A}	759,03 ^{E}	630,91 ^{D}	71,55^{E}	43,76 ^{A}	559,35 ^{A}	128,12 ^{E}
E. P. M. †	2,34	84,64	1,67	1,11	0,28	15,82	0,83	0,58
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	<0,01
				Cana-de-açúcar picada				
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	916,64 ^{C}	984,57 ^{A}	414,25 ^{B}	292,50 ^{B}	73,61 ^{A}	28,50 ^{A}	218,89 ^{C}	121,75 ^{B}
6º	925,99 ^{B}	988,02 ^{A}	322,47 ^{E}	219,22 ^{E}	49,02 ^{D}	23,39 ^{A}	170,20 ^{E}	103,24 ^{D}
12º	932,82 ^{A}	886,89 ^{A}	393,64 ^{C}	287,94 ^{C}	57,03 ^{C}	23,22 ^{A}	230,91 ^{B}	105,70 ^{C}
18º	938,13 ^{A}	466,71 ^{A}	387,73 ^{D}	282,82 ^{D}	74,26 ^{A}	23,08 ^{A}	208,55 ^{D}	104,91 ^{CD}
24º	900,01 ^{D}	884,02 ^{A}	606,78 ^{A}	331,05 ^{A}	61,98 ^{B}	23,35 ^{A}	269,06 ^{A}	275,73 ^{A}
E. P. M. †	2,34	84,64	1,67	1,11	0,28	15,82	0,83	0,58
Valor – p	<0,01	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	1,000	<0,01	<0,01

† E.P.M. = erro padrão da média

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%

Na Tabela 11 observa-se o resultado do tratamento com o fungo *P. albidus*, após 24 dias de incubação, em relação com a amostra controle, sobre a *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk apresentaram reduções de 4% de Lig e 6% no teor de H-cel e um aumento nos teores em 0,5 % de FDN, 6% de FDA, 19% de PB e 8% no teor de Cel. Na forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier observaram reduções de 57% de PB, 16% de Cel e 3% no teor de H-cel e um aumento nos teores em 2% de FDN, 5% de FDA e 31% no teor de Lig. Para o *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel ocorreram reduções de 23% de FDN, 27% de FDA, 13% de Lig, 31% de Cel e 12% no teor de H-cel e aumento de 62% no teor de PB. Para a *Panicum maximum* cv. Aruana apresentaram reduções de 71% de PB e 19% no teor da H-cel e aumento nos teores em 3% de FDN, 13% de FDA, 11% de Lig e 14% no teor de Cel. No bagaço de cana-de-açúcar ocorreram reduções de 34% de FDN, 39% de FDA, 50% de Lig, 32% de PB, 33% de Cel e 19% no teor de H-cel. Para a cana-de-açúcar picada apresentaram aumentos nos teores de 32% de FDN, 13% de FDA, 33% de Lig, 81% de PB, 3% de Cel e 56% no teor de H-cel.

Tabela 11 – Avaliação da composição química dos capins submetido ao tratamento biológico com fungo *P. albidus* CCB 068, por 24 dias. Os resultados foram expressos em (g Kg^{-1} MS)

	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**								
Controle	906,57 ^{C}	880,46 ^{B}	581,32 ^{D}	343,50 ^{E}	74,78 ^{C}	141,79 ^{B}	268,71 ^{D}	237,82 ^{A}
6º	912,83 ^{C}	891,30 ^{A}	655,99 ^{A}	423,11 ^{A}	115,67 ^{A}	147,62 ^{B}	307,44 ^{B}	232,88 ^{B}
12º	944,51 ^{B}	893,89 ^{A}	632,75 ^{B}	402,08 ^{B}	98,71 ^{B}	168,19 ^{A}	303,37 ^{E}	230,67 ^{B}
18º	952,60 ^{A}	877,61 ^{B}	620,38 ^{C}	388,50 ^{C}	74,21 ^{C}	171,13 ^{A}	314,28 ^{A}	231,88 ^{BC}
24º	952,60 ^{A}	877,60 ^{B}	583,44 ^{D}	365,80 ^{D}	71,77 ^{D}	175,82 ^{A}	294,03 ^{C}	217,63 ^{D}
E. P. M. †	2,20	3,59	1,58	1,11	0,33	6,08	0,80	0,49
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	938,44 ^{B}	885,78 ^{B}	659,83 ^{E}	410,88 ^{E}	102,13 ^{E}	167,00 ^{A}	308,74 ^{C}	248,95 ^{A}
6º	930,41 ^{C}	891,15 ^{AB}	748,73 ^{A}	500,37 ^{A}	159,06 ^{B}	49,26 ^{C}	341,31 ^{B}	248,36 ^{A}
12º	950,11 ^{A}	895,25 ^{AB}	706,65 ^{B}	463,54 ^{C}	103,80 ^{D}	54,81 ^{B}	359,74 ^{A}	243,12 ^{B}
18º	943,17 ^{B}	885,47 ^{B}	687,13 ^{C}	489,02 ^{B}	183,70 ^{A}	55,49 ^{B}	305,32 ^{D}	198,11 ^{C}
24º	906,21 ^{D}	897,72 ^{A}	676,52 ^{D}	434,70 ^{D}	148,57 ^{C}	71,87 ^{B}	286,12 ^{E}	241,82 ^{B}
E. P. M. †	2,20	3,59	1,58	1,11	0,33	6,08	0,80	0,49
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	958,56 ^{A}	879,58 ^{B}	726,00 ^{A}	525,89 ^{A}	131,32 ^{C}	59,08 ^{C}	394,58 ^{A}	200,10 ^{B}
6º	917,76 ^{C}	883,05 ^{B}	708,57 ^{B}	500,65 ^{B}	146,37 ^{B}	133,28 ^{B}	354,29 ^{B}	207,92 ^{A}
12º	943,39 ^{B}	878,13 ^{B}	612,48 ^{C}	435,03 ^{C}	168,54 ^{A}	138,48 ^{B}	266,49 ^{D}	177,45 ^{C}
18º	944,72 ^{B}	896,10 ^{A}	496,24 ^{E}	344,51 ^{E}	89,51 ^{E}	142,35 ^{A}	255,00 ^{E}	151,73 ^{D}
24º	942,67 ^{B}	886,16 ^{AB}	562,02 ^{D}	385,71 ^{D}	114,57 ^{D}	157,33 ^{A}	271,15 ^{C}	176,31 ^{C}
E. P. M. †	2,20	3,59	1,58	1,11	0,33	6,08	0,80	0,49
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
***Panicum maximum* cv. Aruana**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	940,68 ^{C}	897,58 ^{B}	749,35 ^{D}	480,24 ^{D}	138,49 ^{E}	143,18 ^{A}	341,75 ^{E}	269,11 ^{A}
6º	940,56 ^{C}	948,81 ^{A}	901,73 ^{A}	859,02 ^{A}	158,29 ^{C}	32,43 ^{B}	700,73 ^{A}	42,70 ^{D}
12º	961,11 ^{A}	940,09 ^{A}	868,99 ^{B}	654,91 ^{B}	237,98 ^{A}	31,64 ^{B}	416,93 ^{C}	214,08 ^{C}
18º	954,81 ^{AB}	876,87 ^{C}	872,22 ^{B}	654,59 ^{B}	218,27 ^{B}	27,26 ^{B}	436,32 ^{B}	217,64 ^{B}
24º	950,27 ^{B}	866,83 ^{C}	774,10 ^{C}	556,27 ^{C}	155,96 ^{D}	41,15 ^{B}	400,31 ^{D}	217,83 ^{B}
E. P. M. †	2,20	3,59	1,58	1,11	0,33	6,08	0,80	0,49
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Bagaço de cana-de-açúcar								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	954,27 ^{A}	931,91 ^{B}	887,12 ^{A}	673,77 ^{A}	263,60 ^{A}	41,13 ^{A}	410,17 ^{A}	213,35 ^{A}
6º	915,60 ^{C}	981,72 ^{A}	435,34 ^{E}	314,55 ^{E}	98,07 ^{E}	23,77 ^{AB}	216,47 ^{E}	120,80 ^{E}
12º	956,52 ^{A}	940,96 ^{B}	542,60 ^{D}	383,69 ^{D}	100,57 ^{D}	20,58 ^{B}	283,11 ^{C}	158,91 ^{D}
18º	708,65 ^{D}	980,25 ^{A}	671,02 ^{B}	469,35 ^{B}	122,70 ^{C}	40,11 ^{A}	346,65 ^{B}	201,67 ^{B}
24º	931,51 ^{B}	981,59 ^{A}	581,81 ^{C}	408,47 ^{C}	132,15 ^{B}	27,97 ^{AB}	276,32 ^{D}	173,34 ^{C}
E. P. M. †	2,20	3,59	1,58	1,11	0,33	6,08	0,80	0,49
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Cana-de-açúcar picada								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	916,64 ^{D}	984,57 ^{A}	414,25 ^{D}	292,50 ^{E}	73,61 ^{C}	28,50 ^{C}	218,89 ^{D}	121,75 ^{E}
6º	942,66 ^{B}	864,24 ^{C}	611,67 ^{A}	343,28 ^{A}	85,92 ^{B}	127,06 ^{B}	257,36 ^{A}	268,39 ^{B}
12º	932,82 ^{C}	886,89 ^{B}	576,96 ^{B}	322,46 ^{C}	65,39 ^{D}	151,94 ^{A}	257,07 ^{A}	254,50 ^{C}
18º	987,80 ^{A}	834,92 ^{D}	540,59 ^{C}	302,49 ^{D}	58,71 ^{E}	125,48 ^{B}	243,77 ^{B}	238,10 ^{D}
24º	916,02 ^{D}	887,64 ^{B}	610,90 ^{A}	335,36 ^{B}	110,26 ^{A}	147,62 ^{A}	225,10 ^{C}	275,54 ^{A}
E. P. M. †	2,20	3,59	1,58	1,11	0,33	6,08	0,80	0,49
Valor – p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

† E.P.M. = erro padrão da média

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%

Na Tabela 12 observa-se o resultado do tratamento com o fungo *P. ostreatus*, após 24 dias de incubação, em relação com a amostra controle, sobre a *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk apresentou redução de 2% no teor de H-cel e aumento nos teores de 4% de FDN, 10% de FDA, 1% de Lig, 21% de PB e 12% no teor de Cel. Na forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier observaram reduções em 59% de PB e 14% de no teor de H-cel e aumento nos teores de 6% de FDN, 16% de FDA, 38% de Lig e 4% no teor de Cel. Para o *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel ocorreram reduções de 7% de FDN, 12% de FDA, 3% de Lig e 15% no teor de Cel e aumentos nos teores em 55% de PB e 5% no teor de H-cel. Para a *Panicum maximum* cv. Aruana apresentaram reduções de 71% de PB e 24% no teor de H-cel e aumentos nos teores em 12% de FDN, 26% de FDA, 43% de Lig e 15% no teor de Cel. No bagaço de cana-de-açúcar observaram reduções em 56% de FDN, 58% de FDA, 7% de Lig, 33% de PB, 46% de Cel e 50% no teor de H-cel. Para a cana-de-açúcar picada, ocorreu uma redução 16% no teor H-cel e aumentos nos teores de 17% de FDN, 26% de FDA, 2% de Lig, 80% de PB e 31% no teor de Cel.

Tabela 12 – Avaliação da composição química dos capins submetido ao tratamento biológico com fungo *P. ostreatus*, por 24 dias. Os resultados foram expressos em (g Kg^{-1} MS)

	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**								
Controle	906,57 A	880,46 A	581,32 A	343,50 B	74,78 B	141,79 B	268,71 B	237,82 A
6º	929,76 A	887,16 A	653,72 A	400,54 AB	80,88 B	175,32 A	319,66 A	253,19 A
12º	939,03 A	892,13 A	641,89 A	412,40 AB	109,75 A	181,16 A	302,66 AB	229,49 A
18º	645,26 A	888,71 A	672,95 A	430,39 A	96,34 AB	172,28 A	334,05 A	242,56 A
24º	949,53 A	894,48 A	605,77 A	380,40 AB	75,61 B	178,98 A	304,78 AB	225,38 A
E. P. M. †	33,62	8,21	37,82	24,94	8,52	7,10	17,03	12,87
Valor – p	1,000	0,999	0,997	0,989	<0,01	<0,01	<0,01	0,999
***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	938,44 A	885,78 A	659,83 C	410,88 C	102,13 D	167,00 A	308,74 C	248,95 BC
6º	813,00 B	905,89 A	916,31 A	604,23 A	196,03 A	65,89 B	408,20 A	312,08 A
12º	956,27 A	897,77 A	769,99 B	512,63 B	160,64 B	68,46 B	351,99 BC	257,36 B
18º	953,52 A	902,66 A	726,79 BC	503,61 B	129,42 C	54,54 B	374,20 AB	223,18 BC
24º	943,67 A	888,24 A	701,30 BC	486,61 B	164,46 B	68,85 B	322,15 C	214,69 C
E. P. M. †	33,62	8,21	37,82	24,94	8,52	7,10	17,03	12,87
Valor – p	1,000	0,998	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	958,56 A	879,58 A	726,00 A	525,89 A	131,32 B	59,08 C	394,58 A	200,10 A
6º	938,23 A	897,67 A	701,35 A	485,71 A	136,31 B	169,11 A	349,40 AB	215,64 A
12º	952,76 A	893,27 A	707,27 A	492,62 A	136,00 A	164,82 A	356,62 C	214,65 A
18º	953,14 A	887,79 A	694,13 A	482,40 A	102,19 C	132,27 B	380,22 AB	211,72 A
24º	948,36 A	894,70 A	672,34 A	462,49 A	127,38 B	130,97 B	335,11 B	209,84 A
E. P. M. †	33,62	8,21	37,82	24,94	8,52	7,10	17,03	12,87
Valor – p	1,000	0,999	0,999	0,999	<0,01	<0,01	<0,01	0,999
***Panicum maximum* cv. Aruana**								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	940,68 A	897,58 B	749,35 B	480,24 B	138,49 C	143,18 A	341,75 B	269,11 A
6º	943,63 A	947,10 A	897,26 A	659,88 A	236,11 B	48,53 B	423,77 A	237,38 AB
12º	956,78 A	903,08 B	867,52 A	686,94 A	309,77 A	34,08 B	377,17 AB	180,58 C
18º	936,63 A	930,89 A	870,72 A	670,78 A	259,83 B	34,92 B	410,95 A	199,93 C
24º	947,11 A	940,41 A	850,46 AB	645,70 A	242,53 B	41,47 B	403,17 A	204,75 BC
E. P. M. †	33,62	8,21	37,82	24,94	8,52	7,10	17,03	12,87
Valor – p	1,000	0,961	1,000	0,992	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Bagaço de cana-de-açúcar								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	954,27 A	931,91 AB	887,12 A	673,77 A	263,60 A	41,13 A	410,17 A	213,35 A
6º	927,08 A	946,15 A	398,58 B	283,87 B	80,49 B	32,85 A	203,38 B	114,71 B
12º	956,52 A	940,95 A	392,68 B	284,99 B	83,00 B	31,89 A	201,98 B	107,68 B
18º	944,42 A	935,38 AB	406,81 B	291,18 B	79,62 B	32,23 A	211,56 B	115,63 B
24º	947,53 A	913,03 B	392,74 B	286,13 B	65,73 B	27,60 A	220,39 B	106,61 B
E. P. M. †	33,62	8,21	37,82	24,94	8,52	7,10	17,03	12,87
Valor – p	0,999	0,993	1,000	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Cana-de-Açúcar picada								
	MS	MO	FDN	FDA	Lig	PB	Cel	H-cel
Controle	916,64 A	984,57 A	414,25 B	292,50 B	73,61 C	28,50 C	218,89 B	121,75 B
6º	927,40 A	883,03 B	569,76 A	332,20 AB	98,73 AB	164,15 A	233,47 B	237,56 A
12º	932,82 A	886,89 B	573,30 A	330,48 AB	100,30 A	153,90 AB	230,18 B	242,82 A
18º	938,13 A	869,75 B	572,27 A	344,81 AB	96,90 AB	141,46 B	247,91 B	227,46 A
24º	921,70 A	977,98 A	496,48 AB	394,27 A	75,29 BC	143,84 AB	318,98 A	102,20 B
E. P. M. †	33,62	8,21	37,82	24,94	8,52	7,10	17,03	12,87
Valor – p	0,999	0,989	1,000	1,000	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

† E.P.M. = erro padrão da média

Letras em comum na vertical implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Após o tratamento físico, realizado no momento da esterilização das forrageiras (item 4.6.1), fez com que ocorresse alterações na parede celular, permitindo maior atuação dos fungos sobre nas mesmas. Em seguida foi realizado o tratamento biológico com a inoculação dos fungos, que atuaram sobre a forrageiras por 24 dias.

A inoculação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020 sobre as forrageiras Aruana e Napier mostrou diminuição no teor de PB, para a Brachiaria, Buffel, bagaço de can-de-açúcar e cana-de-açúcar picada não foram observados, talvez pelo consumo do N, no crescimento do fungo. Também o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 não apresentou variações significativas quanto as degradações da Lig e da Cel, mas sim degradou preferencialmente a H-cel do Napier, Aruana, bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada, o mesmo não ocorrendo para a Brachiaria e Buffel.

No cultivo do *P. ostreatus var. shimeji* não apresentou significamente aumento no teor de PB para nenhuma das forrageiras. Mas o fungo *P. ostreatus var. shimeji* atuou sobre as forrageiras Brachiaria, Napier, Buffel, bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada, degradando a Lig. Para os teores de Cel e H-cel apenas ocorreram degradação nas forrageiras Napier e Aruana, nas demais forrageiras apenas a Cel, para Brachiaria e a H-cel para o bagaço de cana-de-açúcar.

Para o tratamento biológico com fungo *P. albidus* CCB 068 nas forrageiras Brachiaria, Napier e Aruana, o fungo demostrou uma afinidade em degradar H-cel de ambas as forrageiras e somente para a forrageira Brachiaria houve aumento da PB. O tratamento biológico com o Buffel demostrou melhor eficiência na ação do fungo, na degradações em todo material lignocelulósico e um aumento no teor de PB. Entretanto para a cana-de-açúcar picada não ocorreu degradação nos teores de Lig, Cel e H-cel, mas um aumento no teor de PB. No entanto para bagaço de cana-de-açúcar houveram degradações nas frações fibrosas de Lig, Cel e H-cel, não havendo aumento no teor de PB.

Para o fungo *P. ostreatus* apresentou aumento no teor de PB nas forrageiras Brachiaria, Buffel e cana-de-açúcar picada, não sendo observado nas forrageiras Napier, Aruana e bagaço de cana-de-açúcar. Na degradação da Lig apenas ocorreu no bagaço de cana-de-açúcar, não apresentaram variações significativas para as demais forrageiras, sendo preferencialmente degradada a Cel e/ou a H-cel nas demais forrageiras.

Os fungos conseguem suas exigências da decomposição da MO e constituintes celulolíticos. Isso pode explicar as mudanças do cultivo dos *Pleurotus* cultivados nas forrageiras. Estes fungos são incapazes de suprir todas as suas necessidades de C para seu crescimento/deslignificação (RUGGERI e SASSI, 2003).

O maior teor de PB apresentados em algumas nas forrageiras pode ser devido a uma das razões: a presença de microrganismos, enzimas extracelulares e ingredientes de meios residuais (BALL e JACKSON, 1995; SIDDHANT and SINGH, 2009); A captura de acesso N por fermentação aeróbica por fungos (AKINFEMI, 2010); A proliferação de fungos durante a degradação (AKINFEMI e OGUNWOLE, 2012).

Resultados semelhantes foram obtidos por (JAFARI, 2007; AKINFEMI e OGUNWOLE; 2012) onde *P. ostreatus* cultivado sobre a palha de arroz, causando um aumento da PB, teor de cinzas e diminuição no teores de H-cel, MO, FB, FDA, FDN e Lig.

Segundo Castro et al. (2004) o *P. sajor-caju* como outros fungos são eficientes em reduzir as frações FDN, FDA e aumentar o teor de PB dos substratos à base de resíduos de lixadeira de algodão.

Em estudos observados por Schmidt et al. (2003b), em tempos de incubações diferentes pelo fungo *P. ostreatus*, na avaliação do valor nutricional do feno de braquiária, por 42 dias houve redução do teor de FDN em 5% e o de H-cel em 30%; e elevou o teor de Lig em 20%, além de elevar o teor de PB em 13%. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por Schmidt et al. (2003a), que verificaram diminuição média de 15,3% no teor de FDN e 33,0% no teor de H-cel, com elevação de 39% no teor de PB, após a incubação do feno de braquiária por 35 dias, com *P. ostreatus*, nas mesmas condições.

Observou-se também que o aumento nos valores de PB foi com o decorrer da incubação, o fungo *Pleurotus* não fixa nitrogênio atmosférico, e o aumento no teor de PB do substrato deve ser atribuído à perda de carboidratos característica do crescimento fúngicos (NICOLINI et al., 1993). O teor médio de PB foi elevado em 39% entre o início e o final da incubação. Nicolini et al. (1993) observaram aumentos de 18,7% no teor de PB após 70 dias de incubação com *P. ostreatus* na palha de trigo. Já em Bisaria, Madan e Vasudevan (1997), o aumento no teor de PB, após 20 dias de incubação, foi de 141,9%, usando o mesmo fungo e volumoso, em condições de laboratório.

Contudo, Moyson et al. (1991) observaram que após 84 dias de incubação com duas espécies do gênero *Pleurotus*, houve degradação de hemicelulose e lignina (59 e 54%) e uma pequena diminuição no teor de celulose (11%).

Alguns autores afirmam que a inclusão de fonte de nitrogênio, em substratos pobres destes elementos, proporciona aumento na produção de fungo, principalmente nas espécies *P. sajor-caju* (ZADRAZIL, 1980; ROYSE; FALES; KARUNANANDAA, 1991; PERMANA et al., 2000). No entanto, Bisaria, Madan e Vasudevan (1997) destacaram a importância da suplementação proteica de substratos pobres em N, mas em pequenas doses, pois o excesso de

nitrogênio (N) também pode inibir a síntese das enzimas degradadoras da lignina, podendo, desta forma diminuir a degradação do substrato e interferir negativamente no crescimento.

Para Gonçalves (2007) em estudo com fungos, o *P. sajor-caju* e *Agaricus blazei* foram inoculados em resíduo de algodão para alimentação de ruminantes, constatou o aumento da PB, estando relacionado com a suplementação de ureia com 1% de N e com a presença de micélios dos fungos no substrato. Em relação ao *Agaricus blazei* quando desidratado, é rico em proteínas e carboidratos contendo aproximadamente 40% de PB e 38% de carboidratos (MIZUNO, 1995; MORAIS et al., 2000).

Van Soest (1994) relatou ainda que a lignina é resistente à degradação química não sendo digerida pelas bactérias do rúmen, formando, assim, complexas associações com a celulose e a hemicelulose, reduzindo a digestibilidade da fibra.

Os fungos do gênero *Pleurotus* destacam-se por apresentar alto valor nutritivo, pouca exigência em relação ao substrato e, segundo Platt, Hadar e Chet (1984), produzem um complexo enzimático que inclui, entre outras, as enzimas celulase, hemicelulase, lignase e lacase. A lacase, uma fenol-oxidase característica dos basidiomicetos causadores da podridão branca, degrada lignina fenólica e não fenólica, produzindo ácidos aromáticos (BUSWELL; ODIER; KIRK, 1987). Cultivando *Pleurotus ostreatus 'florida'* sobre palha de arroz, Platt, Hadar e Chet (1984) afirmaram que 40 a 50% do conteúdo de lignina pode ser diminuído em um período de 35 a 45 dias, sendo que a degradação da lignina é maior durante a fase inicial de colonização do substrato.

Berger et al. (1994) citaram trabalhos nos quais a fermentação sólida de resíduos lignocelulósicos acarretou perdas de matéria seca de 17 a 42%. Segundo estes autores, estas perdas, bem como o longo tempo necessário para o tratamento, são as principais desvantagens do uso de fungos da podridão branca no tratamento biológico. Os resultados obtidos no estudo discordam deste, testando as quatro espécies de fungo, no período de 24 dias, nas seis forrageiras a tendência foi de aumento da MS.

Essas características químicas das forrageiras após 24 dias de tratamento biológico, juntamente com o tratamento físico, muito também se deve as diferenças no tocante à parede celular, podem ser atribuídas a melhor crescimento dos fungos nas forrageiras. E o aumento do teor de PB das forrageiras deve ser atribuídas a perda de carboidratos, características do crescimento dos fungos e também a adição de N presente na vinhaça na inoculação dos fungos nas forrageiras.

É possível inferir que o tratamento de forrageiras com os fungos é uma alternativa interessante e que pode vir a ser usado como ingrediente alimentar nas dietas, com o cuidado do tempo de incubação e escolha da espécie do fungo inoculado na forrageira. Uma análise da qualidade das proteínas presentes poderia ajudar a concluir qual o melhor tratamento.

5.8. Avaliação da produção de gases e degradabilidade *in vitro* pós tratamento biológico

A técnica *in vitro* de produção de gases é capaz de simular o ambiente ruminal e a digestão enzimática; também descrevem a cinética de fermentação ruminal e estimam o consumo, sendo dessa forma, uma opção para o estudo de diversos alimentos utilizados na dieta de ruminantes (THEODOROU et al., 1994).

No presente experimento, com a técnica de produção de gases, foi avaliado seis forrageiras tropicais cuja composição bromatológica foi determinada conforme item 5.7. e experimento de avaliação da degradabilidade conforme consta no item 4.10 do material e métodos. As Tabelas 13 a 16 mostram o perfil de produção de gases, indicando os valores de produção total de gases em 24 horas.

O fungo *P. sajor-caju* CCB 020 crescido na forrageira Brachiaria, apresentou diminuição nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg) em 1,56 – 1,75 – 2,20 – 1,12 – 1,43 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação.

Para a forrageira Napier, os resultados mostraram diminuição nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD) e PG (mL/g FDND) em 1,23 – 1,29 – 1,53 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não apresentaram variações significativas para MOVD (g/kg) e FDND (g/kg).

Para a forrageira Buffel, observou uma diminuição nos parâmetros PG (mL/g MOVD), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg) em 1,62 – 1,38 – 1,53 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 12º dia de incubação. Não apresentaram efeitos significativos para PG_{24} (mL/g MS) e PG (mL/g FDND).

Para a forrageira Aruana, foi verificado um aumento no parâmetro MOVD (g/kg) em 1,20 vezes em relação a amostra controle com decorrer do 24º dias de incubação. Não diferenciaram estatisticamente para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e FDND (g/kg).

Para o bagaço de cana-de-açúcar, observou um aumento no parâmetro MOVD (g/kg) em 1,76 vezes em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não

apresentaram efeitos significativos para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e FDND (g/kg).

Para a cana-de-açúcar picada, foi encontrado uma diminuição no parâmetro PG (mL/g MOVD) em 1,17 vezes em relação a amostra controle com decorrer do 18º dias de incubação. Para os parâmetros PG (mL/g FDND) e FDND (g/kg) apresentaram aumento de 4,48 e 4,98 vezes em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Não apresentaram variações significativas para PG_{24} (mL/g MS) e MOVD (g/kg).

Tabela 13 – Parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro* das forrageiras, sob influência do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, em 24 dias de cultivo

	***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	160,33 ^{A}	152,52 ^{A}	142,20 ^{A}	108,59 ^{B}	102,24 ^{B}	9,21	<0,01
PG (mL/g MOVD)	93,26 ^{A}	85,93 ^{A}	82,99 ^{A}	54,30 ^{B}	53,15 ^{B}	6,07	<0,01
PG (mL/g FDND)	58,74 ^{A}	50,32 ^{A}	57,16 ^{A}	28,17 ^{B}	26,71 ^{B}	6,32	<0,01
MOVD (g/kg)	581,70 ^{A}	563,26 ^{AB}	582,43 ^{A}	500,20 ^{B}	515,85 ^{AB}	26,6	0,005
FDND (g/kg)	366,43 ^{A}	329,68 ^{AB}	400,20 ^{A}	259,64 ^{B}	255,02 ^{B}	36,1	0,001
	***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	146,36 ^{A}	133,45 ^{AB}	118,97 ^{B}	126,44 ^{AB}	120,51 ^{AB}	9,21	0,027
PG (mL/g MOVD)	77,34 ^{A}	65,33 ^{AB}	60,81 ^{AB}	66,60 ^{AB}	59,77 ^{B}	6,07	0,041
PG (mL/g FDND)	53,71 ^{A}	44,90 ^{AB}	38,91 ^{AB}	33,40 ^{B}	35,03 ^{B}	6,32	0,013
MOVD (g/kg)	524,48 ^{A}	488,61 ^{A}	511,17 ^{A}	527,12 ^{A}	495,18 ^{A}	26,6	0,511
FDND (g/kg)	361,65 ^{A}	335,18 ^{A}	327,12 ^{A}	264,67 ^{A}	289,53 ^{A}	36,1	0,072
	***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	117,02 ^{A}	114,49 ^{A}	100,15 ^{A}	102,15 ^{A}	106,02 ^{A}	9,21	0,274
PG (mL/g MOVD)	48,86 ^{A}	40,84 ^{AB}	30,20 ^{B}	35,02 ^{AB}	43,20 ^{AB}	6,07	0,031
PG (mL/g FDND)	34,44 ^{A}	26,56 ^{A}	19,29 ^{A}	19,45 ^{A}	30,05 ^{A}	6,32	0,079
MOVD (g/kg)	417,60 ^{A}	356,03 ^{ABC}	301,49 ^{C}	342,53 ^{BC}	407,37 ^{AB}	26,6	0,001
FDND (g/kg)	294,39 ^{A}	231,19 ^{AB}	192,57 ^{B}	189,97 ^{B}	283,29 ^{AB}	36,1	0,009
	***Panicum maximum* cv. Aruana**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	106,49 ^{A}	116,94 ^{A}	112,37 ^{A}	105,88 ^{A}	118,54 ^{A}	9,21	0,532
PG (mL/g MOVD)	43,87 ^{A}	52,83 ^{A}	50,51 ^{A}	49,97 ^{A}	58,63 ^{A}	6,07	0,201
PG (mL/g FDND)	31,48 ^{A}	38,13 ^{A}	36,09 ^{A}	28,05 ^{A}	39,67 ^{A}	6,32	0,336
MOVD (g/kg)	411,60 ^{B}	451,94 ^{AB}	449,09 ^{AB}	472,43 ^{AB}	495,41 ^{A}	26,6	0,038
FDND (g/kg)	295,20 ^{A}	326,21 ^{A}	320,61 ^{A}	265,57 ^{A}	335,68 ^{A}	36,1	0,306
	Bagaço de cana-de-açúcar						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	75,47 ^{A}	79,99 ^{A}	87,07 ^{A}	89,47 ^{A}	93,51 ^{A}	9,21	0,298
PG (mL/g MOVD)	11,71 ^{A}	13,78 ^{A}	20,80 ^{A}	23,50 ^{A}	25,54 ^{A}	6,07	0,107
PG (mL/g FDND)	8,49 ^{A}	8,42 ^{A}	11,89 ^{A}	6,07 ^{A}	12,77 ^{A}	6,32	0,822
MOVD (g/kg)	153,52 ^{C}	183,79 ^{BC}	230,74 ^{AB}	262,61 ^{A}	271,09 ^{A}	26,6	<0,01
FDND (g/kg)	110,78 ^{A}	117,61 ^{A}	127,25 ^{A}	67,73 ^{A}	134,18 ^{A}	36,1	0,393
	Cana-de-açúcar picada						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	214,29 ^{A}	189,96 ^{A}	203,53 ^{A}	193,31 ^{A}	213,65 ^{A}	9,21	0,126
PG (mL/g MOVD)	130,49 ^{A}	115,89 ^{AB}	123,08 ^{AB}	110,70 ^{B}	124,68 ^{AB}	6,07	0,017
PG (mL/g FDND)	15,10 ^{C}	19,85 ^{BC}	79,71 ^{A}	67,75 ^{A}	34,90 ^{B}	6,32	<0,01
MOVD (g/kg)	608,73 ^{A}	608,92 ^{A}	603,43 ^{A}	571,96 ^{A}	583,91 ^{A}	26,6	0,543
FDND (g/kg)	70,06 ^{B}	101,80 ^{B}	389,71 ^{A}	349,45 ^{A}	164,05 ^{A}	36,1	<0,01

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado. † E.P.M. = erro padrão da média.

Letras em comum na horizontal, para cada forrageira, implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%.

O fungo *P. ostreatus var. shimeji* crescido na forrageira Brachiaria, os resultados mostraram uma diminuição nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS); PG (mL/g MOVD) e PG (mL/g FDND) em 1,38 – 1,43 – 1,85 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não apresentaram efeitos significativos para MOVD (g/kg) e FDND (g/kg).

Para a forrageira Napier, apresentou diminuição nos parâmetros PG (mL/g MOVD) e MOVD (g/kg) em 2,39 e 4,19 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 12º dia de incubação. Para os parâmetros PG_{24} (mL/g MS) e PG (mL/g FDND) apresentaram aumento de 1,78 e 1,63 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 12º dia de incubação. Não apresentou efeito significativo para FDND (g/kg).

Para a forrageira Buffel, foi verificado uma diminuição nos parâmetros PG (mL/g FDND) e MOVD (g/kg) em 1,62 e 1,26 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 12º dia de incubação. Não diferenciaram estatisticamente para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD) e FDND (g/kg).

Para a forrageira Aruana, observou uma diminuição no parâmetro PG (mL/g FDND) em 1,51 vezes em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não apresentaram efeitos significativos para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg).

Já para o bagaço de cana-de-açúcar, apresentou aumento nos parâmetros PG (mL/g MOVD), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg) em 3,03 – 2,44 – 2,24 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não diferenciaram estatisticamente para PG_{24} (mL/g MS) e PG (mL/g FDND).

Para a cana-de-açúcar picada, proporcionou uma diminuição nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS) e PG (mL/g MOVD) em 1,40 – 1,55 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Para os parâmetros PG (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg) apresentaram aumento de 3,48 – 1,15 – 4,90 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Com exceção ao MOVD (g/kg) que apresentou aumento ao sexto dia de incubação.

Tabela 14 – Parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro* das forrageiras, sob influência do fungo *P. ostreatus var. shimeji*, em 24 dias de cultivo

	***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	160,33 ^{AB}	160,69 ^{A}	155,41 ^{AB}	136,19 ^{AB}	115,66 ^{B}	15,9	0,025
PG (mL/g MOVD)	93,26 ^{A}	96,35 ^{A}	96,82 ^{A}	78,39 ^{AB}	64,94 ^{B}	8,02	<0,01
PG (mL/g FDND)	58,74 ^{A}	64,18 ^{A}	65,07 ^{A}	49,66 ^{AB}	31,75 ^{B}	6,53	<0,01
MOVD (g/kg)	581,70 ^{A}	598,06 ^{A}	620,73 ^{A}	575,46 ^{A}	561,16 ^{A}	30,4	0,354
FDND (g/kg)	366,43 ^{A}	397,02 ^{A}	415,24 ^{A}	364,37 ^{A}	273,90 ^{A}	53,4	0,096
	***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	146,36 ^{B}	148,70 ^{B}	261,05 ^{A}	120,05 ^{B}	105,18 ^{B}	15,9	<0,01
PG (mL/g MOVD)	77,34 ^{A}	76,91 ^{A}	32,37 ^{B}	61,47 ^{A}	54,92 ^{AB}	8,02	<0,01
PG (mL/g FDND)	53,71 ^{B}	53,14 ^{B}	87,43 ^{A}	38,38 ^{BC}	27,04 ^{C}	6,53	<0,01
MOVD (g/kg)	524,48 ^{A}	520,15 ^{A}	125,21 ^{B}	512,99 ^{A}	519,66 ^{A}	30,4	<0,01
FDND (g/kg)	361,65 ^{A}	361,25 ^{A}	335,84 ^{A}	321,08 ^{A}	253,18 ^{A}	53,4	0,249
	***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	117,02 ^{A}	136,30 ^{A}	110,09 ^{A}	114,79 ^{A}	119,18 ^{A}	15,9	0,539
PG (mL/g MOVD)	48,86 ^{A}	57,51 ^{A}	36,41 ^{A}	42,24 ^{A}	51,62 ^{A}	8,02	0,092
PG (mL/g FDND)	34,44 ^{AB}	42,97 ^{A}	21,25 ^{B}	30,55 ^{AB}	37,46 0 ^{AB}	6,53	0,021
MOVD (g/kg)	417,60 ^{A}	421,75 ^{A}	331,80 ^{B}	367,34 ^{AB}	433,36 ^{A}	30,4	0,006
FDND (g/kg)	294,39 ^{A}	315,02 ^{A}	194,22 ^{A}	265,36 ^{A}	314,58 ^{A}	53,4	0,146
	***Panicum maximum* cv. Aruana**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	106,49 ^{A}	132,38 ^{A}	111,64 ^{A}	107,16 ^{A}	90,22 ^{A}	15,9	0,141
PG (mL/g MOVD)	43,87 ^{A}	62,39 ^{A}	52,95 ^{A}	46,56 ^{A}	40,00 ^{A}	8,02	0,060
PG (mL/g FDND)	31,48 ^{AB}	47,97 ^{A}	35,78 ^{AB}	30,88 ^{AB}	20,80 ^{B}	6,53	0,002
MOVD (g/kg)	411,60 ^{A}	471,76 ^{A}	475,01 ^{A}	433,12 ^{A}	443,03 ^{A}	30,4	0,202
FDND (g/kg)	295,20 ^{A}	362,95 ^{A}	321,40 ^{A}	286,36 ^{A}	229,96 ^{A}	53,4	0,169
	Bagaço de cana-de-açúcar						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	75,47 ^{A}	90,91 ^{A}	76,83 ^{A}	95,43 ^{A}	94,66 ^{A}	15,9	0,562
PG (mL/g MOVD)	11,71 ^{B}	11,80 ^{B}	17,06 ^{AB}	31,30 ^{AB}	35,56 ^{A}	8,02	0,006
PG (mL/g FDND)	8,49 ^{A}	8,15 ^{A}	8,57 ^{A}	18,59 ^{A}	23,57 ^{A}	6,53	0,059
MOVD (g/kg)	153,52 ^{BC}	126,89 ^{C}	221,23 ^{B}	326,26 ^{A}	375,33 ^{A}	30,4	<0,01
FDND (g/kg)	110,78 ^{AB}	86,59 ^{B}	110,56 ^{AB}	192,73 ^{AB}	248,60 ^{A}	53,4	0,017
	Cana-de-açúcar picada						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	214,29 ^{A}	227,45 ^{A}	205,75 ^{A}	154,75 ^{B}	152,45 ^{B}	15,9	<0,01
PG (mL/g MOVD)	130,49 ^{B}	160,40 ^{A}	123,50 ^{B}	87,09 ^{C}	83,95 ^{C}	8,02	<0,01
PG (mL/g FDND)	15,10 ^{B}	22,02 ^{B}	20,44 ^{B}	16,09 ^{B}	52,65 ^{A}	6,53	<0,01
MOVD (g/kg)	608,73 ^{B}	705,22 ^{A}	599,70 ^{B}	613,07 ^{B}	549,55 ^{B}	30,4	<0,01
FDND (g/kg)	70,06 ^{B}	96,81 ^{B}	98,10 ^{B}	207,06 ^{AB}	343,74 ^{AB}	53,4	<0,01

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado. † E.P.M. = erro padrão da média.

Letras em comum na horizontal, para cada forrageira, implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%.

O fungo *P. albidus* CCB 068 crescido na forrageira Brachiaria, observou uma diminuição no parâmetro PG_{24} (mL/g MS) em 1,24 vezes em relação a amostra controle no decorrer do 24º dia de incubação. Não observaram efeitos significativos para PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg).

Para a forrageira Napier, apresentaram diminuições nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e MOVD (g/kg) em 1,26 – 1,84 – 3,02 – 1,45 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não apresentou efeito significativo para FDND (g/kg).

Para a forrageira Buffel, foi encontrado uma diminuição no parâmetro FDND (g/kg) em 2,78 vezes em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Não foram encontrados efeitos significativos para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e MOVD (g/kg).

Para a forrageira Aruana, os resultados mostraram diminuições nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD) e MOVD (g/kg) em 1,68 – 5,21 – 3,06 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Os resultados não mostraram efeitos significativos para PG (mL/g FDND) e FDND (g/kg).

Para o bagaço de cana-de-açúcar, apresentaram aumentos nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e MOVD (g/kg) em 3,63 – 10,08 – 5,44 – 2,79 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Não apresentou efeito significativo para FDND (g/kg).

Para a cana-de-açúcar picada, foram encontrados diminuições nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS) e PG (mL/g MOVD) em 2,55 e 3,14 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Para os parâmetros PG (mL/g FDND) e FDND (g/kg) apresentaram aumentos de 4,37 e 5,62 vezes respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não foi encontrado efeito significativo para MOVD (g/kg).

Tabela 15 – Parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro* das forrageiras, sob influência do fungo *P. albidus* CCB 068, em 24 dias de cultivo

	***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	160,33 ^{A}	134,78 ^{B}	145,01 ^{AB}	134,74 ^{B}	128,36 ^{B}	8,49	<0,01
PG (mL/g MOVD)	93,26 ^{A}	65,68 ^{A}	75,90 ^{A}	71,03 ^{A}	73,44 ^{A}	7,10	0,346
PG (mL/g FDND)	58,74 ^{A}	40,89 ^{A}	47,38 ^{A}	44,61 ^{A}	45,76 ^{A}	7,84	0,921
MOVD (g/kg)	581,70 ^{A}	486,94 ^{A}	523,14 ^{A}	523,83 ^{A}	573,40 ^{A}	3,57	0,249
FDND (g/kg)	366,43 ^{A}	302,90 ^{A}	326,34 ^{A}	326,39 ^{A}	358,29 ^{A}	40,08	0,358
	***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	146,36 ^{A}	106,36 ^{B}	113,44 ^{B}	120,31 ^{B}	115,98 ^{B}	8,49	<0,01
PG (mL/g MOVD)	77,34 ^{AB}	44,29 ^{A}	42,80 ^{A}	50,53 ^{B}	41,96 ^{A}	7,10	<0,01
PG (mL/g FDND)	53,71 ^{A}	32,48 ^{AB}	23,95 ^{AB}	30,39 ^{AB}	17,76 ^{B}	7,84	<0,01
MOVD (g/kg)	524,48 ^{A}	417,55 ^{A}	376,51 ^{A}	420,67 ^{A}	359,87 ^{B}	3,57	<0,01
FDND (g/kg)	361,65 ^{A}	306,75 ^{A}	210,10 ^{A}	253,47 ^{A}	150,56 ^{A}	40,08	0,102
	***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	117,02 ^{A}	124,09 ^{A}	106,48 ^{A}	112,89 ^{A}	104,69 ^{A}	8,49	0,153
PG (mL/g MOVD)	48,86 ^{A}	59,75 ^{A}	47,34 ^{A}	57,25 ^{A}	50,58 ^{A}	7,10	0,204
PG (mL/g FDND)	34,44 ^{A}	43,91 ^{A}	21,69 ^{A}	12,42 ^{A}	19,38 ^{A}	7,84	0,251
MOVD (g/kg)	417,60 ^{A}	477,28 ^{A}	443,37 ^{A}	504,81 ^{A}	482,61 ^{A}	3,57	0,123
FDND (g/kg)	294,39 ^{AB}	348,57 ^{A}	201,95 ^{AB}	105,79 ^{B}	184,21 ^{AB}	40,08	<0,01
	***Panicum maximum* cv. Aruana**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	106,49 ^{A}	68,13 ^{B}	66,88 ^{B}	63,03 ^{B}	72,22 ^{B}	8,49	0,002
PG (mL/g MOVD)	43,87 ^{A}	9,20 ^{B}	10,67 ^{B}	8,41 ^{B}	13,04 ^{B}	7,10	<0,01
PG (mL/g FDND)	31,48 ^{A}	6,12 ^{A}	6,07 ^{A}	8,12 ^{A}	5,95 ^{A}	7,84	0,153
MOVD (g/kg)	411,60 ^{A}	136,07 ^{B}	158,54 ^{B}	134,19 ^{B}	180,58 ^{B}	3,57	<0,01
FDND (g/kg)	295,20 ^{A}	90,95 ^{A}	89,69 ^{A}	129,58 ^{A}	82,43 ^{A}	40,08	0,258
	Bagaço de cana-de-açúcar						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	75,47 ^{D}	205,76 ^{B}	183,67 ^{BC}	274,12 ^{A}	175,01 ^{C}	8,49	<0,01
PG (mL/g MOVD)	11,71 ^{B}	114,75 ^{A}	93,28 ^{A}	118,12 ^{A}	87,09 ^{A}	7,10	<0,01
PG (mL/g FDND)	8,49 ^{B}	0,52 ^{BC}	26,92 ^{AB}	46,23 ^{A}	26,67 ^{AB}	7,84	<0,01
MOVD (g/kg)	153,52 ^{B}	557,68 ^{A}	508,15 ^{A}	429,07 ^{A}	496,38 ^{A}	3,57	<0,01
FDND (g/kg)	110,78 ^{A}	112,54 ^{A}	147,05 ^{A}	165,96 ^{A}	150,33 ^{A}	40,08	0,125
	Cana-de-açúcar picada						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	214,29 ^{A}	108,26 ^{C}	96,13 ^{CD}	83,95 ^{D}	167,97 ^{B}	8,49	0,001
PG (mL/g MOVD)	130,49 ^{A}	52,76 ^{C}	46,55 ^{C}	41,58 ^{C}	97,87 ^{B}	7,10	<0,01
PG (mL/g FDND)	15,10 ^{B}	29,85 ^{B}	19,92 ^{B}	18,52 ^{B}	66,11 ^{A}	7,84	<0,01
MOVD (g/kg)	608,73 ^{A}	485,53 ^{A}	485,62 ^{A}	495,98 ^{A}	583,11 ^{A}	3,57	0,241
FDND (g/kg)	70,06 ^{B}	273,09 ^{AB}	209,31 ^{AB}	221,57 ^{AB}	394,26 ^{A}	40,08	0,007

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado. † E.P.M. = erro padrão da média.

Letras em comum na horizontal, para cada forrageira, implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%.

O fungo *P. ostreatus* crescido na forrageira Brachiaria, não apresentaram efeito significativo para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg).

Para a forrageira Napier, observou-se uma diminuição nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e MOVD (g/kg) em 1,40 – 1,89 – 2,25 – 1,35 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não diferenciou estatisticamente para FDND (g/kg).

Para a forrageira Buffel, não apresentaram variações significativas para PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg).

Para a forrageira Aruana, apresentram diminuições nos parâmetros PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), MOVD e FDND (g/kg) em 3,38 – 4,69 – 2,29 – 3,17 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não apresentou efeito significativo para PG_{24} (mL/g MS).

Para o bagaço de cana-de-açúcar, foram encontrados aumento nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND) e MOVD (g/kg) em 2,88 – 11,69 – 3,52 – 4,09 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 24º dia de incubação. Não foi encontrado efeito significativo para FDND (g/kg).

Para a cana-de-açúcar picada, os resultados mostraram uma diminuição nos parâmetros PG_{24} (mL/g MS) e PG (mL/g MOVD) em 1,39 e 1,36 vezes, respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Para os parâmetros PG (mL/g FDND) e FDND (g/kg) apresentaram aumento de 4,31 e 5,98 vezes respectivamente, em relação a amostra controle com decorrer do 18º dia de incubação. Não foi mostrado efeito significativo para MOVD (g/kg).

Tabela 16 – Parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro* das forrageiras, sob influência do fungo *P. ostreatus*, em 24 dias de cultivo

	***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	160,33 ^{A}	149,47 ^{A}	144,83 ^{A}	149,21 ^{A}	132,98 ^{A}	14,2	0,436
PG (mL/g MOVD)	93,26 ^{A}	78,85 ^{A}	81,31 ^{A}	84,36 ^{A}	78,29 ^{A}	8,86	0,442
PG (mL/g FDND)	58,74 ^{A}	53,63 ^{A}	56,55 ^{A}	63,58 ^{A}	52,23 ^{A}	8,25	0,670
MOVD (g/kg)	581,70 ^{A}	522,23 ^{A}	555,19 ^{A}	560,35 ^{A}	591,84 ^{A}	39,3	0,449
FDND (g/kg)	366,43 ^{A}	351,76 ^{A}	381,78 ^{A}	419,38 ^{A}	397,31 ^{A}	50,2	0,698
	***Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	146,36 ^{A}	168,16 ^{A}	131,82 ^{AB}	130,92 ^{AB}	104,12 ^{B}	14,2	<0,01
PG (mL/g MOVD)	77,34 ^{A}	48,38 ^{B}	48,79 ^{B}	48,94 ^{B}	40,71 ^{B}	8,86	0,001
PG (mL/g FDND)	53,71 ^{A}	49,75 ^{AB}	35,01 ^{ABC}	29,11 ^{BC}	23,81 ^{C}	8,25	<0,01
MOVD (g/kg)	524,48 ^{A}	288,09 ^{B}	370,86 ^{B}	372,81 ^{B}	386,79 ^{B}	39,3	<0,01
FDND (g/kg)	361,65 ^{A}	296,19 ^{A}	266,46 ^{A}	221,04 ^{A}	223,33 ^{A}	50,2	0,139
	***Cenchrus ciliaris* cv. Buffel**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	117,02 ^{A}	124,33 ^{A}	125,56 ^{A}	122,88 ^{A}	127,02 ^{A}	14,2	0,963
PG (mL/g MOVD)	48,86 ^{A}	53,69 ^{A}	62,54 ^{A}	56,60 ^{A}	59,15 ^{A}	8,86	0,598
PG (mL/g FDND)	34,44 ^{A}	33,92 ^{A}	45,97 ^{A}	38,11 ^{A}	36,70 ^{A}	8,25	0,599
MOVD (g/kg)	417,60 ^{A}	429,40 ^{A}	502,65 ^{A}	461,10 ^{A}	465,20 ^{A}	39,3	0,231
FDND (g/kg)	294,39 ^{A}	269,68 ^{A}	371,85 ^{A}	310,74 ^{A}	288,32 ^{A}	50,2	0,314
	***Panicum maximum* cv. Aruana**						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	106,49 ^{A}	74,74 ^{A}	69,23 ^{A}	72,19 ^{A}	72,11 ^{A}	14,2	0,062
PG (mL/g MOVD)	43,87 ^{A}	12,53 ^{B}	18,10 ^{B}	9,81 ^{B}	12,96 ^{B}	8,86	0,001
PG (mL/g FDND)	31,48 ^{A}	9,08 ^{AB}	16,01 ^{AB}	5,50 ^{B}	6,70 ^{B}	8,25	0,014
MOVD (g/kg)	411,60 ^{A}	172,51 ^{BC}	271,41 ^{B}	134,24 ^{C}	179,68 ^{BC}	39,3	<0,01
FDND (g/kg)	295,20 ^{A}	126,54 ^{BC}	241,53 ^{AB}	74,40 ^{C}	92,91 ^{C}	50,2	<0,01
	Bagaço de cana-de-açúcar						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	75,47 ^{B}	202,18 ^{A}	220,95 ^{A}	229,08 ^{A}	217,76 ^{A}	14,2	<0,01
PG (mL/g MOVD)	11,71 ^{B}	119,49 ^{A}	133,47 ^{A}	139,47 ^{A}	136,95 ^{A}	8,86	<0,01
PG (mL/g FDND)	8,49 ^{AB}	5,89 ^{B}	11,31 ^{AB}	16,30 ^{AB}	29,88 ^{A}	8,25	0,042
MOVD (g/kg)	153,52 ^{B}	591,02 ^{A}	604,11 ^{A}	609,16 ^{A}	628,67 ^{A}	39,3	<0,01
FDND (g/kg)	110,78 ^{A}	29,15 ^{A}	51,32 ^{A}	72,50 ^{A}	136,75 ^{A}	50,2	0,209
	Cana-de-açúcar picada						
	Dias						
Parâmetros *	0º	6º	12º	18º	24º	E. P. M. †	Valor – p
PG_{24} (mL/g MS)	214,29 ^{A}	155,13 ^{BC}	148,44 ^{C}	153,55 ^{C}	194,26 ^{AB}	14,2	<0,01
PG (mL/g MOVD)	130,49 ^{A}	99,17 ^{B}	93,37 ^{B}	95,35 ^{B}	115,54 ^{AB}	8,86	<0,01
PG (mL/g FDND)	15,10 ^{C}	68,41 ^{A}	63,26 ^{A}	65,10 ^{A}	39,18 ^{B}	8,25	<0,01
MOVD (g/kg)	608,73 ^{A}	643,91 ^{A}	637,99 ^{A}	617,71 ^{A}	594,13 ^{A}	39,3	0,701
FDND (g/kg)	70,06 ^{C}	448,12 ^{A}	439,97 ^{A}	418,98 ^{A}	200,51 ^{B}	50,2	<0,01

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado. † E.P.M. = erro padrão da média.

Letras em comum na horizontal, para cada forrageira, implica que não existe diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Desta maneira os parâmetros avaliados na análise bromatológica, mostrou que o crescimento dos fungos sobre as forragens proporcionou um efeito na produção de gases, deixando claro que a dieta fornecida ao animal influencia diretamente nos parâmetros ruminais, bem como a taxa de passagem que a dieta possui, podendo modificar a atividade metabólica dos microrganismos ruminais, alterando os produtos gerados pela fermentação ruminal. De acordo com Manella e El-Shafie, Abdel-Khalek (2003), o tipo de alimento altera os produtos da fermentação ruminal, por conta da especificidade dos microrganismos em digerir determinados nutrientes da dieta. Esses autores afirmam que, dietas ricas em forragens resultam em maior atividade de bactérias celulolíticas e sacarolíticas, aumentando a produção de ácido acético. Já as dietas ricas em amido e/ou proteína, aumentam ação das bactérias amilolíticas e/ou proteolíticas, que são produtoras de ácido propiônico (CHURCH, 1988).

A granulometria do alimento fornecido ao animal influencia na taxa de passagem da dieta e na fermentação ruminal. Segundo Valadares Filho e Pina (2006), dietas com moagem fina, aumentam a densidade e a ingestão, promovendo rápida passagem do material insolúvel. De acordo com esses autores, dietas totalmente moídas, leva ao desaparecimento da estratificação do conteúdo ruminal, que é encontrada normalmente em animais alimentados com forragem, permitindo dessa forma rápida passagem de partículas grosseiras, diminuindo sua degradação e aproveitamento por parte dos microrganismos ruminais.

Outro fator importante é que dietas com alto grau de fermentação (com pouca fibra ou partículas muito pequenas) elevam a produção de AGCC, levando ao abaixamento do pH ruminal, desfavorecendo o desenvolvimento de algumas espécies de microrganismos que não toleram essas condições. Microrganismos celulolíticos e metanogênicos possuem pouca tolerância ao abaixamento do pH ruminal (SATTER; SLYTER, 1974).

Dietas com alto teor de fibra com granulometria adequada estimulam maior taxa de ruminação e maior produção de saliva, o que leva ao aumento da diluição do conteúdo ruminal e tamponamento do mesmo, mantendo condições adequadas para o desenvolvimento de bactérias celulolíticas e protozoários. Segundo Valadares Filho e Pina (2006), dietas a base de forragem diminuem a concentração de ácidos ruminais, em relação a dietas com concentrado.

5.9. Produção de ácidos graxos de cadeia curta, das forrageiras submetidas ao tratamento biológico com cultivo de quatro espécies de fungos

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são produzidos no rúmen decorrente da fermentação microbiana. No processo, a energia é conservada na forma de adenosina trifosfato (ATP) e posteriormente utilizada pela flora microbiana. Os principais produtos da fermentação ruminal dos alimentos são os AGCC, constituídos na sua maioria pelos ácidos acético, propiônico e butírico. Estes ácidos resultam da glicólise de mono e polissacarídeos dos alimentos. O CO_2 e CH_4 são subprodutos naturais da fermentação microbiana, principalmente o acético e o butírico, resultando no CO_2 e no H_2 (HRISTOV et al., 2013; NGULUVE, 2014).

Os AGCC representam a principal fonte energética dos ruminantes, estimada em 50 a 70% da energia total digestível. Contudo, o ácido propiônico é o mais eficiente do ponto de vista de conservação e disponibilização de energia para o animal, pois ele não é convertido em CH_4 (NOGUEIRA; MAURÍCIO; GONÇALVES, 2006). As emissões de CH_4 representam uma perda 5 – 7% de energia bruta da dieta, que seria aproveitada pelo animal para o seu metabolismo. (HRISTOV et al., 2013).

A hidrólise de uma molécula de glicose fermentada no rúmen resultaria em duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ácido acético, duas moléculas de propionato e uma molécula de butirato. Portanto, a fermentação ruminal é um processo anaeróbio que converte os carboidratos em, principalmente, ácido acético, propionato e butírico na proporção aproximada de 70:20:10 respectivamente, sendo que os três ácidos representam 95 % do total dos AGCC produzidos no rúmen (ELLIS et al., 2008).

No entanto, a razão acetato:propionato obtido para substratos semelhantes pode alterar o volume de gases, em que substratos com maior capacidade de produção de acetato, elevados teores de carboidratos fibrosos (CF), produzem maiores quantidades de gases quando comparados aos substratos ricos em carboidratos não fibrosos (CNF), os quais proporcionam maior produção de propionato e, consequentemente, menor produção de gases (NGULUVE, 2014).

O perfil dos principais AGCC e a razão acetato:propionato (C2:C3), em forrageiras inoculadas com quatro linhagens de *Pleurotus*, são mostrados nas Tabelas 17 a 20. Foi observado que na forrageira Aruana inoculada ao 18º dia com *P. sajor-caju* CCB 020 aumentou a concentração de acetato 1,24 vezes ($p<0,05$), em relação a amostra controle (Tabela 17), sendo que as demais concentrações de propionato e butirato diminuiu e a razão C2:C3 aumentou. Para a cana-de-açúcar picada incubada ao 18º dia com o fungo *P. albidus* CCB 068 mostrou diminuir

as concentrações de acetato, propionato e butirato e a aumentar em relação aos tempos a razão C2:C3 em 0,86 – 0,58 – 0,71, 1,48 vezes, respectivamente, observado na Tabela 19. Enquanto para o bagaço de cana-de-açúcar, inoculado ao 24º dia com fungo *P. albidus* foi observado aumento nas concentrações de acetato, propionato e butirato e diminuição na razão C2:C3, em 1,14 – 1,75 – 1,32, 0,64 vezes, respectivamente, sendo observado na Tabela 19. E para o bagaço de cana-de-açúcar inoculado ao 24º dia com fungo *P. ostreatus* observou aumento nas concentrações de acetato, propionato e butirato e diminuição na razão C2:C3, em 1,20 – 1,88 – 1,40, 0,65 vezes respectivamente, sendo observado na Tabela 20. Não observou nenhum efeito significativo para os demais tratamentos.

Tabela 17 – Quantificação (mmol L^{-1}) de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em seis forrageiras, inoculados pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, em cinco períodos diferentes

Forrageiras	Parâmetros	Dias					E. P. M. †	Valor - p
		0º	6º	12º	18º	24º		
Panicum maximum cv. Aruana	Acetato	42,09 B	42,20 B	43,28 AB	51,93 A	44,34 AB	3,10	<0,01
	Propionato	11,57 A	11,16 A	11,44 A	14,12 A	11,93 A	1,71	1,000
	Butirato	9,06 A	9,12 A	9,33 A	11,23 A	9,35 A	1,10	1,000
	Outros	3,98 A	3,81 A	4,00 A	4,77 A	4,18 A	0,45	1,000
	C2:C3	3,65 A	3,79 A	3,81 A	3,78 A	3,73 A	0,30	1,000
Bagaço de cana-de-açúcar	Acetato	38,10 A	37,68 A	39,06 A	40,70 A	40,54 A	3,10	1,000
	Propionato	9,60 A	9,37 A	10,38 A	10,73 A	10,75 A	1,71	1,000
	Butirato	8,28 A	8,20 A	8,61 A	8,85 A	8,61 A	1,10	1,000
	Outros	3,94 A	3,95 A	3,96 A	4,02 A	4,07 A	0,45	1,000
	C2:C3	3,99 A	4,05 A	3,81 A	3,82 A	3,81 A	0,30	1,000
Brachiaria decumbens cv. Basilisk	Acetato	45,83 A	44,43 A	44,65 A	41,97 A	41,51 A	3,10	1,000
	Propionato	13,35 A	14,41 A	14,25 A	12,40 A	11,75 A	1,71	1,000
	Butirato	9,98 A	10,43 A	10,32 A	9,44 A	9,12 A	1,10	1,000
	Outros	4,32 A	4,32 A	4,23 A	4,27 A	4,30 A	0,45	1,000
	C2:C3	3,63 A	3,10 A	3,14 A	3,40 A	3,56 A	0,30	0,999
Cenchrus ciliaris cv. Buffel	Acetato	41,66 A	43,00 A	41,16A	37,07 A	42,18 A	3,10	0,999
	Propionato	11,91 A	12,60 A	11,43 A	10,09 A	12,12 A	1,71	0,999
	Butirato	9,41 A	10,02 A	9,44 A	8,29 A	9,22 A	1,10	1,000
	Outros	3,97 A	4,05 A	4,02 A	3,61 A	4,08 A	0,45	1,000
	C2:C3	3,53 A	3,44 A	3,63 A	3,66 A	3,49 A	0,30	1,000
Cana-de-açúcar picada	Acetato	46,06 A	46,81 A	46,49 A	47,31 A	47,76 A	3,10	1,000
	Propionato	18,84 A	19,28 A	19,73 A	19,18 A	19,64 A	1,71	1,000
	Butirato	12,17 A	11,05 A	11,27 A	11,22 A	11,34 A	1,10	1,000
	Outros	3,67 A	3,50 A	3,50 A	3,55 A	3,69 A	0,45	1,000
	C2:C3	2,45 A	2,44 A	2,37 A	2,49 A	2,44 A	0,30	1,000
Pennisetum purpureum Schum. cv. Napier	Acetato	44,01 A	43,32 A	43,10 A	42,69 A	43,29 A	3,10	1,000
	Propionato	12,84 A	12,83 A	12,46 A	12,44 A	11,95 A	1,71	1,000
	Butirato	10,07 A	10,01 A	9,85 A	9,68 A	9,46 A	1,10	1,000
	Outros	4,18 A	4,17 A	4,07 A	4,00 A	4,16 A	0,45	1,000
	C2:C3	3,47 A	3,39A	3,48 A	3,45 A	3,65 A	0,30	1,000

Outros = (Isobutirato + Isovalerato + Valerato)
C2:C3 = razão acetato:propionato
† E.P.M. = erro padrão da média.
Médias com letras em comum na horizontal dentro de cada dia de incubação e em cada forrageiras, implica que não existe diferença pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 18 – Quantificação (mmol L^{-1}) de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em seis forrageiras, inoculados pelo fungo *P. ostreatus var. shimeji*, em cinco períodos diferentes

Forrageiras	Parâmetros	Dias					E. P. M. †	Valor - p
		0º	6º	12º	18º	24º		
Panicum maximum cv. Aruana	Acetato	42,09 A	46,59 A	43,39 A	42,99 A	42,59 A	1,61	0,992
	Propionato	11,57 A	12,62 A	11,57 A	11,05 A	11,08 A	1,58	1,000
	Butirato	9,06 A	9,72 A	9,11 A	8,87 A	8,76 A	0,96	1,000
	Outros	3,98 A	4,17 A	4,02 A	3,95 A	4,01 A	0,38	1,000
	C2:C3	3,65 A	3,73 A	3,79 A	3,92 A	3,89 A	0,34	1,000
Bagaço de cana-de-açúcar	Acetato	38,10 A	39,94 A	39,41 A	40,76 A	40,07 A	1,61	1,000
	Propionato	9,60 A	9,67 A	10,07 A	10,96 A	11,15 A	1,58	1,000
	Butirato	8,28 A	8,51 A	8,37 A	8,58 A	8,35 A	0,96	1,000
	Outros	3,94 A	4,19 A	3,97 A	3,86 A	3,84 A	0,38	1,000
	C2:C3	3,99 A	4,16 A	3,96 A	3,77 A	3,63 A	0,34	1,000
Brachiaria decumbens cv. Basilisk	Acetato	45,83 A	45,51 A	46,36 A	44,97 A	42,38 A	1,61	0,996
	Propionato	13,35 A	14,38 A	14,91 A	13,85 A	12,26 A	1,58	0,972
	Butirato	9,98 A	10,33 A	10,62 A	10,18 A	9,26 A	0,96	0,999
	Outros	4,32 A	4,25 A	4,34 A	4,30 A	4,10 A	0,38	1,000
	C2:C3	3,63 A	3,18 A	3,12 A	3,27 A	3,49 A	0,34	0,998
Cenchrus ciliaris cv. Buffel	Acetato	41,66 A	42,64 A	41,58 A	41,70 A	41,97 A	1,61	1,000
	Propionato	11,91 A	12,47 A	11,37 A	11,56 A	12,16 A	1,58	1,000
	Butirato	9,41 A	9,58 A	9,17 A	9,14 A	9,10 A	0,96	1,000
	Outros	3,97 A	3,93 A	4,07 A	3,98 A	3,86 A	0,38	1,000
	C2:C3	3,53 A	3,44 A	3,69 A	3,64 A	3,48 A	0,34	1,000
Cana-de-açúcar picada	Acetato	46,06 A	48,59 A	47,23 A	48,56 A	44,35 A	1,61	1,000
	Propionato	18,84 A	20,75 A	19,19 A	19,42 A	14,06 A	1,58	0,999
	Butirato	12,17 A	11,71 A	11,33 A	11,42 A	9,98 A	0,96	1,000
	Outros	3,67 AB	3,67 B	3,64 AB	3,67 AB	4,37 A	0,38	1,000
	C2:C3	2,45 A	2,36 A	2,49 A	2,53 A	3,18 A	0,34	1,000
Pennisetum purpureum Schum. cv. Napier	Acetato	44,01 A	45,70 A	44,98 A	43,57 A	43,90 A	1,61	1,000
	Propionato	12,84 A	13,41 A	12,91 A	12,39 A	12,33 A	1,58	1,000
	Butirato	10,07 A	10,24 A	9,79 A	9,59 A	9,39 A	0,96	0,998
	Outros	4,18 A	4,30 A	4,39 A	4,20 A	4,22 A	0,38	1,000
	C2:C3	3,47 A	3,42 A	3,51 A	3,55 A	3,59 A	0,34	1,000

Outros = (Isobutirato + Isovalerato + Valerato)

C2:C3 = razão acetato:propionato

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras em comum na horizontal dentro de cada dia de incubação e em cada forrageiras, implica que não existe diferença pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 19 – Quantificação (mmol L^{-1}) de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em seis forrageiras, inoculados pelo fungo *P. albidus* CCB 068, em cinco períodos diferentes

Forrageiras	Parâmetros	Dias					E. P. M. †	Valor - p
		0º	6º	12º	18º	24º		
Panicum maximum cv. Aruana	Acetato	42,09 A	37,36 A	38,40 A	37,45 A	37,37 A	1,74	1,000
	Propionato	11,57 A	9,13 A	9,45 A	9,14 A	9,32 A	1,67	1,000
	Butirato	9,06 A	8,08 A	8,44 A	8,17 A	8,23 A	0,84	1,000
	Outros	3,98 A	3,81 A	4,10 A	3,96 A	4,00 A	0,32	1,000
	C2:C3	3,65 A	4,14 A	4,08 A	4,12 A	4,06 A	0,34	1,000
Bagaço de cana-de-açúcar	Acetato	38,10 B	45,33 A	43,62 A	43,89 A	43,25 A	1,74	<0,01
	Propionato	9,60 B	16,37 A	17,28 A	17,62 A	16,83 A	1,67	<0,01
	Butirato	8,28 B	10,31 AB	11,30 A	11,60 A	10,93 A	0,84	<0,01
	Outros	3,94 A	3,83 AB	3,75 AB	3,66 B	3,70 AB	1,94	<0,01
	C2:C3	3,99 A	2,91 B	2,54 B	2,51 B	2,57 B	0,34	<0,01
Brachiaria decumbens cv. Basilisk	Acetato	45,83 A	44,28 A	46,09 A	43,96 A	43,83 A	1,74	1,000
	Propionato	13,35 A	12,75 A	13,61 A	13,03 A	12,53 A	1,67	0,999
	Butirato	9,98 A	9,87 A	10,48 A	10,06 A	9,69 A	0,84	1,000
	Outros	4,32 A	4,11 A	4,29 A	4,27 A	4,30 A	1,94	1,000
	C2:C3	3,63 A	3,51 A	3,42 A	3,40 A	3,51 A	0,34	1,000
Cenchrus ciliaris cv. Buffel	Acetato	41,66 A	43,90 A	43,59 A	42,84 A	43,25 A	1,74	0,997
	Propionato	11,91 A	11,96 A	11,94 A	11,91 A	11,39 A	1,67	1,000
	Butirato	9,41 A	9,29 A	9,14 A	8,99 A	8,85 A	0,84	0,998
	Outros	3,97 A	4,03 A	4,41 A	4,24 A	4,26 A	1,94	1,000
	C2:C3	3,53 A	3,72 A	3,69 A	3,64 A	3,84 A	0,34	1,000
Cana-de-açúcar picada	Acetato	46,06 A	44,05 AB	41,17 AB	40,04 B	44,10 AB	1,74	<0,01
	Propionato	18,84 A	12,34 B	11,34 B	11,11 B	13,91 B	1,67	<0,01
	Butirato	12,17 A	9,69 B	8,93 B	8,67 B	10,20 AB	0,84	<0,01
	Outros	3,67 B	4,55 A	4,42 A	4,41 A	4,16 AB	1,94	<0,01
	C2:C3	2,45 B	3,61 A	3,65 A	3,62 A	3,17 A	0,34	<0,01
Pennisetum purpureum Schum. cv. Napier	Acetato	44,01 A	43,13 A	42,16 A	40,95 A	40,19 A	1,74	0,924
	Propionato	12,84 A	12,33 A	12,53 A	12,47 A	12,34 A	1,67	1,000
	Butirato	10,07 A	9,55 A	9,91 A	9,65 A	9,48 A	0,84	1,000
	Outros	4,18 A	3,94 A	4,19 A	3,94 A	3,86 A	1,94	1,000
	C2:C3	3,47 A	3,52 A	3,40 A	3,31 A	3,31 A	0,34	1,000

Outros = (Isobutirato + Isovalerato + Valerato)
C2:C3 = razão acetato:propionato
† E.P.M. = erro padrão da média.
Médias com letras em comum na horizontal dentro de cada dia de incubação e em cada forrageiras, implica que não existe diferença pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 20 – Quantificação (mmol L^{-1}) de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em seis forrageiras, inoculados pelo fungo *P. ostreatus*, em cinco períodos diferentes

Forrageiras	Parâmetros	Dias					E. P. M. †	Valor - p
		0º	6º	12º	18º	24º		
Panicum maximum cv. Aruana	Acetato	42,09 A	37,32 A	38,80 A	37,92 A	40,09 A	2,46	0,999
	Propionato	11,57 A	9,08 A	9,46 A	9,21 A	10,66 A	2,26	1,000
	Butirato	9,06 A	8,25 A	8,64 A	8,35 A	8,88 A	1,06	1,000
	Outros	3,98 A	3,92 A	4,20 A	4,08 A	4,15 A	0,32	1,000
	C2:C3	3,65 A	4,11 A	4,14 A	4,12 A	3,83 A	0,39	1,000
bagaço de cana-de-açúcar	Acetato	38,10 B	43,15 AB	43,83AB	42,79 AB	45,60 A	2,46	<0,01
	Propionato	9,60 B	15,80 AB	16,08 A	15,78 AB	18,07 A	2,26	<0,01
	Butirato	8,28 B	10,24 A	10,42 A	10,12 A	11,60 A	1,06	<0,01
	Outros	3,94 A	3,64 AB	3,66 AB	3,53 B	3,63 B	0,32	<0,01
	C2:C3	3,99 A	2,99 AB	2,98 AB	2,97 AB	2,58 B	0,39	<0,01
Brachiaria decumbens cv. Basilisk	Acetato	45,83 A	45,13 A	44,43 A	41,37 A	43,60 A	2,46	0,997
	Propionato	13,35 A	13,51 A	13,34 A	11,76 A	12,62 A	2,26	1,000
	Butirato	9,98 A	10,44 A	10,24 A	9,24 A	9,71 A	1,06	0,999
	Outros	4,32 A	4,23 A	4,13 A	3,90 A	4,15 A	0,32	1,000
	C2:C3	3,63 A	3,35 A	3,35 A	3,61 A	3,52 A	0,39	1,000
Cenchrus ciliaris cv. Buffel	Acetato	41,66 A	42,14 A	44,32 A	42,87 A	43,03 A	2,46	1,000
	Propionato	11,91 A	11,18 A	11,89 A	11,63 A	11,91 A	2,26	1,000
	Butirato	9,41 A	8,98 A	9,50 A	9,17 A	10,69 A	1,06	1,000
	Outros	3,97 A	3,75 A	3,99 A	3,84 A	3,81 A	0,32	1,000
	C2:C3	3,53 A	3,79 A	3,75 A	3,71 A	3,62 A	0,39	1,000
cana-de-açúcar picada	Acetato	46,06 A	44,74 A	43,39 A	44,20 A	47,68 A	2,46	0,995
	Propionato	18,84 A	14,27 A	13,64 A	13,99 A	18,21 A	2,26	0,999
	Butirato	12,17 A	10,34 A	10,04 A	10,14 A	11,54 A	1,06	1,000
	Outros	3,67 A	4,24 A	4,20 A	4,24 A	3,69 A	0,32	1,000
	C2:C3	2,45 A	3,15 A	3,21 A	3,18 A	2,62 A	0,39	1,000
Pennisetum purpureum Schum. cv. Napier	Acetato	44,01 A	41,45 A	43,39 A	42,00 A	41,93 A	2,46	1,000
	Propionato	12,84 A	12,49 A	12,57 A	12,41 A	11,90 A	2,26	1,000
	Butirato	10,07 A	9,57 A	9,99 A	9,60 A	9,41 A	1,06	1,000
	Outros	4,18 A	3,70 A	3,96 A	4,01 A	4,08 A	0,32	1,000
	C2:C3	3,47 A	3,34 A	3,46 A	3,42 A	3,54 A	0,39	1,000

Outros = (Isobutirato + Isovalerato + Valerato)
C2:C3 = razão acetato:propionato
† E.P.M. = erro padrão da média.
Médias com letras em comum na horizontal dentro de cada dia de incubação e em cada forrageiras, implica que não existe diferença pelo teste de Tukey a 5%.

5.10. Avaliação da produção de gases e degradabilidade *in vitro* com adição de enzimas

Para avaliar a produção de gases *in vitro*, simulando o metabolismo do rúmen, foram utilizados seis alimentos diferentes cuja composição bromatológica foi determinada (Tabela 8) e três volumes de extrato enzimático, 2, 4 e 6 mL, do fungo *P. sajor caju* CCB 020, (Tabela 4) produzidos em vinhaça aos sexto, 12º e 18º dias de incubação. Foram avaliados os parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro* na produção total de gases em 24 horas (PG_{24} MS); produção de gases (PG); produção de metano (CH_4); matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD); fibra em detergente neutro degradado (FDND), no tempo de 24 horas.

Na adição de concentrações crescentes do extrato enzimático, ao 18º dia na forrageira *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, apresentada na Tabela 21, observa-se o aumento da PG_{24} ($p<0,01$), comparado com o controle "G". A concentração "G 3" teve um aumento de 1,2 vezes do controle (187,71 vs 162,13 mL/g MS, respectivamente) e apresentou efeito quadrático (p_Q <0,01). As concentrações enzimáticas não mostraram diferenças em relação a CH_4 (mL/g MS) e CH_4 (mL/g MOVD), onde nenhum efeito foi observado ($p>0,01$), pelo teste de Tukey. Para a PG mL/g MOVD, foi observado aumento com os extratos enzimáticos com a concentração "G 3", com aumento de 1,2 da PG ($p<0,01$) comparado com a amostra controle "G" de (111,85 vs 91,43 mL/g MOVD, respectivamente) e apresentou efeito quadrático a (p_Q <0,01). Quanto a PG mL/g FDND, foi observado aumento com os extratos enzimáticos na concentração "G 3" com aumento de 1,5 da PG ($p<0,01$) comparado com a amostra controle "G" de (72,89 vs 48,35 mL/g FDND, respectivamente) e apresentou efeito quadrático (p_Q <0,01). As concentrações aplicadas, aumentou CH_4 ($p<0,01$), 1,5 vezes, comparadas com a amostra controle "G" com a amostra de maior concentração "G3" (6,06 vs 3,87 mL/g FDND, respectivamente) e apresentou efeito quadrático ($p_Q<0,01$). A MOVD ($p<0,01$), apresentou aumento 1,1 vezes, comparado com a amostra controle "G" com a amostra de maior concentração "G3" (594,45 vs 523,80 g/kg, respectivamente) porém não houve efeito significativo ($p=0,42$). Para a FDND ($p<0,01$), observou aumento de 1,4 vezes, comparado com o controle "G" com a concentração "G 3" (385,75 vs 278,74 g/kg, respectivamente) também sem efeito significativo ($p=0,43$).

Na adição de concentrações crescentes do extrato enzimático, ao sexto dia na forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, apresentada na Tabela 22, observa-se o aumento da PG_{24} ($p<0,01$), comparado com o controle "G". A concentração mais concentrada "G 3" teve um aumento de 1,3 vezes do controle (149,00 vs 110,99 mL/g MS, respectivamente) e

apresentou efeito quadrático (p_Q<0,01). As concentrações enzimáticas não mostraram diferenças em relação a CH_4 (mL/g MS) e CH_4 (mL/g MOVD), onde nenhum efeito foi observado (p>0,01), pelo teste de Tukey. Por outro lado, foi observado aumento visual gradativo na produção desses gases com a aplicação dos extratos enzimáticos, tento aumento de 1,8 a 2,0 vezes, em relação ao controle. Para a PG mL/g MOVD, foi observado aumento com os extratos enzimáticos com a concentração "G 3" onde ocorreu aumento de 1,5 vezes da PG (p<0,01) comparado com a amostra controle "G" de (79,59 vs 53,70 mL/g MOVD, respectivamente) e apresentou efeito quadrático (p_Q<0,01). Quanto a PG mL/g FDND, foi observado aumento com os extratos enzimáticos com a concentração "G 3", com aumento de 1,6 vezes maior da PG (p<0,01) comparado com a amostra controle "G" de (55,82 vs 34,06 mL/g FDND, respectivamente) e apresentou efeito quadrática (p_Q<0,01). As concentrações aplicadas CH_4 (p<0,01), mostrou aumento 2,3 vezes maior, comparados com a amostra controle "G" com a amostra de maior concentração "G3" (4,36 vs 1,92 mL/g FDND, respectivamente) e apresentou efeito quadrático (p_Q<0,01). A MOVD (p<0,01), apresentou aumento 1,1 vezes, comparado com a amostra controle "G" com a amostra de maior concentração "G3" (536,46 vs 485,13 g/kg, respectivamente) e apresentou efeito linear (p_L=0,04). Para a FDND (p<0,01), observou aumento de 1,2 vezes, comparado com o controle "G" na concentração "G 3" (377,73 vs 308,82 g/kg, respectivamente) e apresentou efeito linear (p_L=0,04).

Para a forrageira o *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, apresentada na Tabela 23, observa-se que as concentrações dos extratos aplicados no sexto e 12º dia aumentaram apenas a PG_{24} mL/g MS, (137,12 vs 104,73 e 123,96 vs 88,20, respectivamente). Foram observados diferenças significativas PG (p<0,01) quanto a de maior concentração "G 3" em comparação a amostra controle "G" tendo efeito quadrática (p_Q <0,01). As concentrações enzimáticas não mostraram diferenças em relação a CH_4 (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), CH_4 (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), CH_4 (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg), (p>0,01), pelo teste de Tukey.

Na adição de concentrações crescentes do extrato enzimático, ao sexto dia na forrageira *Panicum maximum* cv. Aruana, apresentada na Tabela 24, observa-se o aumento da PG_{24} (p<0,01), comparado com o controle "G". A concentração mais concentrada "G 3" teve um aumento de 1,6 vezes do controle (135,81 vs 86,37 mL/g MS, respectivamente) e apresentou efeito linear (p_L<0,01). As concentrações enzimáticas não mostraram diferenças em relação a CH_4 (mL/g MS), CH_4 (mL/g MOVD) e CH_4 (mL/g FDND), onde nenhum efeito foi observado (p>0,01), pelo teste de Tukey. Por outro lado, foi observado aumento visual gradativo na produção desses gases com a aplicação dos extratos enzimáticos, tento aumento de 2,3 – 1,1 e 2,3 vezes, em relação ao controle. Para a PG mL/g MOVD, foi observado aumento com os

extratos enzimáticos na concentração “G 3” ocorreu aumento de 1,7 da PG ($p<0,01$) comparado com a amostra controle “G” de (59,18 vs 34,72 mL/g MOVD, respectivamente) e apresentou efeito linear ($p_L=0,01$). Quanto a PG mL/g FDND, foi observado aumento com os extratos enzimáticos com a concentração “G 3”, ocorreu aumento de 1,8 vezes maior da PG ($p<0,01$) comparado com a amostra controle “G” de (44,02 vs 24,38 mL/g FDND, respectivamente) e não apresentou efeito ($p=0,31$). A MOVD ($P<0,01$) apresentou aumento de 1,1 vezes, comparado com a amostra controle “G” com a amostra de maior concentração “G3” (434,76 vs 396,59 g/kg, respectivamente) e não apresentou efeito ($p=0,85$). Para a FDND ($p<0,01$), observou aumento de 1,1 vezes, comparado com o controle “G” com a concentração “G 3” (322,94 vs 277,39 g/kg, respectivamente) e não apresentou efeito ($p=0,85$).

Para o bagaço de cana-de-açúcar, apresentado na Tabela 25, observa-se que as concentrações dos extratos aplicados no sexto e 12º dia aumentaram apenas a PG_{24} mL/g MS; foram observadas diferenças significativas PG ($p<0,01$) quando comparado ao controle e apresentou efeito quadrático ($P_Q<0,01$). As concentrações enzimáticas não mostraram diferenças em relação a CH_4 (mL/g MS), PG (mL/g MOVD), CH_4 (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), CH_4 (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg), onde nenhum efeito foi observado ($p>0,01$), pelo teste de Tukey.

Para a cana-de-açúcar picada, apresentada na Tabela 26, observa-se que as concentrações dos extratos aplicados no sexto e 12º dia aumentaram apenas a PG_{24} mL/g MS, (232,66 vs 168,16 e 229,78 vs 209,70 respectivamente) e apresentou efeito linear ($p_L< 0,01$). Foram observadas diferenças significativas PG ($p<0,01$) quando comparado ao controle. Para a PG (mL/g MOVD), as concentrações dos extratos aplicados no sexto e 12º dia aumentaram apenas a PG_{24} mL/g MS, (147,24 vs 107,36 e 144,05 vs 127,90 respectivamente). Foram observadas diferenças significativas PG ($p<0,01$) quando comparado ao controle e apresentou efeito linear ($p_L<0,01$). As concentrações enzimáticas não mostraram diferenças em relação a CH_4 (mL/g MS), CH_4 (mL/g MOVD), PG (mL/g FDND), CH_4 (mL/g FDND), MOVD (g/kg) e FDND (g/kg), onde nenhum efeito foi observado ($p>0,01$), pelo teste de Tukey.

Tabela 21 – Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da forrageira *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, tratadas com concentrações crescentes de extrato contendo enzimas lignocelulósicas, oriundo da incubação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, durante seis, 12 e 18 dias em vinhaça

Parâmetros *	6º dia				12º dia				18º dia				E.P.M. †	Valor – p	L	Q
	Doses Enzima (mL)															
	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3				
PG_{24} (mL/g MS)	130,84^{Bb}	139,84^{ABb}	154,35^{Ab}	162,91^{Ab}	126,97^{Bb}	131,88^{ABb}	140,05^{ABb}	151,83^{Ab}	162,13^{Ba}	184,05^{Aa}	180,76^{Aa}	187,71^{Aa}	4,14	<0,01	<0,01	<0,01
CH_4 (mL/g MS)	7,69^{Aab}	9,82^{Aab}	9,87^{Ab}	13,91^{Aa}	6,60^{Ab}	7,25^{Ab}	7,06^{Ab}	10,49^{Aa}	14,20^{Aa}	14,76^{Aa}	16,61^{Aa}	15,64^{Aa}	1,18	0,996	<0,01	<0,01
PG (mL/g MOVD)	72,93^{Bb}	76,98^{ABb}	85,91^{ABab}	90,67^{Ab}	66,80^{Bb}	70,24^{Bb}	72,17^{ABb}	85,56^{Ab}	91,43^{Ba}	96,67^{Ba}	96,84^{Aba}	111,85^{Aa}	2,68	<0,01	<0,01	<0,01
CH_4 (mL/g MOVD)	4,47^{Aab}	4,52^{Aab}	5,42^{Aab}	7,82^{Aa}	3,45^{Ab}	3,86^{Ab}	3,63^{Ab}	5,94^{Aa}	7,38^{Aa}	7,80^{Aa}	8,85^{Aa}	9,32^{Aa}	0,75	0,983	<0,01	<0,01
PG (mL/g FDND)	43,92^{Aa}	47,26^{Aa}	50,69^{Aab}	54,66^{Ab}	35,84^{Ba}	38,52^{Aba}	37,24^{ABb}	51,45^{Ab}	48,35^{Ba}	51,71^{Ba}	53,65^{Ba}	72,89^{Aa}	2,78	<0,01	0,04	<0,01
CH_4 (mL/g FDND)	2,74^{Bab}	3,12^{ABab}	3,13^{ABab}	4,85^{Aab}	1,81^{Ab}	2,11^{Ab}	1,86^{Ab}	3,60^{Ab}	3,87^{Ba}	4,21^{Aba}	4,86^{Aba}	6,06^{Aa}	0,31	<0,01	<0,01	<0,01
MOVD (g/kg)	569,32^{Aa}	569,67^{Aa}	558,84^{Aa}	564,04^{Aa}	525,78^{Aa}	532,80^{Aa}	515,28^{Aa}	562,69^{Aa}	523,80^{Ba}	524,88^{Ba}	536,68^{Aba}	594,45^{Aa}	10,34	<0,01	0,42	0,30
FDND (g/kg)	347,84^{Aa}	348,22^{Aa}	331,81^{Aa}	339,68^{Aa}	281,73^{Aa}	292,38^{Aa}	265,83^{Aa}	337,64^{Aa}	278,74^{Ba}	280,38^{Ba}	298,24^{Aba}	385,75^{Aa}	13,69	<0,01	0,42	0,30

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; CH_4 = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado.

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

Efeito de Dia: L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático;

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as doses pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Médias com letras minúsculas diferentes indica diferença entre a mesma dose nos diferentes dias de incubação pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 22 – Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da forrageira *Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier, tratadas com concentrações crescentes de extrato contendo enzimas lignocelulósicas, oriundo da incubação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, durante seis, 12 e 18 dias em vinhaça

Parâmetros *	6º dia				12º dia				18º dia				E.P.M. †	Valor – p	L	Q
	Doses Enzima (mL)															
	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3				
PG_{24} (mL/g MS)	$110,99^{Bb}$	$115,12^{Bb}$	$130,87^{Aba}$	$149,00^{Aa}$	$105,39^{Bba}$	$116,25^{Bba}$	$125,07^{Aba}$	$138,32^{Aa}$	$154,55^{Aa}$	$154,69^{Aa}$	$140,97^{Aa}$	$157,58^{Aa}$	3,59	<0,01	<0,01	<0,01
CH_4 (mL/g MS)	$6,60^{Aa}$	$8,41^{Aa}$	$9,46^{Aab}$	$11,68^{Aa}$	$5,07^{Aa}$	$6,13^{Aa}$	$5,06^{Ab}$	$8,05^{Aa}$	$9,92^{Aa}$	$12,19^{Aa}$	$12,49^{Aa}$	$13,33^{Aa}$	1,18	0,999	<0,01	<0,01
PG (mL/g MOVD)	$53,70^{Bb}$	$55,86^{Bb}$	$63,92^{Ba}$	$79,59^{Aa}$	$47,94^{Bb}$	$53,90^{Bb}$	$60,38^{Aba}$	$68,70^{Aa}$	$71,99^{Aa}$	$75,68^{Aa}$	$66,11^{Aa}$	$73,21^{Aa}$	2,32	<0,01	<0,01	<0,01
CH_4 (mL/g MOVD)	$3,12^{Aa}$	$4,13^{Aa}$	$4,55^{Aa}$	$6,23^{Aa}$	$2,30^{Aa}$	$2,77^{Aa}$	$2,47^{Aa}$	$4,06^{Aa}$	$4,63^{Aa}$	$5,96^{Aa}$	$5,85^{Aa}$	$6,15^{Aa}$	0,65	0,997	<0,01	<,001
PG (mL/g FDND)	$34,06^{Bab}$	$35,56^{Bab}$	$40,99^{Ba}$	$55,82^{Aa}$	$28,27^{Bb}$	$32,54^{ABb}$	$38,22^{Aba}$	$45,14^{Aa}$	$43,75^{Aa}$	$48,63^{Aa}$	$40,47^{Aa}$	$44,32^{Aa}$	2,41	<0,01	0,33	<0,01
CH_4 (mL/g FDND)	$1,92^{Ba}$	$2,66^{ABab}$	$2,87^{ABab}$	$4,36^{Aa}$	$1,35^{Aa}$	$1,62^{Ab}$	$1,52^{Ab}$	$2,61^{Aa}$	$2,83^{Aa}$	$3,83^{Aa}$	$3,57^{Aa}$	$3,69^{Aa}$	0,31	<0,01	0,08	<0,01
MOVD (g/kg)	$485,13^{Ba}$	$483,35^{Ba}$	$491,84^{Aba}$	$536,46^{Aa}$	$454,35^{Ba}$	$466,27^{Ba}$	$482,25^{Aba}$	$498,33^{Aab}$	$465,47^{Aa}$	$492,32^{Aa}$	$469,42^{Aa}$	$466,15^{Ab}$	10,34	<0,01	0,04	0,31
FDND (g/kg)	$308,82^{Ba}$	$306,43^{Ba}$	$317,82^{Aba}$	$377,73^{Aa}$	$267,50^{Ba}$	$283,51^{Ba}$	$304,95^{Aba}$	$326,33^{Aab}$	$282,87^{Aa}$	$318,48^{Aa}$	$287,73^{Aa}$	$283,34^{Ab}$	13,69	<0,01	0,04	0,31

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; CH_4 = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado.

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

Efeito de Dia: L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático;

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as doses pelo teste de Tukey (p<0,05). Médias com letras minúsculas diferentes indica diferença entre a mesma dose nos diferentes dias de incubação pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 23 – Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da forrageira *Cenchrus ciliaris* cv. Buffel, tratadas com concentrações crescentes de extrato contendo enzimas lignocelulósicas, oriundo da incubação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, durante seis, 12 e 18 dias em vinhaça

Parâmetros *	6º dia				12º dia				18º dia				E.P.M. †	Valor – p	L	Q
	Doses Enzima (mL)															
	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3				
PG_{24} (mL/g MS)	104,73^{Bb}	108,72^{Bb}	118,93^{Aba}	137,12^{Aa}	88,20^{Bb}	104,19^{ABb}	112,54^{Aba}	123,96^{Aa}	131,46^{Aa}	138,76^{Aa}	127,38^{Aa}	139,53^{Aa}	3,59	<0,01	<0,01	<0,01
CH_4 (mL/g MS)	5,02^{Aa}	6,04^{Aa}	8,38^{Aa}	9,72^{Aa}	3,43^{Aa}	4,96^{Aa}	5,19^{Aa}	5,79^{Aa}	7,76^{Aa}	11,24^{Aa}	9,64^{Aa}	8,25^{Aa}	1,18	0,999	0,02	<0,01
PG (mL/g MOVD)	38,77^{Aa}	39,36^{Aa}	43,35^{Aa}	47,01^{Aa}	27,26^{Aa}	38,19^{Aa}	35,04^{Aa}	39,03^{Aa}	38,96^{Aa}	44,10^{Aa}	39,07^{Aa}	38,65^{Aa}	2,32	0,996	0,39	<0,01
CH_4 (mL/g MOVD)	1,86^{Aa}	2,15^{Aa}	3,11^{Aa}	3,32^{Aa}	1,06^{Aa}	1,89^{Aa}	1,60^{Aa}	1,81^{Aa}	2,31^{Aa}	3,56^{Aa}	2,96^{Aa}	2,26^{Aa}	0,65	0,999	0,58	<0,01
PG (mL/g FDND)	24,82^{Aa}	24,68^{Aa}	27,08^{Aa}	27,94^{Aa}	14,37^{Aa}	24,23^{Aa}	18,65^{Aa}	21,06^{Aa}	19,39^{Aa}	24,08^{Aa}	20,39^{Aa}	17,31^{Aa}	2,41	0,860	<0,01	0,03
CH_4 (mL/g FDND)	1,19^{Aa}	1,33^{Aa}	1,94^{Aa}	1,96^{Aa}	0,56^{Aa}	1,24^{Aa}	0,84^{Aa}	0,97^{Aa}	1,15^{Aa}	1,93^{Aa}	1,55^{Aa}	0,99^{Aa}	0,31	0,999	0,29	<0,01
MOVD (g/kg)	371,79^{Aa}	362,90^{Aa}	361,02^{Aa}	344,44^{Aa}	308,40^{Ab}	360,82^{Aa}	311,40^{Aa}	313,59^{Aab}	294,28^{Ab}	316,42^{Aa}	304,56^{Aa}	276,54^{Ab}	10,34	0,934	<0,01	0,57
FDND (g/kg)	238,89^{Aa}	228,12^{Aa}	225,83^{Aa}	205,75^{Aa}	162,09^{Aab}	225,60^{Aa}	165,72^{Aa}	168,37^{Aab}	144,61^{Ab}	171,80^{Aa}	157,44^{Aa}	123,49^{Ab}	13,69	0,985	<0,01	0,57

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; CH_4 = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado.

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

Efeito de Dia: L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático;

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as doses pelo teste de Tukey (p<0,05). Médias com letras minúsculas diferentes indica diferença entre a mesma dose nos diferentes dias de incubação pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 24 – Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da forrageira *Panicum maximum* cv. Aruana, tratadas com concentrações crescentes de extrato contendo enzimas lignocelulósicas, oriundo da incubação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, durante seis, 12 e 18 dias em vinhaça

Parâmetros *	6º dia				12º dia				18º dia				E.P.M. †	Valor – p	L	Q
	Doses Enzima (mL)															
	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3				
PG_{24} (mL/g MS)	86,37^{Cb}	103,62^{BCb}	113,50^{ABb}	135,81^{Aa}	98,48^{Bb}	111,76^{ABab}	116,03^{ABab}	128,18^{Aa}	145,00^{Aa}	126,90^{Aa}	135,37^{Aa}	133,92^{Aa}	3,59	<0,01	<0,01	0,06
CH_4 (mL/g MS)	4,37^{Aa}	8,04^{Aa}	6,94^{Aa}	10,09^{Aa}	3,74^{Aa}	5,73^{Aa}	4,99^{Aa}	7,11^{Aa}	9,31^{Aa}	9,43^{Aa}	10,41^{Aa}	9,29^{Aa}	1,18	0,999	0,03	<0,01
PG (mL/g MOVD)	34,72^{Bb}	45,86^{Aba}	47,56^{Aba}	59,18^{Aa}	41,21^{Ab}	44,01^{Aa}	49,89^{Aa}	53,82^{Aa}	58,51^{Aa}	52,59^{Aa}	56,02^{Aa}	50,86^{Aa}	2,32	<0,01	0,01	0,18
CH_4 (mL/g MOVD)	3,87^{Aa}	3,62^{Aa}	2,94^{Aa}	4,42^{Aa}	1,56^{Aa}	2,23^{Aa}	2,12^{Aa}	3,06^{Aa}	3,56^{Aa}	3,80^{Aa}	4,35^{Aa}	3,48^{Aa}	0,65	0,999	0,88	<0,01
PG (mL/g FDND)	24,38^{Bb}	34,43^{Aba}	34,72^{Aba}	44,02^{Aa}	29,88^{Aab}	30,61^{Aa}	36,72^{Aa}	39,12^{Aa}	41,41^{Aa}	37,89^{Aa}	40,33^{Aa}	34,44^{Aa}	2,41	<0,01	0,13	0,31
CH_4 (mL/g FDND)	1,43^{Aa}	2,74^{Aa}	2,14^{Aa}	3,30^{Aa}	1,13^{Aa}	1,54^{Aa}	1,55^{Aa}	2,26^{Aa}	2,42^{Aa}	2,69^{Aa}	3,15^{Aa}	2,36^{Aa}	0,31	0,981	0,47	<0,01
MOVD (g/kg)	396,59^{Ba}	441,50^{Aa}	427,89^{Aba}	434,76^{Aa}	417,79^{Aa}	399,33^{Aa}	428,83^{Aa}	417,38^{Aa}	403,82^{Aa}	412,78^{Aa}	412,50^{Aa}	379,39^{Aa}	10,34	<0,01	0,09	0,85
FDND (g/kg)	277,39^{Ba}	331,01^{Aa}	314,72^{Aba}	322,94^{Aa}	302,62^{Aa}	280,50^{Aa}	315,60^{Aa}	302,13^{Aa}	285,88^{Aa}	296,62^{Aa}	296,28^{Aa}	256,58^{Aa}	13,69	<0,01	0,09	0,85

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; CH_4 = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado.

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

Efeito de Dia: L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático;

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as doses pelo teste de Tukey (p<0,05). Médias com letras minúsculas diferentes indica diferença entre a mesma dose nos diferentes dias de incubação pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 25 – Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da forrageira Bagaço de cana-de-açúcar, tratadas com concentrações crescentes de extrato contendo enzimas lignocelulósicas, oriundo da incubação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, durante seis, 12 e 18 dias em vinhaça

Parâmetros *	6º dia				12º dia				18º dia				E.P.M. †	Valor – p	L	Q
	Doses Enzima (mL)															
	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3				
PG_{24} (mL/g MS)	73,39^{Bb}	81,94^{Bb}	82,54^{Bb}	105,88^{Aa}	68,59^{Bb}	72,36^{Bab}	85,22^{ABab}	95,91^{Aa}	114,08^{Aa}	91,25^{Ba}	103,73^{Aba}	101,54^{Aba}	3,59	<0,01	<0,01	<0,01
CH_4 (mL/g MS)	5,31^{Aa}	6,85^{Aa}	5,69^{Aa}	6,66^{Aa}	3,80^{Aa}	4,28^{Aa}	5,26^{Aa}	4,40^{Aa}	10,33^{Aa}	7,76^{Aa}	4,24^{Aa}	9,83^{Aa}	1,18	0,997	0,13	0,01
PG (mL/g MOVD)	11,11^{Aa}	11,98^{Aa}	10,07^{Aa}	14,59^{Aa}	12,29 ^{Aa}	8,75^{Aa}	12,15^{Aa}	10,06^{Aa}	15,27^{Aa}	12,84^{Aa}	15,23^{Aa}	12,97^{Aa}	2,32	0,999	0,05	0,07
CH_4 (mL/g MOVD)	0,79^{Aa}	1,00^{Aa}	0,74^{Aa}	0,79^{Aa}	0,73^{Aa}	0,52^{Aa}	0,75^{Aa}	0,54^{Aa}	1,41^{Aa}	1,09^{Aa}	0,59^{Aa}	1,19^{Aa}	0,65	0,999	0,17	0,04
PG (mL/g FDND)	7,91^{Aa}	8,44^{Aa}	6,42^{Aa}	9,90^{Aa}	9,45^{Aa}	5,56^{Aa}	8,46^{Aa}	7,83^{Aa}	10,28^{Aa}	8,73^{Aa}	10,59^{Aa}	8,14^{Aa}	2,41	0,998	0,18	0,24
CH_4 (mL/g FDND)	0,56^{Aa}	0,70 ^{Aa}	0,49^{Aa}	0,51^{Aa}	0,57^{Aa}	0,33^{Aa}	0,52^{Aa}	0,34^{Aa}	0,73^{Aa}	0,75^{Aa}	0,72^{Aa}	0,77^{Aa}	0,31	0,999	0,23	0,07
MOVD (g/kg)	142,54^{Aa}	146,64^{Aa}	121,53^{Aa}	139,21^{Aa}	181,54^{Aa}	122,22^{Aa}	141,53^{Aa}	125,76^{Aa}	132,43^{Aa}	139,33^{Aa}	147,93^{Aa}	124,56^{Aa}	10,34	0,931	0,87	0,45
FDND (g/kg)	99,25^{Aa}	103,55^{Aa}	77,17^{Aa}	95,69^{Aa}	140,22^{Aa}	77,89^{Aa}	98,19^{Aa}	81,61^{Aa}	88,63^{Aa}	95,86^{Aa}	104,91^{Aa}	79,67^{Aa}	13,69	<0,01	0,86	0,44

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; CH_4 = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado.

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

Efeito de Dia: L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático;

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as doses pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Médias com letras minúsculas diferentes indica diferença entre a mesma dose nos diferentes dias de incubação pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 26 – Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da forrageira Cana-de-açucar picada, tratadas com concentrações crescentes de extrato contendo enzimas lignocelulósicas, oriundo da incubação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020, durante seis, 12 e 18 dias em vinhaça

Parâmetros *	6º dia				12º dia				18º dia				E.P.M. †	Valor – p	L	Q
	Doses Enzima (mL)															
	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3	G	G 1	G 2	G 3				
PG_{24} (mL/g MS)	$168,16^{Bc}$	$188,45^{Bb}$	$222,45^{Aab}$	$232,66^{Aa}$	$205,03^{Bb}$	$217,81^{Aba}$	$209,70^{ABb}$	$229,78^{Aa}$	$269,13^{Aa}$	$236,83^{Ba}$	$237,36^{Ba}$	$250,48^{Aba}$	3,59	<0,01	<0,01	0,12
CH_4 (mL/g MS)	$11,40^{Ab}$	$10,19^{Ab}$	$13,41^{Aab}$	$16,67^{Aab}$	$12,70^{Ab}$	$10,19^{Ab}$	$11,59^{Ab}$	$10,15^{Ab}$	$19,87^{Aa}$	$18,32^{Aa}$	$18,74^{Aa}$	$22,25^{Aa}$	1,18	0,995	<0,01	<0,01
PG (mL/g MOVD)	$107,36^{Cc}$	$121,38^{Bc}$	$144,04^{Aab}$	$147,24^{Aab}$	$127,90^{Bb}$	$137,24^{ABb}$	$131,04^{ABb}$	$144,05^{Ab}$	$171,44^{Aa}$	$151,59^{Ba}$	$146,30^{Ba}$	$157,98^{Aba}$	2,32	<0,01	<0,01	0,04
CH_4 (mL/g MOVD)	$7,28^{ABb}$	$6,51^{Bb}$	$8,67^{ABab}$	$10,56^{Aa}$	$7,91^{Aab}$	$6,42^{Ab}$	$7,25^{Ab}$	$6,34^{Ab}$	$12,27^{Aa}$	$11,72^{Aa}$	$11,49^{Aa}$	$14,12^{Aa}$	0,65	<0,01	<0,01	<0,01
PG (mL/g FDND)	$23,65^{Aab}$	$29,05^{Aa}$	$36,09^{Aa}$	$29,65^{Aa}$	$21,73^{Ab}$	$26,31^{Aa}$	$22,73^{Aab}$	$26,03^{Aa}$	$37,80^{Aa}$	$34,24^{Aba}$	$20,95^{Bb}$	$30,62^{Aba}$	2,41	<0,01	0,60	<0,01
CH_4 (mL/g FDND)	$1,62^{Aa}$	$1,44^{Aa}$	$2,15^{Aa}$	$2,14^{Aa}$	$1,30^{Aa}$	$1,29^{Aa}$	$1,26^{Aa}$	$1,11^{Aa}$	$2,56^{Aa}$	$2,64^{Aa}$	$1,15^{Aa}$	$2,93^{Aa}$	0,31	0,647	0,04	<0,01
MOVD (g/kg)	$640,55^{Aa}$	$645,53^{Aa}$	$648,39^{Aa}$	$632,99^{Aa}$	$624,14^{Aa}$	$630,03^{Aa}$	$624,61^{Aa}$	$626,78^{Aa}$	$637,81^{Aa}$	$641,30^{Aa}$	$616,87^{Aa}$	$630,94^{Aa}$	10,34	0,999	0,02	<0,01
FDND (g/kg)	$145,69^{Aa}$	$157,53^{Aa}$	$164,30^{Aa}$	$127,71^{Aa}$	$106,67^{Aa}$	$120,68^{Aa}$	$107,81^{Aa}$	$112,96^{Aa}$	$138,55^{Aa}$	$147,46^{Aa}$	$89,41^{Aa}$	$122,84^{Aa}$	13,69	0,979	0,02	0,01

* PG_{24} MS = produção total de gases em 24 horas; PG = produção de gases; CH_4 = produção de metano; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; FDND = fibra em detergente neutro degradado.

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

Efeito de Dia: L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático;

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as doses pelo teste de Tukey (p<0,05). Médias com letras minúsculas diferentes indica diferença entre a mesma dose nos diferentes dias de incubação pelo teste de Tukey (p<0,05).

Um passo inicial e de maneira simples, para o conhecimento dos efeitos de enzimas sobre parâmetros de fermentação ruminal é utilizar a metodologia da degradabilidade de forrageiras, em estudos *in vitro* e também a importância de salientar a presença de enzimas lignocelulolíticas e hidrolíticas avaliadas nos itens 5.2 e 5.3 respectivamente, produzidas pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020 atuando em conjunto. Krueger e Adesogan (2008) sugerem a utilização de um coquetel multienzimático, contendo misturas de enzimas como xilanases, celulases, entre outras, como um aditivo para aumentar a degradabilidade de forrageiras tropicais que possuam um baixo valor nutritivo, devido às concentrações relativamente altas de lignina. As ligações cruzadas entre o ácido ferúlico e a lignina limitam o acesso microbiano do rúmen às xilanas digestíveis da parede celular das forrageiras tropicais.

Dessa maneira foi possível observar que das seis forrageiras avaliadas, apenas três aumentaram a degradabilidade das fibras quando tratadas com diferentes concentrações do extrato enzimático de *P. sajor-caju* CCB 020, mostrando que existe uma correlação ideal entre as atividades enzimáticas ligninolíticas e das endoglucanase e/ou a xilanase ao sexto, 12º e 18º dias, respectivamente para Napier, Aruana e Brachiaria para se conseguir bons resultados de degradabilidade.

Os resultados de degradabilidade das fibras com aplicação dos extratos enzimáticos mostraram respostas mais fáceis de interpretar do que com o cultivo dos fungos nas forrageiras. Os fungos modificaram as fibras, diminuindo a hemicelulose total. Os extratos enzimáticos aplicados sobre as fibras mostraram degradabilidade das fibras transformando-as em material de maior digestibilidade pelos microrganismos do rumen, sendo que maiores concentrações dos extratos aumentaram a degradabilidade, mostrada pelos oito parâmetros analisados (Tabelas 21 a 26).

A produção de gases por 24 horas aumentou com o nível de concentração mais elevado das enzimas, sugerindo que os carboidratos fermentados totais aumentaram. A produção de CH_4 aumentou simultâneamente com os níveis das enzimas, em todos os substratos avaliados. Para o capim Aruana, apesar do maior nível de dose exibir diferença entre doses, quando comparado a outros substratos, este libera menos CH_4, demonstrando que o substrato de boa qualidade produz menos CH_4, o que também foi observado por Soltan et al. (2013).

O aumento dos níveis de concentração das enzimas melhorou a matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) e a fibra em detergente neutro degradada (FDND) das diferentes forrageiras analisadas e isto pode ser devido ao aumento na hidrólise do substrato e sinergismo com outras enzimas ruminais.

Como observado, pelos resultados dos parâmetros de produção de gases e degradabilidade *in vitro*, constatou que a adição de enzimas afetou a fermentação ruminal de forrageiras de forma diferente, conforme o conteúdo de fibra e composição dos polissacarídeos presentes, e ainda verificaram que a concentração enzimática foi um fator importante na eficácia das mesmas (JALILVAND et al., 2008; SOLTAN et al., 2013; HE et al., 2016). A otimização de dose de enzimas é necessária para assegurar o uso eficiente da enzima, particularmente devido ao alto custo da enzima fibrolítica. Quantidades excessivas ou insuficientes de doses enzimáticas, podem influenciar na digestão das forrageiras e desempenho do animal (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN et al., 2014).

5.11. Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta com Aplicação de Enzimas

Os microrganismos do rúmen, bactérias, fungos, protozoários, convertem os alimentos ingeridos (carboidratos, proteínas e açúcares) em ácidos orgânicos que são os nutrientes absorvidos para o desenvolvimento do animal, produzem também compostos indesejáveis ao ambiente como gás carbônico (CO_2), metano (CH_4), compostos nitrogenados e hidrogênio. A geração de CH_4 no rúmen é necessária para manter o equilíbrio de compostos, sendo utilizado nas reações de enzimas que mantém o nível de íons hidrogênio. O estudo da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como ácido acético, propiônico e butírico que são utilizados como principais nutrientes, pode mostrar o ganho nutricional proporcionado pelo alimento ingerido (ZHOU et al., 2011).

Nas análises de AGCC não foram detectados efeitos estatisticamente significativos ($p>0,05$) das doses enzimáticas dentro de cada período de incubação, para os parâmetros observados, nas seis forrageiras estudadas (Tabelas 27 e 28). Entretanto pode-se observar que houve uma interação significativa encontrada entre as atividades das enzimas e concentração aplicadas nas forrageiras. Pela razão C2:C3 pode ser recomentada a concentração G3 (6 mL) do extrato enzimático do fungo incubado durante doze dias em vinhaça.

Em pesquisa realizada por Soltan et al. (2013) foram observados os parâmentros de AGCC em forrageiras com adição de duas enzimas (endoglucanase e xilanase), as forrageiras suplementadas com enzima endoglucanases, aumentaram as concentrações de acetato para o Aruana, propionato e butirato para Napier, ambas em 24 horas de incubação e, somente para Buffel foi observado aumento na concentração do propionato, após 48 horas de incubação. Não observaram nenhum efeito significativo nas demais forrageiras com a suplementação das enzimas endoglucanase e xilanase.

Resultados obtido por Soltan et al. (2013), mostraram que a incubação de Aruana e Napier com celulase produziram mais CH_4 sendo consistente com a mudança do padrão de AGCC o que sugere que o aumento do CH_4 foi reflexo da melhoria da degradação da fermentação da fibra e não de modificação da comunidade metanogénica. O aumento das concentrações de acetato e butirato, por incubar estas forrageiras confirmou a suposição que a produção de acetato e butirato estão associadas com a liberação de H_2, que pode ser usado na metanogenese para formar o CH_4. Por sua vez, com uma mudança na produção de AGCC para mais propionato sem alterações no AGCC total e pH geralmente é esperada uma inibição da produção de CH_4 (GOEL; MAKKAR, 2012). Este foi o efeito que Soltan et al. (2013) encontraram no Buffel, com maior teor de fibra, quando tratados com adição celulases. No entanto tais efeitos não foram constatados para o bagaço de cana-de-açúcar. Soltan et al. (2013) concluíram que assim, a melhoria na degradabilidade da fibra em forrageiras com alto teor de celulase pelo tratamento com endoglucanase produziu menos CH_4 e propionato mais elevado, a menos que o bagaço de cana-de-açúcar seja altamente lignificado previamente, pode afetar negativamente os processos gerais de fermentação ruminal e degradabilidade de nutrientes mesmo após o tratamento do bagaço ainda assim, esta associação assumida entre produção de CH_4 e Cel e Lig contida nas forrageiras, precisa ser melhor investigada usando um maior conjunto de amostras de plantas e variáveis mensuradas.

Tabela 27 – Quantificação (mmol L^{-1}) de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em seis forrageiras, tratadas com quatro concentrações de enzimas produzidas em três períodos de incubação por *P. sajor-caju* CCB 020 em vinhaça

Forrageiras	Parâmetros	6º dia				12º dia				18º dia				E. P. M. †	Valor – p
		Concentrações de Enzimas (mL)													
		G	G1	G2	G3	G	G1	G2	G3	G	G1	G2	G3		
Panicum maximum cv. Aruana	Acetato	33,15 A	32,19 A	34,87 A	37,04 A	35,18 A	36,28 A	37,50 A	39,39 A	52,65 A	53,29 A	50,21 A	50,63 A	1,88	1,000
	Propionato	7,69 A	8,35 A	9,63 A	10,94 A	9,42 A	10,04 A	10,66 A	11,33 A	12,06 A	13,14 A	12,21 A	12,92 A	1,05	1,000
	Butirato	7,30 A	6,94 A	7,46 A	7,72 A	6,26 A	6,63 A	6,99 A	7,46 A	10,65 A	10,92 A	10,09 A	10,59 A	0,83	1,000
	Outros	2,60 A	2,31A	2,46 A	2,59 A	2,82A	2,99 A	3,01 A	3,16 A	4,52 A	4,50 A	4,05 A	4,15 A	0,56	1,000
	C2:C3	4,38 A	3,93 A	3,63 A	3,40 A	3,74 A	3,63 A	3,53 A	3,47 A	4,48 A	4,19 A	4,20 A	4,03 A	0,23	1,000
Bagaço de cana-de-açúcar	Acetato	31,42 A	30,84 A	31,82 A	35,04 A	33,53 A	35,19 A	35,03 A	37,87 A	50,53 A	54,67 A	45,82 A	51,45 A	1,88	1,000
	Propionato	7,10 A	7,66 A	8,34 A	10,26 A	8,53 A	9,15 A	9,37 A	10,37 A	10,87 A	11,21 A	10,83 A	13,29 A	1,05	1,000
	Butirato	7,19 A	6,88 A	6,58 A	7,49 A	5,72 A	6,34 A	6,36 A	7,13 A	9,72 A	10,01 A	9,39 A	11,24 A	0,83	1,000
	Outros	2,70 A	2,49 A	2,49 A	2,64 A	2,80 A	3,11 A	2,98 A	3,23 A	4,51 A	4,39 A	4,06 A	4,64 A	0,56	1,000
	C2:C3	4,50 A	4,11 A	3,84 A	3,43 A	3,94 A	3,87 A	3,75 A	3,64 A	4,79 A	5,10 A	4,31 A	4,12 A	0,23	1,000
Brachiaria decumbens cv. Basilisk	Acetato	34,01 A	30,90 A	36,28 A	36,91 A	37,01 A	36,13 A	37,55 A	39,86 A	59,97 A	54,86 A	57,44 A	55,75 A	1,88	1,000
	Propionato	9,71 A	9,28 A	11,57 A	12,00 A	10,99 A	11,12 A	11,68 A	12,67 A	16,00 A	14,58 A	16,72 A	16,12 A	1,05	1,000
	Butirato	8,08 A	7,32 A	8,38 A	8,18 A	7,12 A	6,94 A	7,53 A	7,57 A	13,01 A	11,42 A	12,64 A	12,06 A	0,83	1,000
	Outros	2,85 A	2,54 A	2,88 A	2,82 A	3,29 A	3,25 A	3,50 A	3,33 A	5,38 A	4,69 A	4,99 A	4,79 A	0,56	1,000
	C2:C3	3,55 A	3,47 A	3,17 A	3,08 A	3,37 A	3,25 A	3,21 A	3,14 A	3,78 A	3,83 A	3,58 A	3,58 A	0,23	1,000

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

C2:C3 = razão acetato:propionato

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as concentrações pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Continuação

Forrageiras	Parâmetros	6º dia				12º dia				18º dia				E. P. M. †	Valor – p
		Concentrações de Enzimas (mL)													
		G	G1	G2	G3	G	G1	G2	G3	G	G1	G2	G3		
Cenchrus ciliaris cv. Buffel	Acetato	32,31 A	31,86 A	33,84 A	37,37 A	36,00 A	35,78 A	38,76 A	40,05 A	54,17 A	54,49 A	55,58 A	52,50 A	1,88	1,000
	Propionato	8,19 A	8,45 A	9,66 A	11,54 A	9,67 A	9,84 A	10,72 A	11,43 A	12,48 A	13,22 A	14,17 A	13,47 A	1,05	1,000
	Butirato	7,54 A	7,03 A	7,25 A	8,10 A	6,31 A	6,42 A	6,90 A	7,53 A	10,75 A	10,76 A	11,49 A	10,90 A	0,83	1,000
	Outros	2,50 A	2,44 A	2,43 A	2,74 A	3,07 A	3,10 A	3,23 A	3,40 A	4,88 A	4,67 A	4,86 A	4,50 A	0,56	1,000
	C2:C3	4,02 A	3,91 A	3,60 A	3,25 A	3,73 A	3,65 A	3,62 A	3,50 A	4,45 A	4,22 A	4,10 A	3,97 A	0,23	1,000
Cana-de-açúcar picada	Acetato	35,83 A	36,75 A	38,46 A	41,58 A	38,49 A	40,73 A	41,47 A	42,89 A	59,02 A	57,30 A	59,80 A	62,79 A	1,88	1,000
	Propionato	13,70 A	13,99 A	15,62 A	17,32 A	14,45 A	15,14 A	15,62 A	16,39 A	19,95 A	20,12 A	22,62 A	24,23 A	1,05	1,000
	Butirato	9,42 A	9,23 A	9,41 A	10,16 A	9,64 A	10,48 A	10,72 A	11,26 A	13,68 A	13,97 A	15,06 A	16,19 A	0,83	1,000
	Outros	2,24 A	2,31 A	2,35 A	2,52 A	2,94 A	3,27 A	3,21 A	3,45 A	4,18 A	3,95 A	4,25 A	4,31 A	0,56	1,000
	C2:C3	2,68 A	2,68 A	2,51 A	2,40 A	2,66 A	2,69 A	2,65 A	2,61 A	2,99 A	2,88 A	2,78 A	2,75 A	0,23	1,000
Pennisetum purpureum Schum. cv. Napier	Acetato	34,18 A	35,44 A	36,65 A	38,80 A	35,79 A	36,81 A	38,54 A	39,68 A	58,21 A	54,61 A	59,81 A	58,25 A	1,88	1,000
	Propionato	8,83 A	9,98 A	10,77 A	11,93 A	9,91 A	10,42 A	11,27 A	11,71 A	14,22 A	13,62 A	16,12 A	13,45 A	1,05	1,000
	Butirato	7,88 A	7,79 A	7,93 A	7,86 A	6,51 A	6,68 A	7,16 A	7,66 A	11,75 A	10,93 A	12,15 A	10,58 A	0,83	1,000
	Outros	2,73 A	2,74 A	2,71 A	2,65 A	3,12 A	3,24 A	3,34 A	3,47 A	5,15 A	4,63 A	4,88 A	4,26 A	0,56	1,000
	C2:C3	3,97 A	3,58 A	3,45 A	3,26 A	3,62 A	3,55 A	3,42 A	3,38 A	4,18 A	4,07 A	3,90 A	4,46 A	0,23	1,000

G = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G1 = 0,5 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G2 = 0,5 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo; G3 = 0,5 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 50,0 mL solução nutritiva + 25,0 mL inoculo.

C2:C3 = razão acetato:propionato

† E.P.M. = erro padrão da média.

Médias com letras maiúsculas diferentes dentro de cada dia de incubação indica diferença entre as concentrações pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

6. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente estudo, conclui-se que os fungos *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus var, shimeji*, *P. albidus* CCB 068 e *P. ostreatus* inoculados nas forrageiras se desenvolveram e foram capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas e, que os mesmo modificam a composição bromatológica original das forrageiras, havendo alterações nas porcentagens das fibras, apresentado uma variação na produção de gases decorrente das alterações que os quatros fungos ocasionaram nas forrageiras.

O fungos apresentaram diminuição da degradação das fibras, com decorrer dos dias de avaliação, proporcionando uma diminuição na PG e degradabilidade das forrageiras.

A inoculação do fungo *P. sajor-caju* CCB 020 sobre as forrageiras não proporcionou aumento de proteína, talvez pelo consumo de nitrogênio no desenvolvimento do fungo. Mas demonstrou afinidade em degradar hemicelulose das forrageiras Napier, Aruana e bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada, o mesmo não ocorrendo para Lig e Cel.

No cultivo do *P. ostreatus var. shimeji* não apresentou aumento no teor de PB para nenhuma das forrageiras. Mas o fungo *P. ostreatus var. shimeji* atuou sobre as forrageiras Brachiaria, Napier, Buffel, bagaço de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar picada, degradando a lignina. Já para as forrageiras Napier e Aruana ocorreram degradação no teores de Cel e H-cel, nas demais forrageiras apenas a Cel, para Brachiaria e a H-cel para o bagaço de cana-de-açúcar.

Para o tratamento biológico com fungo *P. albidus* CCB 068 na forrageira Buffel foi o que demostrou melhor eficiência na ação do *P. albidus* CCB 068, comparada com as demais forrageiras, apresentando as degradações no material lignocelulósico e tendo um aumento no teor de PB.

Para o fungo *P. ostreatus apenas nas forrageiras Brachiaria, Buffel e cana-de-açúcar picada apresentaram* aumento no teor de PB e para os demais forrageiras não apresentaram variações e apenas para o bagaço de cana-de-açúcar, teve preferência na degradação da lignina.

A adição de extrato enzimático do fungo *P. sajor-caju* CCB 020 desenvolvido em vinhaça durante os períodos de 6, 12 e 18 dias e aplicado sobre as seis forrageiras, mostrou resultados de degradabilidade. Com a adição de extrato enzimático a produção de gases aumentou com aplicação de 2, 4 e 6 mL, sendo diretamente proporcional a concentração, mostrando a ocorrência da degradabilidade da fibras.

Os resultados de degradabilidade e produção de gases mostraram que para as concentraçoes de extrato enzimático produzida pelo fungo *P. sajor-caju* CCB 020, adicionados nas forrageiras pode variar substancialmente para os diferentes tipos de forrageiras.

Afim de otimizar a eficiência da aplicação de enzimas lignocelulolíticas faz necessário aumentar as concentrações das enzimas, aplicadas sob a forrageiras.

Os resultados obtidos sugerem que os *Pleurotus*, é um fungo apropriado para melhorar o valor nutritivo das forragerias como alimento para ruminates, melhorando a composição bromatoligica, mas também aumentando a degradabilidade.

REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A. T.; MA, Z. X.; ROMERO, J. J.; ARRIOLA, K. G. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, Champaing, v. 92, p. 1317-1330, 2014.

AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AKINFEMI, A.; OGUNWOLE, O.A. Chemical Composition and *in vitro* digestibility of rice straw treated with *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus Pulmonarius* and *Pleurotus tuber-regium. Slovak* **Journal of Animal Science**, v. 45, p. 14-20, 2012.

ALENCAR, C. A. B.; MARTINS, C. E.; OLIVEIRA, R. A., CÓSER, A. C., CUNHA, F. F. Bromatologia e digestibilidade de gramíneas manejadas por corte e submetidas à adubações nitrogenadas e estações anuais. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 8-15, 2014.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMING, J. S.; GEMAEL, A.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. **Nutrição animal**. As bases e os fundamentos da nutrição animal. São Paulo: Nobel, 2002. v. 1.

ANTUNES, R. C.; RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 239-260.

ARAÚJO, R. C.; PIRES, A. V.; MOURO, G. B.; ABDALLA, A. L.; SALLAM, S. M. A. Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Tecnology**, Amsterdam, v. 166, p. 155-162, 2011.

ARCURI, P. B.; MATOS, L. L. Microbiologia do rúmen. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 175, p. 5-8, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 18. ed. Arlington: AOAC Internacional, 2011.

AWAFO, V. A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichodew reseei* and its characteristics. 1997. 255 p. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Department of Food Science and Agricultural Chernistry, Macdonald Campus, McGill University, Montreal, Quebec, 1997.

BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, p. 3513-3519, 2008.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 257-270, 1992.

BALL, A. S.; JACKSON, A. M. The recovery of lignocellulose degrading enzymes from spent mushroom compost. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 311-314, 1995.

BARNEY, D. L. **Growing mushrooms commercially**: risks and opportunities ETSE. Moscow, ID: University of Idaho, College of Agriculture, 2009. 8 p. Disponível em: http://www.naturalresource.msstate.edu/resources/mushroom.html.

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**, Champaing, v. 81, p. E37-E47, 2003.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 538 p.

BERCHIELLI, T. T.; VEJA-GARCIA, A.; OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 415-436.

BERGER, L. L.; FAHEY JUNIOR, G. C; BOURQUIN, L. D.; TITGEMEYER, E. C. Modification of forage after harvest. In: FAHEY, D. C. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. 1. ed. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1994. p. 922-966.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.

BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, Barking, v. 59, p. 5-8, 1997.

BITENCOURT, G. A. **Caracterização ecotoxicológica de lodo gerado em estação de tratamento de água.** 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER. K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, p. 24-34, 1997.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. C. **Enzimas em biotecnologia –** produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Editora Ícone, 1995. 206p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos**. Brasília, DF, 2013.

BUENO, I. C. S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas**. 2002. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

BULLE, M. L. M.; RIBEIRO, F. G.; LEME, P. R.; TITTO, E. A. L.; LANNA, D. P. D. Desempenho de tourinhos cruzados em rações de alto teor de concentrado com bagaço de cana-de-açúcar como único volumoso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, p. 444-450, 2002.

BUSWELL, J. A.; ODIER, E.; KIRK, K. Lignin biodegradation. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 6, n. 1, p. 1-60, 1987.

CAMPOS, C. F. **Efeito do *Bacillus thuringiensis* na dieta (degradabilidade ruminal e digestibilidade aparenteM) e no desempenho de ovinos**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAS, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 44, p. 48-53, 2010.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; MAGALHÃES, A. F.; FREIRE, M. A. L.; SILVA, F. F.; SILVA, R. R.; CARVALHO, B. M. A. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 41, p. 125-132, 2006.

CARVALHO, G. G. P.; CAVALI, J.; FERNANDES, F. E. P.; ROSA, L. O.; OLIVINDO, C. S.; PORTO, M. O.; PIRES, A. J. V.; GARCIA, R. Composição química e digestibilidade da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, p. 1346-1352, 2009.

CASTRO, A. L. A.; PAIVA, P. C. A.; DIAS, E. S.; SANTOS, J. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade de residuos de lixadeira de algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 608-613, 2004.

CASTRO, M. A.; JUNIOR, P. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation.** Boca Raton: CRC Press, 1989.

CHEN, X. L.; WANG, J. K.; WU, Y. M.; LIU, J. X. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid and solidassociated ruminal microbes *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, p. 1-14, 2008.

CHENG, K. H.; COSTERTON. J. W. Microbial adhesion and colonization within the digestive tract. In: BARNES, E. M.; MEAD, G. C. **Anaerobic bacteria in habitats other than man**. London: Blackwell Science, 1986. p. 239-262.

CHURCH, D.C. **The ruminant animal**: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Waveland Press, 1988. 563 p.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y Biotechnological applications and potencial of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus* **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 58, p.582-594, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.1. Brasília, DF: CONAB, 2015. 27 p. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_15_15_44_37_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_14.pdf. Acesso em: 25 fev. 2015.

COWLING, E. B. **Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi**. Washington, DC: USDA, 1961. 79 p. (Technical Bulletin, 1258).

DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology**. Wooster: Ohio State University, 1987. 239 p.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis e efluentes da estação de tratamento de água residuárias de Americana, SP**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de Pleurotus spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivo do Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72. N. 3, p. 331-338, 2005.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Degradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos: atualização. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. cap. 13, p. 303-320.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: a review. **Enzymes and Microbial Technology**, Surrey, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 29, p. 257-266, 1993.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. Effect of growth, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by White-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, p. 1531-1538, 2008.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLAURI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, p. 457-462, 2008.

ELLIS, J. L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; BANNINK, A.; ODONGO, N. E.; McBRIDE, B. W.; FRANCE, J. Aspects of rumen Microbiology central to mechanistic modelling of methane production im cattle. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 146, p. 213-233, 2008.

EL-NASSER, N. H. A.; HELMY, S. M.; EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, Barking, v. 55, p. 249-253, 1997.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

EUCLIDES, V. P. B.; MEDEIROS, S. R. Suplementação animal em pastagens e seu impacto na utilização de pastagem. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM TEORIA E PRATICA DA PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTAGENS, 22., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 33-70.

EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L.; MENDES, A. R.; FATURI, C. Desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore em confinamento alimentados com bagaço de cana-de-açúcar e diferentes fontes energéticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 2050-2057, 2006.

FÄHREUS, G. Aromatic compound as growth substances for laccase producing rot fungi. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, p. 572-579, 1962.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y.-H. **Cellulose hydrolysis.** Heidelberg: Springer, 1987. (Biotechnology Monographs, 3).

FAO. FAOSTAT 2014. Rome,, 2015. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#home.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, untrastructure and reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 465-484.

FERREIRA, L. F. R. Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungo. 2009. 135 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L. F. R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T. G.; POMPEU, G. B.; LOPES, A. M. Q.; SILVA, D. P.; MONTEIRO, R. T. R. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with Pleurotus sajor-caju utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 132-137, 2011.

FERREIRA, L.F.; AGUIAR, M.; POMPEU, G.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.T.R. Selection of vinasse degrading microorganisms. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Oxford, v.26, p.1613-1621, 2010.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FONDEVILA, M. Proceso implicado en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. **Revista de la Facultad de Agronomia (LUZ)**, Maracaibo, v. 15, p. 87-106, 1998.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuaria, 2000. (Serie Engenharia Agrícola, 1)

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrintestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 1-25.

GASSARA, F.; SATINDER, K.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, p. 388–394, 2010.

GERON, L. J. V.; MIGUEL, G. Z.; MEXIA, A. A.; CRUZ, C.; NETO, R. M.; SCHUMANN, A. M. Composição química, valor de pH e temperatura do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e hidrolisado com cal (CaO) conservados em mini silos. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 8, n. 1, p. 57-68, 2010.

GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SCALONI, A.; FONTANELLA, B.; FARACO, V.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, London, v. 34, p. 655-663, 1999.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins, a status review. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 729-739, 2012.

GONÇALVES, C. C. M. **Qualidade e valor nutritivo de resíduo de algodão submetido ao cultivo de cogumelo.** 2007. 165 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 215, p. 425-430, 2002.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: HOFRICHTER, M.; STEINBÜCHEL, A. (Ed.). **Lignin, humic substances and coal**. Weinheim, Germany: Wiley-VHC, 2001, p. 129-179.

HE, Z. X.; ZHAO, Y. L.; MCALLISTER, T. A.; YANG, W. Z. Effect of in vitro techniques and exogenous feed enzymes on feed digestion. **Animal Feed Science and Technology,** Amsterdam, v. 213, p. 148-152, 2016.

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Purifications and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. **Biochemical Enginnering Journal**, Amsterdam, v. 32, p. 179-184, 2006.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbs**. New York: Academic Press, p. 533, 1966.

HRISTOV, A. N.; OH, J.; FIRKINS, J. L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKKAR, H. P. S.; ADESOGAN, A. T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P. J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J. M. SPECIAL TOPICS - mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of manure management mitigation options. **Journal of Animal Science** v. 91, n. 11, p. 5045-5069, 2013.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and lacases for waste treatment. **Journal of Environmental of Enginneering and Science**, Vancouver, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2004.

JAFARI, M.A., NIKKHAH, A., SADEGHI, A.A.; CHAMANI, M. The effect of *Pleurotus* spp. fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of rice straw. *Pakistan.* **Journal of Biological Science**, v. 10, p. 2460-2464, 2007.

JALILVAND, G.; ODONGO, N. E.; LÓPEZ, 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**, Amsterdam, v. 146, p. 289-301, 2008.

JÄNIS, J.; PULKKINEN, P.; ROUVINEN, J.; VAINIOTALO, P. Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 365, p. 165-173, 2007.

JIANG, Z.; BAIL, A. L.; WU, A. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from Thermotoga maritima on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science**, London, v. 47, p. 172-179, 2008.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaing, v. 73, p. 2483-2492, 1995.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, p. 679-689, 2013.

KARUNANANDAA, K.; VARGA, G. A. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism, and fiber utilization during continuous culture. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 61, p. 1-16, 1996.

KIEHL, R. J. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade de composto. 6. ed. Piracicaba: O autor, 2012. 171 p.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 84-94, 2008.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlim v. 57, p. 45-126, 1997.

KUMAR, V.; WATI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; YADAV, B. S.; SINGH, D; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested surgarcane molasses spent wash efluente from biomethanation plants by white-rot fungi. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 83-88, 1998.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H2O2 dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

LABORDE, J. Les champignons peuvent-ils représenter un produit pour la diversification rurale. In: INRA. **Dossier Pleurote**. Bordeaux: Centre de Recherches de Bordeaux, Station de Recherches sur les Champignons, 1995. p. 17–18.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. C.; RODRIGUES, A. A.; CRUZ, G. M.; BATISTA, L. A. R.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M. A.; BIDOIA, M. A. P.; ROSSETO, R.; MARTINS, A. L. M.; GALLO, P. B.; KANTACK, R. A. D.; CAVICHIOLI, J. C.; VASCONCELOS, A. C. M.; XAVIER, M. A. **A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal.** Campinas: Instituto Agronômico, 2002. 36 p. (Boletim técnico, 193).

LANG, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganismos. **Microbial Ecology**, New York, v. 34, p. 1-10, 1997.

LEE, K.; MOON, S. H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, p. 261-268, 2003.

LENDOWSKI, L.; FÄRBER, H.; HOLY, A.; DARIUS, A.; EHRICH, B.; WIPPERMANN, C.; KÜFNER, B.; EXNER, M. Accidental contamination of a German town's drinking water with sodium hydroxide. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 218, p. 366-369, 2015.

LENG, R. A.; NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 67, p. 1072-1089, 1984.

LIMA, R. F. **Fracionamento de carboidratos de concentrados energéticos utilizados na alimentação animal**. 2004. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODDOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAHESH, M. S.; MOLHINI, M. Biological treatment of crop residues for ruminant feeding: A review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 12, p. 4221-4231, 2013.

MAHROUS, A. A.; EL-SHAFIE, M. H.; ABDEL-KHALEK, T. M. M. Performance of growing lambs fed fungs treated sugarcane bagasse. **Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences**, Cairo, v. 6, p. 27-35, 2011.

MANELLA, M. Q.; LOURENÇO, A. J.; LEME, P. R. Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena lecocephala*. Característica de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1002-1012, 2003.

MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com reagentes químicos e pressão de vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, p. 1196-1204, 2000.

MAURÍCIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, p. 321-330, 1999.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. v. 2, p. 304-319.

MENDES, C. Q.; TURINO, V. F.; SUSIN, I.; PIRES, A. V.; MORAIS, J. B.; GENTIL, R. S. Comportamento ingestivo de cordeiros e digestibilidade dos nutrientes de dietas contendo alta proporção de concentrado e diferentes fontes de fibra em detergente neutro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 594-600, 2010.

MENEZES, C. R. **Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos.** 2007. 202 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MERINO, D. F. L. **Patologia y técnicas de intervención**. Recuperación de estruturas de madera patologia de la madera. Madrid: Departamento de Construcción y Tecnologia Arquitectónicas; editorial Munilla-Laría, 1998. 475 p.

MISSIO, R. L. Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 65, n. 250, p. 267-278, 2016.

MIZUNO, T. K. *Agaricus blazei Murrill*: Medicional and dietary effets. **Food Review International**, Oxford, v. 11, n. 1 p. 172-197, 1995.

MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A. P. J. Fungi in ecosystems. In: _____. (Org.). **21st century guidebook to fungi.** New York: Cambridge University Press, 2011. p. 238-245.

MORAIS, M. H.; RAMOS, A. C.; MATOS, N.; SANTOS-OLIVEIRA, E. J. Note: production of shitake mushroom (*Lentinus edodes*), on ligninocellulosic residues. **Food Science and Technology International**, Madison, v. 6, n. 2, p. 123-128, 2000.

MOYSON, E.; VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 421-424, 1991.

NAKAYAMA, T.; AMACHI, T. Fungal peroxidase: its structure, function and application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 6, p. 185-198, 1999.

NGULUVE, D. W. Composição química, produção in vitro de gases da fermentação entérica e ácidos graxos de cadeia curta de gramíneas forrageiras tropicais. 2014. 106 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenaria de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

NICOLINI, L.; VOLPE, C.; PEZZOTTI, A.; CARILLI, A. Changes in in vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. **Bioresource Technology**, Barking, v. 45, p. 17-20, 1993.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing time, freezing and thawing, acid preservative and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, p. 601-607, 1987.

NOGUEIRA, U. T.; MAURÍCIO, R. M.; GONÇALVES, L. C. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizado a técnica in vitro semi-automática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 663-641, 2006.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlhas of rumen microbiology**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1981. v. 31, 302 p.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **REDVET. Revista Eletrônica de Veterinária**, Málaga, v. 8, n. 6, p. 1695-7504, 2007.

OWEN, E.; SMITH, T.; MAKKAR, H. P. S. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries: A synthesis of an FAO e-conference. **Animal Feed Science and Technology**, Amstedam, v. 174, p. 211-226, 2012.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Long Grove: Waveland Press, 1993. p. 145-171.

PALMIERI, G.; DINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleuortus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 920-924, 2000.

PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 54, p. 1025-1031, 1971.

PERMANA, I. G.; FLACHOWSKY, G.; MEULEN, U. ter; ZADRAZIL, F. Use of sugarcane bagasse for mushroom and animal feed production. **Mushroom Science**, Leuven, v. 15, part I, p. 385-390, 2000.

PIRES, A. J. V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S. V.; PEREIRA, O. G.; CECON, P. R.; SILVA, F. F.; SILVA, P. A.; VELOSO, C. M. Novilhas alimentadas com bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, p. 1078-1085, 2004.

PIRES, A. J. V.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. G. P.; SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 953-957, 2006. Suplemento.

PLATT, M. J.; HADAR, Y.; CHET, I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotecnology**, Berlin, v. 20, p. 150-154, 1984.

POMPEU, G.B. **Comportamento enzimático de quatro fungos ligninolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol**. 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. Screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot funfus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 11, p. 1561-1566, 2003.

REIS, R. A.; GARCIA, R.; SILVA, D. J. Efeitos da aplicação de amônia anidra sobre a digestibilidade do feno do capimbraquiária. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 19, n. 3, p. 201-208, 1990.

REIS, R. A.; RODRIGUES, L. R. A.; PEREIRA, J. R. A. Sementes de gramíneas forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 6., 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1996. p. 259-280.

REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G.R. Aditivos alternativos para alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL – CLANA, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Latino-Americano de Nutrição Animal, 2006.

RITTER, S. K. Lignocellulose: a complex biomaterial**. Chemical & Engineering News**, Easton, v 86, p. 15, 2008.

RODRIGUES, M. A. M.; PINTO, P.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A.; GUEDES, C. V. M.; CARDOSO, V. M. G.; CONE, J. W.; FERREIRA, L. M. M.; COLAÇO, J.; SEQUEIRA, C. A. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, Amstedam, v. 141, p. 326-338, 2008.

RODRIGUES, R. C.; PEIXOTO, R. R. Avaliação nutricional do bagaço de cana-de-açúcar de micro destilaria de álcool para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 22, p. 212-221, 1993.

RODRIGUEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BERMÚDEZ, R. C.; MORRIS, H. Tratamiento de efluentes industrials coloreados com *Pleurotus* spp. **Revista Iberoamericana de Micologia**, México, v. 20, p. 164-168, 2003.

ROYSE, D. J.; FALES, S. L.; KARUNANANDAA, K. Influence of formaldehyde treated soybean and commercial nutriente supplementation on mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) yield and in vitro dry matter digestibility of spent substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, n. 3, p. 425-429, 1991.

RUGGERI, B.; SASSI, G. Experimental sensitivity analysis of trickle bed bioreactor for lignin peroxidases production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 669-1676, 2003.

RUSSEL, J. B. Ecology of rumen microorganisms: energy use. In: DOBSON, A.; DOBSON, M. **Aspect of digestive physiology in ruminants**. Ithaca: Comstock Publications, 1988. p. 74-98.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, p. 185–194, 2009.

SÁNCHEZ, C. Modern aspects of mushrooms culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 756-762, 2004.

SANTOS, F. A. P.; MARTINEZ, J. C.; VOLTOLINI, T. V. NUSSIO, C. M. B. Associação de plantas forrageiras de clima temperado e tropical em sistemas de produção animal de regiões subtropicais. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 20., 2003, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2003. p. 215-246.

SANTOS, J. R. P. **Potencial de biodegradação de resíduos por Pleurotus spp.** 2014. 110 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 32, p. 199-208, 1974.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; VARGAS JUNIOR, F. M. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003a.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; VARGAS JUNIOR, F. M.; ROSSI, P. Valor nutritivo do feno de braquiária amonizado com uréia ou inoculado com *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 2040-2049, 2003b.

SHISHIDO, K. The application of molecular genetics to oriental mushrooms. In: KINGHORN, J. R.; TURNER, G. **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. London: Blackie Academic, 1992. cap. 9, p. 201-213. 1992.

SIDDHANT, C.; SINGH, S. Recycling of spent oyster mushroom substrate to recover additional value. *Kathmandu University* **Journal of Science**, v. 5, p. 66-71, 2009.

SILVA, G. M. **Expressão de enzimas de *Pleurotus* spp. e descoloração do corante azul indigo**. 2014. 122 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SOARES, M. S.; PIRES, A. J. V.; SILVA, L. G.; GUIMARÃES, J. T.; MACHADO, T. C.; FRAZÃO, O. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, Belo Horizonte, v. 12, n. 1, p. 3837-3855, 2015.

SOLTAN, Y. A.; ABDALLA, A. L.; SILVA, L. R. F.; NATEL, A. S.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H. Response of different tropical pasture grass species to treatments with fibrolytic enzymes in terms of in vitro ruminal nutrient degradation and methanogenesis. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Izatnagar, v. 13, p. 551-568, 2013.

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes**. 2012. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SOUZA, G.; SILVA, M. G.; SANTOS, P. P.; ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; PEÇANHA, R. S. R. M.; MONTEIRO, R. T. R. Ligninolytic enzymes activities and nutritional value of spent mushroon substract. In: EUROFOODCHEM, 18., 2015, Madrid, Spain.

SOUZA, O. E.; SANTOS, E. I. **Aproveitamento de resíduos e subprodutos agropecuários pelos ruminantes**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidase by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, J. C. **Nutrição dos ruminante**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1991.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gás production method using a pressure transducter to determine the fermentation kinetics of rumintant feeds. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 185-197, 1994.

TORRES, L. B.; FERREIRA, M. A.; VÉRAS, A. S. C.; MELO, A. A. S.; ANDRADE, D. K. B. Níveis de bagaço de cana e uréia como substituto ao farelo de soja em dietas para bovinos leiteiros em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 760-767, 2003.

UNIÃO DA INDUSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. **Novas tecnologias para a vinhaça**. São Paulo: UNICA, 2016. Disponível em: http://www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=32015310. Acesso em: 18 jan. 2017.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: Berchielli, T. T. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583 p.

VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CAPELLE, E. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 329 p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvallis: O e B Books, 1982. 374 p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 446 p.

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

VITTI, L. L. S. **Condições de produção e atividade de celulase do fungo Aspergillus sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana**. 1988. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

WADT, L. C. **Cultivo de *Pleurotus spp*. em vinhaça à produção de biomassa e exopolissacarídeos.** 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich cilliate protozoa. **Microbiological Review**, Washington, DC, v. 50, p. 25-49, 1986.

WILLIAMS, B. A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Ed.). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap. 10, p. 189-214.

WOOD, T. M.; BHAT, M. K. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, p. 87–112, 1988.

WYMAN, C. E. Potencial synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals and power. **Biotechnology Progress**, New York, v. 19, n. 2, p. 254-262, 2003.

YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 903-908, 2009.

ZADRAZIL, F. Influence of ammonium nitrate and organic supplements on the yield of *Pleurotus sajor-caju* (Fr) Singer**. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. New York, v. 9, n. 1, p. 31-35, 1980.

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

ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of celulose by fungal celulose. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.