



Acta Scientiarum. Animal Sciences

ISSN: 1806-2636

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá  
Brasil

de Souza Martins, Adriana; de Figueiredo Vieira, Paulo; Teresinha Berchielli, Telma; Nunes do Prado, Ivanor

Degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz utilizando enzimas fibrolíticas exógenas

Acta Scientiarum. Animal Sciences, vol. 30, núm. 4, 2008, pp. 435-442

Universidade Estadual de Maringá

.png, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303126494006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz utilizando enzimas fibrolíticas exógenas

Adriana de Souza Martins<sup>1\*</sup>, Paulo de Figueiredo Vieira<sup>2</sup>, Telma Teresinha Berchielli<sup>3</sup> e Ivanor Nunes do Prado<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Campos Gerais. Av. Carlos Cavalcanti, 8000, 84020-970, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Faculdade de Agronomia e Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo, Brasil. <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: dri261@yahoo.com.br

**RESUMO.** Estudou-se o efeito da adição de enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) sobre a degradabilidade *in situ* da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose da silagem de milho (SM) e da palha de arroz (PA), utilizando seis bovinos fistulados no rúmen. Também foi avaliada a proporção de nitrogênio (N) insolúvel em detergente ácido em relação ao N total (NIDA/N total). As enzimas fibrolíticas foram extraídas dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*, sendo fornecido 0,75 g kg<sup>-1</sup> de MS animal<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, via cânula ruminal. Os tempos de incubação foram: 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. Os resíduos de incubação foram comparados por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A fração solúvel da MS e da PB da silagem de milho aumentou com a adição de enzimas fibrolíticas. Não houve efeito das enzimas sobre a degradação da parede celular dos volumosos. A adição de enzimas não alterou o teor de NIDA/N total da silagem de milho, porém aumentou esta proporção nos resíduos da palha de arroz incubados durante 12 e 48 h. As observações ao MEV indicaram aumento da colonização bacteriana sobre a parede celular dos volumosos, mas sem efeito sobre a degradação ruminal.

**Palavras-chave:** celulase, fibra, microrganismos, microscopia eletrônica, rúmen.

**ABSTRACT. Ruminal degradation of corn silage and rice straw using exogenous fibrolytic enzymes.** This study evaluated the effect of fibrolytic enzyme addition (cellulase and xylanase) on the dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and hemicellulose *in situ* degradability of corn silage (CS) and rice straw (RS), using six cattle cannulated on the rumen. Acid detergent insoluble nitrogen (ADIN/total N) was evaluated. The fibrolytic enzymes were extracted from *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum* fungi, supplied at 0.75 g kg<sup>-1</sup> of DM animal<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, through ruminal cannula. The incubation times were 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours. The incubation residues were compared by scanning electron micrograph (SEM). Soluble fraction of DM and CP corn silage increased with enzyme supplementation. There was no effect of enzymes on the cell wall degradation of roughages. The enzyme addition did not alter the ADIN/total N level of corn silage; however, this ratio was increased on the rice straw incubated during 12 and 48 h. In general, the SEM observations showed increased bacterial colonization on the cell wall of roughages with fibrolytic enzymes addition, although without effect on ruminal degradation.

**Key words:** cellulase, fiber, microorganisms, electron micrograph, rumen.

## Introdução

Os ruminantes aclimatam-se a uma variedade de nichos ecológicos por serem capazes de utilizar os carboidratos presentes na parede celular dos vegetais graças à simbiose existente entre uma população microbiana diversificada, presente no rúmen. Apesar da habilidade destes microrganismos na digestão da celulose, a conversão dos alimentos, especialmente os fibrosos, para a produção de carne e leite, é pouco

eficiente (Varga e Kolver, 1997). Segundo os autores, fatores relacionados à estrutura da planta, como as interações físico-químicas entre os constituintes da parede celular, particularmente as ligações entre a matriz de hemicelulose e lignina, e os aspectos relacionados ao animal, como mastigação, salivação e pH ruminal, limitam a extensão da digestão da fibra no rúmen por representarem uma barreira física aos processos fibrolíticos.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos volumosos pelos ruminantes, pesquisadores vêm estudando o efeito da utilização de produtos biotecnológicos e, dentre eles, tem-se destacado a suplementação com enzimas fibrolíticas exógenas. Estudos têm indicado aumento na degradabilidade *in situ* da MS e FDN (Lewis et al., 1996), quando enzimas fibrolíticas foram adicionadas à dieta de ruminantes.

O êxito na conservação de gramíneas, na forma de silagem, é dependente da quantidade de carboidratos prontamente fermentáveis presentes na forragem. A estrutura química dos carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) e da lignina da silagem determina a acessibilidade da fibra aos microrganismos ruminais, interferindo indiretamente na degradação e aproveitamento dos nutrientes pelos ruminantes.

A cultura do arroz (*Oryza sativa*) destina-se principalmente ao consumo humano e, após a colheita, grande quantidade de palha é desprezada no campo. Desta forma, a utilização da palha de arroz na alimentação de bovinos constitui uma alternativa para incrementar a dieta total, por se tratar de material de baixo custo. O principal fator limitante ao uso de palhas de cereais está relacionado ao baixo valor nutritivo. Por isso, tratamentos físicos, biológicos e químicos têm sido recomendados como alternativa para melhorar a digestibilidade da palha.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido usada para visualizar e explicar a degradação da parede celular pelos microrganismos do rúmen (Akin, 1989). O estudo microscópico dos resíduos de degradação microbiana possibilita avaliar a digestão nos diferentes tecidos da planta, os quais apresentam comportamentos distintos na degradação ruminal. Portanto, a MEV constitui um complemento nos estudos de nutrição animal, pois permite definir a natureza dos tecidos degradados e informar as relações entre as enzimas (microbianas e exógenas) e os tecidos celulares.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição de enzimas fibrolíticas extraídas de fungos sobre a degradabilidade *in situ* dos nutrientes e, posteriormente, comparar os resíduos de incubação por meio da microscopia eletrônica de varredura.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de avaliação de alimentos do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Foram utilizados seis bovinos machos, castrados, providos de cânula no rúmen, com peso médio de 440 kg, alojados em baias individuais cobertas, com

comedouro e bebedouro. Estudou-se a adição ou não de enzimas fibrolíticas exógenas sobre a degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz.

As dietas foram formuladas baseando-se na ingestão de energia metabolizável fermentável e de proteína degradável no rúmen, segundo as recomendações do AFRC (1995). A proporção volumoso concentrado foi de 70:30, sendo o concentrado composto de milho e levedura seca (*spray dry*) e o volumoso, de silagem de milho, palha de arroz, feno de Tifton cortado aos 30 e 90 dias e bagaço de cana-de-açúcar. A composição percentual (% MS) dos ingredientes da dieta foi de 11,7; 18,3 e 14%, respectivamente, para milho, levedura e para cada volumoso que constituiu a dieta (silagem de milho, palha de arroz, feno de Tifton cortado aos 30 e aos 90 dias e bagaço de cana). Os teores de MS, PB, FDN e FDA da dieta foram 62,30; 12,94; 49,96 e 29,53%, respectivamente. A silagem de milho e a palha de arroz apresentaram teores de MS, PB, FDN, FDA e NIDA N<sup>-1</sup> total de 32,27 e 92,22%; 7,74 e 6,52%; 46,28 e 67,20%; 24,32 e 40,63% e 9,99 e 8,31, respectivamente.

As enzimas fibrolíticas utilizadas foram provenientes de fonte comercial<sup>1</sup> (Fibrozyme<sup>®</sup>) e extraídas dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*. O produto constituiu-se de celulase e xilanase. A atividade enzimática do Fibrozyme<sup>®</sup> foi de aproximadamente 100 unidades de xilanase (UX) por grama do produto comercial. As enzimas fibrolíticas foram acondicionadas em cartuchos de papel e fornecidas aos animais diariamente, às 8 h, via cânula ruminal. A quantidade fornecida foi de 0,75 g de Fibrozyme<sup>®</sup> kg<sup>-1</sup> MS animal<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, segundo recomendação do fabricante.

Os volumosos foram moídos em peneira com crivos de 5 mm e incubados em bolsas de náilon (7 x 14 cm, 50 µm de tamanho de poros) nos seguintes tempos: 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h, em duplicata. Foram incubados 4,5 g de cada volumoso (base na MS). Para garantir a presença das enzimas nos volumosos incubados e avaliar seu efeito por meio da degradabilidade e da análise microscópica dos resíduos, as enzimas fibrolíticas também foram incubadas juntamente com cada volumoso nas bolsas de náilon, na mesma proporção que a recomendada. Portanto, cada animal recebeu 0,75 g kg<sup>-1</sup> de MS dia<sup>-1</sup> das enzimas via cânula ruminal e mais 0,0034 g nas bolsas de náilon, para cada tempo de incubação. Ao final de cada período de incubação, as bolsas foram retiradas do rúmen e lavadas em máquina por cerca de 30 min., até que a água ficasse transparente.

<sup>1</sup> ALLTECH – Empresa Biotecnológica de Produção Animal.

A fração solúvel (tempo zero) foi obtida submergindo duas bolsas contendo cada material, incubadas em água durante uma hora a 39°C e, posteriormente, lavadas em máquina com os demais tempos. Após, as bolsas foram submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 65°C, por 72h. Os resíduos foram analisados para matéria seca (MS) proteína bruta (PB), pelo método de combustão de Dumas, utilizando o analisador de Nitrogênio Leco FP-528; fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), pelo método descrito por Silva e Queiroz (2002), utilizando o analisador de fibras ANKOM®. A hemicelulose foi calculada pela diferença entre FDN e FDA.

Os dados de desaparecimento da MS, PB, FDN, FDA e hemicelulose dos volumosos foram ajustados por uma regressão não-linear, utilizando o modelo proposto por Mehrez e Ørskov (1977):

$$p = a + b(1 - e^{-k_d t}),$$

em que: p corresponde à degradação no tempo t; a equivale à fração solúvel; b corresponde à fração insolúvel potencialmente degradável; k<sub>d</sub> corresponde à taxa constante de degradação da fração b e t, o tempo de incubação em horas.

A degradabilidade efetiva (DE) foi calculada segundo o modelo proposto por Ørskov e Mc Donald (1979):

$$DE = a + ((b.k_d)/(k_d + k_p)),$$

em que: k<sub>p</sub> equivale à taxa estimada de passagem de sólidos no rúmen por hora, levando-se em

consideração a taxa de passagem de sólidos no rúmen de 2%/h, que pode ser atribuída a um consumo alimentar baixo (ARC, 1984).

A degradabilidade potencial foi determinada por meio da fórmula: DP = a + b. A fração indigestível (C) foi obtida como: C = 100 – (a + b).

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, foi inserida no rúmen uma bolsa extra para cada tempo de incubação, em função dos tratamentos. Depois de retirados do rúmen, os resíduos foram processados segundo Santos (1996). Cada resíduo foi previamente analisado no microscópico eletrônico em vários campos, sendo definido um campo representativo para, então, serem fotografados. Foram confeccionadas elétrono-micrografias dos volumosos incubados em cada animal, totalizando três repetições (micrografias) por tratamento para cada tempo de incubação.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, em que a adição ou não de enzimas constituiu a parcela e o tempo, a subparcela, com três repetições (animais) por tratamento. A análise de variância foi realizada utilizando o arranjo fatorial 2 x 2, sendo considerada a fonte de volumoso (silagem de milho ou palha de arroz), a adição ou não de enzimas, bem como a interação entre ambos. As médias foram comparadas pelo Least Squares Means do SAS (1997).

### Resultados e discussão

Na Tabela 1, encontram-se os parâmetros de degradação ruminal dos volumosos, sem (SE) e com (CE) a adição de enzimas fibrolíticas.

**Tabela 1.** Estimativas das frações solúvel (a), potencialmente degradável (b) e não-degradável (C), taxa de degradação (k<sub>d</sub>), degradação potencial (DP) e degradação efetiva (DE) da matéria seca e proteína bruta dos volumosos sem (SE) e com (CE) a adição de enzimas fibrolíticas.

**Table 1.** Estimate of soluble fraction (a), potentially degradable (b) and undegradable (C), degradation rate, potential degradation (PD) and effective degradation (ED) of dry matter and crude protein of roughages without (-FE) or with (+FE) the fibrolytic enzyme addition.

Item	Silagem de milho <i>Corn silage</i>		Palha de arroz <i>Rice straw</i>		Efeito Principal <sup>1</sup> <i>Principal Effect<sup>1</sup></i>		
	SE -FE	CE +FE	SE -FE	CE +FE	V R	E E	V x E R x E
Matéria seca <i>Dry matter</i>							
a (%)	29,23B	40,96A	19,38	17,58	0,0001	0,0001	0,0001
b (%)	52,24A	39,66B	51,51	51,98	0,0016	0,0012	0,0008
C (%)	18,53	19,38	29,11	30,44	0,0001	0,444	0,866
kd (% h <sup>-1</sup> )	3,93	2,52	5,39	4,67	0,0062	0,0604	0,4925
DP (%)	81,47	80,62	70,89	69,56	0,0139	0,2172	0,7790
DE (%) <sup>2</sup>	63,32	62,88	56,91	53,79	0,0092	0,4562	0,5712
Proteína Bruta <i>Crude protein</i>							
a (%)	54,27B	70,07A	21,90b	28,92a	0,0001	0,0001	0,0001
b (%)	32,25A	15,06B	55,28a	47,60b	0,0001	0,0001	0,0012
C (%)	13,47	14,87	22,83	23,49	0,0001	0,2895	0,6503
kd (% h <sup>-1</sup> )	5,29	5,72	5,36	5,63	0,9003	0,2854	0,9297
DP (%)	89,52	85,13	77,18	76,52	0,0001	0,9649	0,7100
DE (%) <sup>2</sup>	77,53	81,22	62,16	64,15	0,0001	0,0093	0,3407

<sup>1</sup>Efeito principal: V = volumoso; E = enzima; V x E = interação volumoso enzima. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha e dentro de cada fonte de volumoso, maiúsculas para silagem de milho e minúsculas para palha de arroz, diferem (p < 0,05) pelo teste LSMEANS. <sup>2</sup>Considerando taxa de passagem de 2% h<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>Principal Effect: R= roughage; E= enzyme; R x E= interaction roughage enzyme. Means followed by different letters in the same row, within each roughage source, small letters to the corn silage and capital letters to the rice straw, differ (p < 0.05) by LSMEANS test. <sup>2</sup>Considering passage rate of 2% h<sup>-1</sup>.

Houve interação ( $p < 0,05$ ) da fonte de volumoso e da adição ou não de enzima para as frações solúvel (a) e potencialmente degradável (b) da MS e da PB. A adição de enzimas à silagem de milho aumentou ( $p < 0,05$ ) a fração 'a' da MS e da PB. Isto pode ter ocorrido pela elevação do teor de nitrogênio não- proteico (NNP), causada pela ação enzimática sobre as partículas, além da própria contribuição do NNP durante a fermentação do material ensilado. Houve redução da fração 'b' da MS e da PB deste volumoso com a adição de enzimas ( $p < 0,05$ ) em consequência do aumento da fração solúvel.

Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) da adição de enzimas sobre a degradação ruminal da MS da palha de arroz. Por outro lado, a adição de enzimas causou aumento ( $p < 0,05$ ) da fração 'a' e, conseqüentemente, redução da fração 'b' da PB deste volumoso. Na determinação da fração solúvel, a ação das enzimas fibrolíticas pode ter promovido maior atividade das enzimas exógenas sobre os polissacarídeos da parede celular, causando o afrouxamento das ligações e, com isso, disponibilizando mais nitrogênio, contribuindo com o aumento dessa fração. A fonte de volumoso teve efeito ( $p < 0,05$ ) sobre os parâmetros ruminiais avaliados. A silagem de milho apresentou valores para a taxa de degradação ( $k_d$ ), fração não-digestível (C), DP e DE da MS de 3,23%  $h^{-1}$ ; 18,96; 75,64 e 63,10%, respectivamente, e a palha de arroz, valores de 5,02%  $h^{-1}$ ; 29,77; 68,62 e 55,35%, respectivamente. Da mesma forma, os parâmetros ruminiais da PB variaram ( $p < 0,05$ ) entre os volumosos. A silagem de milho teve os seguintes valores para a fração C, DP e DE: 14,26; 83,96 e 79,38%, respectivamente. Para a palha de arroz, os parâmetros citados foram de, respectivamente, 23,16; 75,85 e 63,15%. Esses dados indicam a maior degradação da silagem comparada à palha de arroz, por ser a silagem um volumoso pré-fermentado e com maior teor de nitrogênio solúvel.

Por outro lado, a adição de enzimas não alterou ( $p > 0,05$ ) a taxa de degradação, a fração C, DP e DE da MS e da PB dos volumosos, exceto a DE da PB, que aumentou de 69,84 para 72,69% com a adição das enzimas fibrolíticas.

Quanto à estabilidade das enzimas no fluido ruminal, Morgavi *et al.* (2000) testaram fontes de proteínas extraídas de diferentes plantas e resíduos e observaram que a resistência e a estabilidade das enzimas no fluido ruminal não foi um fator limitante na degradação dos alimentos. Os autores

afirmaram, ainda, que a estabilidade das enzimas fibrolíticas no rúmen poderia ser preservada da ação proteolítica por meio da adição de outras fontes de proteína que fossem resistentes à degradação ruminal.

Os valores da fração potencialmente degradável e da DE da MS da silagem de milho sem as enzimas fibrolíticas foram próximos aos respectivos valores de 54,8 e 63,2%, obtidos por Martins *et al.* (1999). Da mesma forma, a fração solúvel da PB desta dieta foi semelhante à encontrada por Backes *et al.* (2000), de 55,97%.

O valor médio observado para a DE da MS da palha de arroz (55,35%) foi inferior ao valor de 74,7% (com taxa de passagem de 2%  $h^{-1}$ ), verificado por Valadares Filho (1994), em uma coletânea de dados de degradação *in situ*. Entretanto, Endres *et al.* (1999), avaliando a degradabilidade *in situ* da palha de arroz fermentada por fungos, observaram valores de taxa de degradação e de DE da MS de 1,91%  $h^{-1}$  e 43,1%, respectivamente. As diferenças verificadas para os referidos parâmetros estão relacionadas, entre outros fatores, com a composição bromatológica dos volumosos estudados.

As estimativas dos parâmetros de degradação ruminal da fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose dos volumosos são mostradas na Tabela 2. Não houve interação ( $p > 0,05$ ) da fonte de volumoso e da adição ou não das enzimas fibrolíticas sobre os parâmetros ruminiais da parede celular, exceto para a DP da FDN e da hemicelulose.

Verificou-se, para a palha de arroz, aumento na DP da FDN ( $p < 0,06$ ) e da hemicelulose com a adição das enzimas. Este resultado evidencia o efeito das enzimas exógenas que proporcionaram maior permanência dos microrganismos sobre a fibra, aumentando a degradabilidade potencial da fração fibrosa deste volumoso.

A adição das enzimas fibrolíticas não alterou ( $p > 0,05$ ) os parâmetros de degradação ruminal da parede celular dos volumosos, exceto para a taxa de degradação ( $k_d$ ) da hemicelulose, que foi maior para os volumosos sem adição de enzimas (3,73%), em comparação aos volumosos com a adição de enzimas (2,33%).

Lewis *et al.* (1996), estudando o efeito de diferentes formas de aplicação de enzimas fibrolíticas no volumoso, observaram que a aplicação diretamente no alimento melhorou a digestão, quando comparada à infusão por meio da cânula ruminal.

**Tabela 2.** Estimativas da fração potencialmente degradável (b) e não-degradável (C), taxa de degradação ( $k_d$ ), degradação potencial (DP) e degradação efetiva (DE) da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) dos volumosos sem (SE) e com (CE) a adição de enzimas fibrolíticas.

**Table 2.** Estimate of potentially fraction (b), degradable (b) and undegradable (C), degradation rate ( $k_d$ ), potential degradation (PD) and effective degradation (ED) of dry matter and crude protein of roughages without (-FE) or with (+FE) the fibrolytic enzyme addition.

Item	Silagem de milho Corn silage		Palha de arroz Rice straw		Efeito Principal <sup>1</sup> Principal Effect <sup>1</sup>		
	SE -FE	CE +FE	SE -FE	CE +FE	V R	E E	V x E R x E
					FDN		
					NDF		
b (%)	64,97	64,14	56,53	60,81	0,0383	0,490	0,314
C (%)	35,03	35,86	43,47	39,19	0,0383	0,4892	0,3129
kd (% h <sup>-1</sup> )	3,24	2,12	4,45	4,41	0,0051	0,2450	0,2738
DP (%)	57,67	44,37	49,30b	58,00a	0,5702	0,6187	0,0383
DE (%) <sup>1</sup>	39,74	32,97	38,66	41,71	0,8186	0,8087	0,6272
					FDA		
					ADF		
b (%)	61,19	58,82	59,47	62,26	0,738	0,935	0,332
C (%)	38,81	41,18	40,53	37,74	0,7383	0,9354	0,3302
kd (% h <sup>-1</sup> )	3,73	1,92	5,08	4,44	0,0093	0,0639	0,3336
DP (%)	55,38	43,59	57,82	59,45	0,0370	0,2025	0,1044
DE (%) <sup>1</sup>	38,98	28,56	42,57	42,83	0,0278	0,1652	0,1475
					Hemicelulose		
					Hemicellulose		
b (%)	68,75	70,03	61,57	71,02	0,254	0,065	0,143
C (%)	31,25	29,97	38,43	28,98	0,2547	0,0659	0,1437
kd (% h <sup>-1</sup> )	3,28	2,19	4,18	2,48	0,2214	0,0150	0,5259
DP (%)	61,90	55,46	52,06b	64,27a	0,8487	0,2970	0,0069
DE (%) <sup>1</sup>	42,51	36,55	40,94	39,22	0,7838	0,0837	0,3075

<sup>1</sup>Efeito principal: V = volumoso; E = enzima; V x E = interação volumoso enzima. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, dentro de cada fonte de volumoso, maiúsculas para silagem de milho e minúsculas para palha de arroz, diferem (p < 0,05) pelo teste LSMEANS. <sup>2</sup>Considerando taxa de passagem de 2% h<sup>-1</sup>.  
<sup>3</sup>Principal Effect: R = roughage; E = enzyme; R x E = interaction roughage enzyme. Means followed by different letters in the same row, within each roughage source, small letters to the corn silage and capital letters to the rice straw, differ (p < 0.05) by LSMEANS test. <sup>2</sup>Considering passage rate of 2% h<sup>-1</sup>.

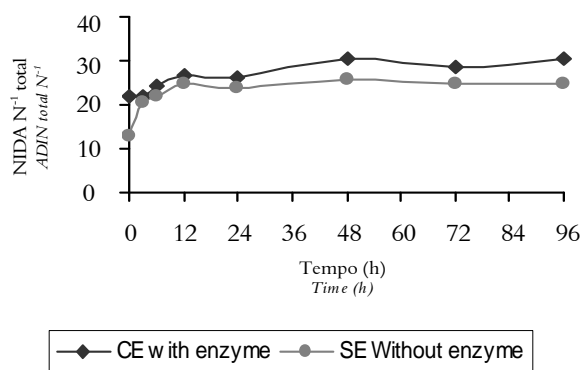
Segundo os autores, a ineficiência das enzimas, quando aplicadas via cânula, seria pelo menor tempo de contato com o substrato. Neste trabalho, o suplemento foi fornecido via cânula ruminal, sem contato prévio das enzimas com o alimento. Além disso, Chesson (1993) salienta que a liberação de enzimas exógenas aos sítios de atuação poderia expô-las a condições desfavoráveis no meio ruminal (temperatura, pH e condições físicas da digesta), podendo comprometer sua estrutura e, conseqüentemente, limitar sua atividade sobre o substrato.

Outra possibilidade para explicar a ausência do efeito das enzimas sobre a fibra seria com relação à quantidade fornecida. Yang *et al.* (1999) relataram que o nível de aplicação de complexos enzimáticos abaixo de 1 g kg<sup>-1</sup> de MS, como verificado neste estudo, não causaria efeito sobre a degradação da fibra no rúmen. Segundo os autores, o nível ótimo de aplicação das enzimas dependeria da composição do alimento.

Os parâmetros de degradação ruminal da fibra variaram (p < 0,05) em função da fonte de volumoso avaliada. A taxa de degradação (2,67% h<sup>-1</sup>) e a fração C (35,44%) da FDN da silagem de milho foram inferiores (p < 0,05), comparadas à palha de arroz (4,43 e 41,33%). A fração b da FDN da silagem foi superior (64,55%), comparada à palha de arroz (41,33%); a DE da FDA da silagem (33,76%), porém, foi inferior (42,70%). Rossi Junior *et al.* (1997) encontraram para a DE da FDN da silagem de milho o valor de 42,7%, com taxa de passagem de

3,7% h<sup>-1</sup>, superior à obtida neste trabalho sem a adição de enzimas (39,74%).

Os teores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido, em relação ao nitrogênio total (NIDA N<sup>-1</sup> total) dos resíduos de incubação da silagem de milho com (CE) e sem (SE) a adição de enzimas fibrolíticas, são apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Teores nitrogênio insolúvel em detergente ácido, em relação ao nitrogênio total (NIDA N<sup>-1</sup> total), em função dos tempos de incubação, da silagem de milho com (CE) e sem (SE) a adição de enzimas fibrolíticas.

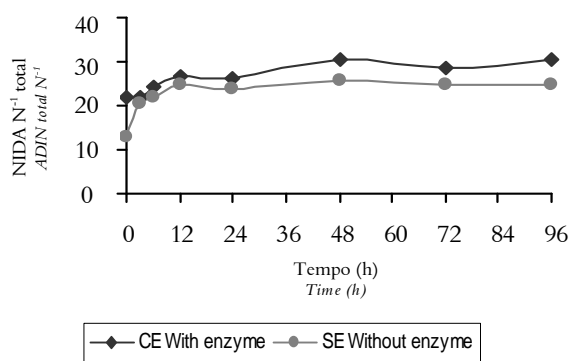
**Figure 1.** Levels of acid detergent insoluble nitrogen in relation to the total nitrogen (ADIN total N<sup>-1</sup>), on the incubation times of corn silage without and with fibrolytic enzymes addition.

O teor de NIDA N<sup>-1</sup> total obtido para a silagem de milho foi de 9,99%, inferior ao observado por Valadares Filho (1994), de 15%, com teor de FDA de 34,1%. As diferenças no conteúdo de NIDA, FDN e

lignina podem estar relacionadas, dentre outros fatores, ao estágio de maturação da planta na ocasião da colheita para ensilagem, à fermentação ocorrida no silo, à adubação utilizada, à variedade do milho e também à amostragem realizada.

A relação NIDA N<sup>-1</sup> total dos resíduos de incubação da silagem de milho para ambos os tratamentos (SE e CE) aumentou nos primeiros tempos de incubação. Este comportamento mostrou que, com o aumento no tempo de incubação, foi utilizado mais N potencialmente degradável pelos microrganismos, causando aumento na proporção do N indisponível ligado à fibra.

Na Figura 2, são apresentados os teores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido, em relação ao nitrogênio total (NIDA N<sup>-1</sup> total) dos resíduos de incubação da palha de arroz com (CE) e sem (SE) a adição de enzimas fibrolíticas.



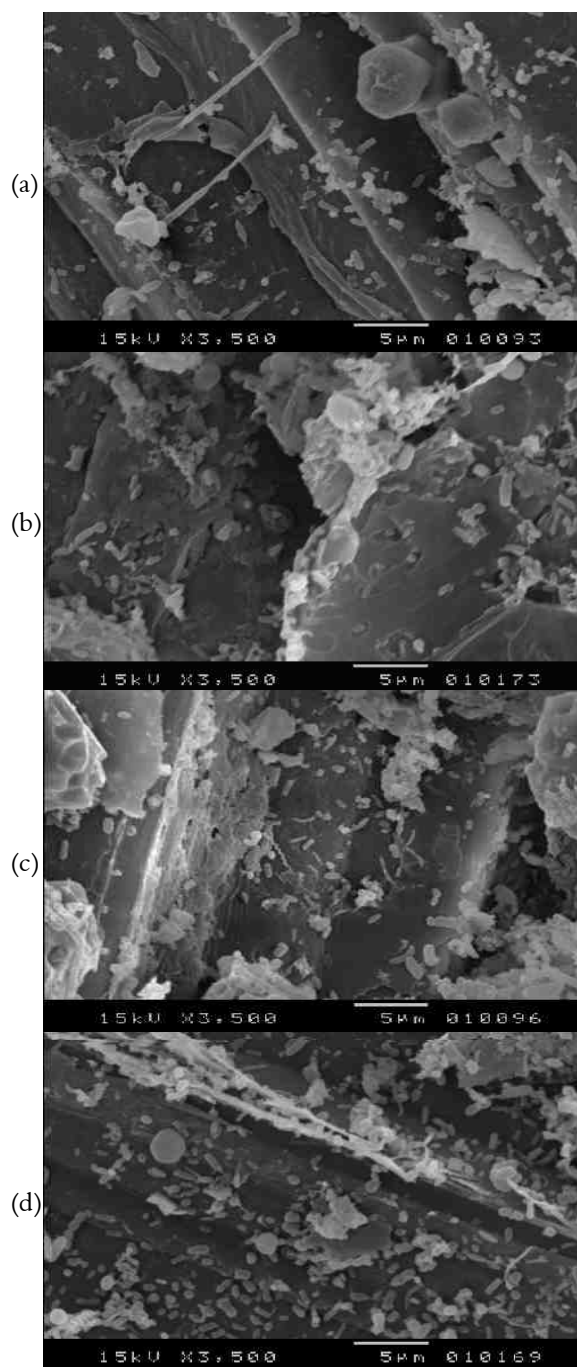
**Figura 2.** Teores nitrogênio insolúvel em detergente ácido, em relação ao nitrogênio total (NIDA N<sup>-1</sup> total), em função dos tempos de incubação, da palha de arroz com (CE) e sem (SE) a adição de enzimas fibrolíticas.

**Figure 2.** Levels of acid detergent insoluble nitrogen in relation to the total nitrogen (ADIN total N<sup>-1</sup>), on the incubation time of rice straw without and with fibrolytic enzymes addition.

Os resíduos de incubação da palha de arroz apresentaram variações na proporção de NIDA N<sup>-1</sup> total durante os tempos de incubação. A relação NIDA N<sup>-1</sup> total foi maior para a palha CE, entre os tempos de 12 e 48h, e igual nos tempos de 72 e 96h. Provavelmente, o aumento da fração solúvel do nitrogênio (N), verificado para a da palha de arroz com a adição das enzimas (Tabela 1) e, conseqüentemente, a redução no teor de N total do resíduo, teria causado aumento na relação NIDA N<sup>-1</sup> total entre os tempos de 12 e 48h.

Na Figura 3, encontram-se as elétrtron-micrografias de varredura dos resíduos de degradação *in situ* da silagem de milho. Por se tratar de uma avaliação qualitativa, baseando-se em observações visuais, as elétrtron-micrografias de varredura dos resíduos de incubação podem não ter

retratado de forma expressiva a ação das enzimas sobre a degradação ruminal dos volumosos.



**Figura 3.** Elétron-micrografias de varredura dos resíduos de degradação *in situ* da silagem de milho sem a adição de enzimas (A e C) e com a adição de enzimas fibrolíticas (B e D). A e B – 6 h de incubação. C e D – 12 h de incubação.

**Figure 3.** Scanning electron micrograph of *in situ* degradation residues of corn silage without enzymes addition (A and C) and with fibrolytic enzymes addition (B and D). A and B – 6 hours of incubation. C and D – 12 hours of incubation.

As observações dos resíduos de degradação da silagem sem a adição das enzimas com 6 h de

incubação (Figura 3A) revelaram a epiderme danificada e colonizada por bactérias, porém não houve evidência de digestão do tecido, apresentando-se ainda intacto. Na Figura 3B (resíduo com a adição de enzimas), também foram observados a colonização da epiderme, com bactérias aderidas às partículas, e o início da digestão do tecido.

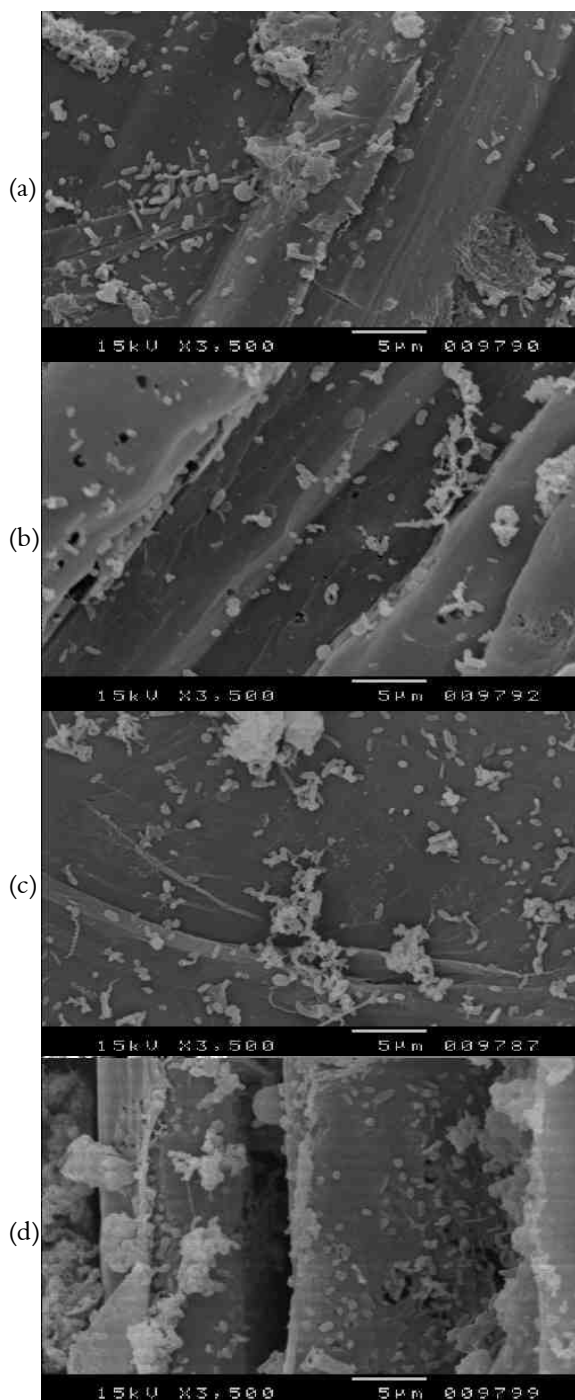
As observações microscópicas dos resíduos da silagem de milho com 12h de incubação sem a adição de enzimas (Figura 3C) revelaram a colonização pelas bactérias ruminais e a erosão do tecido. Na Figura 3D (resíduo com a adição de enzimas), observa-se a célula da bainha parenquimática dos feixes vasculares (BPFV) altamente colonizada, porém sem indício de digestão. McAllister *et al.* (2001) observaram ao MEV que somente altas concentrações de enzimas fibrolíticas causariam ruptura e digestão da parede celular da palha de cevada e que não houve indício de degradação do tecido quando as enzimas foram aplicadas na dose recomendada pelo fabricante.

Na Figura 4, apresentam-se as elétrtron-micrografias de varredura dos resíduos de degradação da palha de arroz, sem e com a adição das enzimas fibrolíticas. As observações microscópicas, após 12h de incubação (Figuras 4A e 4B), revelaram colonização da parede celular e ausência de digestão do tecido, e não se verificou alteração na colonização microbiana com a adição de enzimas fibrolíticas. Karunanandaa *et al.* (1995), investigando o efeito de espécies de fungos sobre a digestibilidade da palha de arroz por meio de observações microscópicas, verificaram que o tratamento com fungos melhorou a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).

Gilbert e Hazlewood (1993) relataram que, em função da natureza recalcitrante da parede celular ao ataque enzimático, para ocorrer hidrólise eficiente dos polissacarídeos estruturais, são requeridos altos níveis de celulases e xilanases no meio ruminal.

Os resíduos da palha de arroz, após 24h de incubação sem adição de enzimas (Figura 4C), indicaram alta colonização da parede primária, não havendo, entretanto, exposição da parede secundária.

Com a adição das enzimas (Figura 4D), verificou-se maior população bacteriana associada ao tecido, onde parece ter iniciado a remoção da parede primária, com digestão da parede secundária. Segundo Yang *et al.* (1999), a adição de enzimas fibrolíticas promoveria aumento da colonização microbiana, uma vez que a presença de celulases no conteúdo ruminal favoreceria a adesão das bactérias à celulose.



**Figura 4.** Elétron-micrografias de varredura dos resíduos de degradação *in situ* da palha de arroz (PA) sem (SE) a adição de enzimas fibrolíticas (A e C) e com (CE) a adição de enzimas fibrolíticas (B e D). A e B – 12h de incubação; C e D – 24h de incubação.

**Figure 4.** Scanning electron micrograph of *in situ* degradation residues of rice straw without enzymes addition (A and C) and with fibrolytic enzymes addition (B and D). A and B – 12 hours of incubation. C and D – 24 hours of incubation.

De modo geral, as elétrtron-micrografias de varredura revelaram aumento na colonização microbiana sobre o resíduo com a adição de enzimas



fibrolíticas, porém sem digestão dos tecidos da planta. Tais resultados não foram condizentes com os parâmetros de degradação ruminal destes volumosos, mostrando que o aumento da colonização dos tecidos observados ao MEV com a adição de enzimas não foi suficiente para gerar uma resposta efetiva sobre a degradação ruminal da fibra.

### Conclusão

As observações microscópicas dos resíduos revelaram aparente aumento da colonização microbiana com a adição de enzimas. Entretanto, isto não causou aumento da degradação ruminal da parede celular dos volumosos. Assim, verifica-se que a adição de enzimas fibrolíticas não tem ação expressiva na degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz.

### Referências

ARC-Agricultural Research Council. *The nutrient requirements of ruminant livestock*. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1984.

AFRC-Agricultural and Food Research Council. *Technical committee on responses to nutrients: energy and protein requirements of ruminants*. Wallingford: CAB International, 1995.

AKIN, D.E. Histological and physiological factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.*, Madison, v. 81, n. 1, p. 7-25, 1989.

BACKES, A.A., et al. Avaliação da degradabilidade ruminal "in situ" da matéria seca e proteína bruta de alguns alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. *Anais...* Viçosa: SBZ., 2000. 1CD-ROM.

CHESSON, A. Feed enzyme. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 65-79, 1993.

ENDRES, E. et al. Avaliação da degradabilidade ruminal *in situ* da palha de arroz fermentada por *Trichoderma viridae*, *Rhizopus stolonifer* e *Pycnoporus sanguineus*. *Rev. Bras. Zootecn.*, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 816-821, 1999.

GILBERT, H.J.; HAZLEWOOD, G.P. Review article: bacterial cellulases and xilanases. *J. Gen. Microb.*, Cambridge, v. 139, n. 2, p. 187-194, 1993.

KARUNANANDAA, K. et al. Botanical white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 179-199, 1995.

LEWIS, G.E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.*, Champaign, v. 74, n. 3, p. 3020-3028, 1996.

MARTINS, A.S. et al. Degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca e proteína bruta das silagens de milho e sorgo e de alguns alimentos concentrados. *Rev. Bras. Zootecn.*, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 1109-1117, 1999.

McALLISTER, T.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. (Ed.). *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxon: Cab International, 2001. p. 273-297.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.*, Cambridge, v. 88, n. 3, p. 645-650, 1977.

MORGAVI, D.P. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. *Enz. Microb. Technol.*, New York, v. 26, n. 2-4, p. 171-177, 2000.

ØRSKOV, E.R.; Mc DONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

ROSSI JUNIOR, P. et al. Degradabilidade ruminal da fibra em detergente neutro e do nitrogênio insolúvel em detergente neutro da silagem de milho e do farelo de soja, em bovinos da raça Nelore. *Rev. Bras. Zootecn.*, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 608-615, 1997.

SANTOS, J.M. *Microscopia de varredura aplicada às ciências biológicas*. Jaboticabal: Funep, 1996.

SAS-Institute. *SAS/STAT user's guide: statistics*. 8. ed. Cary, 1997.

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

VALADARES FILHO, S.C. Utilização da técnica *in situ* para avaliação dos alimentos. In: PRADO, I.N. et al. (Ed.). SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 1994. Maringá. *Anais...* Maringá: UEM. p. 95-118.

VARGA, G.A.; KOLVER, E.S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 127, n. 5, p. 819-823, 1997.

YANG, W.Z. et al. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 82, n. 2, p. 391-403, 1999.

Received on June 18, 2007.

Accepted on November 25, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.