

## EFEITO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS SOBRE A COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE SILAGENS DE CAPINS TROPICAIS<sup>1</sup>

CRISTINE DOS SANTOS SETTIMI CYSNEIROS,<sup>2</sup> GUMERCINDO LORIANO FRANCO,<sup>3</sup> CIRANO JOSÉ ULHOA,<sup>4</sup> JOSÉ MAURO DA SILVA DIOGO<sup>5</sup> E ALLAN KARDEC BRAGA RAMOS<sup>6</sup>

1. Parte da dissertação de Mestrado da primeira autora apresentada à FAV, Universidade de Brasília.

2. Médica veterinária. E-mail: cysneiros cristine@hotmail.com

3. Pesquisador associado da FAV, UnB. E-mail: glfranco@unb.br, bolsista do CNPq

4. Professor titular do ICB, UFG. E-mail: ulhoa@icb.ufg.br

5. Professor da FAV, UnB. E-mail: diogojm@unb.br

6. Pesquisador da Embrapa Cerrados. E-mail: allan@cpac.embrapa.br

### RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido para determinar o efeito de níveis de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica e a degradabilidade ruminal da MS e da FDN das silagens de capim-braquiária e de capim-tanzânia. O experimento consistiu de quatro níveis enzimáticos (0, 5, 10 e 20 mg de enzimas por kg de matéria natural) e dois períodos de armazenamento (45 e 120 dias) e três repetições. Após o armazenamento, os silos experimentais foram abertos para avaliação dos teores da MS, da PB, da FDN, do N-NH<sub>3</sub>/NT e do pH. Utilizou-se a técnica do saco de náilon, com três bovinos canulados no rúmen, horários de incubação de 6, 24 e 96 horas e amostras do período de 45 dias de

ensilagem. Verificou-se que as soluções enzimáticas não alteraram o teor de MS, PB, N-NH<sub>3</sub>/NT e pH das silagens de capins. Para o capim-braquiária, a solução enzimática alterou o teor da FDN, mas foi dependente do nível de enzimas. Verificou-se redução da FDN para o nível de 20 mg (67,99%) em relação ao tratamento-testemunha (70,28%). Não houve diferença entre os períodos de armazenamento nem interação entre período de armazenamento e nível enzimático. Para os parâmetros de degradação ruminal da MS e da FDN das silagens de capins não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aditivos, celulases, degradabilidade, hemicelulases, parede celular

### ABSTRACT

#### EFFECT OF FIBROLYTIC ENZYMES ON THE BROMATOLOGIC COMPOSITION AND RUMINAL DISAPPEARANCE OF TROPICAL GRASSES SILAGE

This work was carried out to determine the effect of fibrolytic enzymes levels on the bromatologic composition and *in situ* degradability of dry matter (DM) and neutral detergent fibre (NDF) of tropical grasses silage. The experiment consisted of four enzymatic levels (0, 5, 10 and 20 mg of enzymes for kg natural matter), two periods of storage (45 and 120 days) and three repetitions. After the storage, the silos were opened and the content analyzed for dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), ammonia N and pH. In the study of *in situ* degradability of DM and NDF. It was used the nylon bag technique with three cannulated bovine and the times

incubations were 6, 24 and 96 hours and sample of 45 days ensiling. The experimental period was of 36 days. The solution didn't modify the content of DM, CP, ammonia N and pH of grasses silage. In case of NDF, *Brachiaria* silage treated with 20 mg level showed lower fiber content (67,99%) versus untreated control (70,28%), suggesting an improvement in the nutritive quality. There was no difference among period of storage neither interaction period of storage and enzymatic level. *In situ* rumen degradation, there was no difference among the treatments to the degradation of DM and NDF of grasses silage., there was no difference among the treatments to the degradation of NDF of grasses silage.

**KEY WORDS:** Additives, cell wall, cellulases, degradability, hemicellulases.

## INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, por meio dos avanços científicos, melhoras significativas na digestibilidade da parede celular têm sido alcançadas. Mesmo assim, a lenta e a pequena degradação da forragem representam grandes limitações à ingestão pelos ruminantes da energia disponível, em particular nas condições tropicais. Desde o final da década de 1960, estudos vêm sendo realizados com o uso de enzimas fibrolíticas exógenas na ensilagem, buscando aumentar a utilização das forrageiras e melhorar a eficiência produtiva dos ruminantes (BEUACHEMIN et al., 2003).

Enzimas fibrolíticas, tais como celulasas e xilanases, são adicionadas na ensilagem com a finalidade de melhorar o processo fermentativo, a composição química das silagens resultantes e a performance animal (McDONALD et al., 1991). Entre as características melhoradas, a redução do teor de fibra é uma das mais importantes.

Na teoria, as enzimas deverão degradar parcialmente os componentes da parede celular, fornecendo às bactérias da cultura ensilada mais substrato fermentável com conseqüente diminuição do pH. Uma vantagem adicional deverá ser que, pela degradação parcial dos componentes estruturais das plantas, a taxa e a extensão da digestão das silagens no rúmen deverão ser aumentadas.

Os efeitos da adição de enzimas na ensilagem têm sido amplamente relatados. No entanto, os resultados de aumentos na degradação da parede celular e melhorias na fermentação das silagens são ainda inconsistentes (COLOMBATTO et al., 2004).

Este experimento foi desenvolvido para avaliar o efeito de níveis de enzimas fibrolíticas sobre os teores da MS, da proteína bruta (PB), da FDN, do nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total ( $N-NH_3/NT$ ), do potencial hidrogeniônico (pH) e degradabilidade ruminal *in situ* da MS e da FDN de silagens de capins tropicais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em sua fase de campo, o experimento foi desenvolvido na Fazenda Água Limpa da

Universidade de Brasília, localizada na Vargem Bonita, Brasília, Distrito Federal, no período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2004. Realizou-se a etapa de laboratório no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG), no Laboratório de Enzimologia e no Laboratório de Bromatologia da Universidade de Brasília (UnB).

Para a produção de enzimas fibrolíticas, utilizou-se o fungo *Trichoderma harzianum* linhagem Tc (coleção do laboratório de enzimologia do ICB/UFG) e outros isolados (coleção Embrapa Jaguariúna), que foram mantidos em repiques periódicos para a manutenção das culturas em meio MYG (extrato de malte 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 1%, ágar 2%, e água destilada 100 mL), autoclavado a 120°C, durante vinte minutos à temperatura ambiente por sete dias e guardados a 4°C.

Inocularam-se esporos dos isolados de *Trichoderma harzianum* em erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio TLE, com a composição em g/100 mL: glicose 0,3, celulose 0,5, extrato de levedura 3,0, sulfato de amônio 0,14,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  0,03, sulfato de magnésio 0,03 e elementos traços  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4$ . Os capins (triturados- 0,5 mm) foram usados como fonte de carbono (celulose) para a produção das soluções de enzimas fibrolíticas. Inocularam-se os frascos em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 120 rpm. Após 48 horas de incubação, as soluções foram filtradas a vácuo e esterilizadas em filtro de *Trypanosoma cruzi* em câmara de fluxo laminar para serem utilizados como fonte de enzimas hidrolíticas. Retiraram-se alíquotas para a determinação da concentração de proteínas e ensaios enzimáticos.

Procedeu-se à análise das atividades enzimáticas e à determinação da concentração de proteínas para a completa caracterização do complexo enzimático (Quadro 1). Obtiveram-se as atividades de celulasas e xilanases conforme descrição feita por MILLER (1959), a atividade de amilase pelo método de FUWA (1954), as atividades de xilosidase, furanosidase, b-glicosidase, segundo descrição de XIMENES et al. (1999) e a concentração de proteína pelo método de LOWRY et al. (1951).

**QUADRO 1.** Atividade enzimática do sobrenadante da cultura do fungo *Trichoderma harzianum* após crescimento em meio contendo capins-braquiária e tanzânia como fonte de carbono

Classe de enzimas	Atividade enzimática específica (U/mg)	
	Braquiária	Tanzânia
Celulase total	2,48	6,76
Xilanase	3,55	7,15
Pectinase	0,49	0,63
Xilosidase	0,00044	0,0024
Furanosidase	0,00036	0,0052
$\beta$ -Glucosidase	0,0072	0,051
Amilase	0	0

Os quatro níveis de enzimas utilizados foram determinados a partir do trabalho desenvolvido por CYSNEIROS & ULHOA (2001), que obtiveram para o feno de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk) a concentração (nível) a ser aplicada de cinco mg de enzima por kg de matéria natural de feno (5 mg/kg de MN). No presente experimento, avaliaram-se os níveis de enzimas de 0, 5, 10 e 20 mg por kg de MN, os quais foram convertidos em volume (mL) de solução, considerando-se a atividade de proteína total do sobrenadante da cultura do fungo *Trichoderma harzianum*. Obtiveram-se os valores 0,555 e 0,3737 mg/mL, respectivamente, para as forragens de capim-braquiária (*B. decumbens* cv. Basilisk) e tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia). Assim, os volumes de solução enzimática utilizados nos tratamentos com o capim-braquiária foram: controle – 36 mL de água (nível 0 mg/kg MN de forragem); 27 mL de água e 9 mL de solução enzimática (nível 5 mg/kg de MN); 18 mL de água e 18 mL de solução enzimática (nível 10 mg/kg de MN) e 36 mL de solução enzimática (nível 20 mg/kg MN). Para os tratamentos com o capim-tanzânia foram: controle – 54 mL de água (nível 0 mg/kg de MN de forragem); 40,6 mL de água e 13,4 mL de solução enzimática (nível 5 mg/kg MN), 27 mL de água e 27 mL de solução enzimática (nível 10 mg/kg MN) e 54 mL de solução enzimática (nível 20 mg/kg de MN).

Para o tratamento com os complexos enzimáticos, procedeu-se à coleta dos capins no

estádio de florescimento. As forrageiras foram cortadas, picadas (1 cm) por meio de ensiladeira estacionária, pesadas e acondicionadas de maneira uniforme em bacias de plástico. Adicionaram-se as soluções com os complexos enzimáticos, específicas para cada forrageira e cada nível de enzimas, por aspersão à forragem picada. Posteriormente, a forragem foi ensilada, utilizando-se minissilos experimentais de PVC com 40 cm de altura e diâmetro interno de 100 mm, com uma densidade média do material de 478 kg/m<sup>3</sup>. Para cada nível de enzima adicionado em cada capim, constituíram-se dois conjuntos de minissilos que corresponderam aos dois períodos de armazenamento considerados na avaliação da forragem ensilada (45 e 120 dias). Realizaram-se três repetições para cada combinação entre capim, nível de enzima e período de armazenamento.

Após 45 e 120 dias de armazenamento, de cada silo retiraram-se amostras representativas das silagens dos capins para análise bromatológica. Por meio de prensa hidráulica, obtiveram-se amostras do suco das silagens para a determinação do pH. O suco foi congelado para posterior análise de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>/NT).

Submeteram-se as amostras de silagens destinadas às análises bromatológicas à secagem em estufa, sob ventilação forçada de ar a 60°C por 72 horas, as quais, em seguida, foram moídas em peneira de crivo de 1 mm e acondicionadas em frascos devidamente rotulados. Determinaram-se os teores de proteína bruta (PB), de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e de matéria seca (MS) conforme descrição feita por SILVA & QUEIROZ (2002) e a relação N-NH<sub>3</sub>/NT conforme VIEIRA (1980).

Amostras de silagens com 45 dias de armazenamento foram coletadas para avaliação da ação do complexo enzimático sobre a degradabilidade ruminal (*in situ*) da MS e da FDN. Para tanto, utilizaram-se três bovinos mestiços (holandês x zebu) canulados no rúmen, com peso médio de 597 kg, que receberam uma dieta basal de silagem de milho. Utilizou-se a técnica do saco de náilon, com poros de aproximadamente 50  $\mu$ m de diâmetro (especificação do fabricante), nas dimensões de 7 x 14 cm, selados nas bordas por fusão com resistência elétrica. Os sacos, após serem pesados, receberam 5 g da silagem

triturada em peneira de crivo de 2 mm, resultando em uma relação de 25 mg de amostra por cm<sup>2</sup> de área dos sacos de náilon.

Após o enchimento, cada saco teve seu peso registrado e foi atado firmemente por meio de um elástico. Antes da incubação, embeberam-se os sacos em água por uma hora e introduziram-se no rúmen via cânula sempre às 9 horas (antes da alimentação), sendo retirados após o tempo estipulado para a incubação (6, 24, 96 horas). Desta forma, foram incubados 24 sacos por animal (3 horários x 4 tratamentos x 2 gramíneas).

O período experimental totalizou 36 dias, sendo 15 dias de adaptação dos animais, seguidos de 21 dias de coleta (3 períodos), quando foram colocados os sacos de náilon. Retirados do rúmen, imergiram-se os sacos imediatamente em água fria, lavando-se automaticamente em tanque de lavar roupa, em três baterias de cinco minutos cada. Após, foram colocados em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C, onde permaneceram por 72 horas para posterior esfriamento e pesagem.

Submeteram-se os resultados correspondentes à composição bromatológica das silagens de braquiária e de tanzânia à análise de variância segundo o delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial (capim x nível de enzima x tempo de armazenamento).

Submeteram-se os dados correspondentes à degradação ruminal a um delineamento quadrado latino 3x3 (3 animais x 3 períodos), sendo que, em cada período, cada animal correspondeu a um dos tempos de incubação (6, 24, 96 horas) das silagens. Para a análise dos efeitos dos tempos de incubação, de capim e de nível de enzima aplicado, considerou-se ainda a estrutura de um delineamento com parcelas subdivididas, em que as parcelas eram os tempos de incubação, e as subparcelas, as combinações entre os níveis enzimáticos e capins ensilados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 é mostrada a atividade enzimática do sobrenadante da cultura do fungo *Trichoderma harzianum* após crescimento em meio contendo os capins-braquiária e tanzânia como fonte de carbono.

Foi encontrada alta atividade específica de celulase total e baixa atividade de b-glucosidase, que representam a atividade das enzimas endocelulases e exocelulases, componentes do complexo celulolítico (ARISTODOU & PENTILLA, 2000). Para verificar a capacidade do fungo em degradar a hemicelulose, a atividade de algumas enzimas, detectou-se alta atividade de xilanase, baixa atividade de pectinase, xilosidase, furanosidase. Não foi detectada nenhuma atividade de amilase durante o crescimento do fungo em meio contendo capins como fonte de carbono (Quadro 1).

Na Tabela 1 é indicada a porcentagem da MS das silagens de capins-braquiária e tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento. A ensilagem dos capins tropicais com as soluções enzimáticas não afetou o conteúdo de MS das silagens resultantes ( $P>0,05$ ), o que também foi verificado por COLOMBATTO et al. (2004). Não se observou diferença entre os períodos de armazenamento nem interação entre os períodos de armazenamento e os níveis enzimáticos ( $P>0,05$ ). Observou-se diferença entre as gramíneas ( $P<0,05$ ), porém não ocorreu interação entre gramíneas e níveis de enzimas ( $P>0,05$ ) (Tabela 1).

O teor de MS é um fator inerente a cada forrageira, o que explicaria a diferença observada no teor de MS entre as silagens de braquiária e de tanzânia. O teor médio de MS encontrado para as diferentes gramíneas é consistente com os dados de literatura. ROSA (2003) preconizou teor de MS acima de 25% para silagens de capins bem conservadas.

Na Tabela 2 é observada a porcentagem de proteína bruta (PB) das silagens de capins-braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas em dois períodos de armazenamento. Não foi observada diferença entre os períodos de armazenamento nem interação entre os períodos de armazenamento e os níveis enzimáticos. Observou-se diferença entre as gramíneas, no entanto, não houve interação entre gramíneas e níveis de enzimas.

Esta informação é consistente com a avaliação química das soluções enzimáticas, que revelou atividade de protease nula, em que nenhuma alteração foi observada no teor de PB, devido ao efeito enzimático. O teor de PB inerente a cada

gramínea leva à produção de silagens com diferentes teores protéicos, o que explicaria as diferenças observadas entre as silagens de capins. RIBEIRO et al. (2002) relataram valores de 5,3% a 7,6% de PB para silagens de braquiária. De acordo com MARI (2003), o teor médio de PB de silagens de braquiária está situado entre 6,7% e 13,8%. IGARASI (2002) obteve valores de 6,1% a 6,4% de PB para silagens de capim-tanzânia.

Na Tabela 3 é mostrada a porcentagem de fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas em dois períodos de armazenamento. Não ocorreu diferença entre os períodos de armazenamento nem interação entre períodos de armazenamento e níveis enzimáticos ( $P > 0,05$ ). Entretanto, observou-se diferença entre as gramíneas e interação entre tempo de armazenamento e gramíneas e destas com níveis de enzimas ( $P < 0,05$ ). Assinale-se que MARI (2003) obteve valores entre 61,3% e 68,97% para a FDN em silagens de braquiária, e IGARASI (2002) obteve valores de 61,9% a 68,2% em silagens de tanzânia.

A caracterização bioquímica das soluções enzimáticas revelou atividades de celulasas e xilanases, enzimas estas que degradam a parede celular. Consistente com essa avaliação, a ensilagem de braquiária com o complexo enzimático reduziu o teor da FDN da silagem resultante, o que não ocorreu com as silagens de tanzânia (Tabela 3).

Segundo BEAUCHEMIN et al. (1998), a diversidade de respostas obtidas com o uso de enzimas pode ser causada por vários fatores, o que inclui o nível de enzima adicionado na ensilagem. O nível de enzima requerido vai depender do substrato,

do material ensilado, indicando que o nível de enzima de 20 mg – efetivo para a silagem de braquiária, – não foi suficiente para reduzir o conteúdo da FDN da silagem de tanzânia.

Na Tabela 4, em que se verifica a participação do nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total ( $N-NH_3/NT$ , em porcentagem), nas silagens de braquiária e de tanzânia, sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento, observa-se diferença entre os períodos de armazenamento. Porém, não ocorreu interação entre tempo de armazenamento e níveis de enzimas. Observou-se diferença entre as gramíneas e interação entre gramíneas com os níveis enzimáticos. Para a média dos níveis de enzimas, foi observado um aumento no nível de 5 mg em relação ao tratamento-controle, com valores de 13,68% e 10,18%, respectivamente. Segundo ROSA (2003), silagens de boa qualidade apresentam teor de  $N-NH_3/NT$  inferior a 12,5%.

O maior teor de amônia observado no período de 120 dias de armazenamento é resultado de um maior tempo de exposição das frações nitrogenadas às proteases das plantas levando a uma maior produção de amônia, o que está de acordo com NADEAU et al. (2000).

Na Tabela 5, para o potencial hidrogeniônico (pH) das silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas em dois períodos de armazenamento, observaram-se diferença entre os períodos de armazenamento e interação entre período de armazenamento e nível enzimático ( $P < 0,05$ ). Observou-se diferença entre as gramíneas ( $P < 0,05$ ), porém não houve interação entre gramíneas e os níveis enzimáticos ( $P > 0,05$ ).

**TABELA 1.** Porcentagem de matéria seca (MS) das silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural – MN) em dois períodos de armazenamento.

Fonte de variação	Níveis de enzimas (mg/kgMN)				Média
	0	5	10	20	
Capim	MS (%)				
Braquiária	30,24a	30,12a	29,81a	30,08a	30,06A
Tanzânia	25,62b	24,72b	26,09b	25,89b	25,58B
Armazenamento	MS (%)				
45 dias	28,30a	27,35a	27,88a	28,07a	27,90A
120 dias	27,56a	27,49a	28,03a	27,91a	27,75A
Média	27,93aA	27,42aA	27,95aA	27,99aA	27,82

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ )  $CV=4,42\%$ .

**TABELA 2.** Porcentagem de proteína bruta (PB) das silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural – MN) em dois períodos armazenamento.

Fonte de variação	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
Capim	PB (%)				
Braquiária	3,53aB	3,74aB	3,75aB	3,65aB	3,67B
Tanzânia	5,77aAb	5,75aAb	5,22aAb	5,30aAb	5,51A
Armazenamento	PB (%)				
45 dias	4,69a	4,65a	4,63a	4,47a	4,61A
120 dias	4,61a	4,84a	4,34a	4,48a	4,57A
Enzimas	4,65aA	4,74aA	4,48aA	4,48aA	4,59

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ). CV=7,87%.

**TABELA 3.** Porcentagem da fibra em detergente neutro (FDN) de silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural – MN) em dois períodos de armazenamento (dias).

Fonte de variação	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
Capim	N – NH/NT x 100				
Braquiária	70,28aA	69,42aA	69,10abeA	67,99beA	69,20A
Tanzânia	64,48abB	64,52abB	65,41abB	65,13abB	64,88B
Armazenamento	N – NH/NT x 100				
45 dias	67,32a	66,81a	66,93a	66,30a	66,84A
120 dias	67,45a	67,12a	67,57a	66,8a	67,24A
Enzimas	67,38A	66,97AB	67,25AB	66,56B	67,04

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ) CV=1,04%.

**TABELA 4.** Porcentagem de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total ( $N-NH_3/NT \times 100$ ) das silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural – MN) em dois períodos de armazenamento (dias).

Fonte de variação	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
Capim	FDN (%)				
Braquiária	10,50aA	11,12aB	10,86aA	10,00aA	10,62B
Tanzânia	9,87abA	16,23abA	10,27baA	10,41baA	11,70A
Armazenamento	FDN (%)				
45 dias	8,82a	11,63a	9,62a	9,74a	9,95B
120 dias	11,54a	15,72b	11,51a	10,66a	12,36A
Enzimas	10,18bB	13,68aA	10,57bB	10,20bB	11,16

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ). CV=14,12%.

**TABELA 5.** Valores médios de pH das silagens de braquiária e de tanzânia ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural – MN) em dois períodos de armazenamento (dias).

Fonte de variação	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
Capim	pH				
Braquiária	4,14aB	4,15aB	4,17aB	4,10aB	4,14B
Tanzânia	5,00baA	4,83aAc	4,95baA	4,86abA	4,91A
Armazenamento	pH				
45 dias	4,54 aA	4,28ebB	4,52aA	4,40ebB	4,44BA
120 dias	4,59abA	4,70baA	4,60abA	4,55abA	4,61AB
Enzimas	4,57aA	4,49aA	4,56aA	4,48aA	4,52

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ )  $CV = 1,92\%$ .

A acidez é considerada um fator importante na conservação das silagens. Um pH elevado indica perdas de nutrientes, principalmente de proteína. Altos níveis de amônia têm sido associados a um forte desdobramento de aminoácidos. Neste experimento, o tratamento enzimático foi capaz de manter o valor de pH dentro da faixa ideal para reduzir a atividade de proteases dos microrganismos da cultura ensilada, o que está de acordo com dados obtidos por NADEAU et al. (2000). Em associação, a solução enzimática não apresentou atividade de protease e não ocorreu degradação de proteína à amônia com o tratamento enzimático.

MARI (2003) obteve valores de 4,7 a 5,6 de pH para silagem de braquiária. Segundo o mesmo autor, valores de pH maiores que 5 têm sido encontrados para silagens de capins tropicais, o que poderia ser explicado pelo baixo conteúdo de carboidratos solúveis e alto poder tampão. AGUIAR et al. (2001) encontraram valores de 4,9 a 5,6 para silagens de capim-tanzânia.

Conforme os dados obtidos, todas as silagens foram bem preservadas, o que fica evidenciado pelos valores finais de pH que se mantiveram dentro da faixa ideal conforme mencionado pela literatura. Independentemente do nível enzimático utilizado, as soluções de enzimas não abaixaram o valor médio de pH das silagens de braquiária e de tanzânia em relação ao controle, indicando também que as soluções enzimáticas não reduziram o teor de fibra das silagens, não fornecendo substrato adicional às bactérias para o declínio de pH.

O valor de pH final das silagens vai depender da espécie forrageira, do teor de umidade e de carboidratos solúveis (açúcares) e do poder tampão da forragem que está sendo ensilada. Capins tropicais apresentam diferenças quanto ao teor de carboidratos solúveis, teor de umidade e poder tampão, o que reflete no nível de acidez ou queda de pH final da silagem (ROSA, 2003), explicando as diferenças de pH observadas para as silagens de braquiária e tanzânia.

Em relação ao período de armazenamento, os períodos longos possibilitam uma maior ação das bactérias sobre a silagem com aumento da fermentação de carboidratos solúveis com maior declínio de pH, o que foi observado entre os períodos de armazenamento.

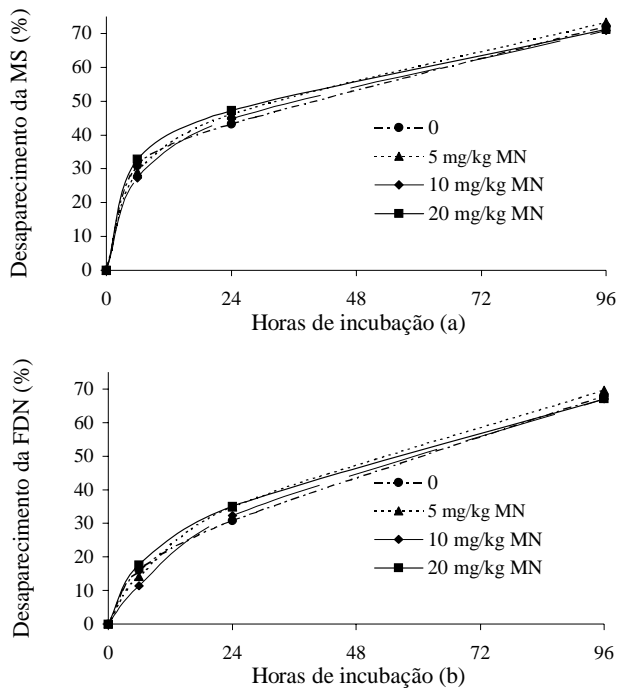
Os efeitos dos níveis de enzimas fibrolíticas sobre o desaparecimento ruminal da MS e da FDN das silagens de braquiária e de tanzânia são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente, em que se observa aumento na degradação ruminal da MS e da FDN com o aumento dos tempos de incubação. Considerando as médias dos três tempos de incubação, os resultados foram de 38,65% e 35,94% para a braquiária e tanzânia, respectivamente, indicando que as gramíneas são constituídas de compostos químicos de lenta degradação.

Não houve efeito dos níveis enzimáticos sobre a degradação da MS e da FDN de ambas as gramíneas. A solução enzimática agiu exclusivamente durante o processo de ensilagem, não sendo suficiente o bastante para romper ligações ou barreiras e criar

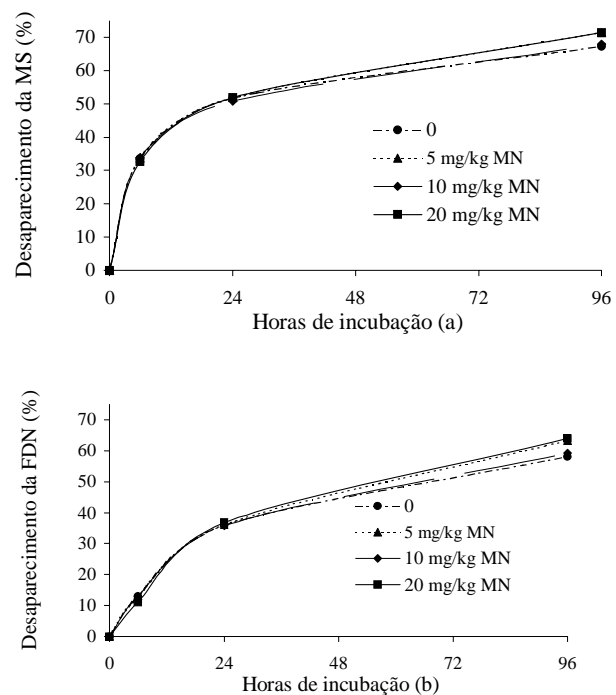
sítios adicionais de digestão para ação dos microrganismos ruminais e o aumento da degradação da parede celular.

Segundo WANG & McALLISTER (2004), a degradação da celulose e hemicelulose requer várias enzimas específicas, e diferenças na proporção e ati-

vidade dessas enzimas podem comprometer a degradação da parede celular. Isto poderia explicar a ineficácia das soluções utilizadas em romper certas ligações e estruturas que impediriam a aderência dos microrganismos ruminais.



**FIGURA 1.** Desaparecimento ruminal da matéria seca (%) (a) e da fibra em detergente neutro (%) (b) da silagem de braquiária ensilada com diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural - MN)



**FIGURA 2.** Desaparecimento ruminal da matéria seca (%) (a) e da fibra em detergente neutro (%) (b) da silagem de tanzânia ensilada com diferentes níveis de enzimas fibrolíticas (mg/kg matéria natural - MN)

## CONCLUSÕES

Os complexos enzimáticos de *Trichoderma harzianum* aplicados nas concentrações de até 20 mg/kg de material ensilado de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk ou de *Panicum maximum* cv. Tanzânia não alteraram os teores de proteína bruta e de matéria seca, nem os valores de pH e a proporção de nitrogênio amoniacal das silagens, independentemente do tempo de armazenamento. Apenas o teor da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) da silagem de braquiária diminuiu com a adição do complexo enzimático no nível de 20 mg/kg de matéria natural.

Considerando-se os resultados obtidos com a utilização dos complexos enzimáticos, sugere-se que pesquisas futuras concentrem esforços na elucidação dos mecanismos pelos quais as enzimas aumentam a digestão e utilização dos alimentos nas dietas dos ruminantes.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, R.W.S.; CRISTANA, R.F.; NUSSIO, L.G. Efeito do tamanho da partícula na composição da fração nitrogenada de silagens de capim Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRA-



- SILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba. FEALQ, 2001. p.314-315.
- ARISTODOU, A.; PENTILLA, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 187-198, 2000.
- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; YAG, W.Z.; KARRER, D. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33<sup>rd</sup>, 1998. Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 1998. p. 121-135.
- BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P.D.; YANG, Z.W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; PHIPPS, R.H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p. 111-128, 2004.
- CYSNEIROS, C.S.; ULHOA, C.J. **Caracterização e aplicação de b-1,3- glucanases (celulases e hemicelulases) produzidas por isolados de *Trichoderma***. Goiânia, GO: Universidade Federal de Goiás, 2001. p. 1-18 (Relatório final de PIBIC).
- FUWA, H.A. New method for micro determination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
- IGARASI, M.S. **Controle de perdas na ensilagem de capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho da partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano**. Piracicaba, 2002, 152 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.
- LOWRY, Y.H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARI, J.L. **Intervalos entre cortes em capim Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst. E x A. Rich.) Stapf cv. Marandu): produção, valor nutritivo e perdas associadas à fermentação da silagem**. Piracicaba, 2003. 159p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERONT, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcome, 1991. 340 p.
- MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NADEAU, E.M.; BUXTON, D.R.; RUSSELL, J.R.; ALISON, J.M.; YOUNG, J.W. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfafa. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1487-1502, 2000.
- RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, O.G.; SOUZA, P.O.P. Composição bromatológica de silagens de *Brachiaria decumbens* tratadas com inoculante microbiano em diferentes idades de corte (Compact Disc). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2001, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002.
- ROSA, B. **II Curso sobre produção e manejo de silagens**. Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 2003. 24 p. (Manual Didático).
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.
- VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em ração para ruminantes**. Viçosa, MG: UFV, 1980. 98 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1980.
- WANG, Y.; McALLISTER, T.A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion. **Journal of animal Science**, v. 15, n. 11, p. 1659-1676, 2002.

XIMENES, F.A.; SOUSA, M.V.; PLUS, J. *nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 18-21, 1999.  
Purification and characterization of a low molecular weight xylanase produced by *Acrophialophora*

---

Protocolado em: 24 mar. 2005. Aprovado em: 30 abr. 2005.