

## EFEITO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SILAGEM DE MILHO<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. Professor visitante da UFMS. E-mail: gumercindo@nin.ufms.br
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

Objetivou-se avaliar o efeito de níveis de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica e a degradabilidade ruminal da fibra em detergente neutro (FDN) da silagem de milho. O experimento consistiu de quatro níveis enzimáticos, dois períodos de armazenamento e três repetições. Aplicaram-se, por aspersão, na ensilagem, os níveis enzimáticos de 0, 5, 10 e 20 mg de enzimas por kg de matéria natural (MN). Após 45 e 120 dias de armazenamento, abriram-se os silos experimentais utilizados em triplicata para avaliação do conteúdo de matéria seca (MS), FDN, proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>/NT) e pH. Coletaram-se amostras após 45 dias de ensilagem para estudo da degradação ruminal *in situ* da FDN, empregando-se a técnica do saco de náilon, de modo que três bovinos foram canulados no rúmen, sendo os horários de incubação de 6,

24 e 96 horas. Verificou-se que a solução enzimática não alterou o conteúdo de MS, pH e N-NH<sub>3</sub>/NT da silagem de milho. Na PB, não se observou diferença entre os períodos de armazenamento, porém houve interação período de armazenamento e nível de enzima. Verificou-se aumento da PB no nível de 20 mg (10,14%) em relação ao controle (8,77%) no período de 45 dias. A solução enzimática alterou o teor da FDN para a média do nível de enzimas. Observou-se uma redução da FDN do nível de 10 mg (47,25%) em relação ao tratamento-testemunha (49,96%). Não houve diferença entre os períodos de armazenamento nem interação período de armazenamento e nível enzimático. Nos parâmetros de degradação ruminal da FDN da silagem de milho não se registraram diferenças entre os tratamentos.

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

### ABSTRACT

#### EFFECT OF FIBROLYTIC ENZYMES ON CHEMICAL COMPOSITION OF MAIZE SILAGE

This experiment was carried out to determine the effect of enzymatic solution on bromatologic composition and *in situ* degradability for neutral detergent fiber (NDF) of maize silage. The treatments were four enzymatic levels, two fermentation periods and three replications. The levels adopted were 0, 5, 10 and 20 mg of enzyme per kg of natural matter (MN) of grass. Experimental silos, in triplicate, were

opened 45 and 120 days after ensiling, and DM, NDF, crude protein (CP), N-NH<sub>3</sub> and pH were analyzed. In the study of *in situ* degradability of DM and NDF, silage of 45 days was collected. Nylon bag technique was used with three canulated bovine and three incubation times (6, 24 and 96 hours). The experimental period was of the 36 days. The solution didn't change the content of DM, pH and N-NH<sub>3</sub> values of maize

silage. There was no difference on the CP among fermentation periods of, but there was interaction between period of storage and enzymatic level. The solution increased final CP of maize silage after 45 days of ensiling and this effect was higher to 20 mg (10.14%) compared the control (8.77%). In case of NDF, maize silage treated with 10 mg

level showed lower fiber content (47.25%) versus untreated control (49.96%), suggesting an improvement in the nutritive value. There was no difference among period of storage neither interaction period of storage and enzymatic level. *In situ* rumen degradation showed no difference among the treatments on NDF degradation of maize silage.

KEY WORDS: additives, cellulases, degradability, hemicellulases, cell wall.

## INTRODUÇÃO

Produtos à base de enzimas fibrolíticas, tais como celulases e xilanases, há algum tempo têm sido usados como aditivos durante o processo de ensilagem com a finalidade de melhorar o processo fermentativo e as características químicas das silagens resultantes e, conseqüentemente, a performance animal (MCDONALD et al., 1991). A redução dos conteúdos de fibra em detergente neutro (FDN) e de fibra em detergente ácido (FDA) da forragem ensilada é uma das vantagens a ser destacada, tendo em vista a possibilidade de aumento da ingestão e da eficiência da digestão de matéria seca (MS), quando oferecida aos ruminantes.

Durante a degradação de um substrato complexo, como a celulose, várias enzimas agem em associação para uma digestão eficiente. O primeiro passo na degradação de um substrato insolúvel parece ser a vinculação do complexo enzimático ou microrganismo ao substrato. Assim, a aderência é obrigatória para que ocorra a degradação dos componentes da planta pelas bactérias do rúmen. A aderência dos microrganismos e das enzimas que degradam os polissacarídeos não somente coloca os sistemas de enzimas em proximidade ao substrato, mas pode agir rompendo ligações entre celulose e polissacarídeos não-celulolíticos, bem como ligações dentro das fibrilas de celulose (BEAUCHEMIN et al., 2003).

As enzimas adicionadas na ensilagem deverão agir de maneira similar às bactérias que iniciam a digestão no rúmen, iniciando a digestão dos componentes estruturais da parede celular, o que cria sítios adicionais de digestão e a liberação de produtos que atraem as bactérias do rúmen aos sítios de digestão.

Logo, as enzimas deverão degradar parcialmente os componentes da parede celular, fornecendo às bactérias da cultura ensilada mais substrato fermentável (NADEAU et al., 2000). O aumento da produção de ácido láctico, a partir da degradação de tais componentes, diminui o pH da silagem, restringindo a atividade proteolítica e aumentando a estabilidade aeróbica. A degradação dos componentes estruturais das plantas pelas enzimas possibilita o aumento da taxa e da extensão da digestão das silagens no rúmen (COLOMBATTO et al., 2004).

Embora os efeitos da adição de enzimas fibrolíticas venham sendo estudados, existem poucas informações a respeito da diminuição dos componentes estruturais da parede celular durante a ensilagem, das prováveis melhorias no processo fermentativo e dos efeitos na taxa e extensão da degradação ruminal da fibra das silagens de milho (MCDONALD et al., 1991).

Dessa forma, este experimento foi desenvolvido para avaliar o efeito de níveis de enzimas fibrolíticas sobre os teores da FDN, proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>/NT), potencial hidrogeniônico (pH), MS e desaparecimento ruminal *in situ* da FDN da silagem de milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolveu-se o experimento, em sua fase de campo, na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília, localizado na Vargem Bonita, Brasília, Distrito Federal, de fevereiro de 2003 a janeiro de 2004. A etapa de laboratório foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás

(UFG), e nos Laboratórios de Enzimologia e de Bromatologia da Universidade de Brasília.

Os tratamentos da massa de forragem de milho consistiram de quatro níveis de enzimas, dois períodos de armazenamento (45 e 120 dias) com três repetições.

Os níveis de enzimas utilizados foram determinados com base no trabalho desenvolvido por CYSNEIROS & ULHOA (2001) que recomendaram para cada 1000 g de matéria natural (MN) de capim braquiária uma taxa de aplicação de 5 mg de enzima (5 mg/kg de MN). No presente experimento, os níveis de enzimas foram 0, 5, 10 e 20 mg por kg de MN que foram convertidos em mL de solução enzimática. O valor em mL foi obtido dividindo os níveis enzimáticos (mg) pela atividade de proteína total do sobrenadante da cultura do fungo *Trichoderma*, com valor de 0,4797 mg/mL. Os tratamentos em mL foram: controle 42 mL de água (0 mg de enzima), 31,6 mL de água e 10,4 mL de solução enzimática (5 mg de enzimas), 21 mL de água e 21 mL de solução enzimática (10 mg de enzimas) e 42 mL de solução enzimática (20 mg de enzimas).

Para a produção de enzimas fibrolíticas, foi utilizado 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 20 minutos, mantidos à temperatura ambiente por sete dias e armazenados a 4°C.

Esporos dos isolados de *Trichoderma* foram inoculados em erlanmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio (TLE), cuja composição em g/100 mL era: glicose 0,3; celulose 0,5; extrato de levedura 3,0; sulfato de amônia 0,14;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,03; sulfato de magnésio 0,03; e elementos traços  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ . O milho (triturado) foi usado como fonte de carbono (celulose) para a produção da solução de enzimas fibrolíticas. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 120 rpm. Após 48 horas de incubação a solução foi filtrada a vácuo e esterilizada em filtro de *Trypanosoma cruzi*

em câmara de fluxo laminar para ser utilizada como fonte de enzimas hidrolíticas. Alíquotas foram retiradas para a determinação da concentração de proteínas e ensaios enzimáticos.

A análise das atividades enzimáticas e a determinação da concentração de proteína foram realizadas para a completa caracterização do complexo enzimático (Quadro 1). As atividades de celulases e xilanases foram obtidas conforme descrição feita por MILLER (1959), a atividade de amilase foi determinada pelo método de FUWA (1954), as atividades de xilosidase, furanosidase, b-glucosidase, segundo descrição feita por XIMENES et al. (1989) e a concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951).

Para o tratamento com o complexo enzimático o milho (planta inteira) foi colhido no estádio farináceo duro. A forrageira foi cortada, picada em ensiladora estacionária, pesada e acondicionada de maneira uniforme em bacias de plástico para ser tratada com o complexo enzimático que foi adicionado à forragem por aspersão. Posteriormente, a forragem foi ensilada, utilizando-se silos experimentais de PVC de 40 cm de altura e diâmetro de 10 cm. Utilizaram-se 12 silos experimentais para a forragem em cada período de armazenamento, sendo ensilados 2 kg de milho, alcançando uma densidade de 637 kg/m<sup>3</sup>.

Após 45 e 120 dias de armazenamento, foram retiradas de cada silo amostras representativas da silagem de milho para análise bromatológica. Posteriormente, por meio de prensa hidráulica foram obtidas amostras do suco da silagem para a determinação do pH. O suco foi congelado para posterior análise de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total ( $\text{N-NH}_3/\text{NT}$ ).

As amostras de silagem destinadas às análises bromatológicas foram submetidas à secagem em estufa, sob ventilação forçada de ar a 65°C por 72 horas, sendo em seguida, moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm e acondicionadas em frascos devidamente rotulados. Os teores de PB, FDN e MS foram determinados conforme descrição feita por SILVA & QUEIROZ (2002) e o  $\text{N-NH}_3/\text{NT}$  foi determinado conforme VIEIRA (1980).

Amostras de silagem de milho, do período de 45 dias de armazenamento, foram coletadas para

avaliação da ação do complexo enzimático sobre a degradação ruminal da FDN.

Para a determinação do desaparecimento *in situ* foram utilizados três bovinos mestiços (holandês x zebu) canulados, com peso médio de 597 kg, recebendo uma ração basal de silagem de milho. Utilizou-se a técnica do saco de náilon, com poros de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro (especificação do fabricante), nas dimensões de 7 x 14 cm, selados nas bordas por fusão com resistência elétrica e, devidamente, identificados. 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  $\text{cm}^2$  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 os sacos foram embebidos em água por uma hora e introduzidos no rúmen via cânula sempre às 9 horas (antes da alimentação) e retirados após o tempo estipulado para a incubação (6, 24 e 96 horas). Dessa forma, incubaram-se doze sacos por animal (3 horários x 4 tratamentos).

O período experimental foi de 36 dias, sendo quinze dias de adaptação dos animais, seguidos de 21 dias de coleta, quando colocaram-se os sacos de náilon. Retirados do rúmen, imergiram-se imediatamente os sacos em água fria, sendo lavados automaticamente em tanque, em três baterias de cinco minutos cada ou até que a água estivesse límpida. Após, foram colocados em estufa de ventilação forçada de ar a 65°C, onde permaneceram por 72 horas, para posterior esfriamento e pesagem.

Submeteram-se os resultados correspondentes à composição bromatológica da silagem de milho à análise de variância segundo o delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial (2x4).

Os dados correspondentes ao desaparecimento ruminal foram submetidos a um delineamento quadrado latino 3x3 (3 animais x 3 períodos), sendo que cada unidade experimental correspondeu aos tempos de incubação (6, 24 e 96 horas) da silagem. Para a análise dos efeitos dos tempos de incubação, considerou-se ainda a estrutura de um delineamento com parcelas subdivididas, em que as parcelas eram os

tempos de incubação e as subparcelas eram as combinações entre os níveis enzimáticos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 é mostrada a atividade enzimática do sobrenadante da cultura do fungo *Trichoderma harzianum* após crescimento em meio contendo milho (planta inteira) como fonte de carbono.

**QUADRO 1.** Atividade enzimática do sobrenadante da cultura do fungo *Trichoderma harzianum* após crescimento em meio contendo milho (planta inteira) como fonte de carbono

Classe de enzimas	Atividade enzimática específica (U/mg)
Celulase total	5,65
Xilanase	2,89
Pectinase	0,63
Xilosidase	0,0012
Furanosidase	0,0018
b-Glucosidase	0,0055
Amilase	0
Protease	0

Encontrou-se 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 avaliar a capacidade do fungo em degradar a hemicelulose, avaliou-se também a atividade de algumas enzimas. Alta atividade de xilanase, baixa atividade de pectinase, xilosidase, furanosidase e nenhuma atividade de amilase foram detectadas durante o crescimento do fungo em meio contendo milho como fonte de carbono.

Na Tabela 1 é indicada a porcentagem da MS da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os períodos de armazenamento, porém houve diferença ( $P<0,05$ ) entre os níveis enzimáticos e interação entre períodos de armazenamento e níveis

enzimáticos ( $P < 0,05$ ). O teor médio de MS encontrado em todos os níveis enzimáticos, de 30,55%, está dentro da faixa considerada ideal. Estudos rea-

lizados por COLOMBATTO et al. (2004) não revelaram mudanças no teor de MS de silagens de milho tratadas com diferentes produtos enzimáticos.

**TABELA 1.** Porcentagem de matéria seca (MS) de silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento

Período (dias)	Níveis de enzimas (mg/kgMN)				Equações
	0	5	10	20	
45	29,46 aA	30,52abA	28,70 aA	37,36 bA	$y=0,2195x+28,6313$ $R^2=0,4819$
120	29,39 aA	28,52a A	30,41 aA	30,05 aB	$y=0,3839x+28,153$ $R^2=0,6438$

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ )  $CV=8,26\%$

O aumento da MS da silagem de milho observado no nível enzimático de 20 mg, no período de 45 dias de armazenamento, pode ser conseqüência da atuação das enzimas celulasas e xilanasas na parede celular. A remoção de barreiras estruturais pode permitir um maior aproveitamento do conteúdo celular pelas bactérias presentes no material ensilado, aumentando as perdas de efluentes

e aumento da MS. Observou-se comportamento linear ( $P < 0,05$ ) entre nível de enzimas e teor de MS, e com o aumento dos níveis enzimáticos, ocorreu aumento no teor de MS.

Na Tabela 2 é mostrada a porcentagem de PB da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento.

**TABELA 2.** Porcentagem de proteína bruta (PB) da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento

Período (dias)	Níveis de enzimas (mg/kgMN)				Equações
	0	5	10	20	
45	8,77 aA	9,02 abA	9,05 abA	10,14 bA	$y=0,03962x+8,7317$ $R^2=0,4986$
120	9,05 aA	8,61 aA	8,83 aA	9,15 aA	$y=0,06748x+8,6513$ $R^2=0,7134$

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ )  $CV=8,26\%$ .

Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os períodos de armazenamento, porém houve interação ( $P < 0,05$ ) o período de armazenamento e o nível enzimático. O teor médio de PB obtido no experimento, de 9,08%, está dentro dos valores citados por ERDMAN (1993) e RODRIGUES et al. (2002), que obtiveram teor médio de PB de 8 e 9,43%, respectivamente.

Verificou-se que a solução enzimática não afetou o teor de PB das silagens de milho, o que é

consistente com a caracterização bioquímica da solução utilizada, que revelou atividade nula de protease. Para o período de 45 dias de ensilagem, observou-se comportamento linear ( $P < 0,05$ ) entre nível de enzimas e teor de PB, com aumentos no teor de PB, o que ocorreu à medida que aumentaram os níveis de enzimas.

Na Tabela 3 é observada a porcentagem de FDN da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de

armazenamento. Não houve diferença entre períodos de armazenamento ( $P>0,05$ ), tampouco interação entre períodos de armazenamento e níveis enzimáticos ( $P<0,05$ ). Na média dos períodos de armazenamento em cada nível de enzima, o tratamento com o complexo enzimático alterou o conteúdo da FDN da silagem de milho. Pode-se observar redução da

FDN para o nível de 10 mg em relação à silagem que não recebeu enzima, com valores de 47,25% e 49,96%, respectivamente. ERDMAN (1993) e RODRIGUES et al. (2002) preconizaram teores de 53,26% e 49,4% da FDN como ideal para uma silagem de milho de boa qualidade.

**TABELA 3.** Porcentagem da fibra em detergente neutro (FDN) de silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento

Período (dias)	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
45	50,42	50,86	47,32	48,68	49,32A
120	49,49	47,86	47,18	48,52	48,26A
Média	49,96A	49,36AB	47,25B	48,60AB	48,79

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ) CV=2,78%.

As mudanças no conteúdo da FDN da silagem de milho, após a adição de enzimas fibrolíticas, durante a ensilagem, vão ao encontro dos resultados relatados por NADEAU et al. (2000) e COLOMBATTO et al. (2004), que observaram que a ensilagem com diferentes aditivos enzimáticos reduziu parcialmente o conteúdo de fibra, liberando substrato adicional para a fermentação.

A redução da FDN da silagem de milho pode ser explicada com base no perfil das atividades enzimáticas, que revelou altas atividades de celulases e xilanases, enzimas envolvidas na degradação da parede celular. Porém, observou-se redução apenas no nível de 10 mg, indicando que o nível enzimático afetou a efetividade da resposta, consistente com os dados obtidos por NADEAU et al. (2000).

Estudos feitos por BEAUCHEMIN et al. (1998) demonstraram que o ótimo nível enzimático depende do substrato. Esses autores relataram diferentes taxas de aplicação de enzimas e diferentes respostas no feno de alfafa, silagem de milho, silagem de cevada e grãos de milho. Com feno de alfafa,

observou-se redução no conteúdo de FDN mesmo com a adição de um baixo nível enzimático, sem nenhuma alteração observada com a adição de altos níveis.

As altas quantidades de enzimas ligadas ao substrato podem restringir a ligação dos microrganismos da planta à massa ensilada limitando a digestão da parede celular (BEAUCHEMIN et al., 2003), o que poderia explicar a ineficiência da taxa de 20 mg em reduzir a FDN da silagem de milho.

Na Tabela 4 é verificada a porcentagem de  $N-NH_3/NT$  da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento. Houve diferença ( $P<0,05$ ) entre os períodos de armazenamento, porém não foi observada interação ( $P>0,05$ ) entre períodos de armazenamento e níveis enzimáticos.

O teor médio de  $N-NH_3/NT$  está dentro do sugerido na literatura para uma silagem de excelente qualidade. LOPES (1975) apontou valores acima de 15% do  $N-NH_3/NT$  como indicadores de uma silagem de milho de baixa qualidade.

**TABELA 4.** Porcentagem de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>/NT) da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento

Período(dias)	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
45	5,11	4,52	4,05	2,87	4,14B
120	6,71	6,09	5,48	6,11	6,10A
Média	5,91A	5,31A	4,77A	4,49A	5,12

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05) CV=23,79%.

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 à forte degradação de aminoácidos. Neste experimento, o tratamento enzimático e o controle foram capazes de manter o valor de pH dentro da faixa ideal para reduzir a atividade de proteases dos microrganismos da cultura ensilada (Tabela 5), o que está de acordo com dados obtidos por NADEAU et al., 2000). Em associação, a solução enzimática não apresentou atividade de protease, não ocorrendo degradação de proteína à amônia com o controle e o tratamento enzimático (Tabela 4).

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 à maior produção de amônia.

Na Tabela 5 é apresentado o potencial hidrogeniônico (pH) da silagem de milho ensilada sob diferentes níveis de enzimas em dois períodos de armazenamento.

Observou-se diferença (P<0,05) do pH entre os períodos de armazenamento, porém não houve interação (P>0,05) entre período de armazenamento e nível enzimático. O maior período de armazenamento (120 dias) possibilitou uma maior ação das bactérias sobre a massa ensilada, com aumento da fermentação de carboidratos solúveis e conseqüentemente maior declínio médio do pH.

No presente experimento, a silagem de milho foi bem preservada, evidenciado pelo pH que se manteve abaixo de 4,2, ideal para silagens de milho. Independente do nível enzimático adicionado, a solução enzimática não reduziu o valor de pH da silagem de milho.

**TABELA 5.** Valores médios de pH das silagens de milho ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas em dois períodos de armazenamento

Período (dias)	Níveis de enzimas (mg/kg MN)				Média
	0	5	10	20	
45	3,53	3,65	3,58	3,66	3,61A
120	3,77	3,71	3,76	3,70	3,74B
Média	3,65A	3,68A	3,67A	3,68A	3,67

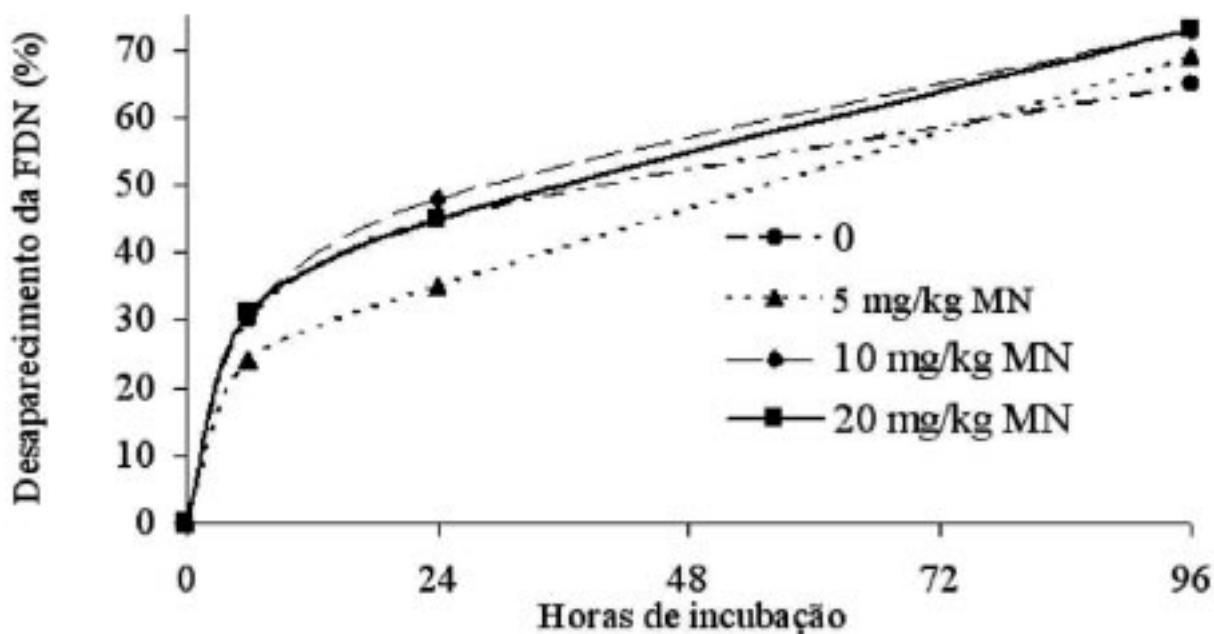
Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05) CV=1,34%.

Na Figura 1 é apontado o efeito do nível de enzimas fibrolíticas sobre o desaparecimento ruminal da FDN da silagem de milho nos diferentes horários de incubação e níveis enzimáticos.

De acordo com os resultados obtidos, a solução enzimática agiu exclusivamente durante o processo de ensilagem, não conseguindo romper ligações ou barreiras que impossibilitariam criar sítios adicionais de digestão para ação dos microrganismos ruminais

com conseqüente aumento da degradação da parede celular.

Segundo WANG & McALLISTER (1994), a degradação da celulose e hemicelulose requer várias enzimas específicas, e diferenças na proporção e atividade destas enzimas podem comprometer a degradação da parede celular. Isso poderia explicar a ineficácia das soluções utilizadas em romper certas ligações e estruturas que impediram a aderência dos microrganismos ruminais.



**FIGURA 1.** Desaparecimento ruminal da fibra em detergente neutro (%) das silagens de milho ensiladas sob diferentes níveis de enzimas fibrolíticas

Nos horários de incubação, o desaparecimento da FDN da silagem foi aumentado ( $P < 0,05$ ), indicando que a gramínea é constituída de compostos químicos de lenta degradação, além do mais, as interações físico-químicas entre estes compostos poderão limitar a taxa e extensão da degradação no rúmen. WILSON & MERTENS (1995) relataram que uma grande proporção da parede celular potencialmente degradável da silagem de milho é composta de uma espessa parede celular secundária de degradação lenta, o que faz com que a degradação ativa se estenda durante os períodos de incubação.

## CONCLUSÕES

A adição do complexo enzimático, nos níveis de 0 a 20 mg por kg de MN, não afetou os teores de PB, MS, N-NH<sub>3</sub>/NT e pH da silagem de milho. O teor da FDN da silagem foi reduzido pelo complexo enzimático a depender do nível de enzima. O complexo enzimático não influenciou no desaparecimento ruminal da FDN das silagens de milho. De acordo com os resultados obtidos, o complexo enzimático agiu exclusivamente na parede celular durante o processo de fermentação no silo.



A silagem submetida à ação de enzimas sofreu uma digestão prévia, o que pode melhorar o padrão de fermentação, não significando, no entanto, que apresente fibra mais digestível.

#### REFERÊNCIAS

- 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.; YANG, W. Z. et al. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33., 1998, Vancouver. **Proceedings ...** Vancouver, 1998. p.121-135.
- BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P.D. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 81, n. 2, p. 37-47, 2003.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K. et al. 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**. Amsterdam, v. 111, n. 1, 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).
- ERDMAN, R. Silage fermentation characteristics affecting feed intake. In: SILAGE PRODUCTION FROM SEED TO ANIMAL, 1993, New York. **Proceedings...** New York: National Silage Production Conference, 1993. p.210-219.
- 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.
- LOPES, J. Valor nutritivo das silagens In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1975. p. 187-218.
- LOWRY, Y.H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, AL et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERONT, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcome, 1991. 340p.
- MILLER. G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NADEAU, E.M.; BUXTO, D.R.; RUSSELL, J.R. et al. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfafa. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 83, n. 7, p. 1487-1502, 2000.
- RODRIGUES, P. H. M.; ANDRADE, S. J.; TAVARES, R. et al. Valor nutritivo da silagem de milho sob o efeito da inoculação de bactérias ácido-lácticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2380-2385, 2002.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em ração para ruminantes**. Viçosa, MG: UFV, 1980. 98f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1980.
- WANG, Y.; McALLISTER, T. A. **Rumen microbes, enzymes and feed digestion**. Agriculture and Agri-

Food Canada Research Centre, Canada, 1994. Disponível em: <http://rumen.snu.ac.kr/symposium/lectures/MaAllister-TA.polf>. Acesso em: 25 de fev. 2004.

WILSON, J. R.; MERTENS, D. R. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. **Crop Science**, v. 35, n. 1, p. 251-259, 1995.

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

---

Protocolado em: 1 dez. 2005. Aceito em: 19 jun. 2006.