

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



**Dissertação**

**Comportamento alimentar, perfil metabólico, produção e  
composição do leite de vacas suplementadas com produto  
fibrolítico derivado da fermentação de fungos**

**Magna Fabrícia Brasil Savela**

**2021**

**Magna Fabrícia Brasil Savela**

**Comportamento alimentar, perfil metabólico, produção e composição do  
leite de vacas suplementadas com produto fibrolítico derivado da  
fermentação de fungos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Zootecnia, da Universidade  
Federal de Pelotas como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
(Área do conhecimento: Produção Animal).

Orientador: Dr. Cássio Cassal Brauner

Co-Orientador: Dr. Marcio Nunes Corrêa

Co-orientador: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Pelotas, 2021

Magna Fabrícia Brasil Savela

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S263c Savela, Magna Fabrícia  
Brasil

Comportamento alimentar, perfil metabólico, produção e composição do leite de vacas suplementadas com produto fibrolítico derivado da fermentação de fungos / Magna Fabrícia Brasil Savela ; Cássio Cassal Brauner, orientador ; Marcio Nunes Corrêa, Francisco Augusto Burkert Del Pino, coorientadores. — Pelotas, 2021.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Enzima. 2. Fibra. 3. Nutrição de precisão. 4. Metabolismo. I. Brauner, Cássio Cassal, orient. II. Corrêa, Marcio Nunes, coorient. III. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, coorient. IV. Título.

CDD : 636.234

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04 de março de 2021

Banca examinadora: Augusto Schneider, Eduardo Schmitt, Eliza Rossi  
Kominou

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner (Orientador)  
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus e a toda minha família, que sempre foram a base de tudo. Em especial aos meus pais Jorge Savela e Nedi Brasil Savela pelo amor, pela vida, por acreditarem em mim e por todo esforço para me propiciar condições para que eu pudesse chegar até aqui e realizar este trabalho, meu muito obrigada.

Aos meus amigos, distantes e próximos, por serem uma fonte inesgotável de motivação e incentivo.

Aos meus colegas de trabalho do NUPEEC, pela ajuda na execução do projeto e convivência durante este período.

Ao meu orientador, Dr. Cássio Cassal Brauner, pela competência, pela disponibilidade, oportunidade, suporte, boa vontade e apoio em me orientar, confeccionar e desenvolver este trabalho.

Aos meus co-orientadores e professores do NUPEEC, pelos ensinamentos técnicos e profissionais.

A Granja 4 Irmãos, especialmente ao gerente da Pecuária Leiteira, Eduardo Xavier, pela oportunidade de proporcionar a realização do experimento, e a todos os funcionários que auxiliaram durante o período experimental.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realizar o mestrado e a Capes pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma, durante esse período, acreditaram e me fizeram crescer.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*  
*(Marthin Luther King)*

## Resumo

SAVELA, Magna Fabrícia Brasil. **Comportamento alimentar, perfil metabólico, produção e composição do leite de vacas suplementadas com produto fibrolítico derivado da fermentação de fungos**. 2021. 48f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O uso de enzimas fibrolíticas exógenas como suplementação na dieta de ruminantes tem sido uma alternativa para melhorar a digestibilidade da fibra da dieta e o aproveitamento de nutrientes pelos animais e consequentemente melhorar seu desempenho produtivo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de um produto de fermentação de fungos secos expressando atividade enzimática fibrolítica (MAXFIBER®, Provita Supplements, Pinneberg / Alemanha), sobre a digestibilidade, comportamento alimentar, perfil metabólico, desempenho produtivo e qualidade do leite de vacas leiteiras entre 40 e 70 dias em lactação. Trinta e seis vacas multíparas da raça holandês, foram divididas em dois grupos: grupo Controle (GC; n = 18) que recebia a dieta necessária para suprir suas necessidades segundo o NRC 2001, e grupo suplementado (GS; n = 18), que recebeu a mesma dieta do controle mais 10g/dia do produto com atividade enzimática fibrolítica sobre a dieta durante um período experimental de 23 dias. A produção de leite foi avaliada diariamente e amostras de leite e sangue coletadas nos dias 0, 14, 19 e 23 do período experimental para avaliação da composição e qualidade do leite, bem como avaliação dos metabólitos sanguíneos (albumina, ureia, Proteínas totais (PPT)  $\beta$ hidroxibutirato (BHBA), ácidos graxos não esterificados (AGNE) e glicose). O consumo e o comportamento alimentar foram avaliados diariamente por meio de cochos automáticos (Intergado®). Vacas que receberam dieta suplementada com enzimas apresentaram maior produção de leite (1kg/leite/vaca dia), menor CCS no leite ( $p = 0,003$ ), com 97.000 CCS/mL a menos no leite e menor ( $p = 0,01$ ) percentual de gordura no leite. Na avaliação do comportamento alimentar, o tratamento não teve efeito significativo sobre o consumo de MS e digestibilidade da dieta, mas aumentou a frequência de acesso aos cochos e a frequência das refeições. A suplementação do produto com atividade enzimática não afetou as concentrações de albumina, ureia, PPT, AGNE e BHBA, mas tendeu ( $p = 0,09$ ) aumentar a glicose no sangue. A suplementação do produto da fermentação fúngica com atividade enzimática fibrolítica na dieta de vacas leiteiras multíparas foi eficaz ao aumentar a produção de leite, apresentar benefícios à imunidade da glândula mamária reduzindo a CCS no leite, além de alterar o comportamento alimentar, aumentando a frequência de consumo, sem alterar o perfil metabólico desses animais.

**Palavras-chave:** enzimas; fibra, nutrição de precisão, metabolismo

## Abstract

SAVELA, Magna Fabrícia Brasil. **Feeding behavior, metabolic profile, milk production and composition of cows supplemented with fibrolytic product derived from the fermentation of fungi**. 2021. 48f. Dissertation (Master's) - Postgraduate Program in Animal Science. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The use of exogenous fibrolytic enzymes as supplementation in the diet of ruminants has been alternative to improve the use of nutrients by animals and consequently improve their productive performance. The aim of this study was to evaluate the effect of supplementing a dried fungi fermentation product expressing residual fibrolytic enzymatic activity (MAXFIBER®, Provita Supplements, Pinneberg/Germany), on digestibility, feeding behavior, productive performance and quality of milk and metabolic profile of high production dairy cows. Thirty-six multiparous Holstein cows were divided into two groups: Control group (GC; n = 18) that received a diet to meet their needs according to NRC 2001, and supplemented group (GS; n = 18), which received the same control diet plus 10 g of the product with fibrolytic enzyme activity directly on the diet during a 23-day experimental period. Milk production was evaluated daily and milk and blood samples were collected on days 0, 14, 19 and 23 of the experimental period to evaluate the composition and quality of milk and to evaluate blood metabolites (albumin, urea, total proteins (PPT)  $\beta$ hydroxybutyrate (BHBA), non-esterified fatty acids (AGNE) and glucose) respectively. Consumption and eating behavior were assessed daily using automatic troughs (Intergado®). Cows that received a diet supplemented with enzymes showed higher milk production, producing 1 kg more, less CCS in milk ( $p = 0.003$ ), with 97,000 CCS / mL less in milk and less ( $p = 0.01$ ) percentage of fat in milk. In the assessment of eating behavior, the treatment had no significant effect on DM consumption and diet digestibility, but increased the frequency of access to troughs and the frequency of meals ( $p = 0.001$ ). Supplementation with the product with enzymatic activity did not affect the concentrations of albumin, urea, PPT, AGNE and BHBA, but tended to increase blood glucose ( $p = 0.09$ ).

Supplementation of the fungal fermentation product with fibrolytic enzyme activity in the diet of multiparous dairy cows was effective in increasing milk production, presenting benefits to the mammary gland immunity by reducing CCS in milk, in addition to altering feeding behavior, increasing the frequency consumption, without changing the metabolic profile of these animals.

Keywords: enzymes; fiber, precision nutrition, metabolism

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Efeito da suplementação com 10g / vaca.dia de um produto de fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica sobre a produção de leite das vacas do grupo suplementado (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e grupo controle. .... | 30 |
| <b>Figura 2:</b> Efeito da suplementação com 10g / vaca.dia de um produto de fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica sobre a CCS no leite de vaca do grupo suplementado (MAXFIBER®, Suplementos Provita, Pinneberg / Alemanha) e grupo controle. ....             | 31 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Ingrediente e composição química da TMR utilizado durante o período experimental para vacas do grupo suplementado e controle. ....                                                                                                                                                                                                                 | 26 |
| <b>Tabela 2:</b> Resultados da ingestão de matéria seca e comportamento alimentar no grupo suplementado com 10g / vaca / dia do produto da fermentação de fungos em estado sólido, com atividade enzimática fibrolítica residual (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e vacas do grupo controle sem suplementação. ....                      | 29 |
| <b>Tabela 3:</b> Resultados dos parâmetros de produção e composição do leite de vacas leiteiras do grupo suplementado com 10g / vaca / dia de um produto de fermentação de fungo seco em estado sólido, com atividade enzimática fibrolítica residual (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e vacas do grupo controle sem suplementação. .... | 29 |
| <b>Tabela 4:</b> Resultados dos parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras do grupo suplementado com 10g / vaca / dia do produto da fermentação de fungos em estado sólido, com atividade enzimática fibrolítica residual (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e vacas do grupo controle sem suplementação. ....                               | 31 |

## SUMÁRIO

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                               | 11 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                          | 14 |
| 2.1 Parede celular vegetal e a fibra na alimentação de ruminantes ..... | 14 |
| 2.2 Enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação de ruminantes .....    | 15 |
| 2.3 Mecanismo de ação as EFE e degradação da fibra .....                | 17 |
| 2.4 Formas de aplicação enzimática .....                                | 18 |
| 3. HIPÓTESE E OBJETIVOS .....                                           | 21 |
| 3.1 Hipótese .....                                                      | 21 |
| 3.2 Objetivo geral .....                                                | 21 |
| 3.3 Objetivo específico .....                                           | 21 |
| 4. ARTIGO .....                                                         | 22 |
| 5. CONCLUSÃO GERAL .....                                                | 42 |
| 6. REFERÊNCIAS .....                                                    | 43 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ruminantes possuem um trato digestivo adaptado com capacidade de aproveitar de forma eficiente carboidratos estruturais como fonte de energia (REFAT et al., 2018). Essa capacidade em digerir tais nutrientes, foi adquirida ao longo da evolução e se deve principalmente ao desenvolvimento de estruturas anatômicas especializadas (pré-estômagos) e à relação simbiótica da população microbiana diversificada presente no rúmen. A população microbiana é composta por bactérias celulolíticas, protozoários e fungos. Suas enzimas fermentam os alimentos fibrosos, sintetizando nutrientes como proteínas, algumas vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), dentre eles principalmente o acético, propiônico e o butírico os quais correspondem de 60 a 80% das necessidades energéticas dos ruminantes (CYSNEIROS et al., 2009; ZILIO et al., 2019).

No entanto ainda que os microrganismos do rúmen consigam digerir componentes estruturais das fibras (celulose e hemicelulose) esse processo raramente é completo atingindo apenas 70% em condições ruminais ótimas (ARRIOLA et al., 2017). Isso devido a fatores relacionados à estrutura e composição das forragens, bem como às interações físico-químicas entre a matriz de hemicelulose e lignina, bem como os aspectos relacionados ao animal, como a mastigação, salivação, temperatura e pH ruminal. Estes fatores podem limitar a extensão da digestão da fibra no rúmen diminuindo a disponibilidade de energia, prejudicando o desempenho animal, com consequências no custo de produção (ANTONIO et al., 2018). Beauchemin et al. (2003) reconheceram que a colonização e penetração limitadas dos microrganismos celulolíticos e suas enzimas na superfície exposta das partículas alimentares são os principais fatores que impedem a digestão efetiva.

O uso de biotecnologias tem possibilitado avanços tecnológicos com melhoras significativas da digestibilidade da parede celular utilizando enzimas fibrolíticas exógenas (EFE), como celulasas e as xilanases. Estes aditivos quando adicionados à dieta de ruminantes, melhoram a digestibilidade da fibra e a taxa de degradação, através da potencialização da ação das enzimas produzidas pelos microrganismos do rúmen. Como consequência, há um

aumento da disponibilidade de energia ao animal e inibição de fatores antinutricionais (BEAUCHEMIN et al., 2003; GANDRA et al., 2017).

Pesquisas utilizando enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de ruminantes vem sendo realizadas desde 1960 (BORROUGHS et al., 1960), e já demonstraram que a suplementação em dietas de vacas leiteiras aumenta a digestibilidade da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) (BEAUCHEMIN et al., 1995; REFAT et al., 2018), bem como da produção de leite (ARRIOLA et al., 2017), palatabilidade da dieta em decorrência da liberação de açúcares que ocorre na hidrólise das fibras, estimulando dessa forma o aumento no consumo de MS (MEALE et al., 2014). Pesquisas desenvolvidas por Lewis et al. (1995) trabalhando com vacas em lactação consumindo forragem e suplementação enzimática, demonstraram um aumento de 5 a 25% no consumo de MS e na produção de leite. Beauchemin et al. (1999) e Bassiouni et al., 2010 em um estudo com vacas em lactação verificaram efeito da adição de enzima fibrolítica sobre o tempo de retenção ruminal das partículas, sendo este menor em comparação ao tratamento controle.

Com relação a produção e composição do leite Schingoethe et al. (1999) demonstrou aumento de 11% na produção de leite e 20 e 13%, no teor de gordura e proteína do leite respectivamente, com a adição de celulase e xilanase. No entanto ARRIOLA et al. (2017) em uma meta-análise encontrou aumento da produção, mas nenhuma diferença na composição do leite.

Considerando-se o comportamento alimentar de vacas leiteiras, outros estudos demonstraram alterações, com maior frequência de acesso aos comedouros, bem como maior frequência de refeições em vacas suplementadas com xilanase e celulase (HE et al. 2015; REFAT et al. 2018).

Outros estudos demonstram que a suplementação com enzimas também melhora o estado energético do animal, reduzindo o balanço energético negativo (BEN) por promover nutrientes rapidamente absorvíveis, com isso há diminuição da concentração de betahidroxibutirato (BHBA) sérico devido a menor mobilização de gordura (DEAN et al., 2013). Isso porque as enzimas favorecem a quebra do substrato liberando os produtos que serão captados pelos microrganismos mais rapidamente e dessa forma sintetizando AGCC, promovendo energia e diminuindo o BEN (DEAN et al., 2013). Desta forma, podendo aumentar os níveis de proteína e glicose sérica, demonstrando resposta

positiva quanto ao uso de enzimas no estado nutricional do animal (ELBODERNY et al., 2015).

No entanto, ainda não há informações suficientes para garantir a consistência e a magnitude destas respostas, uma vez que, há variabilidade de resultados encontrados na literatura em torno da aplicação de enzimas na dieta para ruminantes, atividade enzimática, tempo de suplementação, tipo de dieta e estágio de lactação dos animais (SUJANI & SEREZINHE 2015). Assim, faz-se necessário mais pesquisas a fim de se obter um produto final altamente qualificado, que permita o uso em dietas para ruminantes e a comparação entre diferentes estudos.

Dessa forma, conduziu-se esse estudo, com objetivo de avaliar o efeito da inclusão de um produto da fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica na dieta de vacas leiteiras sobre a digestibilidade, comportamento alimentar, metabólitos sanguíneos, produção e composição do leite.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Parede celular vegetal e a fibra na alimentação de ruminantes

A parede celular vegetal é um termo histológico utilizado para definir um conjunto de compostos sendo esses, polissacarídeos, proteínas e algumas vitaminas, que juntos formam a estrutura da célula vegetal. A fibra é um termo nutricional que indicam os componentes do alimento que possuem baixa solubilidade em sistemas de solventes específicos (JUNG & ALLEN, 1995).

A fibra é a base da alimentação dos ruminantes, pois desempenham papel fundamental na produção, saúde e bem-estar animal. Os diferentes tipos de fibra constituem uma importante fonte de energia, estimula a mastigação, salivação, ruminação, motilidade ruminal, além de regular o consumo de alimento pelos animais (SILVA et al. 2016).

A classificação da parede celular se dá de duas formas, a parede celular primária, mais externa da célula vegetal, responsável pelo desenvolvimento e crescimento das plantas, compostas de 80-90% por polissacarídeos e 10-20% de proteínas, sendo que dos polissacarídeos destacam-se a celulose, hemicelulose, pectina, ácido fenólico interligados, sem deposição de lignina (VAN SOEST, 1994). Após cessar seu crescimento a parede celular secundária, camada mais interna fundamental para o suporte mecânico, começa a ser depositada sobre a primária, surgindo uma nova substância a lignina (BRETT & WALDRON, 1996). Segundo ALBERSHEIM et al. (1996) a parede celular secundária é composta por celulose, hemicelulose e lignina que começa a se depositar na célula com o início da formação da parede secundária.

As enzimas bacterianas começam a colonização e digestão da parede celular a partir da estrutura secundária da fibra, onde ocorre a maior concentração de lignina. Esta é menos digestível para o animal, enquanto a parede primária colonizada posteriormente, possui maior concentração de celulose e hemicelulose que será melhor aproveitada pelo animal (ZILIO et al., 2019).

A celulose é o componente orgânico mais abundante da natureza, quase que exclusivamente na parede celular vegetal, é um homopolímero de glicose,

ou seja, uma longa cadeia formada por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas B-1,4. Sua digestibilidade varia de totalmente indigestível para totalmente digestível dependendo da amplitude da sua lignificação (VAN SUEST, 1994).

A hemicelulose é um heterossacarídeo de baixo peso molecular que se liga às microfibrilas de celulose, especialmente em tecidos não lignificados. É formado por vários resíduos de açúcares, D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-ramnose. A Xilana, é a mais abundante das hemiceluloses e encontra-se entre as moléculas de lignina e as fibras de celulose (FILHO, 1994). A cadeia principal, pode ser linear ou ramificada e é formada de resíduos de xilopirranose que se unem por ligações do tipo  $\beta$ -1,4. A digestibilidade da hemicelulose no rúmen é semelhante à da celulose, uma vez que está diretamente ligada a quantidade de celulose presente na planta, no entanto, é inversamente correlacionado com a amplitude de lignificação (VAN SUEST, 1994).

A lignina é um polímero ramificado formado por quatro álcoois (coniferil, hidroxiconiferil, coumaryl e sinapil). Ela é depositada nas paredes celulares de acordo com a maturidade da planta detendo alto peso molecular e rigidez, fator esse limitante à digestibilidade, visto que o microbiota ruminal natural não é capaz de degradá-la (TUNCER et al., 1999). A digestão desses polissacarídeos da parede celular ocorre de forma em que haja um sinergismo entre as enzimas celulasas e xilanases (ZILIO et al. 2019).

## **2.2 Enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação de ruminantes**

As enzimas são proteínas globulares, de estrutura tridimensional, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem sofrerem alterações durante o processo. São altamente específicas para seus substratos e degradam todos os eventos metabólicos do organismo, causando hidrólise das ligações químicas após se ligarem ao sítio ativo do substrato formando um complexo enzima-substrato que será convertido à enzima e produto (LEHNINGER, 2007).

As enzimas são essências para os ruminantes, uma vez que esses animais são capazes de aproveitar com eficiência alimentos com alta quantidade de fibra, devido aos microorganismos presentes no rúmen, que realizam hidrólise de alimentos complexos como a fibra em suas moléculas mais simples. Essas moléculas como glicose, celobiose, xilose, resultarão em ácidos graxos voláteis (AGV) que serão usados pelos microorganismos do rúmen e pelo animal como fonte de energia (KOZLOSKY, 2009).

As enzimas utilizadas como aditivos nutricionais são caracterizadas pelo extrato enzimático concentrado produzido por fermentação fúngica sendo as espécies mais comuns (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*) ou fermentação bacteriana (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* e *Streptococcus faecium*, spp.) (QUEIROZ et al., 2004; PALOHEIMO et al., 2011). Os fungos são mais utilizados em função do seu rápido crescimento em meio de cultivo, maior produção de enzimas e de mais fácil extração e purificação quando comparadas às enzimas bacterianas (MEALE et al., 2014). A extração enzimática pode ser realizada através de fermentação em meio de cultivo em estado sólido (farelos, bagaços e palhas), mais adequado para o cultivo de fungos que exigem menor teor de umidade, ou realizado através da fermentação submersa em estado líquido (melaço e caldos), mais comum em bactérias que requerem alto teor de umidade (MEALE et al., 2014).

As enzimas fibrolíticas exógenas mais utilizadas na alimentação de ruminantes são as celulasas, que envolvem três tipos de enzimas: as endo- $\beta$ 1,4-glucanases ou endoglucanases, as exo- $\beta$ -1,4-glucanase ou celobiohidrolases, ou apenas exoglucanases e as  $\beta$ -1,4-glucosidase que atuam de forma sinérgica na hidrólise de celulose (ZHANG et al., 2007). As endoglucanases atuam nas regiões de menor organização das microfibrilas da celulose formando celobiose, as exoglucanases hidrolisam a cadeia de celulose a partir da extremidade não redutora produzindo celobiose; e as  $\beta$ -glucosidades hidrolisam a celobiose e as cadeias curtas de celoligossacarídeos a partir de extremidades redutoras ou não redutoras produzindo glicose (SILVA et al, 2016). As xilanases fazem a degradação da xilana componente estrutural da hemicelulose, e assim como as celulasas possuem um sistema enzimático composto por endo- $\beta$ -1,4-xilanases e as  $\beta$ -xilosidases que atuam de forma sinérgica para que ocorra a hidrólise completa. As endo- $\beta$ -1,4-xilanases realizam a hidrólise da cadeia principal da

xilana, gerando oligossacarídeos. As  $\beta$ xilosidases hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose, liberando xilose (VRIES & VISSER, 2001).

É importante ressaltar que os produtos enzimáticos fibrolíticos, geralmente, são combinações de atividades enzimáticas, ou seja, associação de celulasas e xilanases (MCALLISTER et al. 2001). São produtos considerados seguros, uma vez que, além de serem de origem natural, não são tóxicos ou patogênicos, e não apresentam ação antibiótica (ARRIOLA et al. 2017).

### **2.3 Mecanismo de ação das enzimas fibrolíticas exógenas e degradação da fibra**

O uso de EFE como xilanases que catalisam a hidrólise de ligações 1,4 $\beta$ -D-xilosídicas em xilanos e as celulasas que hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4-Dglicose em glicose, degradam a hemicelulose e a celulose das forragens, respectivamente, proporcionando aumento da digestibilidade da fibra, melhor utilização da mesma pelo animal (SUJANI & SERESINHE, 2015).

A hidrólise dos compostos que constituem a parede celular vegetal ocorre quando as bactérias fibrolíticas colonizam as partículas de alimento recémingerido pelo animal, iniciando a degradação extracelular através da síntese de enzimas que irão hidrolisar celulose e hemicelulose até monossacarídeos, estes são capturados para dentro da célula bacteriana e são metabolizados intracelularmente através de rotas comuns (Glicólise e Ciclo de Krebs) originando os produtos essenciais para os ruminantes, os AGV (propionato, acetato e butirato) (MEALE et al. 2014).

No entanto, segundo BEAUCHEMIN & HOLTSHAUSEN (2011) o mecanismo de ação das EFE adicionadas a dieta de ruminantes não é totalmente conhecido. REFAT et al. (2018) demonstrou que a sua utilização pode melhorar a degradação agindo diretamente na fibra, ou aumentar a digestão da MS e FDN no rúmen refletindo em aumento da produção de leite (ARRIOLA et al. 2017). MARTINS et al. (2007) utilizando imagens de microscopia de varredura mostrou aumento na colonização da fibra com a adição das EFE melhorando a colonização das partículas do alimento. Já MORGAVI et al. (2000) sugere que

as EFE potencializam a ação das enzimas endógenas aumentando dessa forma a hidrólise do fluido ruminal.

O aumento da atividade hidrolítica do fluido ruminal pelas EFE pode ocorrer como sugere BEAUCHEMIN e RODE (1996) que observaram aumento de 15% na atividade da celulase, e WALLACE (2001) que encontrou aumento de 5 % na atividade da xilanase. MORGOVI et al. (2000) observou melhora na sinergia entre EFE e enzimas microbianas. No entanto, esses resultados segundo SILVA et al. (2016) dependem da dose enzimática adicionada e tempo de suplementação.

BEAUCHEMIN et al. (2003) sugere que assim que adicionada as EFE na dieta, começa a ação das enzimas sobre a fibra, degradando a FDN e FDA resultando na diminuição do tempo despendido para colonização e ataque microbiano da fração degradável da fibra alimentar. Dessa forma, além de favorecer a utilização de energia da dieta e a fermentação ruminal, as EFE determinam maior disponibilidade de nutrientes (celobiose, glicose) úteis aos microrganismos ruminais, resultando no crescimento da biomassa microbiana ruminal total (BEAUCHEMIN et al. 2003). Isso, por sua vez, acelera o processo de digestão, inclusive de componentes não-estruturais (como o amido, pectina, açúcares), e aumenta o nível de proteína metabolizável que é direcionado às porções inferiores do trato digestivo (SUJANI & SEREZINHE, 2015).

## **2.4 Formas de aplicação enzimática**

Existem algumas questões relacionadas ao método de aplicação adequado e dosagem ideal a ser especificada de maneira mais precisas (ARRIOLA et al. 2017). No entanto, independente da forma, as EFE são usadas para melhorar a qualidade e a digestibilidade dos alimentos para ruminantes, através da degradação da fibra do alimento, seja por efeito associativo com enzimas endógenas, ou por atuar indiretamente estimulando a colonização da fibra por microrganismos ruminais (ANTONIO et al., 2018).

As formas de aplicação das enzimas exógenas são bastante variáveis, como demonstram os estudos com aplicação diretamente no alimento por um período antes do fornecimento aos animais, como nas silagens (DEAN et al.,

2013), aplicação no momento da alimentação, em rações totalmente misturadas (TMR) (REFAT et al., 2018) ou sobre concentrado (DEAN et al., 2013).

Estudos relatam que a enzima fibrolítica aplicada na colheita de forrageiras melhora o consumo de proteína bruta (PB), digestibilidade da PB, e ingestão de matéria seca. Outros estudos relatam que a adição de enzimas antes da alimentação melhora a digestão da fibra ruminal, alterando a estrutura da alimentação, tornando-a mais suscetível à degradação pelos microrganismos, melhorando a digestibilidade da dieta e aumentando a disponibilidade de nutrientes a serem utilizados para síntese do leite (MORGAVI et al., 2000; MEALE et al., 2014). As enzimas podem também ser aplicadas como aditivo em ração para ruminantes no cocho, no intuito de aumentar a digestibilidade de alimentos fibrosos e, conseqüentemente, o desempenho do animal. Quando fornecidas dessa maneira, as enzimas fibrolíticas formam ligações com os substratos, que as protegem da degradação ruminal e podem aumentar a digestibilidade da forragem (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Estudos realizados por McAllister et al. (1999) sugerem que o fornecimento da enzima diretamente no alimento seria mais eficaz do quando administradas diretamente ao rúmen, onde seria mais rapidamente eliminado pelo fluido ruminal. Porém, observações de Morgavi et al. (2000) estudando o efeito de enzima fibrolítica em um estudo *in vitro* com digesta ruminal de ovinos, observou que o fator limitante na ação da enzima sobre os alimentos não foi a estabilidade das enzimas no fluido ruminal. Já MEALE et al. (2014) relata que a suplementação com enzima fibrolítica diretamente no rúmen aumenta a atividade fibrolítica no líquido ruminal sem uma interação pré-alimentação com enzima alimentar.

Esses efeitos positivos com a suplementação ocorrem devido ao aprimoramento da ligação da enzima ao substrato alimentar, que pode aumentar a resistência das enzimas à proteólise e prolongar o tempo de permanência no rúmen para melhor ação dos microrganismos responsáveis pela digestão (BEAUCHEMIN et al., 2004).

Outro fator que também deve ser estudado é a dose enzimática a ser aplicado, ou seja, quantas unidades de atividade enzimática devem ser adicionadas por quilo de matéria seca a ser ingerida. Nsereko et al. (2002) especularam que a aplicação de um nível moderado de enzimas na alimentação

de ruminantes causou uma ruptura benéfica da estrutura da superfície dos alimentos, antes e após a ingestão. Silva et al. (2016) demonstrou que a adição de níveis elevados de enzimas podem ser menos eficazes do que níveis mais baixos. Já Beauchemin et al. (2003), sugere que o nível ótimo pode depender da dieta.

Um dos principais entraves para a realização de pesquisas nesta área é a inconsistência de resultados, isso devido à variedade de produtos enzimáticos e condições experimentais.

### **3. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótese**

A suplementação dietética com um produto da fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica melhora a digestibilidade dos nutrientes da dieta, refletindo no comportamento alimentar, perfil metabólico, aumento da produção e melhora na qualidade do leite.

#### **3.2 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da inclusão de um produto da fermentação de fungos em estado sólido na dieta de vacas leiteiras sobre a digestibilidade, comportamento alimentar, metabólitos sanguíneos, bem como sobre a produção e composição do leite.

#### **3.3 Objetivo específico**

- ✓ Avaliar o efeito da suplementação com produto da fermentação de fungos em estado sólido com atividade enzimática fibrolítica, sobre o consumo de matéria seca (MS) e o comportamento alimentar de vacas leiteiras da raça holandês.
- ✓ Avaliar o efeito da suplementação com produto da fermentação de fungos em estado sólido com atividade enzimática fibrolítica, sobre a digestibilidade da dieta de vacas leiteiras da raça holandês.
- ✓ Avaliar o efeito da suplementação com produto da fermentação de fungos em estado sólido com atividade enzimática fibrolítica, sobre a produção e composição do leite de vacas leiteiras da raça holandês.
- ✓ Avaliar o efeito da suplementação com produto da fermentação de fungos em estado sólido com atividade enzimática fibrolítica, sobre os metabolitos do sangue de vacas leiteiras da raça holandês.

## 4. ARTIGO

### 4.1 Comportamento alimentar, perfil metabólico, produção e composição do leite de vacas suplementadas com produto fibrolítico derivado da fermentação de fungos

*Magna Fabrícia Brasil Savela<sup>a</sup>, Joana Piagetti Noschang<sup>a</sup>, Antônio Amaral Barbosa<sup>a</sup>,*

*Josiane de Oliveira Feijó<sup>a</sup>, Viviane Rohrig Rabassa<sup>a</sup>, Eduardo Schmitt<sup>a</sup> Francisco*

*Augusto Burkert Del Pino<sup>a</sup>, Marcio Nunes Corrêa<sup>a</sup>, Cássio Cassal Brauner<sup>b</sup>*

<sup>a</sup> Núcleo de Pesquisa , Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal de Pelotas ( UFPel ), Brasil

<sup>b</sup> Autor para correspondência . Email endereço : [cassiocb@gmail.com](mailto:cassiocb@gmail.com)

Manuscrito submetido à revista Livestock Science

## RESUMO

A suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de ruminantes pode melhorar o aproveitamento de nutrientes pelos animais e consequentemente melhorar seu desempenho produtivo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de um produto da fermentação de fungos seco em estado sólido com atividade enzimática fibrolítica residual (MAXFIBER®, Provita Supplements, Pinneberg/Alemanha), sobre a digestibilidade, comportamento alimentar, desempenho produtivo, qualidade do leite e o perfil metabólico de vacas leiteiras entre 40 e 70 dias em lactação. Trinta e seis vacas holandesas multíparas foram divididas em dois grupos: um grupo suplementado com 10 g / vaca / dia de produto com atividade enzimática fibrolítica (GS; n = 18), com inclusão na ração total misturada (TMR), e um grupo controle (GC; n = 18) sem suplementação. Os resultados foram analisados em um desenho de blocos ao acaso ao longo de um período experimental de 23 dias. A produção de leite foi avaliada diariamente e amostras de leite e sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 19 e 23 do período experimental para avaliar a composição e qualidade do leite e dos metabólitos do sangue. O consumo e o comportamento alimentar foram avaliados diariamente com o uso de cochos automáticos. As vacas que receberam dieta suplementada com o produto enzimático apresentaram maior produção de leite, menor contagem de células somáticas (CCS) no leite (p = 0,003)

e menor percentual de gordura do leite ( $p = 0,01$ ). Na avaliação do comportamento alimentar, houve maior frequência de acesso aos comedouros e refeições diárias ( $p = 0,001$ ) nos animais que receberam as enzimas na dieta. A glicemia tendeu a aumentar ( $p = 0,09$ ) no grupo tratado. O tratamento não teve efeito significativo sobre o consumo de MS e digestibilidade da dieta. A suplementação com um produto oriundo da fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica aumentou a produção de leite e reduziu a CCS no leite, aumentou a frequência de acesso aos alimentadores e a frequência de consumo. No entanto, não foi capaz de melhorar a digestibilidade da fibra da dieta.

*Palavras-chave:* celulose, fibra, nutrição de precisão, fermentação em estado sólido, xilanase

## 1. Introdução

Maximizar a produção e aumentar a produtividade por vaca exige uma melhor eficiência alimentar fazendo com que o manejo nutricional seja o processo mais oneroso para o sistema (Peters et al. 2015). As forragens são a base da alimentação dos ruminantes, uma vez que esses animais podem utilizar os componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose) como fonte de energia para o metabolismo e desempenho, bem como para promover a atividade motora do rúmen (Refat et al. 2018). Esse aproveitamento só é possível devido à atividade microbiana do rúmen (bactérias e enzimas fibrolíticas), que desempenha um papel fundamental no processo de fermentação para a digestão do alimento ingerido (Sujani e Seresinhe 2015; Zilio et al. 2019).

Porém esse processo de degradação da fibra no sistema digestivo dos ruminantes não é completo, atingindo apenas 70% mesmo em condições ideais de pH e temperatura (Arriola et al., 2017). Essa limitação na digestão da fibra indica que há um limite na secreção endógena de enzimas fibrolíticas ou dificuldade dessas em digerir totalmente a fração fibrosa da dieta (Sujani e Seresinhe, 2015). Neste sentido, o uso de enzimas fibrolíticas exógenas é uma ferramenta importante para otimizar a digestibilidade ruminal das fibras, complementando a atividade das enzimas endógenas, expondo sítios da parede celular à aderência bacteriana que permitirá uma digestão mais eficiente, melhorando a utilização do alimento pelos ruminantes (Gandra et al., 2017).

Pesquisas demonstraram que a suplementação com enzimas fibrolíticas aumenta a digestibilidade da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) em vacas leiteiras com reflexos positivos na produção de leite (Arriola, et al., 2017). Além disso estudos *in vitro* (Refat et al., 2018), *in situ* (Krueger et al., 2008; Antônio et al., 2018) e *in vivo* (Salem et al., 2013; Lunagariya et al., 2019), demonstram melhora na degradação de fibras e aumento da síntese de proteína microbiana (El-Bordeny et al., 2015), com efeitos diretos no aumento da taxa de passagem do alimento no rúmen (Krueger et al., 2008).

Diante deste contexto, hipotetizamos que a suplementação dietética com enzimas fibrolíticas melhoraria a digestibilidade dos nutrientes da dieta, e o perfil metabólico, refletindo em aumento da produção e melhora na qualidade do leite. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de um produto da fermentação de fungos em estado sólido na dieta de vacas leiteiras de alta produção sobre a digestibilidade,

comportamento alimentar, metabólitos sanguíneos, bem como sobre a produção e composição do leite.

## 2. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, registrado sob o Código 46050-2019 sendo conduzido em uma fazenda comercial localizada no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32 ° 16 'S, 52 ° 32' E), durante os meses de setembro a novembro de 2019.

### 2.1. Animais e instalações

Foram utilizadas 36 vacas multíparas da raça holandês, entre 40 a 70 dias em lactação (DEL), com peso médio de  $700 \pm 20,5\text{kg}$ , distribuídas aleatoriamente em dois grupos, sendo esses categorizados em: Grupo Controle (GC) e Grupo Suplementado (GS), ambos com 18 animais, acompanhadas durante um período de 23 dias nos meses de setembro e novembro de 2020.

Os animais foram mantidos em sistema intensivo de produção, alocados em galpão de sistema *compost barn*, com cama de maravalha, durante 23 dias, sendo os grupos manejados conjuntamente durante o período experimental, os quais receberam a mesma dieta (Tabela 1), duas vezes ao dia, com água *ad libitum*. Para o GS houve a inclusão a inclusão de 10g/animal/dia de um produto da fermentação de fungos seco com atividade enzimática fibrolítica, produzidas a partir das linhagens de *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Neurospora intermedia* (MAXFIBER®, Provita Supplements, GmbH, Pinneberg/Germany), contendo atividades de xilanase, endoglucanase e exoglucanase, adicionada à ração total misturada (TMR) diretamente no cocho 10 minutos antes da primeira oferta do dia.

**Tabela 1:** Ingrediente e composição química da TMR utilizado durante o período experimental para vacas do grupo suplementado e controle.

| Item                            | Montante             |
|---------------------------------|----------------------|
| <b>Ingrediente (TMR)</b>        | <b>Kg/animal/dia</b> |
| Água                            | 8                    |
| Grão de milho moído fino        | 1                    |
| Farelo de soja                  | 2,9                  |
| Casca de soja                   | 2,6                  |
| Farelo de arroz                 | 1,9                  |
| Milho grão úmido                | 2                    |
| Silagem de Milho                | 27                   |
| Pré-secado azevém               | 2                    |
| Resíduo de arroz                | 1                    |
| <b>Composição química (TMR)</b> | <b>(%)</b>           |
| DM                              | 91,74                |
| MM                              | 9,37                 |
| PB                              | 12,71                |
| EE                              | 5,54                 |
| FDN                             | 35,04                |
| FDA                             | 18,89                |
| LIG                             | 1,59                 |

TMR: ração total misturada ; DM: matéria seca, MM: matéria mineral, PB: proteína bruta, EE: extrato de éter; FDN: Fibra de detergente neutro, FDA: Fibra de detergente ácido, LIG: Lignina

## 2.2. Coletas e análises

As amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 19 e 23 do período experimental após a primeira ordenha do dia, essas foram realizadas através de punção do complexo arteriovenoso da coccígea, em tubos sem anticoagulante para avaliação dos níveis circulantes de ácidos graxos não esterificados (NEFA), beta hidroxibutirato (BHB), ureia, albumina e proteínas totais, e em um tubo contendo fluoreto de sódio para avaliação

508 circulante de glicose. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram  
509 centrifugadas a 3500 *rpm* durante 15 minutos para obtenção do soro e acondicionados em  
510 microtubos de 1,5mL do tipo eppendorff e congeladas para posterior análises.

511 As análises do perfil proteico (ureia, albumina e proteínas totais) e glicose foram  
512 realizadas através de análise colorimétrica por kit comercial (Labtest, Belo Horizonte,  
513 Brasil) e as análises de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e  $\beta$ -hidroxibutirato  
514 (BHBA) através de kits comerciais (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals USA®,  
515 Richmond, EUA, e BHBA, Ranbut, Randox® Laboratories Ltd, Reino Unido) de acordo  
516 com o método descrito por Ballou et al. (2009). As leituras das amostras do perfil proteico  
517 e energético foi realizado através do analisador bioquímico automático (Labmax Pleno®,  
518 Labtest - Centerlab, São Paulo, Brasil).

519 Assim como as coletas de sangue, as coletas de leite também foram realizadas nos  
520 dias (0, 14, 19 e 23) do experimento, colhidas nas duas ordenhas do dia (manhã e noite)  
521 em frascos contendo conservante bronopol, mantidas refrigeradas e enviados para o  
522 laboratório Lableite da EMBRAPA Clima Temperado, de Pelotas, Rio Grande do Sul,  
523 Brasil, para análises de composição (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) e  
524 qualidade do leite (contagem de células somáticas (CCS)).

525 A avaliação do consumo e comportamento alimentar dos animais foram obtidos  
526 diariamente durante 23 dias por um período de 24hs por dia, através de alimentadores  
527 inteligentes (Intergado®), de forma automática e individualizada. Foi mensurado o  
528 consumo dos animais, tempo de consumo (min/dia), frequência de consumo (número de  
529 visitas aos cochos com consumo), frequência de acesso aos cochos e duração das refeições  
530 (min/refeição), sendo esta última, calculada através do tempo de consumo divididos pela  
531 frequência de consumo dos animais.

532 Diariamente foram coletadas amostras de dieta para análise do teor de matéria  
533 seca, realizado no laboratório de Nutrição animal do Núcleo de Pesquisa, Ensino e  
534 Extensão em Pecuária da Universidade Federal de Pelotas. Semanalmente foram colhidas  
535 amostras para análise da digestibilidade da matéria seca, realizada *in vitro* com e sem  
536 adição do produto da fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica  
537 (MAXFIBER®, Provita Supplements, Pinneberg/Germany) através do método descrito  
538 por Tilley e Terry (1963) pelo Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes,  
539 na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

### 2.3. Análise Estatística

Todos os dados estatísticos foram analisados por meio do programa estatístico SAS® (Statistical Analysis System) por meio de análise de variância (Mixed Model) para avaliar o efeito do tratamento, dia e suas interações e as comparações das médias dos grupos quando significativa, foram realizadas por meio do teste Tukey HSD, considerando  $P \leq 0,05$  como significativo e  $P < 0,10$  como tendência. As variáveis que não apresentaram distribuição normal (CCS e consumo de MS) foram transformadas em base logarítmica e as variáveis (gordura, sólidos totais e CCS) foram analisadas por meio de uma análise de covariância com um modelo incluindo o efeito contínuo da covariável (uma medida da mesma variável antes do início do tratamento), e a melhor estrutura de covariância foi definida pelo critério de informação de Akaike (AIC).

As análises envolvendo medidas repetidas ao longo do tempo foram feitas usando o procedimento PROC MIXED do SAS 9.4, e o seguinte modelo estatístico foi considerado:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + A_k + e(a)_{ijk} + F_m + TP_{im} + e(b)_{ijkm}, \quad (\text{Equação 1})$$

onde:  $y_{ijk}$  representa a observação para o animal  $k$  em um dado tratamento  $i$  em um período  $j$ ;  $i$  representa o efeito fixo do tratamento ( $i = 1-4$ );  $j$  representa o efeito fixo do período ( $j = 1-4$ );  $A_k$  é o efeito aleatório do animal dentro do bloco ( $k = 1-36$ );  $F_m$  representa o efeito fixo do tempo ( $m = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14$  e  $16$ );  $TP_{im}$  é o efeito fixo de interação entre o tratamento e o tempo  $m$ ; e  $e(b)_{ijkm}$  representa o erro aleatório associado a cada observação.

A matriz de covariância foi estimada usando o menor valor encontrado pelo critério de Akaike. Além disso, contrastes lineares e quadráticos foram obtidos para avaliar o efeito dose-resposta da adição de enzimas fibrolíticas exógenas EFE.

### 3. Resultados

O consumo de ração e o comportamento alimentar das vacas leiteiras durante o período experimental são descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados da ingestão de matéria seca e comportamento alimentar no grupo suplementado com 10g / vaca / dia de um produto da fermentação de fungos em estado

sólido, com atividade enzimática fibrolítica (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e vacas do grupo controle sem suplementação.

| Parâmetro                       | <u>Média±SE</u><br>GS | Média±SE<br>GC | Grupo | Valor P |       |
|---------------------------------|-----------------------|----------------|-------|---------|-------|
|                                 |                       |                |       | Dia     | G*P   |
| Consumo, (kg / dia)             | 20.67 ± 0.31          | 20.25 ± 0.31   | 0.326 | 0.001   | 0.156 |
| Tempo consumo (min/dia)         | 122.18±2.41           | 118.59±2.23    | 0.326 | 0.001   | 0.176 |
| Freq. de acesso cochos/dia      | 67.52 ± 1.40          | 60.71 ± 1.12   | 0.001 | 0.618   | 0.487 |
| Freq. consumo (N ° dia)         | 26.45 ± 0.53          | 23.66 ± 0.46   | 0.001 | 0.001   | 0.801 |
| Taxa de consumo (kg / min)      | 0.194±0,005           | 0.196±0.005    | 0.663 | 0.001   | 0.006 |
| Duração da refeição (min / ref) | 5.839±015             | 5.924±0.18     | 0.051 | 0.001   | 0.162 |

GC: grupo controle; GS: grupo suplementado; G \* P: interação de grupo e período

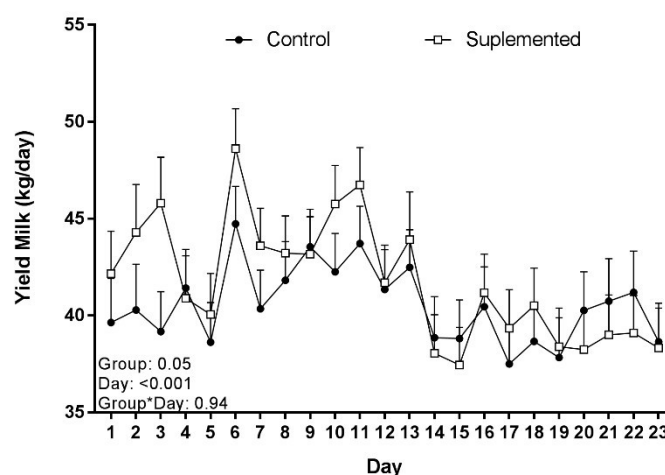
Não houve diferença no consumo de MS entre o grupo suplementado e grupo controle (P=0.32), bem como na taxa de consumo (P= 0.66), indicando que a suplementação enzimática não alterou a ingestão de MS. Assim como no consumo, a suplementação enzimática não melhorou a digestibilidade da dieta, sendo que as médias para as dietas dos grupos suplementado e controle foram 62.014±4.54 e 60.270±4.99, respectivamente, não apresentando diferenças significativas (P=0.50). Mas proporcionou um aumento na frequência de acesso aos cochos (P = 0,001) pelos animais, bem como uma maior frequência de refeições diárias (P = 0,001) no grupo suplementado.

A Tabela 3 mostra que a aplicação de enzimas aumentou a produção de leite (P = 0,05) em relação ao grupo controle (Figura 1), e reduziu o teor de gordura do leite (P = 0,011) e CCS (P = 0,003) no grupo suplementado (Figura 2). Os demais parâmetros avaliados (sólidos totais, lactose e proteína) não diferiram significativamente entre os grupos.

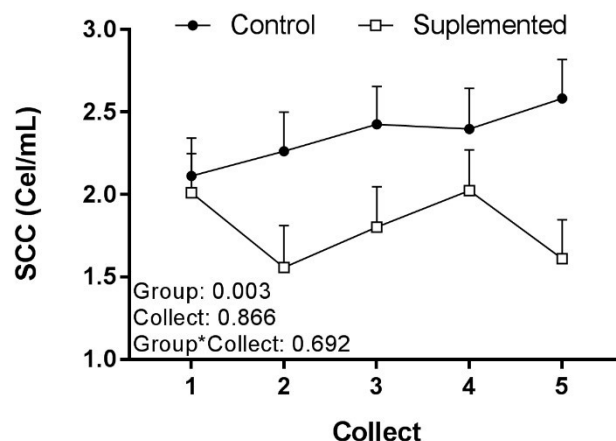
**Tabela 3:** Resultados dos parâmetros de produção e composição do leite de vacas leiteiras do grupo suplementado com 10g / vaca / dia de um produto de fermentação de fungo em estado sólido, com atividade enzimática fibrolítica residual (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e vacas do grupo controle sem suplementação.

| Parâmetro               | Média ± SE     | Média ± SE     | Valor P |        |       |
|-------------------------|----------------|----------------|---------|--------|-------|
|                         | GS             | GC             | Grupo   | Coleta | G*P   |
| Produção Leite (kg/dia) | 41.59 ± 0.44   | 40.58 ± 0.42   | 0.052   | 0.001  | 0.943 |
| Lactose (%)             | 4.38 ± 0.02    | 4.37 ± 0.04    | 0.661   | 0.316  | 0.493 |
| Gordura (%)             | 4.34 ± 0.11    | 4.77 ± 0.11    | 0.011   | 0.001  | 0.047 |
| Proteína (%)            | 2.93 ± 0.02    | 2.96 ± 0.03    | 0.471   | 0.009  | 0.546 |
| Sólidos totais (%)      | 12.65 ± 0.15   | 12.93 ± 0.15   | 0.200   | 0.001  | 0.435 |
| CCS (cel/mL)            | 540.08 ± 115.4 | 637.57 ± 102.3 | 0.003   | 0.865  | 0.692 |

GC: grupo Controle; GS: grupo suplementado; G \* P: interação de grupo e período; CCS: contagem de células somáticas



**Figura 1:** Efeito da suplementação com 10g / vaca.dia de um produto de fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica residual sobre a produção de leite das vacas do grupo suplementado (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e grupo controle.



**Figura 2:** Efeito da suplementação com 10g / vaca.dia de um produto de fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica residual sobre a CCS no leite de vacas do grupo suplementado (MAXFIBER®, Suplementos Provita, Pinneberg / Alemanha) e grupo controle.

A Tabela 4 mostra os resultados dos parâmetros metabólicos do sangue, A suplementação de EFE neste estudo não teve efeito no NEFA sérico ( $P = 0,21$ ) e BHB ( $P = 0,70$ ). Houve tendência no aumento da glicemia ( $P = 0,09$ ) no grupo suplementado e não houve diferença nos níveis de proteína entre os grupos.

**Tabela 4:** Resultados dos parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras do grupo suplementado com 10g / vaca / dia de um produto da fermentação de fungos em estado sólido, com atividade enzimática fibrolítica residual (MAXFIBER®, Provita Supplements GmbH, Pinneberg / Alemanha) e vacas do grupo controle sem suplementação.

| Parâmetro             | Média±SE     | Média±SE     | Valor P |        |       |
|-----------------------|--------------|--------------|---------|--------|-------|
|                       | GS           | GC           | Grupo   | Coleta | G*C   |
| Proteína Total (g/dL) | 6.68 ± 0.15  | 7.00 ± 0.12  | 0.100   | <.0001 | 0.145 |
| Albumina (g/dL)       | 2.79 ± 0.13  | 2.93 ± 0.10  | 0.402   | 0.095  | 0.952 |
| Ureia (mg/dL)         | 41.27 ± 3.34 | 36.59 ± 0.79 | 0.177   | 0.296  | 0.354 |
| Glicose (mg/dL)       | 50.59 ± 1.20 | 49.80 ± 1.32 | 0.094   | 0.659  | 0.958 |
| NEFA (mmol,dL)        | 0.39 ± 0.03  | 0.48 ± 0.06  | 0.216   | 0.007  | 0.709 |

|                     |                 |                 |       |        |       |
|---------------------|-----------------|-----------------|-------|--------|-------|
| $\beta$ HBA (mg/dL) | $0.91 \pm 0.07$ | $0.95 \pm 0.07$ | 0.705 | <.0001 | 0.121 |
|---------------------|-----------------|-----------------|-------|--------|-------|

GC: grupo controle; GS: grupo suplementado; G \* P: interação grupo coleta

#### 4. Discussão

Os resultados de consumo e digestibilidade do presente estudo, são semelhantes aos encontrados por Elwakeel et al. (2007) e Mohamed et al. (2013) que constataram que a suplementação da dieta de vacas leiteiras com enzimas fibrolíticas adicionadas à TMR no momento da alimentação não causaram alterações significativas na ingestão de MS. Arriola et al. (2011), Dean et al. (2013) e Tirado-González et al. (2017) também não observaram efeitos da adição de enzimas na ingestão de MS. Esse resultado pode ser esperado, em partes, pelo fato de que o consumo de MS em dietas suplementadas com enzimas exógenas pode resultar em aumento no uso dos nutrientes através da degradação da fibra da dieta, ocasionando um maior aproveitamento desses nutrientes pelos animais, levando à uma maior saciedade e uma melhor conversão alimentar (Holstshausen et al. 2011; Lunagariya et al. 2019). Outra alternativa seria que a suplementação enzimática não influenciou a palatabilidade da dieta com a liberação de açúcares através da hidrólise das fibras, e portanto, não estimulou o aumento no consumo (Gado et al. 2009).

Cantet et al. (2015) não observaram benefícios da adição de celulase na digestibilidade *in vitro* de forragens de baixa qualidade, e Silva et al. (2016) não encontrou nenhum efeito na digestibilidade da dieta de vacas leiteiras suplementadas com EFE. No entanto, eles observaram um aumento na produção de ácidos graxos voláteis (AGV) sugerindo maior aproveitamento do substrato pelos microrganismos ruminais. Outros estudos mostraram que a suplementação de TMRs de vacas leiteiras com enzimas exógenas aumenta a digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) da dieta (Gado et al. 2009; Arriola et al. 2011; Salem et al. 2013; Arriola et al. 2017). Isto corrobora com a nossa hipótese de que dietas suplementadas com enzimas fibrolíticas tivessem melhora da digestibilidade, devido a complementação da atividade enzimática endógena expondo sítios da parede celular à aderência bacteriana, o que permitiria uma digestão mais completa da dieta (Gandra et al., 2017) aumentando a degradação da fibra, estimulando uma mais rápida taxa de passagem do alimento pelo rúmen (Krueger et al., 2008), podendo resultar em aumento no consumo de MS.

O aumento do consumo também poderia ser esperado neste estudo, visto que houve um aumento na frequência de acesso aos cochos pelos animais, bem como uma frequência maior de refeições diárias no grupo suplementado. Portanto, demonstrar que esses animais apresentaram maior atividade de cocho, sugere aumento da atividade enzimática no rúmen e melhora na taxa de passagem, o que resultaria em aumento do consumo, visto que o consumo de ração compreende não só a quantidade de ração ingerida, mas também o número de refeições diárias, frequência e duração (Refat et al. 2018). No entanto, no presente estudo não houve efeito do tratamento sobre o consumo de alimento. Esses resultados demonstram que, independentemente do consumo, os animais do grupo suplementado tornaram-se mais ativos. Isso está de acordo com estudos anteriores, onde houve aumento do acesso ao comedouro em animais suplementados com enzimas fibrolíticas (He et al. 2015). O monitoramento do comportamento alimentar é importante no sistema de produção, pois não só fornece a quantidade de alimento consumida pelo animal em 24 horas, mas também fornece informações importantes sobre o bem-estar e as possíveis alterações de saúde enfrentadas por eles, sendo uma importante ferramenta no diagnóstico e previsão de doenças (Steensels et al. 2017; Refat et al. 2018).

A aplicação de enzimas aumentou a produção de leite e reduziu o teor de gordura do leite e CCS no grupo suplementado. Os demais parâmetros avaliados (sólidos totais, lactose e proteína) não foram significativamente diferentes entre os grupos. Esses resultados estão de acordo com Lewis et al. (1999), Yang et al. (2000), Gado et al. (2009), and Arriola et al. (2017), que encontraram um aumento na produção de leite, explicado pelo aumento do consumo e digestibilidade da dieta. Este não foi o caso do presente estudo, portanto, o aumento na produção de leite pode ter sido devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes no trato digestivo e no rúmen, refletindo em aumento na energia líquida ganha para a produção de leite (Mohamed et al. 2013).

A composição do leite (exceto gordura) foi semelhante nos dois grupos, tal fato pode ser devido, a digestibilidade da dieta não foi alterada e também não afetou a densidade energética dos componentes do leite. O baixo percentual de gordura encontrado no grupo suplementado com o produto oriundo da fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica, está de acordo com outros estudos que apresentaram uma redução deste sólido ao aplicar altas dosagens de enzimas ricas em xilanase e celulase nas dietas para vacas leiteiras. Neste caso a redução de gordura no leite se deu devido ao aumento da taxa de passagem da fibra pelo rúmen, diminuindo a proporção de acetato ruminal, que

691 é o principal ácido graxo precursor lipogênico na glândula mamária (Smith, 1983; Refat  
692 et al. 2018).

693 Além disso, Dean et al. (2013) relataram redução na proporção de acetato em  
694 relação ao propionato devido à aplicação de um produto enzimático fibrolítico  
695 diretamente no TMR, indicando que a adição da enzima tornou a fermentação mais  
696 gluconeogênica e, portanto, melhorou a eficiência energética da fermentação. Essa  
697 alteração na proporção dos ácidos pode melhorar a utilização dos nutrientes pelos animais,  
698 principalmente para vacas leiteiras no início da lactação, quando a demanda por nutrientes  
699 é maior do que a ingestão (Gado et al. 2009). Sendo assim, especula-se que essa diferença  
700 na proporção dos ácidos graxos voláteis no presente estudo e o aumento da taxa de  
701 passagem do alimento pelo rúmen explicaria o menor teor de gordura no leite e uma  
702 tendência no aumento de glicose no grupo suplementado.

703 A diminuição da CCS no leite no grupo suplementado com o produto enzimático,  
704 está de acordo com Tewoldebrhan et al. (2017) que observou redução nos níveis de CCS  
705 no leite para o grupo suplementado com enzima  $\beta$ -mananase em comparação ao grupo  
706 controle e Sederevičius (2006) que também encontrou diminuição dos níveis de CCS no  
707 leite de vacas suplementadas com lisozima. Esses resultados podem ser explicados pelo  
708 efeito da capacidade estimulante do sistema auto lítico microbiano causado pelas enzimas  
709 e pela melhora do estado energético do animal favorecendo o sistema imune e a atividade  
710 fagocitária de forma sistêmica (Cross, 2002). Dessa forma, compreendendo que as células  
711 somáticas são as células do sistema imunológico e fazem parte do mecanismo de defesa  
712 natural do organismo do animal, os seus níveis no leite podem ser um indicador eficaz da  
713 saúde do úbere (Kasikci et al., 2012), mesmo não sendo tão sensível quanto a cultura  
714 bacteriana, uma CCS decrescente em vacas do grupo suplementado pode ser um  
715 indicativo de que a suplementação com enzimas fibrolíticas proporcionou uma melhor  
716 condição de saúde a esses animais.

717 A suplementação de EFE neste estudo não teve efeito sobre os níveis séricos de  
718 NEFA e BHB, que são indicadores de aumento da mobilização de gordura ou aumento  
719 do balanço energético devido à melhor oxidação dos corpos cetônicos. No entanto, as  
720 vacas neste estudo apresentaram balanços energético positivo que não foram afetados pelo  
721 tratamento. Houve tendência de aumento da glicemia no grupo suplementado e não houve  
722 diferença nos níveis de proteína entre os grupos. Portanto, a suplementação com  
723 EFE não melhorou os processos metabólicos para aumentar a digestibilidade aparente de  
724 nutrientes, especialmente proteínas. Esses resultados estão de acordo com Peters et al.

2015, que não encontrou nenhum efeito significativo do tratamento com EFE no BHB, proteína total e enzimas hepáticas em vacas leiteiras, e com El-Bordeny et al. 2015, que não encontrou nenhum efeito significativo sobre os parâmetros bioquímicos no sangue de búfalos leiteiros suplementados com enzimas fibrolíticas. Holtshausen et al. (2011) e Dean et al. (2013) observaram que o tratamento com EFE reduziu significativamente a concentração plasmática de BHB, indicando um efeito positivo na redução da mobilização de gordura. El-Bordeny et al. (2015) encontraram um aumento significativo nos níveis de proteína e glicose sérica, mostrando uma resposta positiva ao uso de enzimas exógenas no estado nutricional do animal, com aumento no nível de proteína e melhora na disponibilidade de energia. Por outro lado, Holtshausen et al. (2011) observaram que o tratamento com EFE reduziu significativamente a concentração plasmática de BHB, indicando um efeito positivo na redução da mobilização de gordura.

A tendência para maiores concentrações de glicose no grupo suplementado, pode ser devido a melhoria da utilização de energia e carboidrato solúvel no rúmen, absorvido pela parede ruminal, passando pra circulação sanguínea, resultando em maior glicose disponível, bem como, devido a maior proporção de propionato no rúmen, que é um precursor glicogênico de oxaloacetato resultando em aumento da concentração de glicose no sangue (Dean et al. 2013).

O processo de fermentação enzimática em estado sólido (SSF) tem sido usado há milhares de anos na nutrição humana, para tornar os alimentos mais estáveis nas prateleiras e aumentar seu valor nutricional. De acordo com os resultados gerais encontrados neste experimento utilizando MAXFIBER® na alimentação animal, sugere-se que há uma provável alteração na fermentação bacteriana ruminal, com aumento dos carboidratos fermentáveis, resultando em aumento da produção de leite e aumento da eficiência nos animais. No entanto, essas afirmações não são confirmadas, porque as análises do ambiente ruminal não foram realizadas neste estudo, mas as melhorias na fermentação ruminal podem refletir esses achados.

Essa inconsistência observada entre os estudos pode ser atribuída a diferenças na atividade enzimática, nível de aplicação, estágio de lactação das vacas, modo e tempo de aplicação da enzima (Beauchemin et al. 2004), sugerindo que mais estudos são necessários para elucidar a ação de produtos enzimáticos exógenos.

## 5. Conclusão

A suplementação com um produto da fermentação de fungos em estado sólido com atividade enzimática fibrolítica residual na TMR de vacas leiteiras, melhorou o desempenho alimentar das vacas, aumentando a frequência de acesso aos alimentadores e frequência de refeições por dia, aumentou produção de leite e diminuiu a CCS no leite.

## Reconhecimentos

Os autores agradecem à Provita Supplements GmbH (Pinneberg / Alemanha) pela doação do produto de fermentação de fungos em estado sólido avaliado neste estudo e pelo apoio financeiro. O autor agradece à CAPES pelo apoio à expansão e consolidação desta pesquisa por meio da concessão de uma bolsa.

## Referências

- Antonio, G, Filla, MG, Del Valle, TA, Campana, M, Morais, JPG, 2018. Efeitos de enzimas fibrolíticas sobre a degradação in situ da matéria seca e da fibra de forrageiras. Agrarian. 11, 363-370. doi:[10.30612/agrarian.v11i42.7488](https://doi.org/10.30612/agrarian.v11i42.7488)
- Arriola, KG, Kim, SC, Staples, CR, Adesogan, AT, 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. Journal of Dairy Science 94, 832-841. doi:[10.3168/jds.2010-3424](https://doi.org/10.3168/jds.2010-3424)
- Arriola, KG, Oliveira, AS, Ma, ZX, Lean, IJ, Giurcanu, MC, Adesogan, AT, 2017. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. Journal of Dairy Science 100, 4513–4527. doi:[10.3168/jds.2016-12103](https://doi.org/10.3168/jds.2016-12103)
- Ballou, MA, Gomes, RC, Juchem, SO, Depeters, EJ, 2009. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. Journal of Dairy Science 92, 657-669. doi:[10.3168/jds.2008-1196](https://doi.org/10.3168/jds.2008-1196)

786 Beauchemin, KA, Colombatto, D, Morgavi, DP, Yang, WZ, Rode, LM, 2004. Mode of  
 787 action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. Canadian Journal of  
 788 Animal Science 84, 13–22. doi:[10.4141/A02-102](https://doi.org/10.4141/A02-102)

789 Beigh, YA, Ahmad, H, Ganai, AM, Masood, D, 2018. Blood Metabolic Profile of Lambs  
 790 Fed Complete Diet Supplemented with Exogenous Fibrolytic Enzymes Cocktail. Journal  
 791 of Animal Health and Production 6, 96-102. doi:[10.17582/journal.jahp/2018/6.4.96.10](https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2018/6.4.96.10)

792 Cantet, JM, Colombatto, CD, Jaurena, G, 2015. Methane production and in vitro  
 793 digestibility of low quality forages treated with a protease or a celulase. Animal  
 794 Production Science 56, 1700-1706. doi:[10.1071/an14988](https://doi.org/10.1071/an14988)

795 Cross, ML, 2002. Microbes vs. Microbes: immune signals generated by probiótico  
 796 lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunology  
 797 and Medical Microbiology 34, 545-553. doi:[10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x)

798 Dean, DB, Staples, CR, Littell, RC, Kim, S, Adesogan, AT, 2013. Effect of method of  
 799 adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production,  
 800 ruminal fermentation, and blood metabolites. Animal Feed Science and Technology 13,  
 801 337–353

802 Dineshkumar, D, Abdalla, AL, Silva, SCML, Lucas, RC, Cavalcante, SEAS, Souza, GD,  
 803 dos Santos, PP, dos Santos, JEM, Louvandini, H, 2014. Effect of temperature and  
 804 preincubation time of fibrolytic enzymes on in vitro degradability of Brachiaria  
 805 (Brachiaria decumbens). Animal Production Science 54, 1779–1783.  
 806 doi:[10.1071/AN14262](https://doi.org/10.1071/AN14262)

807 Elwakeel, EA, Titgemeyer, EC, Johnson, BJ, Armendariz, CK, Shirley, JE, 2007.  
 808 Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feeds tuffs. Journal of dairy  
 809 Science 90, 5226-5236. doi:[10.3168/jds.2007-0305](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0305)

810 El-Bordeny, NE, Abedo, AA, El-Sayed, HM, Daoud, EN, Soliman, HS, Mahmoud, AEM,  
811 2015. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on Productive Response of  
812 Dairy Cows at Different Lactation Stages. Asian Journal of Animal and Veterinary  
813 Advances 10, 226-236. doi:[10.3923/ajava.2015.226.236](https://doi.org/10.3923/ajava.2015.226.236)

814 Gado, HM, Salem, AZM, Robinson, PH, Hassan, M, 2009. Influence of exogenous  
815 enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk  
816 production and composition in dairy cows. Animal Feed Science and Technology 154,  
817 36-46. doi:[10.1016/j.anifeedsci.2009.07.006](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.07.006)

818 Gandra, JR, Miranda, GA, Goesa, RHT, Takiya, CS, Del Valle, TA, Oliveira, ER, Freitas,  
819 JJE, Gandra, ERS, Arakia, HMC, Santos, ALAV, 2017. Fibrolitic enzyme  
820 supplementation through ruminal bolus na eating silage or sugarcane silage-based diets.  
821 Animal Feed Science and Technology 231, 29–37. doi:[10.1016/j.anifeedsci.2017.06.009](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.009)

822 He, ZX, Walker, ND, McAllister, TA, Yang, WZ, 2015. Effect of wheat dried distillers  
823 grains with solubles and fibrolytic en zymes on ruminal fermentation, digestibility,  
824 growth performance, and feeding behavior of beef cattle. Journal of Dairy Science 93,  
825 1218–1228. doi:[10.2527/jas.2014-8412](https://doi.org/10.2527/jas.2014-8412)

826 Holtshausen, L, Chucg, YH, Gerardo-Cuervo, H, Oba M, Beauchemin, KA, 2011.  
827 Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition  
828 of a developmmmental fibrolytic enzyme additive. Journal of Dairy Science 94, 899-907.  
829 doi:[10.3168/jds.2010-3573](https://doi.org/10.3168/jds.2010-3573)

830 Kaşıkçı, G, Cetin, Ö, Bingöl, EB, Gündüz, MC, 2012. Relations between electrical  
831 conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in  
832 the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. Turkish Journal of Veterinary and  
833 Animal Sciences 36, 49–55. doi:[10.3906/vet-1103-4](https://doi.org/10.3906/vet-1103-4)

834 Krueger, NA, Adesogan, AT, Staples, CR, 2008. Effect of method of applying fibrolytic  
 835 enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef  
 836 steers. Journal of Animal Science 86, 882-889, doi:[10.2527/jas.2006-717](https://doi.org/10.2527/jas.2006-717)

837 Lewis, GE, Sanchez, WK, Hunt, CW, Guy, MA, Pritchard, GT, Swanson, BI, Treacher  
 838 RJ, 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy  
 839 cows. Journal of Dairy Science 82, 611–617, 1999. doi:[10.3168/jds.S0022 -](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75274-4)  
 840 [0302\(99\)75274-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75274-4)

841 Lunagariya, PM, Gupta, RS, Shah, SV, Patel, IG, 2019. Digestibility of Nutrients as  
 842 Influenced by Supplementation of Exogenous Fibrolytic Enzymes in Dry Non-pregnant  
 843 Cows. The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology 14, 45-48.  
 844 doi:[10.21887/ijvsbt.14.4.12](https://doi.org/10.21887/ijvsbt.14.4.12)

845 Mohamed, DE, Borhami, BE, El-Shazly, KA, Sallam, SMA, 2013. Effect of dietary  
 846 supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactation  
 847 dairy cows. Journal of Agricultural Science 6, 146–155. doi:[10.5539/jas.v5n6p146](https://doi.org/10.5539/jas.v5n6p146)

848 Peters, A, Ulrich, M, Danicke, S, 2015. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on  
 849 performance and blood profile in early and mid-lactation cows. Animal Nutrition, 1-10  
 850 doi:[10.1016/j.aninu.2015.09.001](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.001)

851 Refat, B, Christensen, DA, McKinnon, JJ, Yang, W, Beattie, AD, McAllister, TA, Eun,  
 852 JS, Abdel-Rahman, JA, Yu, P, 2018. Effect of fibrolytic enzymes on lactational  
 853 performance, feeding behavior, and digestibility in high-producing dairy cows fed a  
 854 barley silage-based diet. Journal of Dairy Science 101, 1-9, 2018. doi:[10.3168/jds.2017-](https://doi.org/10.3168/jds.2017-14203)  
 855 [14203](https://doi.org/10.3168/jds.2017-14203)

856 Salem, AZM, Gado, HM, Colombatto, D, Elghandour, MMY, 2013. Effects of exogenous  
 857 enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef  
 858 steers. *Livestock Science* 154, 69–73. doi:[10.1016/j.livsci.2013.02.014](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.02.014)

859 Sederevičius, A, Balsytė, J, Lukauskas, K, Kazlauskaitė, J, Biziulevičius, AG, 2006. An  
 860 enzymatic cow immunity-targeted approach to reducing milk somatic cell count: 3. A  
 861 comparative field trial, *Food and Agricultural Immunology* 17, 1-7.  
 862 doi:[10.1080/09540100500525833](https://doi.org/10.1080/09540100500525833)

863 Silva, TH, Takiya, CS, Vendramini, THA, Ferreira, EJ, Zanferari, F, Rennó, FP, 2016.  
 864 Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and  
 865 performance of mid-lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 221, 35–  
 866 43. doi:[10.1016/j.anifeedsci.2016.08.013](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.013)

867 Smith, SB, 1983. Contribution of the pentose cycle to lipogenesis in bovine adipose tissue.  
 868 *Archives of Biochemistry and Biophysics* 221, 46–56. doi:[10.1016/0003-](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90120-0)  
 869 [9861\(83\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90120-0)

870 Steensels, M, 2017. Towards practical application of sensors for monitoring animal  
 871 health: the effect of post-calving health problems on rumination duration, activity and  
 872 milk yield. *Journal of Dairy Research* 84, 132-138. doi:[10.1017/S0022029917000176](https://doi.org/10.1017/S0022029917000176)

873 Sujani, S, and Seresinhe, RT, 2015. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review.  
 874 *Asian Journal of Animal Science* 93, 85–99. doi:[10.3923/ajas.2015.85.99](https://doi.org/10.3923/ajas.2015.85.99)

875 Tewoldebrhan, TA, Appuhamy, JADRN, Lee, JJ, Niu, M, Seo, S, Jeong, S, Kibreab, E,  
 876 2017. Exogenous  $\beta$ -mannanase improves feed conversion efficiency and reduces somatic  
 877 cell count in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 100, 244–252. doi:[10.3168/jds.2016-](https://doi.org/10.3168/jds.2016-11017)  
 878 [11017](https://doi.org/10.3168/jds.2016-11017)

Tirado-González, DN, Miranda-Romero, LA, Ruíz-Flores, A, Medina-Cuéllar, SE,  
 Ramírez-Valverde, R, Tirado-Estrada, G, 2018. Meta-analysis: Effects of exogenous  
 fibrolytic enzymes in ruminant diets. Journal of Applied Animal Research 46, 771–783.  
 doi: [10.1080/09712119.2017.1399135](https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1399135)

Tilley, JMA, Terry, RAA, 1963. two-stage technique for the in vitro digestion of forage  
 crops. British Grassland Society 18, 104-111. doi: [10.1111 /j.1365-2494.1963.tb00335.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x)

Yang, WZ, Beauchemin, KA, Rode, LM, 2000. A comparison of methods of adding  
 fibrolytic enzymes to lactating cow diets. Journal of Dairy Science 83, 2512-2520. doi:  
[10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75143-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75143-5)

Zilio, EMC, Del Valle, TA, Ghizzi, LG, Takiya, CS, Dias, MSS, Nunes, AT, Silva, GG,  
 Rennó, FP, 2019. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal  
 fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. Journal of Dairy Science 102,  
 1–11. doi:[10.3168/jds.2018-14949](https://doi.org/10.3168/jds.2018-14949)

## 5. CONCLUSÃO GERAL

A suplementação com um produto oriundo da fermentação de fungos com atividade enzimática fibrolítica aumentou a produção de leite e reduziu a CCS no leite, aumentou a frequência de acesso aos alimentadores e a frequência de consumo. No entanto, não foi capaz de melhorar a digestibilidade da fibra da dieta.

De maneira geral a aplicação das enzimas na dieta de vacas leiteiras no momento do fornecimento aos animais no presente estudo apresentou resultados promissores. No entanto, o volume de estudos no Brasil sobre o efeito de enzimas exógenas sobre o desempenho animal ainda é incipiente. Assim, novas pesquisas que contribuam para o entendimento de mecanismos de ação das enzimas utilizadas na nutrição de ruminantes visando maximizar o desempenho animal devem ser estimuladas afim de avaliar criteriosamente a ação dessas enzimas e estreitar a variação existente entre resultados de diferentes pesquisas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O' NEILL, M.A. An hypothesis: the same mix polysaccharides are components of the primary cell walls higher plants. In: Pectins and Pectinases. Amsterdam: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J, 1996. v. 14, p. 47- 45.
- ANTONIO, G.; FILLA, M.G.; DEL VALLE, T.A.; CAMPANA, M.; MORAIS, J.P.G. Efeitos de enzimas fibrolíticas sobre a degradação in situ da matéria seca e da fibra de forrageiras. **Agrarian**, v.11, p. 363-370, 2018.
- ARRIOLA, K.G.; KIM, S.C.; STAPLES, C.R.; ADESOGAN, A.T. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 832-841, 2011.
- ARRIOLA, K.G.; OLIVEIRA, A.S.; MA, Z.X.; LEAN, I.J.; GIURCANU, M.C.; ADESOGAN, A.T. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p. 4513–4527, 2017.
- BALLOU, M.A.; GOMES, R.C.; JUCHEM, S.O.; DEPETERS, E.J. Effects of dietary supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein cows. **Jornal of Dairy Science**, v. 92, p. 657-669, 2009.
- BEAUCHEMIN, K. A.; HOLTSHAUSEN, L. **Developments in enzyme usage in ruminants**. In: BEFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). Enzymes in farm animal nutrition. 2. Ed. London, UK, CAB International, p. 206-230, 2011.
- BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z.; RODE, L.M. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p.13–22, 2004.
- 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.
- BEUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. **The potential use of feed enzyme for ruminants**. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Proceedings... Ithaca: Cornell University, p.131-141, 1996.
- BEIGH, Y.A.; AHMAD, H.; GANAI, A.M.; MASOOD, D. Blood Metabolic Profile of Lambs Fed Complete Diet Supplemented with Exogenous Fibrolytic Enzymes Cocktail. **Journal of Animal Health and Production**, v.6, p.96-102, 2018.
- BRETT, C. T.; WALDRON, K. W. **The molecular components o the wall**. In: BRETT, C.T.; WALDRON,K. W. Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1996. cap. 2, p. 5-43.

966 BURROUGHS, W.; WOODS, W.; EWING, S. A.; GREIG, J.; THEURER, B.  
 967 Enzyme additions to fattening cattle rations. *Journal of Animal Science*, v. 19, p.  
 968 458-46, 1960.

969 CANTET, J.M.; COLOMBATTO, C.D.; JAURENA, G. Methane production and in  
 970 vitro digestibility of low quality forages treated with a protease or a cellulase.  
 971 **Animal Production Science**, v.56, p.1700-1706, 2015.

972 CROSS, M.L. Microbes vs. Microbes: immune signals generated by probiótico  
 973 lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS**  
 974 **Immunology and Medical Microbiology**, v.34, p.545-553, 2002.

975 DEAN, D.B.; STAPLES, C.R.; LITTELL, R.C.; KIM, S.; ADESOGAN, A.T. Effect  
 976 of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake  
 977 digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolites.  
 978 **Animal Feed Science and Technology**, v.13, p.337–353, 2013.

979 DINESHKUMAR, D.; ABDALLA, A.L.; SILVA, S.C.M.L.; LUCAS, R.C.;  
 980 CAVALCANTE, S.E.A.S.; SOUZA, G.D.; DOS SANTOS, P.P.; DOS SANTOS,  
 981 J.E.M.; LOUVANDINI, H. Effect of temperature and pre-incubation time of  
 982 fibrolytic enzymes on in vitro degradability of Brachiaria (*Brachiaria decumbens*).  
 983 **Animal Production Science**, v. 54, p.1779–1783, 2014.

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

987 EL-BORDENY, N.E.; ABEDO, A.A.; EL-SAYED, H.M.; DAOUD, E.N.; SOLIMAN,  
 988 H.S.; MAHMOUD, A.E.M. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on  
 989 Productive Response of Dairy Cows at Different Lactation Stages. **Asian Journal**  
 990 **of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p.226-236, 2015.

991 FILHO, E. X. F. The xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal Medical**  
 992 **and Biological Research**, v.27, p. 1093 –1109, 1994.

993 GADO, H.M.; SALEM, A.Z.M.; ROBINSON, P.H.; HASSAN, M. Influence of  
 994 exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as  
 995 well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science**  
 996 **and Technology**, v. 154, p.36-46, 2009.

997 GANDRA, J.R.; MIRANDA, G.A.; GOESA, R.H.T.; TAKIYA, C.S.; DEL VALLE,  
 998 T.A.; OLIVEIRA, E.R.; FREITAS, J.J.E.; GANDRA, E.R.S.; ARAKIA, H.M.C.;  
 999 SANTOS, A.L.A.V. Fibrolytic enzyme supplementation through ruminal bolus na  
 1000 eating silage or sugarcane silage-based diets. **Animal Feed Science and**  
 1001 **Technology**, v. 231, p. 29–37, 2017.

1002 HE, Z.X.; WALKER, N.D.; MCALLISTER, T.A.; YANG, W.Z. Effect of wheat dried  
 1003 distillers grains with solubles and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation,

- 1004 digestibility, growth performance, and feeding behavior of beef cattle. **Journal of**  
1005 **Dairy Science**, v. 93, p.1218–1228, 2015.
- 1006 HOLTSHAUSEN, L.; CHUCG, Y.H.; GERARDO-CUERVO, H.; OBA M.;  
1007 BEAUCHEMIN, K.A. Improved milk production efficiency in early lactation dairy  
1008 cattle with dietary addition of a developmmmental fibrolytic enzyme additive.  
1009 **Journal of Dairy Science**, v.94, p.899-907, 2011.
- 1010 KAŞIKÇI, G.; CETIN, Ö.; BINGÖL, E.B.; GÜNDÜZ, M.C. Relations between  
1011 electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality  
1012 parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. **Turkish Journal**  
1013 **of Veterinary and Animal Sciences**, v. 36, p.49–55, 2012.
- 1014 KOSLOZKY, G. **Bioquímica de ruminantes**. 2. Ed. Santa Maria: ed. UFSM,  
1015 2009. P.216.
- 1016 KRUEGER, N.A.; ADESOGAN, A.T.; STAPLES, C.R. Effect of method of  
1017 applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake,  
1018 digestion, and growth of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 86,  
1019 p.882889, 2008.
- 1020 LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**.4. Ed. In: NELSON, D. L.;  
1021 MICHAEL M.; COX, M. M. (Rev.). São Paulo: Sarvier, 2007. P.1100
- 1022 LEWIS, G.E.; SANCHEZ, W.K.; HUNT, C.W.; GUY, M.A.; PRITCHARD, G.T.;  
1023 SWANSON, B.I.; TREACHER, R.J. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the  
1024 lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.611–  
1025 617, 1999.
- 1026 LUNAGARIYA, P.M.; GUPTA, R.S.; SHAH, S.V.; PATEL, I.G. Digestibility of  
1027 Nutrients as Influenced by Supplementation of Exogenous Fibrolytic Enzymes in  
1028 Dry Non-pregnant Cows. **The Indian Journal of Veterinary Sciences and**  
1029 **Biotechnology**, v.14, p.45-48, 2019.
- 1030 MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; LEMPP, B.;  
1031 PAULA, M. C. Degradabilidade in sito e observações microscópicas de  
1032 volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas.  
1033 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 1927-1936, 2007.
- 1034 MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T.; PRADO, I.N.; MOLETTA, J.L.  
1035 Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com  
1036 enzima fibrolítica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.2118-2124, 2006.
- 1037 McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in  
1038 ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. Enzymes in farm  
1039 animal nutrition. Oxon: Cab International, 2001. cap 11, p.273-298.
- 1040 McALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J.; POPP, J. D. et al. Effect of exogenous  
1041 enzyme on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle.  
1042 **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, p.353-360, 1999.

- 1043 MEALE, S. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; HRISTOV, A. N.; CHAVES, A. V.;  
1044 MCALLISTER, T. A. Board-invited review: opportunities and challenges in using  
1045 exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal**  
1046 **Science**, v. 92, p.427-442, 2014.
- 1047 MOHAMED, D.E.; BORHAMI, B.E.; EL-SHAZLY, K.A.; SALLAM, S.M.A. Effect of  
1048 dietary supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of  
1049 early lactation dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p.146–155,  
1050 2013.
- 1051 MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L. et al. Synergy between  
1052 ruminal fibrolytic enzyme and enzyme from *Trichoderma longibrachiatum*.  
1053 **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1310-1321, 2000.
- 1054 PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHEMAANPERA, J. **Xylanases and celulasas**  
1055 **as feed additives**. In: Bedford, M. R., PARTRIDGE, G. G. (Ed). Enzymes in farm  
1056 animal nutrition. 2nd ed, London, UK, CAB Internacional. 2011. P. 12-53.
- 1057 PETERS, A.; ULRICH, M.; DANICKE, S. Effect of exogenous fibrolytic enzymes  
1058 on performance and blood profile in early and mid-lactation cows. **Animal**  
1059 **Nutrition**, p.1-10, 2015.
- 1060 QUEIROS, R.C.; BERGAMASCHINE, A.F.; BASTOS, J.F.P.; SANTOS, P.C.;  
1061 LEMOS, G.C. Uso de produto a base de enzima na dieta de bovinos:  
1062 Digestibilidade dos nutrientes e desempenho em confinamento. **Revista**  
1063 **Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1548-1556, 2004.
- 1064 REFAT, B.; CHRISTENSEN, D.A.; MCKINNON, J.J.; YANG, W.; BEATTIE, A.D.;  
1065 MCALLISTER, T.A.; EUN, J.S.; ABDEL-RAHMAN, J.A.; YU, P. Effect of fibrolytic  
1066 enzymes on lactational performance, feeding behavior, and digestibility in  
1067 highproducing dairy cows fed a barley silage–based diet. **Journal of Dairy**  
1068 **Science**, v.101, p.1-9, 2018.
- 1069 SALEM, A.Z.M.; GADO, H.M.; COLOMBATTO, D.; ELGHANDOUR, M.M.Y.  
1070 Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and  
1071 growth performance in beef steers. **Livestock Science**, v. 154, p.69–73, 2013.
- 1072 SCHINGOETHE, D. J.; G, A. STEGEMAN.; TREACHER, R. J. Response of  
1073 lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to  
1074 forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 9961003,  
1075 1999.
- 1076 SEDEREVIČIUS, A.; BALSYTĖ, J.; LUKAUSKAS, K.; KAZLAUSKAITĖ, J.;  
1077 BIZIULEVIČIUS, A.G. An enzymatic cow immunity-targeted approach to reducing  
1078 milk somatic cell count: 3. A comparative field trial, **Food and Agricultural**  
1079 **Immunology**, v.17, p.1-7, 2006.
- 1080 SILVA, T.H.; TAKIYA, C.S.; VENDRAMINI, T.H.A.; FERREIRA, E.J.;  
1081 ZANFERARI, F.; RENNÓ, F.P. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing

1082 time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. **Animal**  
1083 **Feed Science and Technology**, v. 221, p.35–43, 2016.

1084 SMITH, S.B. Contribution of the pentose cycle to lipogenesis in bovine adipose  
1085 tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 221, p.46–56, 1983.

1086 STEENSELS, M. Towards practical application of sensors for monitoring animal  
1087 health: the effect of post-calving health problems on rumination duration, activity  
1088 and milk yield. **Journal of Dairy Research**, v. 84, p.132-138, 2017.

1089 SUJANI, S. AND SERESINHE, R.T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A  
1090 review. **Asian Journal of Animal Science**, v. 93, p.85–99, 2015..

1091 TEWOLDEBRHAN, T.A.; APPUHAMY, J.A.D.R.N.; LEE, J.J.; NIU, M.; SEO, S.;  
1092 JEONG, S.; KEBREAB, E. Exogenous  $\beta$ -mannanase improves feed conversion  
1093 efficiency and reduces somatic cell count in dairy cattle. **Journal of Dairy**  
1094 **Science**, v. 100, p.244–252, 2017.

1095 TIRADO-GONZÁLEZ, D.N.; MIRANDA-ROMERO, L.A.; RUÍZ-FLORES, A.;  
1096 MEDINA-CUÉLLAR, S.E.; RAMÍREZ-VALVERDE, R.; TIRADO-ESTRADA, G.  
1097 Meta-analysis: Effects of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. **Journal**  
1098 **of Applied Animal Research**, v. 46, p.771–783, 2018.

1099 TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A.A. two-stage technique for the in vitro digestion of  
1100 forage crops. **British Grassland Society**, v. 18, p.104-111, 1963.

1101 TUNCER, M.; BALL, A. S.; ROB, A.; WILSON, M. T. Optimization of extracelullar  
1102 lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete  
1103 *Thermomonospora fusca* BD 25. **Enz. Microb. Technol.** v. 25, p. 38-47, 1999.

1104 VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell  
1105 University, 1994. 476p.

1106 WALLACE, R. J.; WALLACE, S. J. A.; MCKAIN, N.; NSEREKO V. L., HARTNELL,  
1107 G. F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn  
1108 and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal Animal**  
1109 **Science**, v. 79, p.1905-1916, 2001.

1110 YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. A comparison of methods of  
1111 adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83,  
1112 p.2512-2520, 2000.

1113 ZILIO, E.M.C.; DEL VALLE, T.A.; GHIZZI, L.G.; TAKIYA, C.S.; DIAS, M.S.S.;  
1114 NUNES, A.T.; SILVA, G.G.; RENNÓ, F.P. Effects of exogenous fibrolytic and

1111 amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation 1112  
dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p.1–11, 2019.