



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO IN VITRO DE CEPAS DE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE PARA USO NA DIETA DE RUMINANTES

Autor: Yann dos Santos Luz
Orientador: D.M.V. Mauro Pereira de Figueiredo

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março 2018

YANN DOS SANTOS LUZ

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
PARA USO NA DIETA DE RUMINANTES**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: D.M.V. Mauro Pereira de Figueiredo
Co-orientador: D. Sc. José Augusto Gomes Azevêdo

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março 2018

636.085 Luz, Yann dos Santos.

L994a Avaliação *in vitro* de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para uso na dieta de ruminantes. / Yann dos Santos Luz. – Itapetinga-BA: UESB, 2018.
72f.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Mauro Pereira de Figueiredo e coorientação do Prof. D.Sc. José Augusto Gomes Azevêdo.

1. Ruminantes – Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* – Aditivo. 2. Dieta de ruminantes – Modulação ruminal. 3. Nutrição de ruminantes - Prebiótico. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, Campus de Itapetinga. II. Figueiredo, Mauro Pereira de. III. Azevêdo, José Augusto Gomes. IV. Título.

CDD(21): 636.085

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Ruminantes – Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* – Aditivo
2. Dieta de ruminantes – Modulação ruminal
3. Nutrição de ruminantes - Prebiótico

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

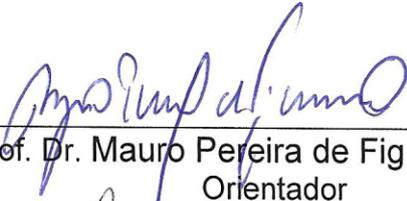
Título: "Avaliação *in vitro* de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para uso na dieta de ruminantes".

Autor (a): Yann dos Santos Luz

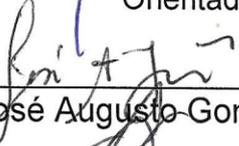
Orientador (a): Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo

Co-orientador (a): Prof. Dr. José Augusto Gomes Azevedo

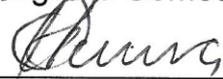
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



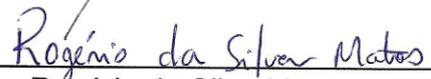
Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo – UESB
Orientador



Prof. Dr. José Augusto Gomes Azevedo - UESC



Prof. Dr. Joel Queiroga Ferreira – UESB



Prof. Dr. Rogério da Silva Matos – IF Baiano



Prof.ª Dr.ª Geisiane Moura Neves Rebouças – FTC

Data de realização: 09 de março de 2018.

“O pessimista se queixa do vento, o otimista espera que ele mude e o realista ajusta as velas”.

William George Ward

AGRADECIMENTOS

A Deus, sentido de tudo e força presente em todos os momentos;

Aos meus pais, Claudio Fernandes da Luz e Herbene Nonato dos Santos Luz, por me colocar no mundo e ao carinho e atenção dispendidos a mim;

Aos meus irmãos Ygor e Iasmim Maria pela torcida;

À minha cômjuge amada, Andréia Muniz (*in memorian*), pela ajuda incondicional em todos os momentos;

Às avós, Josefa e Laura “Dona Dê”, que sempre me abençoaram e colocaram-me em suas orações;

Aos avôs, Jesuíno Luz (*in memorian*) e Hermano Victoria (*in memorian*), por terem deixado como legado a paixão pelo meio rural e a vontade de produzir que está se perpetuando pelas gerações;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela oportunidade de realizar este doutorado;

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, com concentração em Produção de Ruminantes, pela oportunidade, em mais uma etapa de aprimoramento profissional;

À Fundação de apoio a pesquisa do estado da Bahia (Fapesb), pela concessão da bolsa de estudos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Dr. Mauro Pereira Figueiredo, pela orientação desde a época da graduação, onde pude através de seus ensinamentos amadurecer como homem, pesquisador e profissional;

Ao Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão, pela conceção das cepas que foram utilizadas nos experimentos desta tese;

Aos Profs. Drs. Mauro Figueiredo, José Augusto, Paulo Bonomo, Jurandir Cruz e Gleidson Carvalho, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas que cursei;

Ao amigo George Abreu Filho, que sempre esteve disposto a me auxiliar quando estava em Itapetinga;

Aos amigos e colegas de pós-graduação Jennifer, Lorena, Mario Henrique, Tiago, Hermógenes, Pablo e Alexandro pela amizade;

Aos colegas do LNA, pela amizade e parceria em todos os momentos;

À Vera pela amizade de longa data no LNA, e sua alegria cativante, que é fundamental para dar motivação a realização das análises diárias;

A todos que contribuíram de alguma maneira para que eu chegasse até aqui...

...minha eterna gratidão!

BIOGRAFIA

Yann dos Santos Luz, filho de Claudio Fernandes da Luz e Herbene Nonato dos Santos Luz, nasceu em 8 de dezembro de 1988, em Vitória da Conquista, Bahia.

Em julho de 2006, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, finalizando em outubro de 2011.

Em março de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia do Programa de Pós-graduação em Zootecnia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, finalizando em março de 2014.

Em março de 2014, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia do Programa de Pós-graduação em Zootecnia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
I - REFERENCIAL TEÓRICO	1
1.1 Introdução	1
1.2 Aditivos na Nutrição de Ruminantes	4
1.3 Probióticos na nutrição de ruminantes.....	5
1.4 Leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	6
1.5 Influência da inclusão dietética de cepas vivas de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no rúmen	7
1.6 Efeito da inclusão de leveduras na dieta sobre a digestibilidade da Fibra.....	8
1.7 Referências.....	9
II – OBJETIVO GERAL	16
III - CAPÍTULO I - ADIÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO NA DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE SUBSTRATOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSOS	17
Resumo	17
Abstract.....	18
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados e Discussão.....	24
Conclusões.....	32
Referências.....	33
IV - CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO E DEGRADABILIDADE RUMINAL <i>IN VITRO</i> EM SUBSTRATOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSOS COM OU SEM ADIÇÃO DE LEVEDURA.....	36

Resumo	36
Abstract.....	37
Introdução	38
Material e Métodos	39
Resultados e Discussão.....	44
Conclusões	51
Referências.....	52
V - CONSIDERAÇÕES FINAIS	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS de dietas com diferentes proporções de volumoso com a inclusão de níveis crescentes de três cepas de leveduras (LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45).....	27
FIGURA 2 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da FDN de dietas com diferentes proporções de volumoso com a inclusão de níveis crescentes de três cepas de leveduras (LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45).....	30

LISTA DETABELAS

	Página
TABELA 1. Proporção dos ingredientes (% de matéria seca) e composição nutricional das dietas experimentais.	22
TABELA 2. Valores médios das digestibilidades <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) das dietas em função dos níveis de inclusão das cepas LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45. 24	24
TABELA 3. Valores médios das digestibilidades <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das dietas em função dos níveis de inclusão das cepas LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45.	28
TABELA 4. Proporção dos ingredientes (% de matéria seca) e composição nutricional das dietas experimentais.	41
TABELA 5. Produções cumulativas de gases (PCG), degradabilidade aparente da MS (DAMS) e degradabilidades verdadeiras da MS (DVMS), das dietas com níveis de volumoso com ou sem adição de levedura (LBCM 45).	44
TABELA 6. Estimativas dos parâmetros cinéticos da produção de gases <i>in vitro</i> da matéria seca (MS) das dietas com níveis de volumoso com e sem leveduras (LBCM 45).	46
TABELA 7. Valores médios de biomassa microbiana (BIO), eficiência de produção da biomassa microbiana (EPB), fator de partição (FP) e ácidos graxos voláteis (AGCC), das dietas com níveis de volumoso, com e sem levedura (LBCM 45).	47
TABELA 8. Estimativa dos parâmetros cinéticos da degradação aparente da matéria seca (MS) das dietas com níveis de volumoso com e sem leveduras (LBCM 45).	48
TABELA 9. Estimativa dos parâmetros cinéticos da degradação da fibra em detergente neutro (FDN) das dietas com níveis de volumoso com e sem leveduras (LBCM 45). ..	50

RESUMO

LUZ, Y.S. Avaliação *in vitro* de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para uso na dieta de ruminantes. Itapetinga-Ba: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, 2018. 56 p. (Tese - Doutorado em Zootecnia – Produção de Ruminantes)*.

Objetivou-se avaliar a adição de três cepas de leveduras sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo diferentes proporções de volumoso e concentrado, avaliando também o efeito da adição da cepa LBCM 45 de levedura sobre a cinética da fermentação e degradação ruminal *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo diferentes quantidades de volumoso e concentrado. O primeiro experimento foi conduzido utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, fazendo-se o uso de três cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (LBCM 13, 29 e 45), em cinco níveis de inclusão (0; 0,2; 0,4 e 0,6 g de MS/L). As cepas de leveduras foram comparadas em cinco diferentes relações de volumoso e concentrado, sendo as proporções de volumoso das dietas (100, 75, 50, 25 e 0%) determinadas na base da matéria seca. As digestibilidades foram mensuradas após 48 horas de fermentação. No segundo experimento utilizou-se também um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x5, com quatro repetições, correspondendo ao uso ou não de levedura nas dietas, com cinco proporções de concentrados em relação aos volumosos (base seca). Foi utilizada unicamente a cepa LBCM 45 (*Saccharomyces cerevisiae*), onde foi incluída 0,4g de MS/L e uma testemunha, ou seja, sem levedura adicionada ao meio. A levedura foi adicionada em cinco dietas, com relação de volumoso e concentrado decrescentes, sendo as proporções de volumoso das dietas (100, 75, 50, 25 e 0%) determinadas na base da matéria seca. Para a DIVMS e DIVFDN foram encontrados os pontos de máxima das equações próximos à dose de 0,32 g de MS/L para todas as dietas avaliadas ao se utilizar a cepa LBCM 45, sendo esta superior ($P < 0,05$) as demais para a DIVMS. Já a cepa LBCM 29 apresentou resultados semelhantes ($P > 0,05$) a cepa LBCM 45 para a DIVFDN com o mesmo nível de inclusão de 0,4 g de MS/L, menos para a dieta 100% volumoso. A inclusão de 0,4 g de MS/L da cepa LBCM 45 promoveu aumento

($P < 0,05$) dos gases provenientes dos carboidratos não fibrosos e da produção total de gases das dietas avaliadas, elevando ($P < 0,05$) estimativa da produção dos ácidos graxos de cadeia curta. Para a degradação aparente da MS a inclusão da levedura aumentou ($P < 0,05$) a taxa de degradação e a degradabilidade efetiva das dietas, menos ($P > 0,05$) para a dieta 100% volumoso e, para degradabilidade da FDN, promoveu redução ($P < 0,05$) do tempo de colonização e elevou ($P < 0,05$) a degradabilidade efetiva para todas as dietas avaliadas, sem alterar ($P > 0,05$) a degradabilidade potencial das dietas. Conclui-se que o nível de inclusão de 0,4 g de MS/L da cepa LBCM 45 promove melhora das condições ruminais *in vitro* para as dietas avaliadas, demonstrando seu potencial para modificar favoravelmente o ambiente ruminal.

Palavras-chave: aditivo, modulação ruminal, prebiótico, probiótico.

*Orientador: Mauro Pereira de Figueiredo, Dr. UESB; e Co-orientador: José Augusto Gomes Azevêdo, Dr, UESC.

ABSTRACT

LUZ, Y.S. Inclusion of strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from stills in diets for ruminants. Itapetinga-Ba: State University of Southwest Bahia - UESB, 2018. 56 p. (Thesis–Doctorate in Animal Science - Ruminant Production)*.

The objective of this study was to evaluate the addition of three yeast strains on the *in vitro* digestibility of dry matter (IVDMD) and neutral detergent fiber (IVDADF) in diets containing different roughages concentrate ratios and to evaluate the effect of addition of LBCM strain 45 of yeast on fermentation kinetics and *in vitro* ruminal degradation of dry matter (IVDMD) and neutral detergent fiber (IVDADF). In the first experiment a completely randomized design, in a 3x4 factorial scheme, using three yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* (LBCM 13, 29 and 45), in five inclusion levels (0; 0.2 , 0.4 and 0.6 g MS / L) was used. Yeast strains were compared in five different roughage and concentrate ratios, with the proportions of roughage of the diets (100, 75, 50, 25 and 0%) determined on dry matter basis. The digestibilities were measured after 48 hours of fermentation. In the second experiment a completely randomized design (DIC) was again used, in a 2x5 factorial scheme, with four replicates, corresponding to the use or not of yeast in the diets, with five proportions of concentrates in relation to roughages (dry basis). LBCM strain 45 (*Saccharomyces cerevisiae*) was solely used, where 0.4 g of DM/L and one control, i.e., no yeast added to the medium, were included. The yeast was added in five diets, with decreasing roughages and concentrated ratios, with the proportions of diets (100, 75, 50, 25 and 0%) determined on the basis of the dry matter. For dry matter and fiber digestibilities, the maximum points of the equations were close to the dose of 0.32 g of DM/L and found for all diets evaluated. When the LBCM strain 45 was used, which was higher ($P<0.05$) than the others for IVDMD. LBCM 29 strain showed similar results ($P>0.05$) as LBCM 45 strain for the DIVFDN with the same inclusion level of 0.4 g DM/L, excluding 100% roughage diet. The addition of 0,4 g of DM/L of the LBCM 45 strain increased ($P<0.05$) gases from the non-fibrous carbohydrates and of the total gas production of the evaluated diets, also increasing ($P<0.05$) short chain fatty acids. For the apparent degradation of DM the inclusion of

yeast increased ($P < 0.05$) the rate of degradation and the effective degradability of the diets, except ($P > 0.05$) for the 100% roughage diet. For NDF degradability LBCM 45 promoted reduction ($P < 0.05$) the effective degradability for all diets evaluated, without altering ($P > 0.05$) the potential degradability of the diets. It is concluded that the inclusion level of 0.4 g DM/L of the LBCM 45 strain promotes an improvement of the *in vitro* ruminal conditions for evaluated diets, demonstrating its potential to favorably change the ruminal environment.

Keywords: additive, ruminal modulation, prebiotic, probiotic

*Adviser: Mauro Pereira de Figueiredo, Dr. UESB and Co-adviser: José Augusto Gomes de Azevêdo, Dr, UESC.

I - REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Introdução

A falta de forragem em quantidade e qualidade adequada, ainda é um problema afeito à alimentação dos rebanhos estando presente na realidade vivenciada por pequenos produtores em extensas regiões brasileiras.

Durante a estação seca do ano, as forragens normalmente disponíveis aos animais são de baixa qualidade. Estas apresentam alto teor de fibra e baixo teor de proteína bruta, influenciando negativamente o consumo de matéria seca, consumo de nutrientes, digestibilidade e taxa de passagem da digesta.

Uma alternativa para melhorar a disponibilidade de nutrientes, ingestão de matéria seca e a atividade microbiana do rúmen são os suplementos, associados ou não ao uso das células microbianas nas dietas dos animais (Ghazanfar et al., 2017).

Os microrganismos podem substituir parcialmente os suplementos proteicos, pois se constituem de uma fonte proteica unicelular de rápido crescimento e podendo ser cultivadas em diversos substratos (Araújo, 2005). Além da contribuição como nutriente propriamente dito, estudos têm mostrado que a adição de culturas de leveduras vivas, como probióticos em dietas de ruminantes, tem se mostrado benefício para o animal (Suarez & Guevara, 2018).

Nesta linha, além de participar da produção de álcool e da aguardente, as leveduras também têm sido usadas como probióticos na alimentação de ruminantes. As leveduras, presentes na nutrição humana e animal, destacam-se entre os organismos processadores de açúcares para a produção de proteínas, pela alta eficiência na conversão, sendo reconhecidas como proteína unicelular (Araújo, 2008).

O processo de fermentação alcoólica realizado para a fabricação da cachaça ou do etanol consiste em um processo biológico, onde ocorre a transformação de açúcares em álcool etílico e gás carbônico. Este processo ocorre através da ação de grupos de microrganismos unicelulares, que são denominadas leveduras. As cepas mais utilizadas na fabricação de álcool e na produção da cachaça são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Cardoso, 1999; Nova et al., 2009; Silva, 2007).

A proteína unicelular pode ser produzida pelo crescimento de muitas espécies de diferentes de fungos, algas, leveduras e bactérias (Chacón, 2004). Para ruminantes, a utilização de leveduras vivas, como probióticos ou fonte proteica unicelular comprovadamente modificam favoravelmente o processo de fermentação ruminal, estabilizando o pH do rúmen e aumentando a digestibilidade das frações fibrosas das forragens (Guedes et al., 2008; Marden et al., 2008; Robinson, 2010).

Neste contexto grupos de pesquisa tem se mobilizado para selecionar cepas de leveduras que proporcionem melhorias no ambiente ruminal. Como exemplo de Marrero et al. (2013) e Ghazanfar et al. (2017), sendo que estas estão sendo isoladas a partir do rúmen ou fezes de animais e estes são alimentados com produtos biofermentados, com o intuito de se selecionar cepas resistentes ao trato gastrointestinal.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes do ambiente de produção de cachaça se caracterizam por apresentar alta resistência a ambientes hostis, visto que em alguns alambiques a condições locais promovem uma grande seleção de microrganismos (cepas) resistentes a baixas faixas de pH, temperaturas elevadas (>35°C) e alta competição entre microrganismo (Araújo, 2013).

Neste particular, leveduras isoladas em condições ambientais desfavoráveis podem apresentar características importantes que as habilitarão a uma maior sobrevivência no ambiente ruminal.

Em adição, a proteína caracteriza-se por ser o principal nutriente limitante nos sistemas de produção de bovinos a pasto durante a estação seca do ano. A suplementação com alimentos concentrados proteicos onera os custos de produção no semiconfinamento e no confinamento de animais mantidos a pasto. Some-se a isso o fato de que o aumento do rebanho bovino terminado a pasto nos últimos anos tem incrementado a demanda por alimentos concentrados proteicos, cuja fonte principal é o farelo de soja, com elevada utilização também na dieta de monogástricos. Em decorrência, a elevação da demanda por fontes proteicas de concentrados tem se refletido na elevação do seu valor de mercado nos últimos anos.

Devido aos altos custos dos suplementos proteicos de origem vegetal, utilizados como principais componentes dos concentrados, novas alternativas não convencionais passaram a ser exploradas nos últimos anos (Campos et al., 2014), onde a utilização de leveduras do gênero *Saccharomyces spp.* tem se destacado para este fim (Araújo et al. 2009).

A contribuição das leveduras, que são organismos unicelulares, não se restringe apenas à contribuição proteica das suas células na dieta dos ruminantes, mas também aos efeitos resultantes do seu processo metabólico. As culturas vivas de determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas como probióticos, aumentam a digestibilidade de parâmetros como matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro, indicando que podem favorecer o aproveitamento do alimento pelos ruminantes (Bonato et al., 2015).

O uso de leveduras vivas na nutrição de bovinos apresenta resultados variados, mas com trabalhos indicando resultados favoráveis com relação a todos os efeitos ruminais, como digestão dos nutrientes, redução da concentração de amônia, aumento da digestão da matéria seca, na produção (leite e ganho de peso) e composição do leite (Bonato et al., 2015).

Existindo diferenças entre leveduras vivas e levedura autoclavadas *in vitro*, sendo que ambas estimulam o processo de fermentação ruminal *in vitro*, mas o efeito mais pronunciado foi obtido com leveduras vivas (Oeztuerk, 2009).

Diferentes espécies ou diferentes cepas de leveduras, bem com a dosagem usada influenciam a resposta fisiológica, podendo ter uma influência de maior ou menor magnitude na produtividade animal na dependência destas. Por outro lado, embora sejam reconhecidas as importâncias do estudo de novas cepas a serem usadas como probióticos, suas dosagens e interações em dietas de diferentes naturezas, a seleção de microrganismos para serem usados como aditivos ainda é um processo complexo que exige a mensuração de diversos parâmetros referenciais para o processo digestivo nos ruminantes, sob diferentes condições (Enjalbert et al., 1999; Newbold 1996).

Tem sido demonstrado que as cepas de algumas espécies foram capazes de produzir altos níveis de biomassa de leveduras, usando melaço como fonte de carbono e energia no processo de fermentação (Sánchez et al., 2007), possibilitando assim grandes avanços na obtenção de células em larga escala com baixo custo de produção.

Novas investigações devem proporcionar oportunidades para projetar dietas ajustadas para proporcionar respostas positivas no desempenho animal com o uso de cepas específicas de levedura vivas como probióticos (De Ondarza et al., 2011).

É importante ressaltar que os resultados variados envolvendo o uso de leveduras estão intimamente ligados a cepa e sua interação com a dieta que foi fornecida aos animais (Chung et al., 2011). Trabalhos com suplementação a pasto apresentam dados conflitantes a respeito da eficácia da utilização de leveduras. Martins (2013) apresenta resultado

favorável a utilização de suplemento contendo 5 gramas de levedura ativa (Yea-Sacc®) no período de transição secas-águas trabalhando com novilhas nelores, com potencialização do efeito da suplementação. Já Carvalho (2014) não encontrou esse efeito para novilhas nelores no período da seca, utilizando a mesma quantidade da mesma levedura.

Neste contexto, é importante se avaliar as cepas de leveduras e sua interação com as fontes dietéticas para se identificar cepas superiores que interagem mais favoravelmente com determinadas dietas, melhorando o desempenho animal ou a utilização da levedura como fonte proteica nas dietas de ruminantes visando redução dos custos da dieta.

1.2 Aditivos na Nutrição de Ruminantes

Na nutrição de ruminantes tem-se intensificado a busca de aditivos que aceleram ou melhoram a eficiência de utilização dos nutrientes da dieta, ou seja, que potencializam o metabolismo melhorando a conversão alimentar e/ou o desempenho animal.

O uso de aditivos contendo células vivas de microrganismos tem aumentado, em resposta à demanda para o uso de substâncias naturais, promotoras do crescimento que melhoram a eficiência da produção em ruminantes.

Aditivos, pelo “Decreto 76.986 de 06 de janeiro de 1976”, são: “Substâncias intencionalmente adicionada ao alimento, com finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo, como os antibióticos, corantes, conservantes, antioxidantes, leveduras e outros” (Brasil, 2009).

Aditivos em dietas para ruminantes têm sido usados visando melhorar a relação simbiótica entre os microrganismos presentes no rúmen e seu hospedeiro (Franzolin et al., 2004). Os primeiros relatos da utilização de culturas de leveduras como aditivo em dietas de bovinos datam da primeira metade do século passado.

A utilização de leveduras vivas como aditivo microbiano para alimentação animal é atualmente bem aceito e amplamente utilizada, especialmente desde que alguns deles foram reconhecidos oficialmente como aditivos alimentares na Europa.

As leveduras são utilizadas como ferramenta biotecnológica em vários setores industriais, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* tradicionalmente utilizada na fermentação de carboidratos e a mais utilizada como aditivo em suplementos para animais (Martin & Nisbet, 1992).

Entre os aditivos existentes no mercado, destacam-se as culturas de leveduras, que possuem características que atendem às exigências internacionais. (Gattaset al., 2008).

1.3 Probióticos na nutrição de ruminantes

Em algumas citações na literatura, tem sido observado o uso do termo "Direct-Fed Microbial" (DFM) em lugar do termo probiótico. O termo DFM é definido pelo FDA (Foods and Drugs Administration) americano como "fonte natural de microrganismos viáveis".

O grupo DFMs pode ser constituído por leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias probióticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidume* dentre outras.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, através da instrução normativa nº13, define os probióticos como sendo cepas de microrganismos vivos e viáveis, que agem como auxiliares na recomposição da flora microbiana do trato digestivo dos animais, diminuindo o número dos microrganismos patogênicos ou indesejáveis (Brasil, 2009).

Vários são os microrganismos probióticos permitidos na nutrição animal, os principais são os *Bacillus cereus*, *Bacillus cereustoyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus farciminis*, *Pediococcus acidilacticie*, *Sacharomyces cerevisiae* entre outros (Sainz, 2010).

A capacidade de atuar como probiótico dependerá do uso contínuo e do fornecimento de quantidade suficiente de células vivas (Yirga, 2015).

Um dos mecanismos de ação dos probióticos está relacionado com a exclusão competitiva, onde o probiótico irá competir com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação de forma passageira (Cross, 2002).

Em adição, efeitos imunoestimuladores dos probióticos já foram relatados em animais (Coppola & Turnes, 2004).

Segundo Arcuri et al. (2006), os prováveis mecanismos de ação dos probióticos no ambiente ruminal são: aumento no número de bactérias ruminais, maior condição de anaerobiose do rúmen, maior estabilização no pH ruminal e na melhoria da digestibilidade da fibra.

1.4 Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

São fungos unicelulares eucariontes, possuem núcleo organizado, são heterotróficos, aclorofilados, pertencentes ao Reino Protista, seu crescimento ocorre para a faixa de temperatura oscilando de 25° a 30 ° C (Tortora, 2000).

Estes fungos unicelulares vivem tanto na presença como na ausência de oxigênio, reproduzindo-se quando o meio é rico em oxigênio (Costa, 2004).

As leveduras constituem-se no principal grupo de microorganismos eucariotos utilizados pelo homem por meio de produtos naturais, bebidas e alimentos elaborados por processos fermentativos (Costa, 2004).

As leveduras apresentam formato oval, podendo apresentar também formas arredondadas ou elípticas, dependendo da maneira da reprodução vegetativa, bem como das condições de cultivo e idade da cultura. Suas células são elípticas, medindo entre 3 a 8 μ m de comprimento entre 5-10 μ m de largura (Carvalho et al., 2006).

As principais estruturas da célula de levedura são: parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, vacúolos e mitocôndria. A membrana citoplasmática apresenta permeabilidade seletiva, regulando a entrada e saída de materiais da célula (Rheinboldt, 1987).

Elas têm alta taxa de reprodução, podendo reproduzir-se sexuadamente, formando esporos, ou por reprodução assexuada, envolvendo brotamento, gemulação ou fissão binária (Lodder, 1971).

As leveduras são microrganismos muito utilizados na indústria alimentícia, desempenhando um papel muito importante na produção de alimentos e bebidas alcoólicas (Hierro et al., 2004; Mayoral et al., 2005). Pode também ser caracterizada como um subproduto quando obtida no processo de fermentação alcoólica da cana-de-açúcar, podendo ter importância significativa na alimentação de ruminantes por apresentar elevados teores de proteína de alto valor biológico.

Dependendo das cepas utilizadas no processo de fermentação e das técnicas de extração, é possível a obtenção de levedura com aproximadamente 40% de a proteína bruta (PB) na MS, conforme determinado por Martins et al. (2000) e Valadares filho et al. (2010) que relataram resultados analíticos para PB deste produto é de cerca de até 41%.

As formas de obtenção das leveduras nas usinas para a fabricação de álcool de cana-de-açúcar normalmente são realizadas por meio do sistema Melle-Boinot, (Almeida, 1960). Neste, uma pequena quantidade de leveduras ativa é adicionada a uma mistura de

caldo-de-açúcar e melado, o que é fermentado, transformando açúcar em etanol. Em seguida, o fermento (o mosto) é centrifugado, separando-se o creme de levedura viva do vinho.

A partir do leite ou creme de leveduras pode ser feita uma sangria, ou seja, um desvio de pequeno volume para originar um concentrado microbiano útil à complementação em ração animal.

Apesar de não se reproduzirem no ambiente ruminal, as leveduras possuem atividade metabólica no rúmen e mantêm sua viabilidade por algum tempo (Newbold & Wallace; 1996).

A limitada reprodução deste microrganismo dentro do rúmen, sugere que o crescimento de *S. cerevisiae* no fluido ruminal seja improvável, fazendo-se necessária a introdução constante com a dieta ingerida. (Chaucheyras-duran et al., 1998).

1.5 Influência da inclusão dietética de cepas vivas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* no rúmen

O estudo sobre o modo de ação das leveduras vivas como aditivos suplementares para ruminantes é bastante amplo e muitos são os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos da sua adição à dieta de ruminantes sobre a melhora do desempenho animal (Santos & Greco, 2012).

Para Kmet et al., (1993), as leveduras têm uma ação diferenciada dos outros probióticos, podendo estimular direta e indiretamente processos microbianos de degradação e fermentação no rúmen, ceco e cólon de animais adultos.

De acordo com Martin & Streeter (1995), o efeito da *S. cerevisiae* pode operar sobre o ambiente ruminal favorecendo a utilização do ácido lático pelas bactérias consumidoras de ácido lático, estabilizando o pH ruminal e prevenindo a acidose.

Os principais efeitos das leveduras na alimentação de ruminantes são, da aceleração do processo de maturidade do rúmen como câmara de fermentação pelo favorecimento do estabelecimento microbiano, estabilização do pH ruminal e interações com bactérias que degradam a parede celular das plantas e metabolizadoras de lactato (Chaucheyras-durand et al., 2008).

As alterações associadas à utilização das leveduras incluem também o aumento da concentração de ácidos graxos voláteis e proporção molar de propionato, decréscimo da concentração de ácido lático no líquido ruminal e menor variação pós-refeições no pH e amônia ruminal (Morais et al., 2011).

Assim, o pH do rúmen torna-se mais estável, a metanogênese e a proporção de ácidos graxos voláteis são alteradas, conseqüentemente, a concentração de ácido láctico diminui, conforme (Martin & Nisbet, 1992).

Sugere-se também que a suplementação com leveduras forneça no rúmen fatores de crescimento solúveis, como ácidos orgânicos, vitamina B e aminoácidos que são exigidos por certos grupos de microrganismos (Rossi et al., 2004).

Alguns estudos têm sugerido que a remoção do O₂ presente no ambiente ruminal e a atividade respiratória das leveduras, poderia estimular o crescimento de bactérias estritamente anaeróbicas, principalmente celulolíticas (Wallace & Newbold, 2007). Segundo Rose (1987), as leveduras podem consumir O₂ ruminal e, assim, estimular o crescimento de bactérias anaeróbicas.

Tripathi et al. (2010) relatam também um outro efeito da utilização de cepas de *S. cerevisiae* na fermentação ruminal, relatando que esta cepa pode ser eficiente para a estabilização do pH ruminal por estimular os protozoários ciliados entodiniomorfos, que são capazes de consumir lactato e são conhecidos também por digerir grânulos de amido muito rapidamente e, assim, competir eficazmente com as bactérias amilolíticas por esse substrato.

Os efeitos das leveduras vivas no ambiente ruminal, bem como o desempenho dos animais, ainda não estão totalmente elucidados, contudo, com o aumento dos experimentos utilizando leveduras como aditivos na dieta de ruminantes, poderá definir em que condições de dieta esses aditivos devem ser inseridos de forma a beneficiar o desempenho animal (Morais et al., 2011).

1.6 Efeito da inclusão de leveduras na dieta sobre a digestibilidade da Fibra

As leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, são fungos que desempenham um papel fundamental na digestão de fibras, pois estão envolvidas no incremento da colonização por fungos na parede celular vegetal das partículas do alimento, facilitando o acesso das bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas às frações menos lignificadas (Chaucheyras-durand et al., 2010).

Além disso, as leveduras utilizam o oxigênio residual, tempo (Newbold et al., 1996), estabilizam o pH ruminal, (Dawson, 1992) e proporcionam condições ideais para o desenvolvimento da microflora fibrolítica (Guedes et al., 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado efeitos benéficos de leveduras associados ao aumento na digestibilidade da matéria seca e da FDN (Plata et al., 1994). Tem sido

sugerido que leveduras favorecem o aumento no número total de bactérias ruminais e de populações celulolíticas, e que este seria um dos mecanismos capazes de induzir ganhos na digestão da fibra (Wallace, 1994). No entanto, Bitencourt et al. (2011) observaram que a digestibilidade aparente da fibra, tendeu a ser maior nas dietas com levedura, mas não detectaram alteração no valor de pH ruminal.

Callaway e Martin (1997) sugerem que a utilização da levedura pode atuar sobre o tempo necessário para colonização microbiana da fibra. Resultado de uma meta-análise sugere que o uso mais efetivo das leveduras ocorra em dietas de baixa fibra e alto amido, situação onde a produção da enzima celulase encontra-se deprimida pela diminuição da população de bactérias celulolíticas (Williams et al., 1991).

No entanto, resultados mais recentes de uma meta-análise sugerem que a suplementação com levedura teria um efeito sobre a digestibilidade da matéria orgânica quando a FDN foi aumentada nas dietas (Desnoyers et al., 2009).

1.7 Referências

ALMEIDA, J.R. **Curso sobre fermentação alcoólica**. Piracicaba: ESALQ, Instituto Zootécnico, 1960, v.2, p254-260

ARAÚJO, L.F.; CARNEIRO, M.V.D.; BRITO, O.J.S. Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnologia & ciência agropecuária**, v. 3, p. 47-53, 2009.

ARAÚJO, L.F.; MEDEIROS, A.N.; NETO, A.P.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H. Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 161-168, 2005.

ARAÚJO, L.F.; SILVA, F.L.H.; BRITO, E.A.; JÚNIOR, S.O.; SANTOS, E.S. Enriquecimento proteico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p. 401-407, 2008.

ARAÚJO, T. M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

ARCURI, P.B.; CAMPOS, O.F.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Utilização de Probióticos e Prebióticos em rações de bovinos. IN: **VIII Simpósio sobre Nutrição de Bovinos**, FEALQ, 2006.

BITENCOURT, L. L.; SILVA, J. R. M., OLIVEIRA, B. M. L. D., DIAS JÚNIOR, G. S., LOPES, F., SIÉCOLA JÚNIOR, S., ZACARONI, O.F., PEREIRA, M.N. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 301-307, 2011.

BONATO, D.V.; NEUMANN, M.; UENO, R.K.; HEKER JUNIOR, J.C.; HORST, E.H.; CARNEIRO, M. K.; POCZYNEK, M.; RUTHS, R.; FIGUEIRA, D.N.; TEIXEIRA, P.P.M. Uso de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta de bovinos. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n.1, p. 1-7, 2015.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by eritrosine B. staining. **Analytical Biochemistry**, Maryland Heights, v. 193, n. 2, p. 225-230, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 15, de 26 de maio de 2009. **Regulamento técnico que dispõe acerca dos procedimentos para registro de estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 mai. 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 09 fev. 2016.

BUTOLO, J.E. (Ed.). **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: CBNA, p. 93-237, 2002.

CALLAWAY, E.S.; MARTIN, S.A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 9, p. 2035-2044, Feb. 1997.

CAMPOS, A. F.; Pereira, O.G.; RIBEIRO, K. G.; SANTOS, S. A.; Valadares Filho, S.C. Impact of replacing soybean meal in beef cattle diets with inactive dry yeast, a sugarcane by-product of ethanol distilleries and sugar mills. **Animal Feed Science and Technology**, v. 190, p. 38-46, 2014.

CARDOSO, M. G.; CAMPOS, G. A., SILVA, R. A., SANTOS, C. D., PINTO, A. P. S., SILVA, C. F. **Cachaça: Qualidade e Produção**. 1999. Disponível em http://www.Editora.UFLA.Br/BolExtensao/pdfBE/bol_07.pdf acessado em: 23 de janeiro.2015.

CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. **Revista Analytica**, n.25, out./nov., 2006.

CARVALHO, V.V. **Estratégias de suplementação para novilhas de corte em pastejo no período da seca**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2014. 55p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2014.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influência do tempo de incubação e tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em

alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimento in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.

CHACÓN, A. Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. **Agronomía Mesoamericana**, v. 15, n. 1, 2004.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; AMEILBONNE, A.; WALKER, N.D.; MOSONI, P.; FORANO, E. Effect of a live yeast, *Saccharomyces cerevisiae* I-1077 on in situ ruminal degradation of alfalfa hay and fibre-associated microorganisms. **Journal of Animal Science**, v.88, (E-Suppl. 2) p.145, 2010.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**.V.145, n.1, p.5-26. 2008.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; THEVENIOT, M.; GOUET, P. Fate of Levucell® SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. **Reproduction Nutrition Review**, London, v. 38, p. 275-280, Mar. 1998.

CHUNG, Y.H., WALKER, N. D., MCGINN, S. M., BEAUCHEMIN, K. A. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2431–2439, 2011.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1297-303, 2004.

COSTA, L. F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, nº1, p.01-06, 2004.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253, 2002.

DAWSON, K.A. Current and Future Role of Yeast Culture in Animal Production: A Review of Research Over the Last Six Years. **Biotechnology in the Feed Industry**, (Sup.), p.1-23, 1992.

DE ONDARZA, M.B., SNIFFEN, C.J., DUSSERT, L., CHEVAUX, E., SULLIVAN, J. Live yeast aids rumen function, milk yield. **Feedstuffs**. 83:24, 2011.

DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G.; DUVAUX-PONTER, C.; & SAUVANT, D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1620-1632, Apr. 2009.

ENJALBERT, F., GARRETT, J.E., MONCOULON, R., BAYOURTHE, C., CHICOTEAU, P. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal

digestion in non-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. 76:195, 1999.

FRANZOLIN, R.; COSTA, F.A.A.; FERNANDES, L.B. Avaliação do uso de aditivos em dietas de bovinos zebuínos. In. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. (CDROM).

GATTASS C.B.A.; DA GRAÇA MORAIS, M., DE ABREU, U. G. P., LEMPP, B., STEIN, J., ALBERTINI, T. Z., FRANCO, G. L. Consumo, digestibilidade aparente e ganho de peso em bovinos de corte confinados e suplementados com cultura de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026). **Ciência Animal Brasileira**. 9(3): 535-542. 2008

GHAZANFAR, S., KHALID, N., AHMED, I., IMRAN, M. Probiotic Yeast: Mode of Action and Its Effects on Ruminant Nutrition. In: **Yeast-Industrial Applications**. InTech, 2017

GUEDES C.M. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. **Animal Feed Science and Technology**. 145(1): 27-40. 2008.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.792-801, 2004.

KMET, V.; FLINT, J.; WALLACE, R.J. Probiotics and manipulation of rumen development and function. **Archives of Animal Nutrition**, v.44, n.1, p.1-10, 1993.

LODDER, J. 1971. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 1385p.

MARDEN, J.P., JULIEN, C., MONTEILS, V., AUCLAIR, E., MONCOULON, R., BAYOURTHE, C. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 91, 3528–3535, 2008.

MARRERO, Y. BURROLA-BARRAZA, M.E., CASTILLO, Y., BASSO, L.C., ROSA, C. A., RUIZ, O., & GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, E. Identification of Levica yeasts as a potential ruminal microbial additive. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, n. 58, p. 460-469, 2013.

MARTIN, S.A.; NISBET, D.J. Effect of direct-fed microbial on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

MARTIN, S. A.; STREETER, M. N. Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 2141-2145, 1995.

MARTINS, A. S.; PRADO, I. N.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; NASCIMENTO, W. G. Digestibilidade aparente de dietas contendo milho ou casca de mandioca como

fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica em novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.1, p.269-277, 2000.

MARTINS, L.S. **Desempenho de novilhas de corte super precoces suplementadas a pasto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 113p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.

MAYORAL, M.B.; MARTÍN, R.; SANZ, A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.27-34, 2005.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T. REIS, R. A. **Aditivos**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de ruminantes. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 580-616

NEWBOLD, C.J., MCINTOSH, F.M., WALLACE RJ. Mode of action of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**. 76:249, 1996.

NOVA, M. X. V.; SCHULER, A. R. P.; BRASILEIRO B. T. R. V.; MORAIS-JUNIOR, M. A. M. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009.

OEZTUERK H. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation *in vitro*. **Journal of Animal and Feed Sciences**, 18, 142–150, 2009.

PLATA, F.; BÁRCENA-GAMA, J.R. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.49, p.203-210, 1994.

ROBINSON, P. H. Yeast Products for Growing and Lactating Ruminants: A Literature Summary of Impacts on Rumen Fermentation and Performance. **Cooperative Extension Specialist Department of Animal Science, University of California, Davis, CA**, v. 95616, 2010.

RHEINBOLDT, R. H. H.; LEIMER, K. H.; ROSSELL, C. E. V. Sangria e secagem de levedura - Processo CTC, São Paulo: COPERSUCAR. **Boletim Técnico**, p.12, 1987.

ROSE, A. H. **Yeast culture, a microorganism for all species: theoretical look at its mode of action**. In: LYONS, T. P. (Ed.). Biotechnology in the feed industry. Nicholasville: Altech Technical, 1987. p. 113-118.

ROSSI, F.; DI LUCCIA, A., VINCENTI, D., COCCONCELLI, P. S. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. **Animal Research**, LesUlis, v. 53, n. 3, p. 177-186, May/June 2004.

SAINZ, R.D. **Nota técnica biofórmula tecnologia agropecuária Ltda.** Disponível em: < <http://www.slideshare.net/andreqcamargo/nota-tecnica-bio-formula-1007041>>. Acesso em: 18/06/2015.

SÁNCHEZ, M.I., SANTOS, A., DUSTET, J.C., GUERRA, G., LEÓN, T., ARGÜELLES, J., RAMOS-LEAL, M., MARGARITA, A., CASADO, G., GÓMEZ, B. Estudio fisiológico de una cepa de levadura con potencialidades para el enriquecimiento proteico del bagazo de caña de azúcar. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**. 38: 39. 2007.

SANTOS, J.E.P.; GRECO, L.F. Levedura viva e cultivo de leveduras em dietas de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM FORMULAÇÃO DE DIETAS PARA O GADO DE LEITE, 2012, Lavras. **Anais...** Lavras: Suprema Gráfica e Editora, 2012. p. 9-33.

SILVA, Juarez de Souza e (Ed.). **Produção de álcool combustível na fazenda e em sistema cooperativo.** Viçosa, 2007. Disponível em: http://www.ufv.br/poscolheita/Produ%C3%A7%C3%A3o_de_%C3%A1lcool_combust%C3%ADvel_index.htm. Acessado 13 Agosto de 2016.

SUAREZ, C.; GUEVARA, C.A. Probiotic Use of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* in Animal Feed. **Research Journal of Zoology**. 1:1. 2018

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

TRIPATHI, M.K.; KARIM, S.A. Effect of individual and mixed live yeast culture feeding on growth performance, nutrient utilization and microbial crude protein synthesis in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 155, p. 163-171, 2010.

VALADARES FILHO, S. C. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos: CQBAL 3.0.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 502 p.

WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, June 1994.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. **Microbial feed additives for ruminants.** [S.l.: s.n.], 2007. Disponível em: <http://www.old-herbornuniversity.de/literature/books/OHUni_book_8_article_9.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2015.

WILLIAMS, P. E. V. TAIT, C. A. G., INNES, G. M., & NEWBOLD, C. J. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n.7, p.3016-3026, Nov. 1991.

YIRGA, H. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. **Journal of Probiotics & Health**, v.3, n.2, 2015.

II – OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o potencial de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo probiótico para uso em dietas para ruminantes.

III - CAPÍTULO I

ADIÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO NA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE SUBSTRATOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSOS

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito da adição de três cepas de leveduras, sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, fazendo-se o uso de três cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (LBCM 13, 29 e 45), em quatro níveis de inclusão (0; 0,2; 0,4 e 0,6 g de MS/L). As cepas de leveduras foram comparadas em cinco diferentes relações de volumoso e concentrado, sendo as proporções de volumoso das dietas (100, 75, 50, 25 e 0%) determinadas na base da matéria seca. As digestibilidades foram mensuradas após 48 horas de fermentação. Para a DIVMS e DIVFDN foram encontrados os pontos de máxima das equações próximos à dose de 0,4 g de MS/L para todas as dietas avaliadas ao se utilizar a cepa LBCM 45, sendo está superior ($P < 0,05$) as demais para a DIVMS. Já a cepa LBCM 29 apresentou resultados semelhantes ($P > 0,05$) a cepa LBCM 45 para a DIVFDN com o mesmo nível de inclusão de 0,4 g de MS/L, menos para a dieta 100% volumoso. Conclui-se que os melhores resultados para a DIVMS e DIVFDN foram na dose de 0,4 g de MS/L para todas as dietas avaliadas. Recomenda-se o nível de inclusão de 0,4 g de MS/L da cepa LBCM 45, por apresentar os melhores resultados de digestibilidade *in vitro* tanto para matéria seca e fibra em detergente neutro.

Palavras-chave: aditivo, modulação ruminal, probiótico.

BRAZILIAN SEMIARID YEAST STRAINS INCLUSION ON *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF SUBSTRATES WITH DIFFERENT ROUGHAGES PROPORTIONS

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of three strains inclusion on *in vitro* dry matter (IVDMD) and neutral detergent fiber (IVDADF) digestibilities of diets containing different roughages concentrate ratios. A completely randomized design was used in a 3x4 factorial scheme, using three yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* (LBCM 13, 29 and 45), in four inclusion levels (0; 0.2; 0.4 and 0.6 g of DM/L). Yeast strains were compared in five different roughage and concentrate ratios, with the proportions of roughage of the diets (100, 75, 50, 25 and 0%) determined on dry matter basis. The digestibilities were measured after 48 hours of fermentation. For IVDMD and IVDADF, the maximum points of the equations close to the dose 0,4 g of DM/L were found for all diets evaluated when the LBCM 45 strain was used, which was higher ($P<0.05$) the others for the IVDMD. The LBCM 29 strain showed similar results ($P>0.05$) as LBCM 45 strain for the IVDADF with the same inclusion level of 0.4 g DM/L, except for the 100% roughage diet. It is concluded that the best results for the IVDMD and IVDADF were at the dose of 0.4 g of DM/L for all diets evaluated. The level of inclusion of 0.4 g of DM/L of the LBCM45 strain is recommended, because it revealed the best *in vitro* digestibility results for both dry matter and neutral detergent fiber.

Keywords: additive, ruminal modulation, probiotic.

INTRODUÇÃO

O uso de culturas vivas de determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas como probióticos nas dietas para ruminantes pode contribuir para o aumento da digestibilidade de parâmetros como matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro, indicando que elas podem favorecer o aproveitamento dos alimentos, atuando diretamente no ambiente ruminal ou mesmo no intestino delgado de ruminantes (Bonato et al., 2015).

A literatura sobre o tema comprova que as leveduras são capazes de influenciar positivamente os resultados dos parâmetros nutricionais relacionados à digestão, a redução da concentração de amônia no rúmen, e a elevação do desempenho animal para o ganho de peso, produção e composição do leite (Bonato et al., 2015; Rossow et al., 2017).

Entretanto, a utilização destes fungos unicelulares na nutrição de bovinos tem também apresentado resultados inconsistentes, nos quais o efeito probiótico destas não se evidencia significativamente.

Boa parte da ineficácia dos resultados envolvendo o uso de leveduras como aditivos microbianos está relacionado às cepas utilizadas e sua interação com a dieta justificando a necessidade de pesquisas que avaliem conjuntamente cepas, dietas e suas interações (Chung et al., 2011).

Nesta linha, o emprego de diferentes espécies de fungos, ou de cepas viáveis ou mortas de leveduras como probióticos, bem como as suas dosagens usadas nas dietas influenciam os resultados na produtividade animal, apontando para a necessidade de seleção de espécies e cepas que se mostrem mais adequadas à utilização nutricional como aditivo (Enjalbert et al., 1999; Newbold, 1996; Viera, 2016).

Portanto, novas investigações são necessárias para avaliar os efeitos suplementares de leveduras selecionadas quando fornecidas conjuntamente a dietas contendo diferentes proporções de volumosos e concentrados (Abrão et al., 2012; De Ondarza et al., 2011; Salvati, 2014).

Desse modo, objetivou-se avaliar o efeito de três cepas de leveduras sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado para ruminantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se este trabalho no Laboratório de Nutrição Animal – UESB, Campus de Vitória da Conquista/BA. Os procedimentos experimentais e o uso de animais portadores de cânulas ruminais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CEUA, protocolo n° 094/2015).

O experimento foi desenvolvido utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4 com quatro repetições, fazendo-se o uso de três cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, em quatro níveis de inclusão (0; 0,2; 0,4 e 0,6 g de MS/L). As cepas de leveduras foram comparadas em cinco diferentes relações de volumoso e concentrado, sendo as proporções de volumoso das dietas (100, 75, 50, 25 e 0%) determinadas na base da matéria seca. As culturas de leveduras utilizadas continham cepas vivas e viáveis de 3 cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) isoladas de alambiques para a produção artesanal de aguardente, pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal de Ouro Preto, nas localidades de Abaíra (BA), cepa LBCM 29, Araçuaí (MG), cepa LBCM 45; e Carinhanha (BA), cepa LBCM 13, com inóculos contendo $3,6 \times 10^{14}$; $6,4 \times 10^{14}$ e $2,7 \times 10^{13}$ unidades formadoras de colônia por grama(UFC/g) respectivamente. As leveduras utilizadas foram isoladas e selecionadas dentre inúmeros isolamentos de cepas diversas de leveduras nestas regiões, para utilização rotineira futura em alambiques de associações comunitárias de produtores rurais, objetivando uma maior padronização na produção de bebidas destiladas e pré-selecionadas para a produção de cerveja, sendo estas classificadas em três grupos distintos (Araújo, 2013). O agrupamento das cepas, foi baseada nos testes de crescimento em baixas temperaturas (15 e 20°C), capacidade de fermentação de melobiose/secreção de melobiase, alta capacidade de floculação (>50%), altos índices de hidrofobicidade (>50%) e relação entre os resíduos de manose/glicose na parede celular (Araújo, 2013).

As três cepas de leveduras foram cultivadas no laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Vitória da Conquista, para multiplicá-las e usá-las nos ensaios. Para tanto, o cultivo das leveduras foi feito em frascos de plástico de 20 litros de capacidade. O meio utilizado foi composto de açúcar demerara, que se caracteriza por ser um açúcar granulado de coloração marrom clara, pois não sofre processo de branqueamento. O açúcar assim produzido apresenta um leve refinamento e não recebe aditivos químicos, apresentando valores nutricionais semelhantes ao açúcar

mascavo. Este açúcar foi diluído a uma concentração de 40 g/L em água destilada e acrescido de 0,25% de levedo de cerveja em pó.

O cultivo das leveduras foi executado sob aeração constante, permanecendo sob incubação por 24 horas, favorecendo assim a multiplicação das células. Após este período, o processo de cultivo foi interrompido, separando-se a massa de leveduras que se decanta naturalmente no período de incubação, da fase líquida superficial. Em seguida, os recipientes foram acondicionados a temperatura de 4°C, por 24 horas, para promover maior decantação, facilitando a separação da massa de leveduras.

Para obter-se as diferentes relações volumoso-concentrado descritas anteriormente nas sucessivas incubações *in vitro*, utilizou-se o volumoso silagem de milho. O concentrado foi composto pela mistura de grão de milho (85%) e farelo de soja (15%) (Tabelas 1).

As dietas foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 60°C, por 72 h. Em seguida, foram moídas em moinho de facas acoplado a uma peneira com crivos de 1 mm de diâmetro possibilitando a moagem do material para determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE), sendo quantificados de acordo com Detmann et al. (2012). Foram analisadas adicionalmente a fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método sequencial, conforme Detmann & Valadares Filho (2010).

A determinação da digestibilidade *in vitro* aparente da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) foi efetuada utilizando-se a técnica descrita por Goering e Van Soest (1970) adaptada a metodologia do rúmen artificial desenvolvido pela ANKON[®] (Ankom technology, 2010), utilizando a incubadora TE-150 (TECNAL).

Foram pesados 0,5 g de amostra seca das diferentes dietas em sacos de filtro (F-57 ANKOM[®]), que em seguida foram vedados utilizando-se uma seladora com lâmina incandescente.

Os sacos foram colocados no interior de cada um dos sete jarros de incubação de vidro no interior da incubadora Tecnal[®] modelo TE-150, mantendo-se a temperatura constante de 39°C e constância na movimentação rotativa dos jarros. Em cada um deles introduziu-se vinte amostras e um saco branco por jarro. Destas vinte amostras, haviam todas as cinco diferentes dietas e quatro repetições de cada uma delas. Cada um dos sete jarros utilizados nas incubações correspondeu à inclusão de um nível de leveduras.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes (% de matéria seca) e composição nutricional das dietas experimentais.

Item	100% silagem	75% silagem	50% silagem	25% silagem	0% silagem
Silagem de milho (%)	100	75	50	25	0
Milho grão moído (%)	0	21,25	42,5	63,75	85,0
Farelo de Soja (%)	0	4,75	7,5	12,25	15,0
Composição					
MS (%)	37,69	50,43	63,17	75,90	88,64
MO (% MS)	94,89	95,73	96,72	97,56	98,28
PB (% MS)	7,24	9,18	11,12	13,06	15,00
EE (% MS)	1,48	2,04	2,58	3,12	3,79
FDN (% MS)	52,67	41,52	31,08	20,90	11,22
FDNcp (% MS)	50,58	39,18	28,67	18,89	9,37
FDA (% MS)	29,06	22,37	15,56	9,45	3,74
Lignina (% MS)	4,90	2,90	2,21	1,93	0,58
CNF (% MS)	35,59	45,33	54,35	62,49	70,12
NDT ¹ (% MS)	59,91	65,80	69,17	82,93	89,12

MS – Matéria seca; MO – Matéria orgânica; PB – proteína bruta; EE – extrato etéreo; FDN – fibra em detergente neutro; FDNcp – fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDA – fibra em detergente ácido; NDT¹ – nutrientes digestíveis totais, ¹segundo: Detmann et al., 2016.

As incubações foram realizadas em duas rodadas, perfazendo o uso dos sete jarros em cada uma delas, quando incubou-se as 3 cepas e dois níveis de inclusão, mais um jarro sem a inclusão da levedura em uma única rodada, repetindo-se o procedimento com os níveis de inclusão restantes na rodada seguinte. Permanecendo incubadas por 48 horas.

O líquido ruminal utilizado nos jarros para os procedimentos das incubações das dietas com a inclusão de níveis crescentes de leveduras foi obtido simultaneamente de três vacas holandesas canuladas no rúmen, alimentadas com dieta composta por 70% de silagem de milho e 30% de ração concentrada comercial com 23% de proteína bruta (base seca). Os animais foram adaptados à dieta descrita acima durante por 14 dias anteriormente ao início das coletas das amostras de fluido ruminal composto das três vacas utilizadas como doadoras de fluido ruminal.

A digesta ruminal (líquido e sólidos) foi coletada em vários pontos da interface líquido sólido do ambiente ruminal imediatamente antes do início de cada rodada de incubação, anteriormente ao início da alimentação matinal das vacas. Logo após a retirada, a digesta foi transferida para o interior de garrafas térmicas pré-aquecidas à temperatura de 39°C. Posteriormente, o material homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze em frascos Becker de 2 L, mantidos em banho maria a 39°C.

Logo após, 400 mL desse líquido ruminal foram transferidos para jarros próprios da incubadora TE-150 (TECNAL), para se realizar a determinação da digestibilidade *in vitro*. Em seguida, foram adicionados 1.600 mL de solução tampão já misturada com os

níveis estabelecidos de lodo da levedura (decantado) nas proporções de 0,2; 0,4 e 0,6 g de MS/L), sendo os jarros selados após a adição de CO₂ por cerca de 30 segundos.

A solução tampão, preparada em recipientes pré-aquecidos a 39 °C, foi composta pela mistura da solução A: 10,0 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄.7H₂O; 0,5 g de NaCl; 0,1 g de CaCl₂.2H₂O e 0,5 g de ureia, por litro de solução; com a solução B: 15,0 g de Na₂CO₃ e 1,0 g de Na₂S.9H₂O em 100 mL de solução. A mistura foi feita respeitando-se a relação de 5:1, obtendo-se, assim, 1.330 mL de solução A e 266 mL de solução B, com pH final de 6,8.

Após 48 horas, os sacos de filtro foram imediatamente lavados com água destilada quente (temperatura superior a 90°C), exercendo-se leve pressão manual para retirada dos gases neles contidos. Após a lavagem, todos os sacos de filtro foram secos (105°C/24 h) e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da MS.

Para a avaliação da DIVFDN, os sacos de filtro foram acondicionados em potes plásticos autoclaváveis (150 mL), sendo adicionados 50 mL de solução de detergente neutro e 250 µL de α-amilase termoestável. Os potes com os sacos de filtro em seu interior foram autoclavados por uma hora à 100°C. Posteriormente, os mesmos foram lavados com água destilada quente (temperatura superior a 90°C) e acetona. Após a lavagem, os sacos de filtro foram secos (105°C/24 h) e pesados para obtenção do resíduo não digerido de FDN (Detmann et al.,2012).

As análises de variância para os valores de DIVMS e DIVFDN foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Statistical Analyses System - SAS (SAS, 2002). Não se abordou a interação tripla entre as dietas, cepas e dose das mesmas. A comparação entre os tratamentos baseados nas diferentes doses de inclusão das cepas de leveduras no meio de cultivo foi realizada por intermédio do teste Tukey. A avaliação do efeito dos níveis de inclusão das cepas de leveduras foi realizada por intermédio de análise de regressão por contrastes polinômias, não adotou o modelo cubico por não apresentar explicação biológica. Todos os testes de significância foram realizados considerando-se α a 5% de probabilidade.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} = valor observado para a variável em estudo referente a k-ésima repetição da combinação do i-ésimo nível do fator A com o j-ésimo nível do fator B; μ = média geral; α_i = efeito do i-ésimo nível do fator A no valor observado Y_{ijk}; β_j = efeito

do j-ésimo nível do fator B no valor observado Y_{ijk} ; $\alpha\beta_{ij}$ = efeito da interação do i-ésimo nível do fator A como o j-ésimo nível do fator B; e_{ijk} = erro associado à observação Y_{ijk} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre as cepas de leveduras e os níveis de inclusão das mesmas, em todas as dietas avaliadas para digestibilidades *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (Tabela 2).

Ao se desdobrar o efeito das cepas dentro das doses de inclusão da levedura para a digestibilidade da matéria seca, verificou-se efeito quadrático para a cepa LBCM 45 para todas as dietas avaliadas, sendo os pontos de máxima situados em 0,32; 0,27; 0,33; 0,34 e 0,31 g/L para as dietas 100, 75, 50, 25 e 0% de volumoso respectivamente.

Tabela 2. Valores médios das digestibilidades *in vitro* da matéria seca (DIVMS) das dietas em função dos níveis de inclusão das cepas LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45.

Cepa de levedura	Leveduras (g/L)				EPM ¹	Valor P ²	
	0	0,2	0,4	0,6		L	Q
LBCM 13		66,95a	62,84b	64,09a		0,206	0,166
LBCM 29	63,92	65,55a	60,28b	63,06a	0,52	0,043	0,473
LBCM 45		67,14a	73,85a	63,40a		0,305	<,001
LBCM 13		69,96b	72,03b	69,17a		0,608	0,419
LBCM 29	70,80	70,47b	69,62b	70,74a	0,38	0,766	0,354
LBCM 45		73,96a	75,81a	67,78a		0,083	<,001
LBCM 13		75,94b	77,79b	78,13a		0,307	0,531
LBCM 29	77,01	78,28ab	76,93b	76,90a	0,36	0,576	0,335
LBCM 45		79,71a	83,65a	77,72a		0,118	<,001
LBCM 13		83,54a	86,31b	76,79b		0,077	0,005
LBCM 29	82,29	83,26a	83,58b	84,01a	0,55	0,188	0,764
LBCM 45		84,82a	90,90a	83,76a		0,069	0,001
LBCM 13		91,30a	92,29b	93,05a		0,078	0,256
LBCM 29	91,83	91,60a	90,30c	90,44b	0,31	0,043	0,738
LBCM 45		92,23a	97,91a	90,83b		0,206	<,001

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%); ²L e Q: efeitos de ordem linear e quadrática relativos à inclusão das cepas de levedura, respectivamente.

Para a cepa LBCM 13 observou-se também efeito quadrático para a dieta contendo 25% de volumoso, com ponto de máxima para a dosagem de levedura estimado pela equação em 0,25 g/L.

Para a cepa LBCM 29 houve efeito linear decrescente nas dietas contendo 100% de alimentos volumosos e na dieta contendo apenas alimentos concentrados, sendo que para cada g/L acrescida na quantidade de levedura introduzida no meio verificou-se a uma redução de 3,93 e 2,73% respectivamente na digestibilidade da matéria seca.

Desta forma, não só as características intrínsecas das cepas das leveduras, mas também as doses usadas nas dietas se apresentaram também como componentes preponderantes para produzir o efeito desejado. Para a LBCM 45 a dose média que resultou em maiores digestibilidades ruminais da matéria seca para todas as dietas foi de 0,32 g/L, sendo dentre as leveduras testadas aquela que se mostrou mais uniforme em relação aos seus efeitos positivos em diferentes tipos de dietas.

Neste particular, Figueiroa et al. (2015) encontraram efeito quadrático *in vitro* para a dose da levedura Biosaf[®] sobre a digestibilidade da matéria seca. A dose que proporcionou maior efeito sobre este parâmetro foi a de 0,4 g/L, ou seja, dose está próxima a que foi encontrada neste ensaio para a LBCM 45.

Considerando-se que as leveduras LBCM 45, LBCM 13 e LBCM 29 apresentam perfis distintos quando analisadas sob o ponto de vista de floculação, velocidade de absorção de carboidratos e temperatura ótima de crescimento (Araújo, 2013). Seria também de se esperar que os resultados de digestibilidade da matéria seca nas diferentes dietas em relação às dosagens testadas destas leveduras fossem diferentes.

Segundo a Araújo (2013) a capacidade de transporte de α -glicosídeos foi avaliada nas cepas em estudo. A cepa LBCM 45 apresentou os maiores valores para o transporte do ρ NP α G, em torno de 676 nM.min/g de células. A cepa LBCM 29 apresentou valor intermediário (222 nM.min/g de células). A cepa LBCM 13 apresentou valor inferior à todas (117 nM.min/g de células).

Este fato está relacionado a maior capacidade da cepa LBCM 45, em relação às demais, de conseguir realizar com maior eficácia o transporte de α -glicosídeos para serem por ela metabolizados, mantendo-se provavelmente mais ativa no meio e favorecendo a fermentação. Assim, esta característica própria da cepa LBCM 45 seria proporcionalmente mais importante em dietas com maior prevalência de alimentos concentrados do que na de volumosos em razão da maior quantidade de carboidratos não fibrosos na primeira.

O aumento da digestibilidade da matéria seca pela inclusão média de levedura em até 0,32 g/L para as dietas pode ser explicado pelas alterações nos padrões de fermentação ruminal. De acordo com Robinson e Erasmus (2009) e Suarez e Guevara (2018), o ambiente ruminal é afetado favoravelmente pelas leveduras, podendo influenciar nos valores de pH ruminal, o que favoreceria o desenvolvimento da flora microbiana, principalmente as bactérias celulolíticas. Lila et al. (2004) relataram aumento linear do

número total de bactérias e de bactérias celulolíticas, com a adição de leveduras, o que estimularia a degradação da celulose.

Ao se desdobrar o efeito da adição das doses das leveduras dentro das cepas em relação à digestibilidade da matéria seca (Tabela 2), observou-se que para a dieta de 100% de volumoso, só foi possível verificar diferenças significativas para a dose 0,4 g/L. Nela, a cepa LBCM 45 foi superior as demais (73,85% de DIVMS), sendo 11% superior as demais.

Ao contrário do verificado para a cepa LBCM 45 neste ensaio, onde constatou-se a maior amplitude de diferença entre os resultados desta e do controle para a DIVMS na dieta contendo 100% de volumosos (10%), Figueiroa et al. (2015) encontram para a Biosaf[®] efeito mais pronunciado na dieta contendo 75% de volumoso.

Há de se considerar obviamente a natureza dos alimentos volumosos utilizados nos ensaios. No presente ensaio, o volumoso utilizado foi a silagem de milho que contrasta com o utilizado por Figueiroa et al. (2015) a base de feno de capim Coast Cross (*Cynodon dactylon*).

Lascano et al. (2009) avaliaram a adição de *Saccharomyces cerevisiae* em dietas com alto e baixo teor de concentrado (60% e 20%, respectivamente) e observaram que a adição da levedura aumentou a digestibilidade da matéria seca, em dietas com menor proporção de volumoso. No presente trabalho o efeito foi oposto, a adição de levedura proporcionou aumento de 9,93% na DIVMS de forma mais efetiva na dieta com maior proporção de volumoso, no nível de 0,4 g/L utilizando-se a cepa LBCM 45 (Figura 1).

Ainda na Tabela 2, para a dieta com 75% de volumoso as cepas diferiram nas doses 0,2 e 0,4 g/L onde a cepa LBCM 45 foi novamente superior as demais (73,96 e 75,81% de DIVMS, respectivamente), caracterizando a sua maior constância frente diferentes relações concentrado volumoso.

Para a dieta com 50% de volumoso na dose 0,4 g/L diferiu, a cepa LBCM 45 foi superior as demais (83,65% de DIVMS). Para a dieta com 25% de volumoso a dose 0,4 g/L diferiu, a cepa LBCM 45 foi superior as demais (90,90% de DIVMS). Já para a dose 0,6 g/L diferiu, a cepa LBCM 13 foi inferior as demais (76,79% de DIVMS).

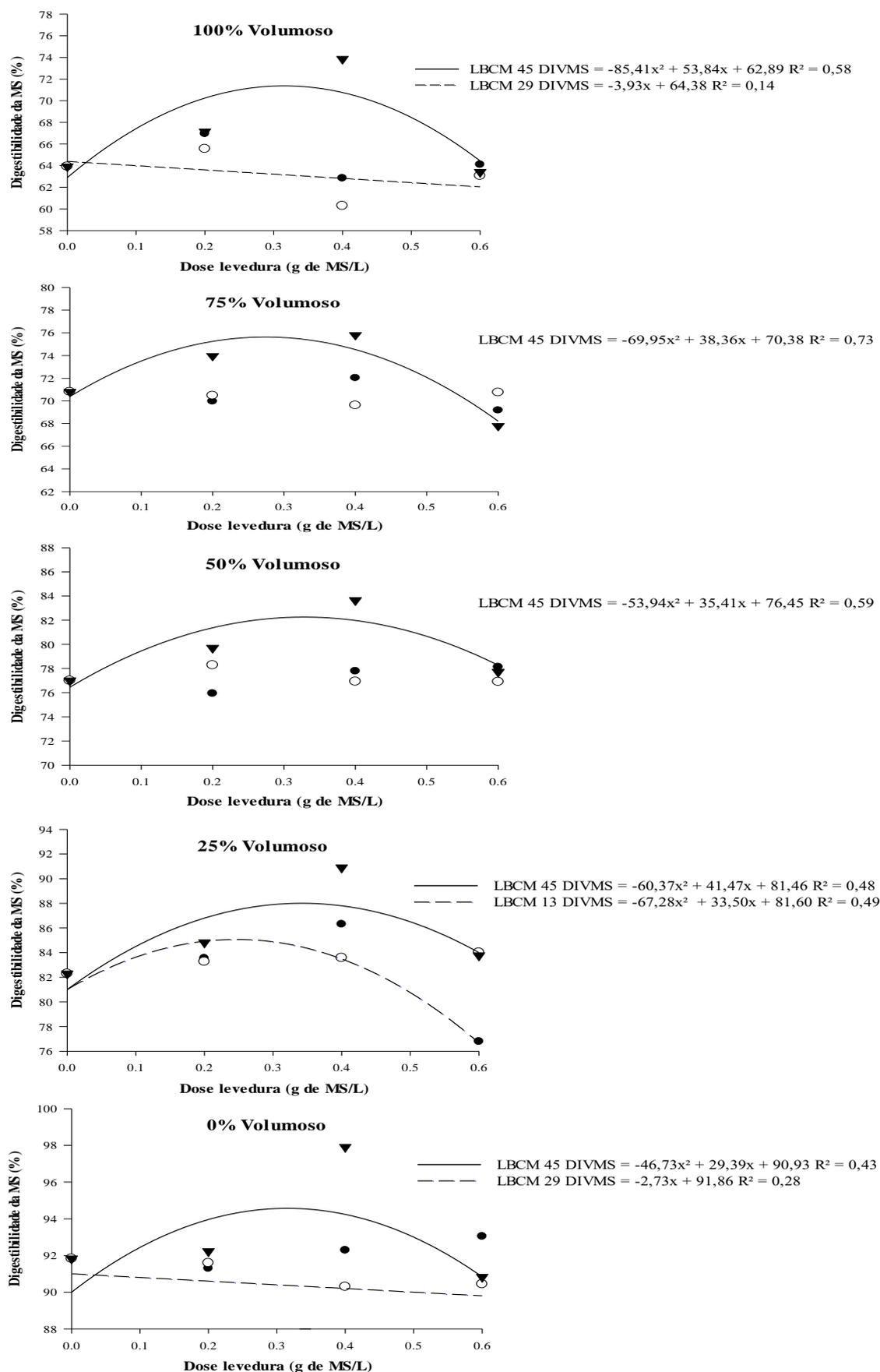


Figura 1 - Digestibilidade *in vitro* da MS de dietas com diferentes proporções de volumoso com a inclusão de níveis crescentes de três cepas de leveduras (LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45)

Quando se observam os resultados encontrados na Tabela 2, constata-se que houve de fato diferença significativa na digestibilidade ruminal para a cepa LBCM 45 em relação as demais na dose de 0,4 g/L enquanto que, para a dosagem de 0,6 g/L a levedura LBCM 13 foi superior as outras na dieta contendo 100% de alimentos concentrados.

Além da DVIVMS, estudou-se o efeito da inclusão de diferentes doses das leveduras sobre a degradabilidade da fração fibra detergente neutro.

Assim, para as dietas contendo apenas alimentos concentrados ou apenas alimentos volumosos, como a distribuição equitativa entre eles (50% de cada), observou-se interação entre as dosagens e cepas testadas (Tabela 3).

Para a dieta contendo 75% de volumosos os resultados de degradabilidade ruminal da FDN apresentaram comportamento quadrático para a inclusão crescente de levedura, com o ponto de máxima da digestibilidade da FDN (76,46%) na dose 0,36 g/L. As cepas LBCM 45 e LBCM 29 foram semelhantes ($P>0,05$).

Tabela 3. Valores médios das digestibilidades *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das dietas em função dos níveis de inclusão das cepas LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45.

Cepa de levedura	Leveduras (g/L)				Média	EPM ¹	Valor P	
	0	0,2	0,4	0,6			L ²	Q ³
LBCM 13		69,16b	66,25c	69,71a	68,39		0,734	0,050
LBCM 29	68,42	69,84ab	69,22b	68,26a	68,93	0,29	0,781	0,193
LBCM 45		71,81a	72,44a	69,11a	70,44		0,301	<,001
Média		70,27	69,30	69,03				
LBCM 13		73,84	74,90	74,60	74,12b			
LBCM 29	73,15	75,50	76,43	75,68	75,19ab	0,31	0,003	<,001
LBCM 45		77,60	78,35	74,65	75,94a			
Média		75,65	76,56	74,98				
LBCM 13		80,38b	80,47b	81,45a	80,86		0,662	0,133
LBCM 29	81,12	82,90a	83,86a	81,91a	82,45	0,22	0,040	<,001
LBCM 45		83,67a	84,75a	81,28a	82,71		0,225	<,001
Média		82,32	83,03	81,55				
LBCM 13		87,40	88,88	85,80	87,24b			
LBCM 29	86,86	88,78	90,68	88,97	88,83a	0,28	0,007	<,001
LBCM 45		88,88	91,24	88,83	88,95a			
Média		88,35	90,27	87,87				
LBCM 13		95,10b	95,72b	96,81a	95,84		0,031	0,028
LBCM 29	95,75	96,23a	97,61a	95,48b	96,27	0,14	0,480	<,001
LBCM 45		95,41ab	97,82a	95,61b	96,15		0,058	0,001
Média		95,58	97,05	95,97				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%); ²L e Q: efeitos de ordem linear e quadrática relativos à inclusão das cepas de levedura, respectivamente.

Para a dieta 25% de volumoso houve comportamento quadrático para a inclusão crescente de levedura, com o ponto de máxima da digestibilidade da FDN (89,62%) na

dose 0,35 g/L. As cepas LBCM 45 e LBCM 29 foram semelhantes ($P>0,05$). A cepa LBCM 13 foi inferior as demais cepas.

Ao se desdobrar as cepas dentro das doses de inclusão da levedura para a digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), verificou-se efeito quadrático para a cepa LBCM 45. Para as dietas contendo 100%, 50 e 0% de volumoso um comportamento quadrático com ponto de máxima da digestibilidade em 0,32; 0,31 e 0,34 g/L foi registrado respectivamente.

Para a cepa LBCM 13 observou efeito quadrático para as dietas 100% e 0% de volumoso, onde os pontos de mínima estimado pela equação foram situados em 0,29 e 0,21 g/L respectivamente. Enquanto que, para a cepa (LBCM 29) os resultados da DIVFDN resultaram em um efeito quadrático com o incremento das doses testadas, sendo os pontos de máxima foram situados em 0,34 e 0,31 g/L na digestibilidade da FDN, para as dietas 50% de volumoso e 0% de volumoso respectivamente.

Para as digestibilidades ruminais *in vitro* da FDN, a dose média estimada que resultou em melhores resultados para todas as dietas foi de 0,33 g/L, dentro de todas as leveduras testadas, sendo a cepa LBCM 45 foi aquela que se mostrou mais uniforme em relação aos seus efeitos positivos em diferentes tipos de dietas (Figura 2).

Ao se desdobrar os resultados da DIVFDN para as doses de avaliação das leveduras dentro das cepas, observou-se que para a dieta de 100% de volumoso, houve diferença para as doses 0,2 g/L onde a cepa LBCM 45 foi superior a cepa LBCM 13 (71,81 e 69,16% de DIVFDN, respectivamente).

Para a dieta com 50% de volumoso a dose 0,2 e 0,4 g/L diferiram, sendo a cepa LBCM 13 foi inferior as demais (80,38 e 80,47% de DIVFDN, respectivamente).

Para a dieta com 0% de volumoso a dose 0,2 g/L diferiu, a cepa LBCM 29 foi superior ($P<0,05$) a cepa LBCM 13 e não diferiu ($P>0,05$) da cepa LBCM 45 que é semelhante ($P>0,05$) a cepa LBCM 13. Na dose de 0,4 g/L a cepa LBCM 13 foi inferior ($P<0,05$) as demais. Já para a dose 0,6 g/L, a cepa LBCM 13 foi superior ($P<0,05$) as demais (96,81% de DIVFDN).

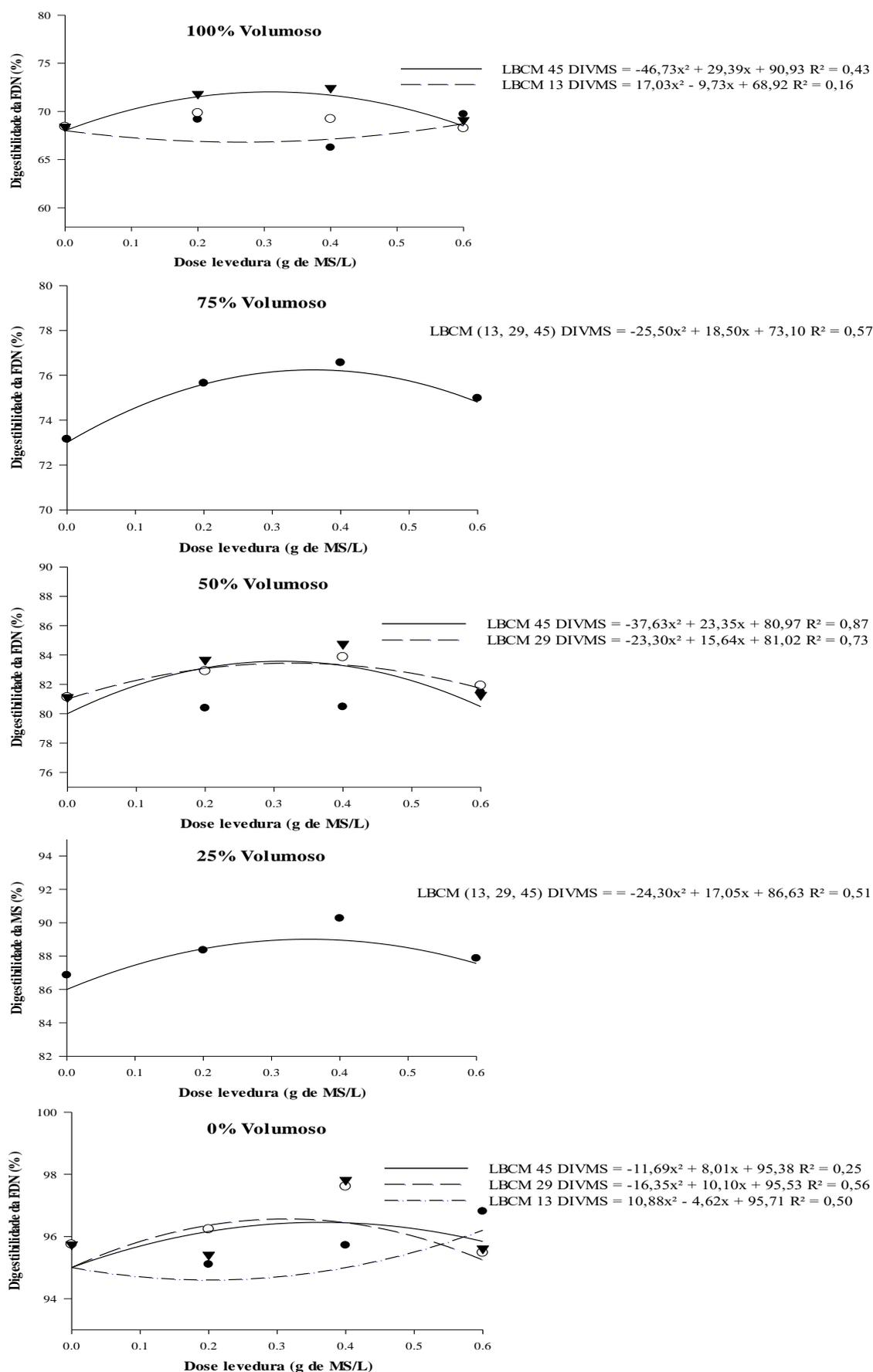


Figura 2 - Digestibilidade *in vitro* da FDN de dietas com diferentes proporções de volumoso com a inclusão de níveis crescentes de três cepas de leveduras (LBCM 13, LBCM 29 e LBCM 45).

De forma semelhante ao verificado para a digestibilidade da matéria os efeitos positivos da inclusão das leveduras nas diferentes dietas também foram verificados para a fração FDN (Tabela 3). O incremento na degradabilidade da fração fibrosa nas dietas, pode ser decorrente da utilização do amido, presente na dieta, e da remoção de substratos facilmente fermentáveis do meio que provocam indiretamente são capazes de promover o aumento na digestibilidade da fibra (Gomes et al., 2010; Lascano et al., 2009) por meio da maior estabilidade do pH ruminal. Neste sentido, o efeito positivo observado para a degradabilidade da FDN pode da mesma forma ter sido provocado em decorrência do aumento do número total de bactérias ruminais que melhorariam a degradação da fibra e o fluxo de proteína microbiana ruminal (Robinson & Erasmus, 2009).

Segundo a Araújo (2013) as cepas experimentais testadas no presente ensaio apresentaram percentual de floculação maior que 32%. A cepa LBCM 45 apresentou o maior percentual de floculação ($72\pm 4\%$). A cepa LBCM 29 apresentou valor intermediário ($58\pm 2\%$) e a cepa LBCM 13 apresentou valor mais inferior ($32\pm 8\%$) entre as três.

A propriedade de maior ou menor floculação das cepas de leveduras pode se relacionar com o incremento da degradabilidade da parede celular das plantas principalmente para as cepas LBCM 45 e LBCM 29. Em razão de apresentarem maior floculação elas são mais facilmente recuperadas no lodo por ocasião do cultivo.

Por conseguinte, esta propriedade pode contribuir com o modo de ação destas leveduras quando metabolicamente ativas ampliando a possibilidade de fornecer promotores de crescimento para as bactérias celulolíticas responsáveis pela degradação da fibra (Rossow et al., 2017).

CONCLUSÕES

Os melhores resultados para a digestibilidade da matéria seca e para a fibra foram encontrados na dose de 0,4 g de MS/L em todas as dietas testadas, sendo a cepa LBCM 45 superior às demais. Recomenda-se o uso desta cepa como probiótico nas dietas de ruminantes, na dosagem definida acima, considerando o desempenho superior às demais desta, em todas as dietas testadas

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. O.; PESSOA, M. S.; FREITAS, C.E. S.; DUARTE, E. R.; RODRIGUEZ, N. M.; BARBOSA, F. A.; ANDRADE, V. J. Potencialidades e limitações da utilização de aditivos na produção de bovinos de corte. **Caderno de Ciências Agrárias**, Montes Claros, v. 4, p. 43-60, 2012.
- ANKOM TECHNOLOGY - In Vitro True Digestibility using the DAISY II Incubator [on line], 2010. Disponível em < [http:// www.ankom.com](http://www.ankom.com)> Acesso em 12 de outubro de 2015.
- ARAÚJO, T. M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- BONATO, D.V.; NEUMANN, M.; UENO, R.K.; HEKER JUNIOR, J.C.; HORST, E.H.; CARNEIRO, M. K.; POCZYNEK, M.; RUTHS, R.; FIGUEIRA, D.N.; TEIXEIRA, P.P.M. Uso de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta de bovinos. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n.1, p. 1-7, 2015.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F; WALKER, N.D; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, 145(1-4):5-26, 2008.
- CHUNG, Y.H., WALKER, N. D., MCGINN , S. M., BEAUCHEMIN, K. A. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2431–2439, 2011.
- DE ONDARZA, M.B., SNIFFEN, C.J., DUSSERT, L., CHEVAUX, E., SULLIVAN, J. Live yeast aids rumen function, milk yield. **Feedstuffs**. 83:24, 2011.
- DETMANN, E.; SILVA, T.E.; VALADARES FILHO, S.C.; SAMPAIO, C.B.; PALMA, M.N.N. **Predição do valor energético de dietas para bovinos a partir da composição química dos alimentos**. In: VALADARES FILHO, S.C. et al. 2016. Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados – BR CORTE. 3. ed. UFV, Suprema Gráfica Ltda: Viçosa. pp. 89-126.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para Análise de Alimentos - INCT - Ciência Animal**. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO. S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and dietas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.980-984, 2010.
- ENJALBERT, F., GARRETT, J.E., MONCOULON, R., BAYOURTHE, C., CHICOTEAU, P. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal

digestion in non-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 76:195, 1999.

FIGUEIROA, F.J.F., BRANCO, A.F., BARRETO, J.C., CARVALHO, S.T., GRANZOTTO, F., OLIVEIRA, M.V.M., GOES, R. H. T.B. Cultura de leveduras na digestibilidade *in vitro* de dietas com diferentes proporções de volumosos. **Ciência Animal Brasileira [online]**. vol.16, n.2, pp.169-178, 2015.

GOERING, N.K.; VAN SOEST, P. **Forage fiber analysis**: apparatus, reagents, procedures and some applications. Washington: USDA, 1970. 20p.

GOMES, R.C; ANTUNES, M.T; NOGUEIRA FILHO, J.C.M; ÍTAVO, L.C.V; LEME, P.R. Leveduras vivas e monensina em dietas de alto concentrado para bovinos: parâmetros ruminais e degradabilidade “in situ”. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 11(1):202-216, 2010.

LASCANO, G.J; ZANTON, G.I; SUAREZ-MENA, F.X; HEINRICH, A.J. Effect of limit feeding high- and low-concentrate diets with *Saccharomyces cerevisiae* on digestibility and on dairy heifer growth and first-lactation performance. **Journal of Dairy Science**, 2009; 92(10):5100-5110.

LILA, Z.A.; MOHAMMED, N; YASUI, T; KUROKAWA, Y; KANDA, S; ITABASHI, H. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. **Journal of Animal Science**, 82(6):1847-1854, 2004.

NEWBOLD, C.J., MCINTOSH, F.M., WALLACE RJ. Mode of action of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**. 76:249, 1996.

OEZTUERK H. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation *in vitro*. **Journal of Animal and Feed Sciences**, 18, 142–150, 2009.

ROBINSON, P.H; ERASMUS, L.J. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products: A systematic review of the literature. **Animal Feed Science and Technology**, 2009; 149(3-4):185–198.

ROSSOW, H. A.; RIORDAN, T.; RIORDAN, A. Effects of addition of a live yeast product on dairy cattle performance. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 159-163, 2017.

SALVATI, G. G. S. **Suplementação de vacas leiteiras com leveduras vivas durante o verão**. 2014. 150f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014. Disponível em: <repositorio.ufla.br/handle/1/4637>. Acesso em: 27 ago. 2017.

SAS, **Statistical Analysis System**. Software, version 9.1.3 Cary: SAS Institute, 2002.

SUAREZ, C.; GUEVARA, C.A. Probiotic Use of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in Animal Feed. **Research Journal of Zoology**. 1:1. 2018

VIEIRA, V. A. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na alimentação de vacas da raça Jersey**. 2016. 95f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2016.

IV - CAPÍTULO II

CINETICA DA FERMENTAÇÃO E DEGRADABILIDADE RUMINAL
IN VITRO EM SUBSTRATOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE
VOLUOSOS COM OU SEM ADIÇÃO DE LEVEDURA

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito da adição da cepa LBCM 45 de levedura sobre a cinética da fermentação e degradação ruminal *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x5, com quatro repetições, correspondendo ao uso ou não de levedura nas dietas, com cinco proporções de concentrados em relação aos volumosos (base seca). Foi utilizada a cepa LBCM 45 (*Saccharomyces cerevisiae*), onde foi incluído 0,4 g de MS/L e uma testemunha, ou seja, sem levedura adicionada ao meio. A levedura foi adicionada em cinco dietas, com relação de volumoso e concentrado decrescentes, sendo as proporções de volumoso das dietas (100, 75, 50, 25 e 0%) determinadas na base da matéria seca. A inclusão de 0,4 g de MS/L da cepa LBCM 45 promoveu aumento ($P<0,05$) dos gases provenientes dos carboidratos não fibrosos e da produção total de gases das dietas avaliadas, elevando ($P<0,05$) estimativa da produção dos ácidos graxos de cadeia curta. Para a degradação aparente da MS a inclusão da levedura aumentou ($P<0,05$) a taxa de degradação e a degradabilidade efetiva das dietas, a exceção da ($P>0,05$) dieta 100% volumoso e, para degradabilidade da FDN, promoveu redução ($P<0,05$) do tempo de colonização e elevou ($P<0,05$) a degradabilidade efetiva para todas as dietas avaliadas, sem alterar ($P>0,05$) a degradabilidade potencial das dietas. Concluiu-se que a inclusão da cepa LBCM 45 promove melhora das condições ruminais *in vitro* das dietas avaliadas, demonstrando seu potencial para modular favoravelmente o ambiente, aumentando a eficácia da fermentação ruminal.

Palavras-chave: aditivo, modulação ruminal, probiótico.

RUMINAL DEGRADABILITY AND *IN VITRO* FERMENTATION KINETIC OF DIFFERENT ROUGHAGE RATIO DIETS WITH OR WITHOUT ADDED YEAST

ABSTRACT: The objective was evaluated the effect of yeast LBCM 45 strain addition on *in vitro* fermentation kinetic, its dry matter (IVDMD) and neutral detergent fiber (IVDADF) ruminal degradation in diets containing different ratios of roughage and concentrate. A completely randomized design was used, in a 2x5 factorial scheme, with four replicates, corresponding to whether or not yeast was used in the diets, with five proportions of concentrates in relation to the forage (dry basis). The strain LBCM 45 (*Saccharomyces cerevisiae*) was used, where 0.4 g of DM/L and control, i.e., without yeast added to the medium, was included. Yeast was added in five diets, with decreasing forage and concentrated ratio, and the proportions of the diets (100, 75, 50, 25 and 0%) were determined on the basis of the dry matter. The inclusion of 0.4 g of DM/L of the LBCM 45 strain promoted an increase ($P<0.05$) in the gases from the non-fibrous carbohydrates and in the total gas production of the evaluated diets, increasing ($P<0.05$) production of short chain fatty acids. For DM apparent degradation the inclusion of yeast increased ($P<0.05$) the rate of ruminal degradation and effective degradability of the diets, except ($P>0.05$) for a 100% roughage diet. For NDF degradability LBCM 45 substrate supplementation promoted reduction ($P<0.05$) of the colonization time and increased ($P<0.05$) the effective degradability for all diets evaluated, without altering ($P>0.05$) their potential degradabilities. It is concluded that the inclusion of the LBCM 45 strain promotes an improvement of the *in vitro* ruminal conditions for evaluated diets, demonstrating its potential to favorably change the ruminal environment enhancing his fermentation efficacy.

Keywords: additive, ruminal modulation, probiotic.

INTRODUÇÃO

Devido a imposições normativas da União Europeia e de outros países na alimentação animal, restringindo o uso de hormônios e substâncias antimicrobianas, como os ionóforos e antibióticos na alimentação animal (Throne et al., 2009), a busca por aditivos microbianos, alternativos e eficazes, tem se intensificado nos últimos anos.

Nesse sentido, a utilização de probióticos (microrganismos vivos) nas rações para ruminantes tem se acentuado, em especial por afetarem benéficamente o processo digestivo no hospedeiro, melhorando o processo fermentativo da microbiota ruminal e, conseqüentemente, a eficiência alimentar (Zeoula et al., 2011) e o desempenho dos animais (Barbosa et al., 2004)

Aditivos em dietas de ruminantes tais como leveduras, probióticos e ionóforos, têm sido utilizados visando atuar na relação simbiótica entre os microrganismos no rúmen para melhoria do processo fermentativo e da eficiência alimentar do hospedeiro, aumentando o fluxo de nitrogênio para o duodeno e reduzindo a emissão de metano, principalmente em animais que recebem dietas ricas em amido (Mitsumori & Sun, 2008).

Efeitos benéficos das leveduras no rúmen, particularmente a *Saccharomyces cerevisiae* estão associados principalmente com aumento de bactérias celulolíticas na biomassa microbiana e melhoria na digestão da fibra (Mosoni et al., 2007); estabilização do pH e prevenção de acúmulo de lactato no rúmen (Fonty & Chaucheyras-durand, 2006).

Diferentes espécies ou diferentes cepas de leveduras, assim como a dosagem destas usada nas dietas influenciam a resposta fisiológica do animal, podendo induzir em maior ou menor grau ao aumento da produtividade animal (Enjalbert et al., 1999; Newbold et al., 1996). Portanto, é importante se identificar cepas específicas de leveduras, a serem usadas vivas como probiótico nas dietas de ruminantes, que tenham maior efeito sobre a fermentação ruminal maximizando o desempenho produtivo desses animais.

Nesta linha, além das especificidades inerentes as cepas de leveduras e suas respectivas quantidades a serem utilizadas nas dietas dos ruminantes, também é importante se determinar as possíveis interações existentes entre o aditivo microbiano em relação ao tipo de dieta que será fornecida aos ruminantes (Figueiroa et al., 2015), que recomendaram a dose de 0,4 g de matéria seca por litro, a qual incrementou o processo de digestibilidade ruminal *in vitro* (Figueiroa et al., 2015).

Novas investigações devem proporcionar oportunidades para projetar dietas para proporcionar a melhor resposta animal utilizando-se aditivos microbianos como as

leveduras, determinando-se as propriedades básicas das dietas para as quais os melhores resultados possam ser expressados com a inclusão de leveduras vivas (De Ondarza et al., 2011).

A seleção de cepas nacionais com fins probióticos para uso na alimentação de ruminantes se reveste de grande importância por permitir a possibilidade de redução da dependência de cepas importadas e permitir maior competição nesse setor. Nesse sentido a cepa LBCM 45 se apresenta como alternativa, onde está já se destacou em ensaios anteriores dentro do grupo de pesquisa, quando se avaliou a digestibilidade ruminal *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro, sendo está também selecionada por Araujo (2013) para a produção de cerveja por suas características favoráveis com vistas ao processo produtivo da mesma.

Neste sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição da cepa LBCM 45 de levedura, em comparação a um controle, ou seja, sem adição do fungo, sobre a cinética da fermentação e degradação ruminal *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), em dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento e as análises laboratoriais foram realizados no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Fitotecnia e Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - *Campus* Vitória da Conquista, BA. Os procedimentos experimentais e o uso de animais portadores de cânulas ruminais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CEUA, protocolo n° 094/2015).

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x5, com quatro repetições, correspondendo ao uso ou não de levedura nas dietas, com cinco proporções de concentrados em relação ao volumosos (base seca). Foi utilizada uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde o nível de inclusão desta estabelecido previamente foi de 0,4 g de MS/L e uma testemunha, ou seja, sem levedura adicionada ao meio. A levedura foi adicionada em cinco dietas, com relação de volumoso e concentrado decrescentes, sendo as proporções de volumoso das dietas (100, 75, 50, 25 e 0%) determinadas na base da matéria seca. A cultura de levedura utilizada continha cepas vivas e viáveis da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) isoladas

de alambiques para a produção artesanal de aguardente, pela equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal de Ouro Preto, na localidade de Araçuaí (MG), cepa LBCM 45. A quantidade utilizada do inóculo de leveduras LBCM 45 (0,4 g MS/L) continha $6,4 \times 10^{14}$ unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g).

A cepa de levedura foi cultivada no laboratório objetivando multiplicá-la para uso no ensaio. Para tanto, o cultivo das leveduras foi feito em frascos de plástico de 20 litros de capacidade. O meio de cultivo utilizado foi composto de açúcar demerara, que se caracteriza por ser um açúcar granulado de coloração marrom clara, pois não sofre processo de branqueamento. Este se caracteriza por ser minimamente processado e não recebe aditivos químicos, apresentando valores nutricionais semelhantes ao açúcar mascavo, sendo diluído a uma concentração de 40 g/L em água destilada e acrescido de 0,25% de levedo de cerveja em pó.

O cultivo das leveduras foi executado sob aeração, permanecendo sob incubação por 24 horas. Após este período, o processo de cultivo foi interrompido, separando-se a massa de leveduras que se decanta naturalmente no período da fase líquida superficial. Em seguida, os recipientes foram acondicionados a temperatura de 4°C, por 24 horas, com o objetivo de promover maior decantação, facilitando a separação da massa de leveduras.

Para obter-se as diferentes relações volumoso-concentrado descritas anteriormente nas sucessivas incubações *in vitro*, utilizou-se como volumoso a silagem de milho. O concentrado foi composto pela mistura de grão de milho (85%) e farelo de soja (15%) (Tabela 4).

As dietas foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 60°C, por 72 h. Em seguida, foram moídas em moinho de facas acoplado a uma peneira com crivos de 1 mm de diâmetro possibilitando a moagem do material para determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE), sendo quantificados de acordo com Detmann et al. (2012). Foram analisadas adicionalmente a fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método sequencial, conforme Detmann & Valadares Filho (2010).

Tabela 4. Proporção dos ingredientes (% de matéria seca) e composição nutricional das dietas experimentais.

Item	100% silagem	75% silagem	50% silagem	25% silagem	0% silagem
Silagem de milho (%)	100	75	50	25	0
Milho grão moído (%)	0	21,25	42,5	63,75	85,0
Farelo de Soja (%)	0	4,75	7,5	12,25	15,0
Composição	100% silagem	75% silagem	50% silagem	25% silagem	0% silagem
MS (%)	37,69	50,43	63,17	75,90	88,64
MO (% MS)	94,89	95,73	96,72	97,56	98,28
PB (% MS)	7,24	9,18	11,12	13,06	15,00
EE (% MS)	0,70	1,27	1,93	2,56	3,07
FDN (% MS)	51,96	42,03	30,68	20,00	10,27
FDNcp (% MS)	49,32	39,30	28,36	17,81	8,76
FDA (% MS)	30,70	23,17	16,41	9,60	3,39
Lignina (% MS)	4,78	3,70	2,95	1,58	0,61
CNF (% MS)	37,63	45,98	55,31	64,13	71,45
NDT (% MS)	60,42	64,18	68,08	83,21	88,43

MS – Matéria seca; MO – Matéria orgânica; PB – proteína bruta; EE – extrato etéreo; FDN – fibra em detergente neutro; FDNcp – fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDA – fibra em detergente ácido; NDT – nutrientes digestíveis totais, ¹segundo: Detmann et al., 2016.

As dietas com e sem a adição de 0,4 g/L da cepa LBCM 45, foram incubadas em frascos (160 mL), previamente injetados com CO₂, segundo a técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases descrita por Maurício et al. (1999). Para tanto, os frascos foram colocados em uma estufa com temperatura constante de 39°C, durante todo o período de incubação. Foi adicionado 1,0 g de amostra por frasco, para cada tratamento (matéria natural), juntamente 90,0 mL de meio de cultura, conforme Theodorou et al. (1994) e, em seguida, estes foram vedados com rolhas de borracha. A inoculação (10,0 mL/frasco) foi feita usando líquido ruminal de três bovinos fistulados no rúmen. O líquido ruminal utilizado nos procedimentos das incubações das dietas com níveis de volumoso, foi obtido simultaneamente de três vacas holandesas canuladas no rúmen, alimentadas com dieta composta por 70% de silagem de milho e 30% de ração concentrada comercial com 23% de proteína bruta (base seca). Os animais foram adaptados à dieta padrão descrita acima durante por 14 dias anteriormente ao início das coletas das amostras de fluido ruminal composto das três vacas utilizadas como doadoras de fluido ruminal.

A produção cumulativa de gases foi estimada por meio da mensuração da pressão dos gases, produzidos no decorrer do processo fermentativo, utilizando-se um transdutor de pressão (tipo T443A; BAILEY; MACKAY, Inglaterra), às 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 h de incubação, fazendo-se uso da equação determinada por Figueiredo et al. (2003), para altitude local, $V = -0,02 + 4,30p + 0,07 p^2$, $R^2 = 0,99$, em que V = volume total de gases e “p” é a pressão dos gases dentro dos frascos de fermentação (psi = pressão por polegada quadrada). De cada leitura de pressão, foi

subtraído o total de gases produzidos nos frascos sem substrato (branco), referentes a cada amostra.

Nos tempos de fermentação 48 e 96 horas, um frasco por tratamento foi retirado, procedendo-se a filtração em cadinho filtrante (n° 2) para a determinação da degradabilidade aparente da matéria seca (DAMS) e, sequencialmente, foi realizada a digestão em detergente neutro (Goering & Van Soest, 1970). Esta última foi realizada colocando-se, em autoclave a 105°C, os cadinhos no interior de recipientes plásticos (250 mL), por 1 hora, para extração dos componentes solúveis em detergente neutro, conforme técnica descrita por Detmann et al. (2012). Dessa forma, obteve-se a degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS).

A biomassa microbiana (BIO, em g/kg de MS digestível) e a eficiência de produção de biomassa microbiana (EPB, em mg/mg) foram calculadas pelas equações propostas por Grings et al. (2005), como se segue: $BIO = DVMS - (\text{volume de gases} \times FS)$ e $EPB = (DVMS - (\text{volume de gases} \times FS)) / DVMS$, sendo FS: o fator estequiométrico de 2,20, utilizado para estimar a conversão do substrato para o complexo de AGCC e gases produzidos no processo fermentativo.

O modelo bicompartimental, proposto por Schofield et al. (1994), foi utilizado para descrever a cinética do processo de fermentação, por meio da produção cumulativa de gases, como se segue:

$$V(t) = \frac{Vf1}{1 + \exp(2 - 4 \times Kd1 \times (T - L))} + \frac{Vf2}{1 + \exp(2 - 4 \times Kd2 \times (T - L))}$$

Em que V (t) é o volume acumulado no tempo t; Vf1 (mL/g), o volume de gás oriundo da fração de rápida digestão (CNF); Kd1 (h⁻¹), a taxa de degradação da fração de rápida digestão (CNF); L, latência ou tempo de colonização em horas; T (h), o tempo de incubação; Vf2 (mL/g), o volume de gás da fração de lenta degradação (B2); Kd2 (h⁻¹), taxa de degradação da fração B2.

Determinou-se o fator de partição (FP), pela divisão dos valores do substrato da matéria verdadeiramente degradada (g/kg) pela produção de gases (mL), em cada tempo de degradação (Blummel et al., 1997; Blummel et al., 1999), para comparar a inclusão da levedura e as dietas em relação as suas eficiências de degradação e produção de gases.

As estimativas das produções dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), foram calculadas de acordo com a equação de Getachew et al. (2002): $AGCC \text{ (mmol/200 mg MS)} = 0,0222 \times PG - 0,00425$, onde: PG – produção líquida de gases em 24 h (mL/200

mg MS). Os valores encontrados para os AGCC foram ajustados para um grama, para representar o conteúdo incubado no ensaio.

Na determinação da degradabilidade ruminal *in vitro* da MS e da FDN das dietas, foi utilizada a metodologia da ANKOM[®] (Ankom technology, 2010), adaptada ao rúmen artificial, utilizando a Incubadora TE-150 (TECNAL). Foram pesados 0,5 g de amostra seca em sacos de filtro (F-57 ANKOM[®]), que em seguida foram vedados utilizando-se uma seladora com lâmina incandescente. Os sacos contendo as diferentes dietas a serem testadas foram colocados em dez jarros de incubação de vidro da Incubadora e, em metade desses, adicionou-se a levedura, sendo utilizadas 20 amostras por cada um dos jarros de incubação usados nos ensaios. Cada par de jarros foi usado para representar um dos tempos de incubação das rações em meio contendo ou não a levedura, sendo eles às 0 (lavados diretamente), 6, 12, 24, 48 e 96 horas de incubação.

Para estimativa da degradabilidade potencial da MS e parâmetros da cinética da degradabilidade ruminal de cada unidade experimental foi utilizado o modelo de McDonald (1981), de acordo com a fórmula: $p = a + b(1 - e^{-c \times (t-L)})$, em que “p”, é degradabilidade potencial; “a”, fração solúvel em água; “b”, fração potencialmente degradável; “c”, taxa de degradação da fração “b” (h^{-1}); “t”, tempo de incubação (h) e “L”, tempo de colonização.

Para estimativa da cinética da degradação da fração fibrosa (FDN), foi utilizado o modelo de Mertens & Loften (1980), de acordo com a fórmula: $\hat{Y} = b \times e^{-c \times (T-L)} + I$ quando $t > L$ e $\hat{Y} = b + I$ quando $0 < t < L$, onde “Y” é o resíduo não degradável no tempo T; “b”, a fração potencialmente degradável da fibra (no tempo $t \leq L$, $b = \hat{Y} - I$); “c”, a taxa de degradação de b (h^{-1}); “T”, o período de incubação, em horas; “L”, a latência ou tempode incubação (h); e “I”, a fração indigestível da fibra.

A degradabilidade efetiva ou real das dietas testada em meio contendo levedura ou não, foi calculada pela fórmula: $p = a + [(b \times c) / (c + k) \times e^{-(c+k) \times L}]$ em que “k” é a taxa de passagem (McDonald, 1981), utilizando-se as taxas de passagem de 2 e 5% para o cálculo da degradabilidade efetiva.

Os dados foram interpretados pela análise da variância, comparando-se as médias pelo teste F a 5% de probabilidade, utilizando-se o Statistical Analysis System (SAS, 2002), procedendo-se as comparações dentro de cada dieta contendo diferentes relações concentrado volumoso.

As estimativas para os parâmetros do modelo bicompartimental e para o modelo adotado para a descrição da degradabilidade de matéria seca e fibra em detergente neutro

foram obtidas a partir do uso do método Gauss-Newton, dentro do PROC NLIN, com o auxílio do programa Statistical Analyses System - SAS (SAS, 2002).

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} = valor observado para a variável em estudo referente a k-ésima repetição da combinação do i-ésimo nível do fator A com o j-ésimo nível do fator B; μ = média geral; α_i = efeito do i-ésimo nível do fator A no valor observado Y_{ijk} ; β_j = efeito do j-ésimo nível do fator B no valor observado Y_{ijk} ; $\alpha\beta_{ij}$ = efeito da interação do i-ésimo nível do fator A como o j-ésimo nível do fator B; e_{ijk} = erro associado à observação Y_{ijk} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação ($P > 0,05$) entre a levedura e as dietas para a produção cumulativa de gases, degradabilidade aparente da matéria seca e degradabilidade verdadeira da matéria (Tabela 5).

Tabela 5. Produções cumulativas de gases (PCG), degradabilidade aparente da MS (DAMS) e degradabilidades verdadeiras da MS (DVMS), das dietas com níveis de volumoso com ou sem adição da levedura (LBCM 45).

Item	Níveis de volumoso (%)					Média	EPM ¹
	100	75	50	25	0		
PCG ₄₈ (mL/g)							
Sem	204,48	232,10	243,92	264,39	274,47	243,87b	
Com	217,82	253,77	270,67	282,88	292,06	263,44a	6,17
Média	211,15	242,94	257,30	273,64	283,27		
PCG ₉₆ (mL/g)							
Sem	236,88	259,22	267,75	287,00	297,21	269,61b	
Com	246,94	281,83	295,76	307,00	314,78	289,26a	5,60
Média	241,91	270,53	281,76	297,00	306,00		
DAMS ₄₈ (g/kg)							
Sem	658,33	764,46	804,12	829,18	939,55	799,13	
Com	688,44	689,96	794,99	842,25	934,07	789,94	21,17
Média	673,39	727,21	799,56	835,72	936,81		
DAMS ₉₆ (g/kg)							
Sem	705,64	776,18	831,27	891,6	960,88	833,11	
Com	750,86	749,95	817,22	891,33	965,28	834,93	19,53
Média	728,25	763,07	824,25	891,47	963,08		
DVMS ₄₈ (g/kg)							
Sem	692,74	847,61	845,49	872,48	958,16	843,29	
Com	718,73	753,36	833,80	861,14	962,56	825,92	19,75
Média	705,74	800,49	839,65	866,81	960,36		
DVMS ₉₆ (g/kg)							
Sem	736,52	828,21	877,74	937,91	983,22	872,72	
Com	774,82	820,99	869,97	931,66	985,47	876,58	18,39
Média	755,67	824,60	873,86	934,79	984,35		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%).

Verificou-se significância estatística ($P < 0,05$) para a inclusão da levedura sobre a produção cumulativa de gases às 48 e 96 horas de incubação (Tabela 5), onde a adição da levedura elevou a produção de gases em 19,57 e 19,65 mL nos tempos respectivos.

A técnica de produção de gases *in vitro* vem sendo utilizada como forma de seleção de cepas de leveduras para sua utilização como aditivo na dieta de ruminantes (Marrero et al., 2013). O incremento da produção de gases é utilizado como fator primordial para a escolha das cepas, em razão da elevada correlação entre a produção de gases e a degradação dos carboidratos.

Todavia, apesar de o incremento da produção de gases refletir a elevação da degradação dos carboidratos fibrosos e não fibrosos da dieta, não foi possível verificar a existência de diferenças ($P > 0,05$) para os parâmetros de digestibilidade verdadeira e aparente nas incubações contendo a levedura LBCM 45 e a testemunha.

Também não houve interação ($P > 0,05$) entre a levedura e as dietas para os parâmetros da cinética fermentativa ruminal *in vitro*. Para o parâmetro Vf1 (Tabela 6), que representa a produção de gases originados pelos CNF e para a produção total de gases (Volume total), a adição da levedura promoveu uma elevação ($P < 0,05$) dos gases produzidos em 14,1 e 19,64 mL nos respectivos parâmetros. De forma semelhante, não se verificou influência ($P > 0,05$) da adição da levedura sobre os parâmetros Kd1, L, Vf2 e Kd2.

A elevação da produção de gases pela fração não fibrosa dos carboidratos está em consonância com a característica intrínseca da cepa LBCM 45 em ser altamente eficiente em metabolizar carboidratos de cadeia curta (Araujo, 2013).

Neste particular, esta propriedade da LBCM 45 também é descrita para outras leveduras comerciais usadas como probióticos nas dietas para ruminantes. Elas são capazes de competir avidamente com bactérias glicolíticas pela fermentação dos carboidratos mais solúveis, reduzindo a produção de ácido lático no rúmen e, desta forma, estabilizar o pH ruminal. Esta maior estabilidade do potencial hidrogeniônico favorece a bactérias celulolíticas aumentando assim a degradação da fração fibrosa dos alimentos volumosos no rúmen (Suarez & Guevara, 2018).

Na Tabela 7 observou-se que não houve interação ($P > 0,05$) entre a levedura e níveis de volumoso para a produção de biomassa microbiana (BIO), eficiência de produção da biomassa microbiana (EPB), fator de partição (FP) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Para os parâmetros biomassa microbiana (BIO), eficiência de produção da biomassa microbiana (EPB), fator de partição (FP) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Tabela 7), a adição da levedura promoveu uma redução ($P < 0,05$) na estimativa da Biomassa produzida em 48 e 96 horas, reduzindo ($P < 0,05$) assim também a eficiência da produção da mesma (EPB). Para o fator de partição também houve redução ($P < 0,05$), o que reflete uma menor eficiência fermentativa nos tempos avaliados (48 e 96 horas).

Tabela 6. Estimativas dos parâmetros cinéticos da produção de gases *in vitro* da matéria seca (MS) das dietas com níveis de volumoso com e sem levedura (LBCM 45).

Item	Níveis de volumoso (%)					Média	EPM ¹
	100	75	50	25	0		
Vf1(mL/g)							
Sem	99,14	117,25	111,60	141,50	149,35	123,77b	
Com	94,70	127,00	131,60	159,55	176,50	137,87a	5,73
Média	96,92	122,13	121,60	150,53	162,93		
Kd1(h ⁻¹)							
Sem	0,087	0,093	0,102	0,098	0,102	0,096	
Com	0,098	0,093	0,100	0,087	0,088	0,093	0,002
Média	0,092	0,093	0,101	0,092	0,095		
L (h)							
Sem	7,85	7,94	7,49	7,74	7,77	7,76	
Com	7,41	7,87	7,53	8,10	7,75	7,73	0,06
Média	7,63	7,91	7,51	7,92	7,76		
Vf2(mL/g)							
Sem	130,70	135,15	148,80	139,15	140,65	138,89	
Com	144,65	147,50	156,40	141,35	132,25	144,43	2,15
Média	137,68	141,33	152,60	140,25	136,45		
Kd2 (h ⁻¹)							
Sem	0,023	0,026	0,029	0,028	0,029	0,027	
Com	0,025	0,026	0,029	0,027	0,027	0,027	0,001
Média	0,024	0,026	0,029	0,027	0,028		
Volume total (mL/g)							
Sem	229,84	252,40	260,40	280,65	290,00	262,66b	
Com	239,35	274,50	288,00	300,90	308,75	282,30a	5,66
Média	234,60	263,45	274,20	290,78	299,38		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%);

Vf1: volume máximo de produção de gases da fração CNF; Kd1: taxa de digestão para a fração dos CNF; L: tempo de colonização; Vf2: volume máximo da produção de gases da fração dos CF; Kd2: taxa de digestão para a fração dos CF.

Por outro lado, para a estimativa dos ácidos graxos de cadeia curta houve um aumento na produção dos mesmos ($P < 0,05$) o que reflete uma maior atividade microbiana e menor multiplicação celular dos microrganismos (Blummel et al., 1997).

Assim, em contraponto, a elevação dos ácidos graxos de cadeia curta provavelmente está relacionada ao aumento da atividade fermentativa das bactérias

ruminais (Zhu et al., 2017), em detrimento do seu crescimento, ou seja, multiplicação celular.

Provavelmente, devido aos fatores de crescimento fornecidos pela levedura LBCM 45, que assim como para outras leveduras comerciais usadas como probióticos em dietas para ruminantes, houve um estímulo o aumento da atividade fermentativa bactérias celulolíticas sem ter ocorrido neste intervalo um incremento significativo na população destas.

Tabela 7. Valores médios de biomassa microbiana (BIO), eficiência de produção da biomassa microbiana (EPB), fator de partição (FP) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), das dietas com níveis de volumoso, com e sem levedura (LBCM 45).

Item	Níveis de volumoso (%)					Média	EPM ¹
	100	75	50	25	0		
BIO _{48h} (g/kg)							
Sem	242,88	336,99	308,86	290,82	354,32	306,78a	
Com	239,53	195,07	238,33	238,80	320,03	246,35b	12,29
Média	241,21	266,03	273,60	264,81	337,18		
BIO _{96h} (g/kg)							
Sem	215,38	257,92	288,69	306,51	329,35	279,57a	
Com	231,56	200,97	219,30	256,27	292,96	240,21b	10,09
Média	223,47	229,45	254,00	281,39	311,16		
EPB _{48h} (mg/mg)							
Sem	0,35	0,40	0,36	0,33	0,37	0,36a	
Com	0,33	0,26	0,29	0,28	0,33	0,30b	0,01
Média	0,34	0,33	0,33	0,31	0,35		
EPB _{96h} (mg/mg)							
Sem	0,29	0,31	0,33	0,33	0,34	0,32a	
Com	0,30	0,24	0,25	0,28	0,30	0,27b	0,01
Média	0,30	0,28	0,29	0,31	0,32		
FP _{48h} (mg/mL)							
Sem	3,39	3,66	3,47	3,30	3,49	3,46a	
Com	3,30	2,97	3,08	3,04	3,30	3,12b	0,05
Média	3,35	3,32	3,28	3,17	3,40		
FP _{96h} (mg/mL)							
Sem	3,11	3,20	3,28	3,27	3,31	3,23a	
Com	3,14	2,92	2,94	3,04	3,13	3,03b	0,03
Média	3,13	3,06	3,11	3,16	3,22		
AGCC _{24h} (mmol/g)							
Sem	3,25	3,84	4,11	4,54	4,86	4,12b	
Com	3,50	4,22	4,64	4,82	5,17	4,47a	0,13
Média	3,38	4,03	4,38	4,68	5,02		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%).

Portanto, o aumento da concentração de AGCCs com a suplementação da levedura aponta para a existência da liberação de fatores nutricionais produzidos pela levedura que estimulariam a atividade fermentativa dos microrganismos ruminais em consonância com

outros estudos *in vitro* que documentaram também os efeitos positivos da suplementação com levedura na fermentação do rúmen (Mao et al., 2013).

A resposta variável na produção de AGCC é padrão com suplementação de cultura de fermento é uma consequência do efeito da cultura de fermento no crescimento de diferentes espécies de micróbios do rúmen (Lascano et al., 2009).

Para os parâmetros que descrevem o processo de degradação da matéria seca (Tabela 8) realizados com o auxílio da Incubadora Ruminal e sacos ANKOM® houve interação significativa ($P < 0,05$) entre a levedura e os níveis de volumoso, para os parâmetros taxa de degradação (C) e degradabilidade efetiva a 2 e a 5%.

Tabela 8. Estimativa dos parâmetros cinéticos da degradação aparente da matéria seca (MS) das dietas com níveis de volumoso com e sem levedura (LBCM 45).

Item	Níveis de volumoso (%)					Média	EPM ¹
	100	75	50	25	0		
A (g/kg)							
Sem	293,49	275,61	251,55	227,43	228,64	255,34	
Com	284,85	275,26	245,55	214,82	224,46	248,99	0,62
Média	289,17	275,44	248,55	221,13	226,55		
B (g/kg)							
Sem	491,39	551,60	626,35	692,98	728,67	618,198	
Com	485,77	546,51	624,71	689,93	730,07	615,398	2,00
Média	488,58	549,055	625,53	691,455	729,37		
C (h ⁻¹)							
Sem	0,024a	0,025b	0,028b	0,029b	0,030b	0,027	
Com	0,026a	0,031a	0,038a	0,040a	0,044a	0,036	0,001
Média	0,025	0,028	0,033	0,035	0,037		
Lag Time (h)							
Sem	0,65	0,78	0,41	0,80	0,51	0,63	
Com	1,30	0,66	0,55	1,07	0,48	0,81	0,10
Média	0,98	0,72	0,48	0,94	0,50		
DP (g/kg)							
Sem	784,88	827,20	877,90	920,42	957,31	873,54	
Com	770,62	821,77	870,26	904,75	954,52	864,38	1,43
Média	777,75	824,49	874,08	912,58	955,91		
DE 2%/h (g/kg)							
Sem	559,18a	581,18b	616,19b	639,24b	665,04b	612,17	
Com	558,46a	606,75a	652,78a	674,35a	726,59a	643,79	1,15
Média	558,82	593,965	634,485	656,795	695,815		
DE 5%/h (g/kg)							
Sem	450,94a	458,84b	475,76b	483,66b	501,24b	474,09	
Com	450,80a	483,83a	513,27a	521,42a	566,53a	507,17	0,78
Média	450,87	471,34	494,52	502,54	533,89		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%). A: fração solúvel; B: fração potencialmente degradável; C: taxa de degradação da fração b; DP: degradabilidade potencial; DE: degradabilidade efetiva.

A inclusão da levedura LBCM 45 só não diferiu ($P>0,05$) da testemunha para dieta de 100% de silagem de milho (volumoso) indicando que a eficiência do seu uso está relacionada à presença de quantidades maiores de CNF nas dietas.

A adição da levedura elevou a taxa de degradação e as degradabilidades efetiva a 2 e a 5% de taxas de passagem no rúmen. A inclusão da levedura nestas condições experimentais aparentemente estimulou a atividade ruminal, favorecendo o incremento dos resultados de degradabilidade efetiva das dietas com até 75% de volumoso.

Não houve influencia ($P>0,05$) da adição da levedura nos parâmetros A (fração solúvel), B (fração potencialmente degradável), Lag (tempo de colonização) e DP (degradabilidade Potencial).

Para os parâmetros que descrevem o processo de degradação da fibra em detergente neutro (Tabela 9) não houve interação significativa ($P>0,05$) entre a levedura e os níveis de volumoso. A adição da levedura elevou ($P<0,05$) as degradabilidades efetiva a 2 e a 5% e reduziu ($P<0,05$) o tempo de colonização. A inclusão da levedura nestas condições experimentais estimulou a atividade ruminal, favorecendo o incremento dos resultados de degradabilidade efetivas dietas em todos os níveis.

A inclusão das culturas de leveduras às dietas encontra-se associada a uma redução do tempo de colonização, favorecendo um incremento na taxa de digestão, ou seja, na cinética da fermentação propriamente dita, mas não na extensão da digestão, pelos microrganismos ruminais (Figueiroa et al., 2015). Esta condição de influência positiva da levedura sobre a redução do tempo de colonização sem alteração da taxa ou velocidade na degradação propriamente dita foi também observada no presente trabalho. Neste sentido, tanto para a degradabilidade da matéria seca como para a degradabilidade da fibra em detergente neutro foi possível a quantificação dos efeitos positivos advindos da inclusão da cepa testada (Tabela 5, Tabela 8 e Tabela 9). Assim, para os parâmetros da degradação da matéria seca (Tabela 8) houve variação positiva ($P<0,05$) na taxa de digestão e para os parâmetros da degradação da FDN, a inclusão da levedura LBCM 45 reduziu ($P<0,05$) o tempo de colonização (Tabela 9).

Não houve influencia ($P>0,05$) da adição da levedura nos parâmetros fração indigestível (I), fração potencialmente degradável (B) e taxa de degradação (C).

Tabela 9. Estimativa dos parâmetros cinéticos da degradação da fibra em detergente neutro (FDN) das dietas com níveis de volumoso com e sem leveduras (LBCM 45).

Item	Níveis de volumoso (%)					Média	EPM ¹
	100	75	50	25	0		
I (g/kg)							
Sem	334,40	324,39	283,33	219,59	118,16	255,97	
Com	338,33	319,54	290,69	234,93	121,12	260,92	8,96
Média	336,37	321,97	287,01	227,26	119,64		
B (g/kg)							
Sem	665,60	675,61	716,67	780,41	881,84	744,03	
Com	661,67	680,46	709,31	765,07	878,88	739,08	8,96
Média	663,64	678,04	712,99	772,74	880,36		
C (h ⁻¹)							
Sem	0,0335	0,0301	0,0366	0,0303	0,0241	0,03092	21,00
Com	0,0312	0,0334	0,0297	0,0232	0,0301	0,02950	
Média	0,0324	0,0318	0,0332	0,0268	0,0271		
Lag Time (h)							
Sem	6,66	5,84	8,96	8,56	6,86	7,38a	40,39
Com	4,95	5,72	3,27	2,85	4,79	4,31b	
Média	5,81	5,78	6,12	5,71	5,83		
DE 2%/h (g/kg)							
Sem	287,23	299,36	275,98	300,06	360,12	304,55b	12,83
Com	311,30	312,54	355,80	363,42	417,48	352,11a	
Média	299,27	305,95	315,89	331,74	388,80		
DE 5%/h (g/kg)							
Sem	239,82	253,59	211,21	232,22	296,41	246,65b	18,85
Com	268,38	264,36	322,52	334,09	363,18	310,51a	
Média	254,10	258,98	266,87	283,16	329,80		
DE 8%/h (g/kg)							
Sem	202,11	215,87	161,79	179,76	244,93	200,89b	24,84
Com	231,38	224,20	292,57	307,17	316,36	274,34a	
Média	216,75	220,04	227,18	243,47	280,65		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade;

¹Erro padrão da média (%). A: fração solúvel; B: fração potencialmente degradável; C: taxa de degradação da fração b; DP: degradabilidade potencial; DE: degradabilidade efetiva.

Os resultados obtidos a partir da realização deste experimento indicam que a inclusão da cepa LBCM 45 melhora o processo fermentativo ruminal e a ação dos microrganismos sobre a digestibilidade da matéria seca e da fibra. De forma semelhante, vários autores encontram resultados similares quando usaram a técnica de produção de gases para avaliar o comportamento de levedura em diferentes substratos (Elghandour et al. 2014a, b, 2015; Galindo et al., 2010).

CONCLUSÕES

A inclusão da cepa LBCM 45 promove melhora das condições ruminais *in vitro* para as dietas avaliadas, demonstrando seu potencial para modificar favoravelmente o ambiente, favorecendo a eficácia do processo fermentativo ruminal.

REFERÊNCIAS

ANKOM TECHNOLOGY - *In Vitro* True Digestibility using the DAISY II Incubator [on line], 2010. Disponível em < [http:// www.ankom.com](http://www.ankom.com)> Acesso em 12 de outubro de 2015.

ARAÚJO, T. M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas.** 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

BARBOSA, F. A.; FARIA, G. A.; VILELA, H. Leveduras vivas na alimentação de bovinos. **Bioscience Journal**, 2004; 20(1):143-150.

BLUMMEL, M.; MGOMEZULU, R.; CHEN, X.B.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K.; ØRSKOV, E. R. The modification of an *in vitro* gas production test to detect roughage related differences *in vivo* microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. **Journal of Agricultural Science**, v. 133, p.335-340, 1999.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Nutrition**, v. 77 n. 1, p. 24-34,1997.

DE ONDARZA, M.B., SNIFFEN, C.J., DUSSERT, L., CHEVAUX, E., SULLIVAN, J. Live yeast aids rumen function, milk yield. **Feedstuffs**. 83:24, 2011.

DETMANN, E.; SILVA, T.E.; VALADARES FILHO, S.C.; SAMPAIO, C.B.; PALMA, M.N.N. **Predição do valor energético de dietas para bovinos a partir da composição química dos alimentos.** In: VALADARES FILHO, S.C. et al. 2016. Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados – BR CORTE. 3. ed. UFV, Suprema Gráfica Ltda: Viçosa. pp. 89-126.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. . **Métodos para Análise de Alimentos** - INCT - Ciência Animal. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO. S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and dietas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.980-984, 2010.

ELGHANDOUR, M. M., SALEM, A. Z., CASTAÑEDA, J. S. M., CAMACHO, L. M., KHOLIF, A. E., & CHAGOYÁN, J. C. V. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 3, p. 526-533, 2015.

ELGHANDOUR, M. M.; CHAGOYÁN, J. C. V., SALEM, A. Z., KHOLIF, A. E., CASTAÑEDA, J. S. M., CAMACHO, L. M., CERRILLO-SOTO, M. A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 2, p. 3075, 2014a.

ELGHANDOUR, M. M.; CHAGOYÁN, J. C. V., SALEM, A. Z., KHOLIF, A. E., CASTAÑEDA, J. S. M., CAMACHO, L. M., & BUENDÍA, G. *In vitro* fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 619-625, 2014b.

ENJALBERT, F., GARRETT, J.E., MONCOULON, R., BAYOURTHE, C., & CHICOTEAU, P. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. **Animal FeedSci. Tech.** 76:195, 1999.

FIGUEIREDO, M. P.; MAURICIO, R. M.; PEREIRA, L. G. R. et al. Determinação entre pressão e volume através da fermentação da raiz de mandioca tratada com uréia, feno de tifton 85 e silagem de milho para a instalação da técnica *in vitro* de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria. 2003. (CD-ROM).

FIGUEIROA, F.J.F., BRANCO, A.F., BARRETO, J.C., CARVALHO, S.T., GRANZOTTO, F., OLIVEIRA, M. V. M., GOES, R. H. T. B. Cultura de leveduras na digestibilidade *in vitro* de dietas com diferentes proporções de volumosos. **Ciência Animal Brasileira[online]**. vol.16, n.2, pp.169-178, 2015.

FONTY, G.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. **Biologia**, v.61, n.6, p.741-750, 2006.

FULLER, R. A. Review. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, 66(5):365-378, 1989.

GALINDO, J.; MARRERO, Y., GONZÁLEZ, N., SOSA, A., MIRANDA, A. L., ALDANA, A. I., MOREIRA, O., BOCOURT, R., DELGADO, D., TORRES, V., SARDUY, L., NODA, A. Effect of preparations with the viable yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and LEVICA-25 on methanogens and *in vitro* ruminal methanogenesis. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 44, n. 3, p. 267-272, 2010.

GETACHEW, G.; MAKERS, H.P.S.; BECKER, K. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **Journal of Agricultural Science**, vol. 139, p. 341-352. 2002.

GOERING, N.K.; VAN SOEST, P. **Forage fiber analysis**: apparatus, reagents, procedures and some applications. Washington: USDA, 1970. 20p.

GRINGS E.E.; BLUMMEL, M.; SUDEKUM, K.H. Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage based diets. **Animal Feed Science and Technology**,v 123, p. 527-545. 2005.

LASCANO, G. J.; HEINRICH, A. J. Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. **Livestock Science**, v. 124, n. 1, p. 48-57, 2009.

MARRERO, Y., BURROLA-BARRAZA, M. E., CASTILLO, Y., BASSO, L. C., ROSA, C. A., RUIZ, O., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, E. Identification of Levica yeasts as a

potential ruminal microbial additive. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, n. 58, p. 460-469, 2013.

MAO HL, MAO HL, WANG JK, LIU JX, YOON I. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on *in vitro* fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets. **Journal of Animal Science**. 91:3291-3298, 2013.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gases production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

McDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.96, p.251-252, 1981.

MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.

MITSUMORI, M.; SUN, W. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.21, n.1, p.144-154, 2008.

MOSONI, P.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; BERA-MAILLET, C.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: Effect of a yeast additive. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.6, p.2676-2685, 2007.

NEWBOLD, C.J., MCINTOSH, F.M., WALLACE R.J. Mode of action of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**. 76:249, 1996.

NEWBOLD, C. J. WALLACE, R. J., CHEN, X. B., MCINTOSH, F. M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 6, p. 1811-1818, 1995.

SAS, **Statistical Analysis System**. Software, version 9.1.3 Cary: SAS Institute, 2002.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2980-2991, 1994.

SUAREZ, C.; GUEVARA, C.A. Probiotic Use of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in Animal Feed. **Research Journal of Zoology**. 1:1. 2018

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B. A simple gas production method using a pressure transducer to determine fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, v.48, p.185-197, 1994.

THRUNE, M.; BACH, A.; RUIZ-MORENO, M.; STERN, M. D.; LINN, J. G. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows Yeast supplementation on rumen fermentation. **Livestock Science**, 124(1-3):261–265, 2009.

ZEOULA, L. M; BELEZE, J. R. F; MAEDA, E. M; SIMIONI, F. L; GERON, L. J. V; RIGOLON, L. P. Levedura ou monensina na dieta de bovinos e bubalinos sobre a fermentação ruminal e eficiência microbiana. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 33(4):379-386, 2011.

ZHU, W.; WEI, Z.H.; XU, N.Y.; YANG, F.; YOON, I.; CHUNG, Y.H.; LIU, J.X.; WANG, J.K. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on performance and rumen fermentation and microbiota in dairy cows fed a diet containing low quality forage. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 36, 2017.

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo permitem inferir que tanto inclusão das cepas e a dose utilizada apresentam resultados distintos no processo de digestibilidade ruminal *in vitro*, onde o nível de inclusão de 0,4 g de MS/L da cepa LBCM 45 promove melhora das condições ruminais *in vitro* das dietas avaliadas, demonstrando seu potencial para modificar favoravelmente o ambiente ruminal. Mais estudos devem ser feitos *in vivo* para ratificar seu potencial como aditivo para ruminantes.