

CULTURA DE LEVEDURAS NA DIGESTIBILIDADE *in vitro* DE DIETAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSOS

YEASTS ON in vitro DIGESTIBILITY OF DIETS WITH DIFFERENT LEVELS OF ROUGHAGE

Fabio José Ferreira Figueiroa¹

Antonio Ferriani Branco²

Julio Cesar Barreto³

Silvana Teixeira Carvalho⁴

Fernanda Granzotto⁵

Marcus Vinicius Moraes de Oliveira⁶

Rafael Henrique Tonissi Buschinelli de Goes⁷

¹Mestre em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

²Professor do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

³Doutor em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

⁴Professora da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

⁵Professora do Instituto de Biodiversidade e Florestas, da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil. ⁶Professor da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil.

⁷Professor da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil. rafaelgoes@ufgd.edu.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de *Saccharomyces cerevisiae* nos níveis 0; 0,2; 0,4 e 0,6 g/L, sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), proteína bruta (DIVPB) e fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo, na MS, 100, 75, 50 e 25% de capim *coast-cross*. O delineamento foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial 4x4. O líquido ruminal foi coletado de um bovino canulado e os alimentos foram incubados por meio da técnica dos dois estágios (48 horas + 24 horas), utilizando-se o rúmen artificial. Os dados foram interpretados por análise de variância e estudos de regressão. A elevação da levedura proporcionou aumentos nas DIVMS, DIVPB e DIVFDN em todos os tratamentos, com exceção do nível de 0,6 g/L nas dietas contendo 100, 75 e 50% de volumoso para DIVMS e DIVFDN, e 100 e 75% para DIVPB, as quais apresentaram comportamento quadrático. Concluiu-se que, nas dietas com proporção de volumoso igual ou superior a 50%, a digestibilidade pode ser melhorada com a utilização de levedura até o nível de 0,4 g/L. Nas dietas com mais de 50% de concentrado, a melhora na digestibilidade ocorre linearmente com a elevação do nível de levedura.

Palavras-chave: aditivos; bovino; probióticos; rúmen; ruminantes.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* at levels 0; 0.2; 0.4 and 0.6 g/L on the *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM), crude protein (IVDCP) and neutral detergent fiber (IVDADF) in diets containing, in DM, 100, 75, 50 and 25% *Cynodon dactylon* grass. The experimental design was completely randomized with 4x4 factorial scheme. The rumen fluid was collected from a cannulated cattle and food were incubated by two stages technique (48 hours + 24 hours), in artificial rumen. The data were interpreted by analysis of variance and regression studies. The elevation of the yeast has provided increases in IVDDM, IVDCP and IVDADF in all treatments, except at the level of 0.6 g/L in the diets containing 100, 75 and 50% roughage for IVDDM and IVDADF, and 100 and 75% for IVDCP, which presented quadratic behavior. We concluded that in diets with proportion of roughage equal or above 50%, the digestibility can be improved with the use of yeast to the level of 0.4 g/L. In diets with more than 50% of concentrate the improvement in digestibility occurs linearly with increasing levels of yeast.

Keywords: addictive; bovine; probiotic; rumen; ruminants.

Recebido em 14 dezembro 2011.

Aceito em 03 fevereiro 2014.

Introdução

Devido a imposições da União Européia na alimentação animal, restringindo o uso de hormônios e substâncias antimicrobianas, como os ionóforos⁽¹⁾, a busca por aditivos alternativos eficazes tem se intensificado. Nesse sentido, a utilização de probióticos (microrganismos vivos) tem se acentuado, em especial por afetarem benéficamente o hospedeiro melhorando o balanço microbiano no rúmen⁽²⁾ e, conseqüentemente, a eficiência alimentar⁽³⁾ e o desempenho dos animais^(4,5).

As leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, são fungos que desempenham um papel fundamental na digestão de fibras⁽⁶⁾, pois estão envolvidas na colonização inicial das partículas do alimento, facilitando o acesso das bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas às frações menos lignificadas. Além disso, as leveduras utilizam o oxigênio residual⁽⁷⁾, estabilizam o pH ruminal⁽⁸⁾ e proporcionam condições ideais para o desenvolvimento da microflora fibrolítica^(9,10). Callaway e Matin⁽¹¹⁾ ressaltam que a cultura de leveduras também fornece fatores de crescimento, como os ácidos orgânicos fumarato e malato; as vitaminas do complexo B e o ácido para-aminobenzóico (PABA), que estimulam o crescimento das bactérias ruminais que utilizam a celulose.

Deste modo, a adição de leveduras na dieta de ruminantes promove aumento na população dos microrganismos celulolíticos e melhora a degradabilidade da fração fibrosa⁽¹⁰⁾. Todavia, são necessários estudos para se determinar as possíveis interações existentes entre a quantidade do aditivo em relação ao tipo de dieta.

Como os trabalhos conduzidos através de procedimentos *in vivo* são de alto custo e demandam muito tempo, as técnicas de digestibilidade *in vitro* tornam-se uma excelente alternativa para auxiliar na reprodução dos eventos que ocorrem no animal; com a vantagem do controle do processo, além de permitir um maior número de repetições nas avaliações. Desse modo, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição de leveduras sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), da

proteína bruta (DIVPB) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi e no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal, pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), da proteína bruta (DIVPB) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) foi efetuada utilizando-se a técnica descrita por Tilley e Terry⁽¹²⁾ adaptada a um rúmen artificial desenvolvido pela ANKON[®], conforme descrito por Holden⁽¹³⁾.

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4, com 4 níveis de inclusão de *Saccharomyces cerevisiae* (0; 0,2; 0,4 e 0,6 g/L) e 4 diferentes relações de volumoso e concentrado, sendo as proporções de volumoso da dieta (100, 75, 50 e 25%) determinadas na base da matéria seca.

A cultura de levedura utilizada continha cepas vivas e viáveis da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Biosaf[®], SafAgri), contendo 10 bilhões de unidades formadoras de colônias/grama do produto (UFC/g).

O volumoso utilizado foi o feno de capim *coast-cross* (*Cynodon dactylon*). A ração concentrada era composta de grão de milho (85%) e farelo de soja (15%) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos e das dietas, expressos na MS

Variáveis	MS (%)	PB (%)	FDN (%)
Grão de milho	90,24	9,03	10,21
Farelo de soja	90,23	50,45	12,85
Feno de <i>coast-cross</i>	93,27	9,04	77,56
Dietas			
100% Feno	93,27	9,04	77,56
75% Feno e 25% Ração	92,68	10,68	60,94
50% Feno e 50% Ração	92,15	12,00	44,47
25% Feno e 75% Ração	92,69	13,58	30,04

Tabela 2: Composição percentual dos ingredientes utilizados na confecção das dietas 100F (100% feno), 75F (75% feno e 25% ração), 50F (50% feno e 50% ração) e 25F (25% feno e 75% ração), expressos na matéria seca

Alimentos	Dietas - % ¹			
	100F	75F	50F	25F
Grão de milho	-	21,25	42,50	63,75
Farelo de soja	-	3,75	7,50	11,25
Feno de <i>coast-cross</i>	100,00	75,00	50,00	25,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Adição de 0; 0,2; 0,4 e 0,6 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O líquido ruminal foi obtido de um bovino leiteiro canulado no rúmen e alimentado com dieta

composta, na matéria seca, por 70% de silagem de milho e 30% de ração concentrada, elaborada com 50% de grão de milho triturado, 35% farelo de soja, 10% de farelo de trigo e 0,5% de suplemento vitamínico-mineral (Lactobovi®).

As coletas do líquido foram realizadas com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada a uma mangueira, que foi introduzida no rúmen entre a fase sólida e líquida, respeitando-se a proporção de 50% entre o material da fase sólida e da líquida. Depois de realizada a coleta, o líquido ruminal foi armazenado em garrafa térmica, previamente aquecida com água quente a uma temperatura de 39 °C, saturada com CO₂ e imediatamente enviada ao laboratório de nutrição animal.

No laboratório, o líquido ruminal foi homogeneizado, durante 30 segundos, com o uso de um liquidificador pré-aquecido em banho-maria a 39 °C, com adição de CO₂, sendo, em seguida, coado num recipiente com adição de CO₂. Logo após, 400 mL desse líquido ruminal foram transferidos para jarros próprios do fermentador ruminal DAISY, para se realizar a determinação da digestibilidade *in vitro*. Em seguida, foram adicionados 1.600 mL de solução tampão, 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 uréia, 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.

As amostras das dietas 100F (100% de feno), 75F (75% de feno e 25% de ração), 50F (50% de feno e 50% de ração) e 25F (25% de feno e 75% de ração) foram moídas em peneira de crivo de 1mm, e uma alíquota de 0,25 g foi introduzida no interior de saquinhos de TNT (100 g/cm²) de tamanho de 5x5 cm, sendo identificados com tinta nanquim.

As incubações dos alimentos no fermentador ruminal DAISY foram realizadas em quatro etapas, em função da concentração de levedura, utilizando-se 20 repetições para cada proporção de volumoso e mais 4 brancos por incubação, num total de 96 amostras em cada etapa; totalizando, assim, 384 saquinhos incubados.

Em cada etapa, o material permaneceu incubado por 48 horas e, ao final desse período, iniciou-se o segundo estágio do método, com a adição, em cada jarro, de 30 mL de ácido clorídrico a 6 N e 8 g de pepsina, na concentração de 1:10.000, dissolvida em 34 mL de água destilada à 35 °C; reduzindo-se, assim, o pH para 2 a 3,5. A temperatura foi mantida a 39 °C e as amostras permaneceram incubadas por mais 24 horas.

Ao término desse período, os jarros foram drenados e os sacos lavados de 5 a 6 vezes com água destilada, no próprio jarro fermentador. O gás contido nos saquinhos foi removido com delicada pressão das mãos sobre os mesmos. Em seguida os saquinhos foram colocados em estufa a 105 °C, onde permaneceram por 8 horas.

Para as determinações da matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), foram utilizadas as metodologias descritas pela AOAC⁽¹⁴⁾, enquanto as análises de fibra em detergente neutro (FDN) foram realizadas segundo metodologia descrita por Van Soest et al.⁽¹⁵⁾. Já as digestibilidades *in vitro* da matéria seca (DIVMS), da fibra em detergente neutro (DIVFDN) e da proteína bruta (DIVPB) foram calculadas pela diferença entre a quantidade incubada e o resíduo que ficou após a incubação, através da equação: DIV nutrientes (%) = ((nutriente no alimento inicial x nutriente residual) / nutriente alimento inicial) x 100.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, sendo

adotado o modelo: $Y_{ijk} = \mu + A_i + C_j + AC_{ij} + e_{ijk}$, em que: Y_{ijk} = é o valor referente a dieta i , na quantidade de *Saccharomyces cerevisiae* j , e repetição k ; A_i = efeito da dieta i , $i = 1, 2, 3$ e 4 ; C_j = efeito da quantidade de *Saccharomyces cerevisiae* j , $j = 1, 2, 3$ e 4 ; AC_{ij} = efeito da interação dieta i e quantidade de *Saccharomyces cerevisiae* j ; e E_{ijk} = erro experimental, associado a cada observação Y_{ijk} . Os dados foram interpretados por análise de variância e estudos de regressão, utilizando-se o pacote *Statistical Analysis System (SAS)*.

Resultados e Discussão

Ocorreu interação significativa ($P < 0,05$) para a adição de levedura e a proporção de volumoso na dieta. A adição de levedura proporcionou aumentos na digestibilidade dos nutrientes avaliados para as dietas com 100, 75 e 50% de volumoso, com exceção para o nível de 0,6 g para DIVMS, DIVPB e DIVFDN (Tabela 3).

Tabela 3: Valores médios das digestibilidades *in vitro* da matéria seca (DIVMS), proteína bruta (DIVPB) e fibra em detergente neutro (DIVFDN) das dietas, em função dos níveis de *Saccharomyces cerevisiae*

Variáveis	Níveis de Levedura – g/L				Média	CV	P ≤
	0	0,2	0,4	0,6			
<i>DIVMS</i>							
100F	47,22Db	48,29Db	50,96Da	45,86Dc	48,08	11,28	0,0847
75F	56,81Cb	60,81Ca	56,34Cb	53,63Cc	59,15	6,63	0,0000
50F	73,41Bab	74,23Bab	75,83Ba	72,58Bb	74,01	2,03	0,0000
25F	84,75Ab	85,72Aa	86,22Aa	87,33Aa	86,01	0,65	0,0000
<i>DIVPB</i>							
100F	66,14Dd	78,84Da	76,39Dc	77,53Db	74,73	1,30	0,0006
75F	81,35Cb	84,28Ca	84,45Ca	78,90Cc	82,25	0,56	0,0007
50F	90,17Bc	91,71Bb	92,10Bab	92,77Ba	91,69	0,61	0,0398
25F	93,93Ac	95,24Ab	95,49Aab	96,38Aa	95,26	0,63	0,0641
<i>DIVFDN</i>							
100F	40,03Bb	42,44Cab	45,26Ca	36,78Cc	41,13	0,99	0,0001
75F	38,97Cb	43,99Ca	37,98Db	32,11Dc	38,27	0,91	0,0000
50F	42,12Bc	49,49Bab	51,49Ba	47,82Bb	47,74	8,18	0,0239
25F	55,24Ac	56,09Abc	58,70Ab	62,98Aa	58,26	3,37	0,0539

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

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

As digestibilidades das dietas com as proporções de volumoso de 100F; 75F e 50F apresentaram comportamento quadrático com acréscimos na digestibilidade em até 0,4 g/L; os valores para 0,6 g/L apresentaram redução média de 3,17%. Para a dieta com 25% de feno, a digestibilidade apresentou efeito linear (Figura 1). Segundo Robinson e Erasmus⁽¹⁰⁾, os efeitos da utilização de leveduras são altamente dependentes da dose e da dieta fornecida.

A DIVMS aumentou com a elevação dos níveis de concentrado na dieta, independente do nível de levedura adicionado (Figura 1). Lascano et al.⁽¹⁶⁾ 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, ou seja, a adição de levedura proporcionou aumento na DIVMS de forma mais efetiva nas dietas com maior proporção de volumoso (principalmente 75F), até o nível de 0,4 g/L (Figura 1). Yoon e Stern⁽¹⁷⁾ associaram aumentos da digestibilidade da MS à elevação da digestibilidade da matéria orgânica, o que, em parte, pode ser explicado pela digestão e utilização do amido ou açúcares simples presentes na dieta, que são facilmente fermentáveis e possibilitam maior digestibilidade da matéria orgânica⁽¹⁸⁾.

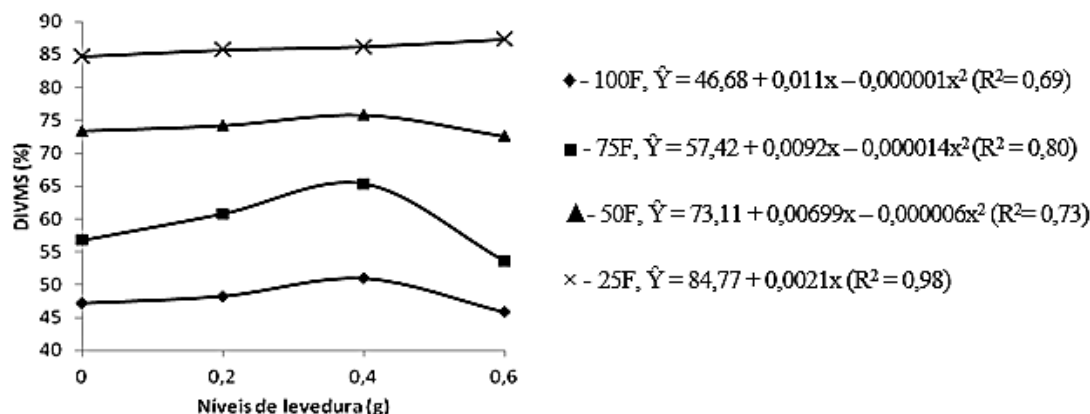


Figura 1: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de dietas contendo 100% de feno (100F), 75% de feno e 25% de ração (75F), 50% de feno e 50% de ração (50F) e 25% de feno e 75% de ração (25F) em função dos níveis de *Saccharomyces cerevisiae*.

Callaway e Martin⁽¹¹⁾ encontraram maiores efeitos da inclusão de *Saccharomyces cerevisiae* para dietas com maior proporção de concentrados sobre o desenvolvimento de bactérias ruminais, com aumento na taxa de degradação da celulose. Lila et al.⁽¹⁹⁾ encontraram aumento linear na DIVMS, para dietas com proporção 60,5% de volumoso e 30,5% de concentrado, à medida que se aumentaram as concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* de 0; 0,33; 0,66 e 1,32 g/L.

O aumento da digestibilidade da matéria seca pela inclusão de levedura em até 0,4 g/L para as dietas pode ser explicada pelas alterações nos padrões de fermentação ruminal. De acordo com Robinson e Erasmus⁽¹⁰⁾, Goes et al.⁽⁶⁾ e Lila et al.⁽¹⁹⁾, 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.⁽¹⁹⁾ relataram aumento linear do número total de bactérias e de bactérias celulolíticas, com a adição de leveduras, o que estimularia a degradação da celulose. Como a cultura de levedura é associada com uma redução do *lag time*, espera-se aumento na taxa de digestão, mas não na extensão da digestão, pelos microrganismos ruminais.

Entretanto, Lynch e Martin⁽²⁰⁾ avaliaram os efeitos da adição da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (0,35 ou 0,73 g/L) sobre a fermentação ruminal de milho moído, feno de alfafa e feno de capim bermuda e não encontraram efeito significativo sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), sendo que a concentração de 0,73 g/L reduziu as concentrações de lactato, o que pode explicar os valores obtidos neste trabalho para as concentrações de 0,4 g/L.

Chaucheyras-Duran et al.⁽²¹⁾ investigaram o efeito da adição de leveduras na dieta e concluíram que a mesma foi capaz de alterar o balanço microbiano e preservar a população celulolítica para dietas

contendo elevadas quantidades de carboidratos rapidamente fermentados no rúmen; possivelmente devido à afinidade aeróbia melhorando o ambiente ruminal pela remoção do oxigênio do meio. A adição de levedura influenciou significativamente ($P < 0,05$) a digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) para todas as dietas (Figura 2).

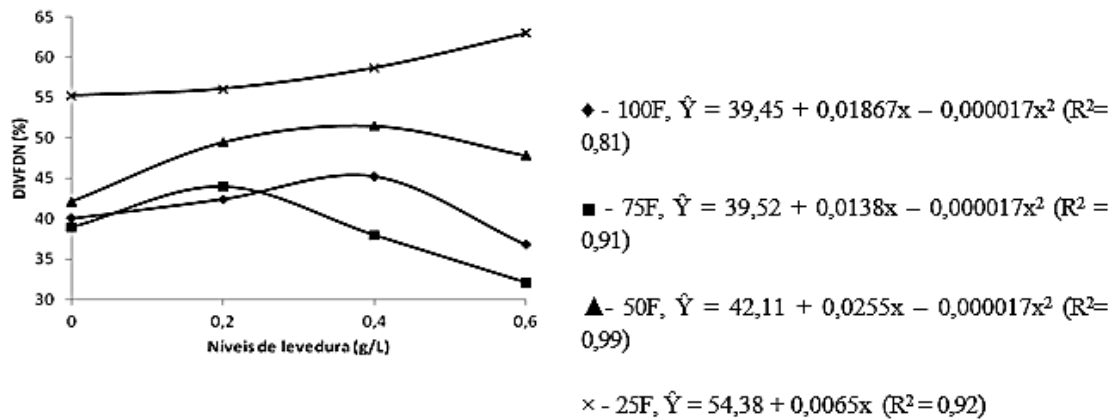


Figura 2: Digestibilidade *in vitro* da FDN (DIVFDN) de dietas contendo 100% de feno (100F), 75% de feno e 25% de ração (75F), 50% de feno e 50% de ração (50F) e 25% de feno e 75% de ração (25F) em função dos níveis de *Saccharomyces cerevisiae*.

O maior efeito na DIVFDN de 22% para o nível 0,4g/L ocorreu na dieta 50F (aumento), enquanto as demais dietas apresentaram elevações semelhantes na digestibilidade (13,0; 12,9 e 14,0% para os níveis 0,4; 0,2 e 0,6 g/L, nas dietas 100F, 75F e 25F, respectivamente). A maior digestão da fração fibrosa pode ser decorrente da utilização do amido, presente na dieta, e da remoção de substratos facilmente fermentáveis do meio que provocam aumento na digestibilidade da fibra^(16, 22).

O aumento da digestão da fração fibrosa em animais alimentados com leveduras na dieta pode ser decorrente do aumento do número total de bactérias ruminais que melhorariam a degradação da fibra e o fluxo de proteína microbiana ruminal^(19, 10). A adição de leveduras maximizaria a degradação da fibra associada à estimulação da atividade bacteriana, sem alterar a ação dos fungos e dos protozoários^(23, 19).

A digestibilidade *in vitro* da proteína bruta (DIVPB) foi influenciada significativamente pela adição de levedura para as proporções de volumosos de 100, 75, 50 e 25F ($P < 0,05$). As equações de regressão para a digestibilidade *in vitro* da proteína bruta (DIVPB) são apresentadas na Figura 3.

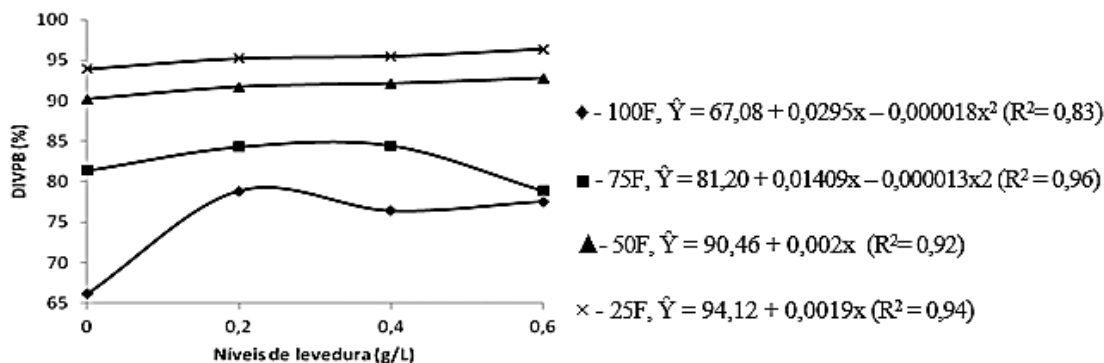


Figura 3: Digestibilidade *in vitro* da proteína bruta (DIVPB) de dietas contendo 100% de feno (100F), 75% de feno e 25% de ração (75F), 50% de feno e 50% de ração (50F) e 25% de feno e 75% de ração (25F) em função dos níveis de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para todos os níveis de leveduras estudados, as dietas com maiores proporções de concentrado apresentaram as maiores digestibilidades. À medida que se aumentou o concentrado na dieta, ocorreu incremento médio de 27,51% para o tratamento 25F em comparação ao tratamento 100F.

Barbosa et al.⁽⁵⁾ destacaram que em ensaios *in vitro* a adição de leveduras proporciona aumento da atividade de bactérias proteolíticas, bem como da concentração de nitrogênio amoniacal, o que pode ter favorecido a maior digestibilidade da proteína (Figura 3).

Wiedmeier et al.⁽²⁴⁾, estudando vacas leiteiras gestantes e lactantes, recebendo dietas com 50% de concentrado, testaram os efeitos da cultura de leveduras sobre a digestibilidade ruminal e encontraram efeito significativo sobre a digestibilidade da proteína bruta com a adição de 90g/dia. Erasmus et al.⁽²⁵⁾, estudando vacas em lactação, que recebiam 2 dietas, com adição de levedura (10 g/dia) e sem adição de leveduras, também relataram um aumento significativo na digestibilidade da proteína bruta. Pereira et al.⁽²⁶⁾ observaram que a suplementação de leveduras não influenciou os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes, inclusive da proteína bruta de novilhos holandês-zebu, recebendo dietas a base de cana-de-açúcar, constituídas por dois níveis de leveduras, 0 e 10g/dia. Resultado semelhante quanto à adição de leveduras sobre digestibilidade dos nutrientes também foi relatado por Lila et al.⁽¹⁹⁾.

Goes et al.⁽⁶⁾, revisando diversos trabalhos sobre a adição de levedura em ruminantes, destacaram que as concentrações de NH_3 são reduzidas em dietas com leveduras, o que pode ser devido à maior incorporação deste pelas bactérias ruminais, para síntese de proteína microbiana, o que, por sua vez, gerou um aumento do fluxo de N não-amoniacal e também do fluxo de N microbiano.

Conclusões

A inclusão de níveis crescentes de concentrado elevou a digestibilidade *in vitro* de nutrientes. A adição de leveduras melhorou a digestibilidade *in vitro* de nutrientes para os níveis mais elevados de concentrado.

Referências

01. Thrune, M.; Bach, A.; Ruiz-Moreno, M.; Stern, MD.; Linn, JG. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livestock Science*, 2009; 124(1-3):261–265.
02. Fuller, RA. Review. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989;66(5):365-378.
03. Zeoula, LM; Beleze, JRF; Maeda, EM; Simioni, FL; Geron, LJV; Rigolon, LP. Levedura ou monensina na dieta de bovinos e bubalinos sobre a fermentação ruminal e eficiência microbiana. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 2011; 33(4):379-386.
04. Galvao, KN; Santos, JE; Coscioni, A; Villasenor, M; Sischo, WM; Berge, AC. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction Nutrition Development*, 2005; 45(4):427–440.
05. Barbosa, FA; Faria, GA; Vilela, H. Leveduras vivas na alimentação de bovinos. *Bioscience Journal*, 2004; 20(1):143-150.
06. Goes, RHTB; Alves, DD; Valadares Filho, SC; Marson, EP. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: Revisão. *Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da Unipar*, 2005; 8(1):47-56.
07. Newbold, Cj; Wallace, RJ; McInstosh, FM. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 1996; 76(2):249-261.
08. Dawson, KA; Hopkins, DM. Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*, 1991; 69(Suppl. 1):531.
09. Guedes, CM; Gonçalves, D; Rodrigues, MAM; Dias-Da-Silva, A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Animal Feed Science and Technology*, 2008; 145(1-4):27-40.
10. Robinson, PH; Erasmus, LJ. 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.
11. Callaway, ES; Martin, SA. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science*, 1997; 80(9):2035-2044.
12. Tilley, JMA.; Terry, RA. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 1963; 18(2):104-111.
13. Holden, LA. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, 1999; 82(8):1791-1794.
14. Association of Official Analytic Chemists-AOAC. *Official Methods of Analysis*. 15 ed. Arlington, V.A., 1990. 1422 p. <http://www.eoma.aoac.org/>.
15. Van Soest, PJ; Robertson, JB; Lewis, BA. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 1991; 74(10):3583-3597.
16. Lascano, GJ; Zanton, GI; Suarez-Mena, FX; Heinrichs, AJ. 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.

17. Yoon, IK; Stern, MD. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *Journal Dairy Science*, 1996; 79(3):411–417.
18. Carro, MD; Lebzien, P; Rohr, K. Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage based diet. *Livestock Production Science*, 1992; 32(3):219-229.
19. Lila, ZA; 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*, 2004; 82(6):1847-1854.
20. Lynch, HA; Martin, SA. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Dairy Science*, 2002; 85(10):2603-2608.
21. Chaucheyras-Durand, F; Walker, ND; Bach, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 2008; 145(1-4):5-26.
22. Gomes, RC; Antunes, MT; Nogueira Filho, JCM; Ítavo, LCV; Leme, PR. Leveduras vivas e monensina em dietas de alto concentrado para bovinos: parâmetros ruminais e degradabilidade “*in situ*”. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2010; 11(1):202-216.
23. Beharka, AA; Nagaraja, TG. Effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm®) on *in vitro* fiber degradation. *Journal Dairy Science*, 1993; 76(3):812-818.
24. Wiedmeier, RD; Arambel, MJ; Walters, JL. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, 1987; 70(10):2063-2068.
25. Erasmus, LJ; Botha, PM; Kistner, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1992; 75(11):3056-3065.
26. Pereira, ES; Queiroz, AC; Paulino, MF; Cecon, PR; Valadares Filho, SC; Miranda, LF; Arruda, AMV; Fernandes, AM; Cabral, LS. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: Consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2001; 30(2):563-572.