

Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas, v.7,n.1- 2013

Centro de Ciências Agrarias e Ambientais-Universidade Federal do Maranhão, MA.

ISSN 1982-4831

Potencial de enzimas fibrolíticas sobre a digestibilidade ruminal do feno de Tifton 85¹

Cristine dos Santos Settimi Cysneiros², Reginaldo Nassar Ferreira², Emmanuel Arnhold³, Cirano José Ulhoa²

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um complexo multienzimático (CM) de enzimas fibrolíticas, produzido pelo fungo *Humicola grisea*, sobre a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS) do feno de Tifton 85. Os tratamentos testados foram: T controle (10 mL de água destilada); Nível 1 (2,5 mL de enzimas); Nível 2 (5,0 mL de enzimas) e Nível 3 (10 mL de enzimas). Para cada tratamento, o CM foi aplicado por aspersão em 17 g do feno (1 mm). Para determinação da DVIVMS, utilizou-se a metodologia adaptada para o rúmen artificial, durante os períodos de 12; 24; 48 e 96 h de incubação, a 39 °C. O experimento foi instalado em blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas 4 x 4. Os blocos (repetições) foram constituídos de quatro rúmens. As parcelas foram constituídas do feno de Tifton tratado com quatro diferentes níveis de enzimas e as subparcelas por quatro momentos de digestão. Houve interação entre nível de enzimas e período de incubação ruminal. Os níveis de 2,5; 5,0 e 10 mL de enzimas melhoraram a DVIVMS do feno de Tifton 85. No entanto, verificaram-se maiores efeitos com adição de 10 mL, obtendo-se aumentos de 18,51; 17,17; 13,59 e 20,93% com 12; 24; 48 e 96 horas de incubação.

Palavras-chave: ankom, bovino, celulase, fungo, xilanase.

Potential of fibrolytic enzymes on ruminal digestibility of Tifton 85 hay

Abstract - The objective of this study was evaluated the effect of a multienzymatic complex (MC) of fibrolytic enzymes, produced by the fungus *Humicola grisea*, on the *in vitro* true digestibility of dry matter (IVTDMD) of Tifton 85 hay. The treatments were: control T (10 mL of distilled water), level 1(2.5 mL of enzyme), level 2 (5.0 mL of enzyme) and level 3 (10.0 ml of enzyme). For each treatment, the MC was applied by spraying in 17 g of hay (1mm). The IVTDMD was obtained using the adapted technique for the artificial rumen for 12; 24; 48 and 96 h of incubation at 39 °C. The experiment was conducted in a randomized block design with four replications in a split plot 4 x 4. The blocks (replications) were four rúmens. The plots consisted of Tifton 85 hay treated with four different levels of enzymes and the subplots of four periods of digestion. There was interaction between enzyme level and period of incubation. The levels of 2.5, 5.0 and 10 mL of enzyme improved DVIVMS Tifton 85 hay. However, there were larger effects with the addition of 10 mL, resulting in increases of 18.51; 17.17; 13.59 and 20.93% with 12; 24; 48 and 96 hours of incubation.

Key words: ankom, bovine, cellulase, fungi, xylanase.

INTRODUÇÃO

Pesquisas têm demonstrado que o uso de enzimas fibrolíticas em dietas de vacas leiteiras e gado de corte têm potencial para melhorar a utilização da ração e o desempenho animal. Os aditivos enzimáticos para alimentação de ruminantes, principalmente xilanase e celulases, são extratos concentrados, resultantes de fermentações bacterianas ou fúngicas.

Melhoras no desempenho de bovinos devido à utilização de enzimas exógenas podem ser

atribuídas principalmente ao aumento da digestão da dieta no rúmen, proporcionando maior aporte dos nutrientes para o metabolismo e produção do animal. A resposta é maior quando a digestão da fibra é comprometida e quando a energia é o primeiro nutriente limitante da dieta.

Os resultados da utilização de enzimas na alimentação de ruminantes são variáveis, o que se atribui as condições experimentais, as

¹Parte da Tese da primeira autora.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia. Email: cysneiros cristine@hotmail.com, nassarferreira@uol.com.br, ulhoa@icb.ufg.br.

³Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia. Email: emmanuelarnhold@yahoo.com.br.

características, atividades e níveis das enzimas fornecidas, tipo de dieta e estado fisiológico dos animais. Embora vários avanços tenham sido alcançados, pesquisas ainda são necessárias para reduzir a variedade de respostas.

Com a preocupação crescente sobre o uso de promotores de crescimento e antibióticos na produção de bovinos e a magnitude do aumento do desempenho animal obtido com a suplementação de enzimas na alimentação, não existe dúvidas de que esses produtos terão no futuro um papel muito importante na nutrição de ruminantes (Beauchemin et al., 2003).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um complexo multienzimático (CM), a base de celulases e xilanase, produzido pelo fungo *Humicola grisea*, sobre a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS) do feno de Tifton 85.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB II) da Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

Para a produção do CM, foram inoculados dez discos de cultura (5 mm), contendo esporos do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* (isolado de compostagem na Universidade Federal de Viçosa, MG), em erlenmeyers de 1L com 250 mL de meio de indução (fonte de carbono 5 g/L; extrato de levedura 3 g/L; sulfato de amônia 1,4 g/L; CaCl₂.6H₂O 0,3 g/L; sulfato de magnésio 0,3 g/L; elementos traços CuSO₄, FeSO₄). Como fonte de carbono, foi utilizado o feno de Tifton 85, moído em moinho tipo Willey provido de peneira com malha de 1 mm de diâmetro. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shacker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A) à 42 °C e velocidade

de 120 rpm. Após 96 horas de cultivo, o CM foi filtrado e alíquotas foram coletadas e centrifugadas, a 4000 rpm por 10 minutos, para realização de ensaios enzimáticos.

O CM exibiu 189,38; 128,33 e 27,02 U/mL de atividades de celulase total, endoglucanase e exocelulase, respectivamente, que foram avaliadas de acordo com Wood & Bhat (1988). Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico, ADNS - (Miller, 1959), utilizando glicose como padrão. A atividade de xilanase foi realizada segundo metodologia de Bailey et al. (1992), obtendo-se valor de 4,70 U/mL. Usou-se xilose como padrão para avaliação de açúcar redutor pelo ADNS.

Para determinação da DVIVMS, utilizou-se a técnica descrita por Tilley & Terry (1963), modificada para o fermentador ruminal (DAISY^{II}), seguindo-se metodologia apresentada no manual de utilização do equipamento (ANKOM[®] technology), fornecida pelo fabricante.

Foram utilizados dois novilhos mestiços (pardo suíço x Jersey e Jersey x girolando), com peso aproximado de 370 e 327 kg, respectivamente, para coleta do líquido ruminal. Os animais foram mantidos em piquetes e adaptados a dieta, por período de 14 dias, antes da coleta do líquido e tiveram livre acesso à água e sal mineral. A dieta (base na MS), fornecida pela manhã, consistiu de 7 kg de feno de Tifton 85.

Os tratamentos realizados foram: Controle (10 mL de água esterilizada); T1 (2,5 mL do CM); T2 (5,0 mL do CM) e T3 (10 mL do CM). Os níveis de 2,5 e 5,0 foram completados para 10 mL, com água esterilizada. As doses enzimáticas foram aplicadas por aspersão, de forma uniforme, em 17 g de amostra do feno de Tifton, moído em moinho tipo Willey provido de peneira com malha de 1 mm de diâmetro.

O feno de Tifton utilizado no experimento apresentou 89,3; 7,0 e 69,6% de matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro,

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Cuiabá-MT, Brasil. CEP 78060-900. E-mail: fagton_negrao@yahoo.com.br

²Professor Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Rondonópolis-MT. E-mail: 78735-910. E-mail: andersonzanine@ufmt.br

respectivamente, que foram determinados conforme procedimento descrito em Silva & Queiroz (2002).

Amostras de 500 mg do feno, após tratamento com os diferentes níveis de enzimas, foram acondicionados em sacos de filtro-náilon (F57 - ANKOM[®]) e lacrados a quente. Os sacos com as amostras tratadas ficaram a temperatura ambiente por 2 horas, antes de serem colocados nos jarros da incubadora (TE-150 TECNAL). Esse procedimento foi realizado porque estudos anteriores (Wang et al., 2001; Giraldo et al., 2004) mostram que a interação da solução enzimática com o substrato antes da incubação com líquido ruminal pode aumentar os efeitos benéficos das enzimas sobre a digestibilidade ruminal.

Em cada jarro, quatro no total, contendo solução tampão e líquido ruminal, a 39 °C em meio anaeróbio, colocaram-se equitativamente 34 bolsas (32 amostras, um branco e uma testemunha). Os tratamentos foram feitos em duplicata. Após períodos de 12, 24, 48 e 96 horas de incubação, os sacos foram retirados do rúmen e lavados com água destilada. Posteriormente, foram tratados com solução de detergente neutro, fazendo uso do aparelho de Fibra TE-149 (TECNAL), a fim de se determinar a DVIVMS.

O cálculo da DVIVMS, em porcentagem, foi realizado utilizando a seguinte fórmula (ANKOM[®] technology):

$$DVIVMS \% = 100 - \frac{(W_3 - (W_1 * C_1)) * 100}{W_2}$$

Em que: W₁ = peso da tara do saco filtro; W₂ = peso das amostras; W₃ = peso final do saco filtro depois da determinação *in vitro* e

sequencial com solução de FDN; C₁ = Correção do saco de filtro em branco (peso final do saco após estufa/peso inicial do saco filtro).

O experimento foi instalado em blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas 4 x 4. Os blocos (repetições) foram constituídos de quatro diferentes rúmens. As parcelas foram constituídas por feno de Tifton tratado com quatro diferentes níveis de enzimas e as subparcelas por quatro momentos de avaliação (períodos de incubação).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e às médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software R (R Development Core Team, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da DVIVMS do feno de Tifton 85 mostraram que houve interação entre níveis de enzimas e período de incubação no rúmen (p<0,01). No nível de 2,5 mL, observou-se aumento da DVIVMS em 12 e 96 horas de incubação, com aumento de 9,23 e 14,83%, quando comparado ao tratamento controle. Verificou-se que a adição de 5,0 mL de enzimas melhorou a digestibilidade em 12,16; 6,32; 7,18 e 13,34%, nos tempos de 12; 24; 48 e 96 horas de incubação no rúmen, respectivamente, em relação ao controle. A adição de 10 mL proporcionou melhoras de 18,51; 17,17; 13,59 e 20,93% sobre a digestibilidade com 12; 24; 48 e 96 horas de permanência do feno no rúmen.

Tabela1. Valores médios da DVIVMS (%) do feno de Tifton 85 em diferentes níveis de enzimas (mL) e quatro períodos de incubação no rúmen (horas).

Nível de enzimas (mL)	Período de incubação no rúmen (horas)			
	12	24	48	96

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Cuiabá-MT, Brasil. CEP 78060-900. E-mail: fagton_negrao@yahoo.com.br

²Professor Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Rondonópolis-MT. E-mail: 78735-910. E-mail: andersonzanine@ufmt.br

Controle	68,24cB	75,61cA	76,09cA	71,61cAB
2,5	74,54bB	76,82bcB	77,39bcB	82,23abA
5,0	76,54abB	80,39bAB	81,55bA	81,16bAB
10,0	80,87aB	88,59aA	86,43aA	86,60 aA

Médias seguidas de letras diferentes, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem ($p < 0,01$) pelo teste Tukey. CV% = 3,13.

A melhora sobre a DVIVMS do feno de Tifton é resultado da atividade hidrolítica das

enzimas no substrato. Essa informação é consistente com a avaliação química do CM utilizado que revelou atividades de celulasas e xilanase.

As enzimas quando adicionadas diretamente as forragens promovem mudança na estrutura da parede celular das plantas, tornando-as mais susceptíveis a hidrólise ruminal. Sua aplicação em materiais com maior teor de matéria seca favorece a formação de um complexo enzima-substrato bastante estável que aumenta a eficiência enzimática no rúmen (Nsereko et al., 2000).

De acordo com Fontes et al. (1995), quando as enzimas são incorporadas ao alimento, aumenta-se sua resistência à proteólise e o seu tempo de permanência no rúmen, em consequência da mudança na conformação da estrutura proteica, que é provocada por forte ligação ao substrato. A adicional vantagem é que essa forma de aplicação proporciona a liberação lenta das enzimas no rúmen (Beauchemin et al., 1999). Quanto maior for a proporção da dieta tratada com enzimas, maior será a chance das proteínas permanecerem ativas no compartimento ruminal. Na ausência do complexo enzima-substrato estável, as enzimas se solubilizam no líquido ruminal.

Na literatura, são escassos os estudos sobre avaliação de feno de Tifton com enzimas fibrolíticas em ensaios de digestibilidade, fazendo com que a comparação de resultados de pesquisas seja inconsistente.

Giraldo et al. (2007), aplicando duas celulasas, produzidas por *Aspergillus niger* e

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Cuiabá-MT, Brasil. CEP 78060-900. E-mail: fagton_negrao@yahoo.com.br

²Professor Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Rondonópolis-MT. E-mail: 78735-910. E-mail: andersonzanine@ufmt.br

Trichoderma longibrachiatum, na dose de 30 U/g de substrato (70% de feno de gramínea e 30% de concentrado), observaram maior desaparecimento da MS depois de 6 e 24 h, sem nenhum efeito após 48 h de incubação. Lewis et al. (1996) não observaram aumento da DIVMS de feno de gramínea com 8; 16 e 24h de incubação, quando da aplicação de enzimas fibrolíticas. Entretanto observaram aumento após 32; 40 e 96 h.

Cysneiros et al. (2006) não verificaram efeitos de 5; 10 e 20 mg de enzimas fibrolíticas por kg de matéria natural sobre o desaparecimento ruminal da MS da silagem de capins tropicais, em 6; 24 e 96 h. Yang et al. (1999) reportaram que as curvas de digestibilidade ruminal da alfafa foram semelhantes para o tratamento controle e enzimático. O desaparecimento foi rápido durante as primeiras 12 h de incubação, com formação de platô próximo a 24 h.

Estudos *in vitro* demonstram que é possível usar preparações de enzimas fibrolíticas para melhorar a digestão do alimento no rúmen. Os resultados são geralmente analisados pelo aumento da taxa inicial de desaparecimento da matéria seca ou da taxa de desaparecimento da fibra em detergente neutro de forragens tratadas com enzimas. Acredita-se que as enzimas conseguem tornar a fibra solúvel ou mais disponível ao ataque microbiano no rúmen (Dawson & Tricarico, 2007). Segundo esses autores, parece que o período mais ativo para atividade das enzimas exógenas compreende às 12 horas iniciais de digestão. Após períodos prolongados de incubação no rúmen, não se observa efeitos significativos sobre a extensão total da digestão da fibra pela ação das enzimas.

A capacidade dos sistemas enzimáticos de aumentar a taxa inicial de degradação da fibra é

importante em vários sistemas de produção animal, pois influencia os processos que controlam a ingestão alimentar. De acordo com Van Soest (1994), a digestibilidade *in vitro* durante as primeiras 12 horas de fermentação parece ser uma medida que reflete os efeitos da fibra vegetal sobre o consumo relativo da matéria seca pelos ruminantes alimentados com dietas à base de forragem. Em consequência, os aumentos verificados na taxa inicial de desaparecimento da fibra são consistentes com a capacidade de certos sistemas de enzimas fibrolíticas de aumentar a ingestão alimentar nos sistemas de produção (Dawson & Tricarico, 2007).

Algumas das variabilidades associadas às enzimas exógenas na alimentação dos animais ruminantes relacionam-se à suplementação com baixas ou altas quantidades de enzimas. Os aditivos enzimáticos são usados na maioria das vezes em baixas concentrações, não contribuindo com o aumento da digestão da fibra, mesmo que as condições do ambiente ruminal sejam ideais para suas atividades (Dawson & Tricarico, 2007).

Pesquisas realizadas por Beauchemin et al. (1998) mostram que o nível enzimático ótimo de aplicação depende do substrato. Esses autores trabalharam com diferentes taxas de aplicação de enzimas para feno de alfafa, silagem de milho, silagem de cevada e grãos de milho, obtendo respostas variadas. Em relação ao feno de Tifton, foi verificada redução no teor da fibra em detergente neutro apenas com aplicação de baixo nível enzimático. Altas quantidades de enzimas ligadas ao substrato podem restringir a adesão da microbiota ruminal ao alimento, limitando sua digestibilidade (Beauchemin et al., 2003).

Enzimas fibrolíticas melhoram a degradação inicial dos carboidratos estruturais das plantas e potencializam as atividades das enzimas microbianas do rúmen, proporcionando aumento da digestão de substratos fibrosos durante as fases preliminares críticas da digestão. Os efeitos globais podem resultar da

capacidade das enzimas exógenas de expor os substratos lentamente degradados ao ataque microbiano (Dawson & Tricarico, 2007).

CONCLUSÕES

Nos níveis de 2,5; 5,0 e 10 mL, o complexo multienzimático aumentou a taxa inicial da DVIVMS do feno de Tifton 85, mas não produziu efeito significativo sobre a extensão da digestão após períodos prolongados de incubação ruminal.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, M. J, BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n.3, p. 257-270, 1992.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, v.75, n.4, p.641-644, 1995.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; YANG, W. Z.; McALLISTER, T. A. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd., 1998, Vancouver. **Proceedings**. Vancouver: 1998. 14 p.
- BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P. D.; YANG, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L., BHAT, M. K.; OWEN, E. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. **Animal Feed Science and Technology**, v. 107, n.1, p. 201-209, 2003.
- CYSNEIROS, C. S. S.; FRANCO, G. L.; ULHOA, C. J.; DIOGO, J. M. S.; RAMOS, A. K. B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 339-348, 2006.

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Cuiabá-MT, Brasil. CEP 78060-900. E-mail: fagton_negrao@yahoo.com.br

²Professor Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Rondonópolis-MT. E-mail: 78735-910. E-mail: andersonzanine@ufmt.br

- DAWSON, K. A.; TRICARICO, J. M. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. http://engormix.com/MA-dairy-cattle/articles/the_use_exogenous_fibrolytic_t695/GDL-p0.htm. Publicado em: 31 out. 2007.
- FONTES, C. M.; HALL, J.; HIRST, B. H.; HAZLEWOOD, G. P.; GILBERT, H. J. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, n.1, p.52-57, 1995.
- GIRALDO, L. A.; CARRO, M. D.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L. Influence of fibrolytic enzymes on in vitro methane production and rumen fermentation of a substrate containing 60% of grass hay. In: Proc. 11th Semin. FAO-CIHEAM Sub-Network Sheep Goat Nutr. Univ. Catania, Italy: 2004, p 87.
- GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; RANILLA, J. M.; CARRO, M. D. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in rusitec fermenters. **Journal Animal Science**, v. 85, n.8, p. 1962-1970, 2007.
- HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle feed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, n.2, p.477- 487, 2000.
- LEWIS, G. E.; HUNT, C. W.; SANCHEZ. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3020-3028, 1996.
- MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; MOLETTA, J. L. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2118-2124, 2006.
- McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R., PARTRIDGE, G. G. (Eds.). **Enzymes in farm nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. p.273-298.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.
- NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, n.3, p. 153-170, 2000.
- NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 16., 1997, Gainesville. **Proceedings**. Gainesville: 1997. p.3-17.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2010.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos - Métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v. 18, n.2, p. 104-111, 1963.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- WANG, Y.; McALLISTER, T. A.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; MORGAVI, D. P.; NSEREKO, V. L.; IWAASA, A. D; YANG, W. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the rumen simulation technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, v. 85, n.3, p. 325–332, 2001.
- WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. **Methods in Enzymology**: Academic Press, London. 1998. p. 87-112.
- YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.2, p.391-403, 1999.

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Cuiabá-MT, Brasil. CEP 78060-900. E-mail: fagton_negrao@yahoo.com.br

²Professor Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Rondonópolis, Rondonópolis-MT. E-mail: 78735-910. E-mail: andersonzanine@ufmt.br