

## EFEITO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS SOBRE A DEGRADAÇÃO MICROBIANA RUMINAL DA FIBRA DE CANA-DE-AÇÚCAR

EMILIO MANUEL ARANDA IBÁÑEZ,<sup>1</sup> GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ,<sup>2</sup> JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ,<sup>3</sup>  
IVES CLÁUDIO DA SILVA BUENO<sup>4</sup> E ANDRÉ CÉSAR VITTI<sup>5</sup>

1. Engenheiro bioquímico, mestre em Ciência da Nutrição Animal, doutor em veterinária UNAM, Mexico, profesor investigador asociado Colegio Postgraduados Mexico, miembro Sistema Nacional de Investigadores Conacyt Mexico Nivel I. E-mail: earanda@colpos.mx

2. Universidad Autonoma Metropolitana

3. Campus Tabasco Colegio de Postgraduados

4. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Centro Sul

5. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Centro Sul.

### RESUMO

Com o objetivo de estudar os limitantes da degradação da fibra da cana-de-açúcar para utilizá-la como alimento para bovinos, fracionaram-se os componentes fibrosos da cana-de-açúcar (variedade Mex69-290) em fibra em detergente neutro (FDN) e em fibra em detergente ácido (FDA). A cana integral e as fibras foram incubadas com bactérias ruminais, na presença ou ausência de enzimas fibrolíticas (Fibrozyme, Alltech Inc.). Determinaram-se o crescimento microbiano e as bactérias totais, assim como a taxa de crescimento, a taxa de geração, o tempo de colonização e a degradabilidade. Os resultados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com arranjo fatorial 2 x 3, com duas doses de enzima e três substratos, utilizando quatro repetições de

incubação. Observou-se o maior crescimento microbiano para cana integral e os menores para suas fibras. A degradabilidade *in vitro* foi de 0,701, 0,392 e 0,191, respectivamente para cana integral, FDN e FDA ( $P < 0,01$ ). A fração FDA com a adição das enzimas fibrolíticas teve sua degradabilidade aumentada de 0,387 para 0,425 ( $P < 0,01$ ). O crescimento microbiano foi limitado nas frações fibrosas, possivelmente pelo grau de lignificação das paredes celulares. A maior degradabilidade *in vitro* das frações fibrosas está associada à presença de açúcares solúveis. A adição de enzimas fibrolíticas aumentou o crescimento microbiano máximo e a digestibilidade da FDA, indicando que estas podem ser um potencial aditivo para melhorar o aproveitamento de dietas com cana-de-açúcar.

PALAVRAS-CHAVES: Crescimento microbiano, degradabilidade *in vitro*, parede celular.

### ABSTRACT

#### EFFECT OF FIBROLITIC ENZYMES ON RUMEN MICROBIAL DEGRADATION OF SUGARCANE FIBER

Aiming to study the limiting factors for degradation of sugarcane fiber to be used as cattle feed, sugarcane fibrous components were fractioned in neutral- and acid-detergent fibers (respectively, NDF and ADF). Whole sugarcane and its fibers were incubated with rumen bacteria, in presence or absence of fibrolytic enzymes (Fibrozyme, Alltech Inc.). Microbial growth and total bacteria count were determined, and the growth rate, generation rate, lag time, and degradability were also determined. Results were analyzed in randomized block design, with a 2x3 factorial arrangement, with two doses of enzymes, and three substrates, using four replications for incubation. The highest microbial growth

was observed for whole sugarcane, and the lowest for its fibers. The *in vitro* degradability was 0.701, 0.392 and 0.191, respectively for whole sugarcane, NDF and ADF ( $P < 0.01$ ). ADF fraction with the addition of fibrolytic enzyme had its degradability increased from 0.387 to 0.425 ( $P < 0.01$ ). Microbial growth was limited in fibrous fractions, possibly due to lignification grade of cell walls. The highest *in vitro* degradability of fibrous fractions is related to the presence of soluble sugars. Addition of fibrolytic enzymes increased the maximum microbial growth and ADF degradability, indicating that it could be a potential additive to enhance diets containing sugarcane.

KEYWORDS: Cell wall, *in vitro* degradability, microbial growth.

## INTRODUÇÃO

Os principais limitantes da utilização da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) na alimentação de ruminantes são a baixa digestibilidade de sua parede celular, o elevado teor de açúcares e a estrutura das moléculas das paredes celulares (LOPEZ et al., 2003; ARANDA et al., 2004). GÓMEZ-VAZQUEZ et al. (2003) notaram uma resposta linear na digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) e no ganho de peso dos novilhos alimentados com pasto estrela e cana-de-açúcar, ao receber doses crescentes de uma enzima fibrolítica exógena. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da adição de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o crescimento microbiano e sobre a fermentação ruminal da cana-de-açúcar, sob a hipótese de que as enzimas fibrolíticas podem incrementar a digestibilidade das paredes celulares da cana-de-açúcar, assim como melhorar a eficiência da fermentação ruminal e estimular o crescimento microbiano.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas incubações *in vitro* de cana-de-açúcar integral, variedade Mex69-290 (Quadro 1), assim como de suas frações fibrosas extraídas com detergentes neutro e ácido (respectivamente FDN e FDA) (VAN SOEST et al., 1991) com ou sem a adição da enzima fibrolítica Fibrozyme© (Alltech Inc.), na dose de 100 mg/g de substrato incubado (PINOS, 1999).

**QUADRO 1.** Composição da cana-de-açúcar, variedade Mex69-290, com doze meses de vegetação

Composição	Teor (%)
Matéria seca (MS)	31,90
Proteína bruta (PB)	2,53
Conteúdo celular	39,50
Fibra em detergente neutro (FDN)	60,50
Hemicelulose	15,64
Fibra em detergente ácido (FDA)	44,86
Lignina em detergente ácido (LDA)	6,72
°Brix	16,40

Calcularam-se a taxa de crescimento com base na regressão do logaritmo natural da concentração de bactérias em função do tempo e a taxa da geração mediante a relação  $0,693/k$ , sendo  $k$  a taxa específica de crescimento ou o coeficiente de manutenção da relação inversa da concentração das bactérias, no tempo zero (PIRT, 1982). O tempo de colonização (fase lag) foi estimado como inverso dos valores do crescimento por extrapolação ao tempo zero (ZWIETERING et al., 1991). Estimaram-se os parâmetros por regressão (DRAPPER & SMITH, 1981).

Em erlenmeyers de capacidade de 250 mL, foram colocados 150 mL de meio anaeróbio (Quadro 2), 1 mL de líquido ruminal e 100 mg de substrato incubados em saco de *nylon*, medindo 4 x 5 cm, por 24 horas à temperatura constante de 39 °C. Para isso, utilizaram-se dez réplicas por amostra, com e sem a adição de enzima fibrolítica. Ao final da incubação, os sacos foram secos a 65 °C, até peso constante. Considerou-se a diferença entre os pesos inicial e final das amostras como material degradado e calculou-se a degradabilidade como a razão entre o material degradado e o peso inicial.

Seguindo a mesma metodologia, como descrito, incubaram-se as amostras com e sem enzima fibrolítica, com três réplicas, repetidas em cinco ensaios. O crescimento microbiano foi determinado em intervalos de trinta minutos nas primeiras dez horas, com uma leitura final às 25 horas, utilizando espectrofotômetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb), ajustado para 600 nm, segundo RUSSEL & DOMBROWSKI (1980). Empregou-se a contagem total de bactérias, para transformar o valor de densidade óptica em concentração de bactérias, visando caracterizar as curvas de crescimento (MIRANDA, 1998).

Os resultados foram analisados de acordo com um delineamento de blocos ao acaso (STEEL & TORRIE, 1980), com arranjo fatorial 2 x 3, com dois teores de enzima e três substratos (cana integral e suas frações – FDN e FDA). Realizaram-se quatro repetições de incubação (CLARY et al., 1988). Usou-se o seguinte modelo estatístico:  $Y_{ijk} = \mu + B_j + S_i + C_k + S_i * C_k + B_j * S_i * C_k + \varepsilon_{ijk}$ , sendo  $Y_{ijk}$  a variável resposta;  $\mu$ , a média geral;  $B_j$ , efeito do bloco;  $S_i$ , efeito do substrato;  $C_k$ , efeito da adição de enzima;  $S_i * C_k$  e  $B_j * S_i * C_k$ , interações; e  $\varepsilon_{ijk}$ , o erro residual do modelo. Empregou-se o procedimento GLM do SAS (1985), considerando-se a interação blocos x tratamentos como

o erro experimental. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (STEEL & TORRIE, 1980).

**QUADRO 2.** Composição do meio anaeróbico utilizado para a estimativa das bactérias totais e celulolíticas.

Composição	Meio GCA-FR	Meio PW-FR
	Quantidade (/100 mL)	
Extrato de levedura	0,1	0,1
Tripticase-peptona	0,2	0,2
Glucose	60	--
Celubiose	60	--
Amido	60	--
Solução mineral I <sup>a</sup>	5,0	5,0
Solução mineral II <sup>b</sup>	5,0	5,0
Líquido ruminal clarificado	30,0	30,0
Solução de cisteína-sulfido <sup>c</sup>	2,0	2,0
Solução de carbonato de sódio 8%	5,0	5,0
Resazurina 0,1%	0,1	0,1
Água destilada	52,6	52,6
Papel Whatman n.º 1	---	Uma camada

<sup>a</sup> 6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1000 mL.

<sup>b</sup> 6,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/1000 mL; 6,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1000 mL; 12 g NaCl/1000 mL; 2,45 g MgSO<sub>4</sub>/1000 mL e 1,6 g CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O/1000 mL.

<sup>c</sup> 2,5 g L-cisteína (15 mL de NaOH 2N; 2,5 g Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O)

GCA-FR = glucose, celubiose, amido e fluido ruminal

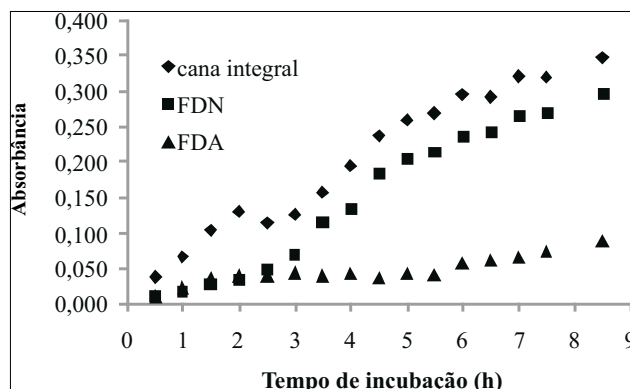
PW-FR = Papel Whatman e fluido ruminal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 e na Figura 1, é apresentado o crescimento das bactérias ruminais de acordo com o substrato incubado.

Apesar de haver uma tendência de maior crescimento microbiano na cana integral, as diferenças estatísticas com respeito ao substrato foram observadas a partir das 3,5 horas. Nas primeiras horas de incubação, não houve diferenças significativas, possivelmente em virtude da grande variabilidade da absorbância, coincidindo com as observações de MERTENS (1993), que apontam que os trabalhos *in vitro*, em sua primeira etapa, apresentam alta variabilidade. O maior crescimento microbiano na cana integral se deve à presença de açúcares solúveis de fácil degradação (BANDA &

VALDEZ, 1976), e o menor crescimento em FDA se associa ao alto teor de lignina (AMJED et al., 1992).



**FIGURA 1.** Crescimento de bactérias ruminais incubadas com cana-de-açúcar e suas frações fibrosas.

A resposta do crescimento microbiano mediante a adição de enzimas é apresentada nas Figuras 2, 3 e 4, sendo uma para cada substrato. Na Tabela 2, os principais efeitos são apresentados, e nela pode-se observar o maior crescimento microbiano em resposta à adição da enzima. Há uma resposta positiva à adição de enzimas fibrolíticas, indicando que há aumento da disponibilidade de metabólitos para o crescimento microbiano. A maior diferença foi observada na fração FDA (Figura 4), a qual poderia estar associada à maior degradabilidade devida à ação enzimática sobre as ligações ligno-celulósicas e possivelmente a outros efeitos indiretos. É possível que a adição de enzimas exógenas possa incrementar a fração potencialmente degradável da celulose contida na FDA (AKIN, 1986).

Na Tabela 3, são apresentados os parâmetros de crescimento microbiano na cana-de-açúcar. Apesar das diferenças apresentadas na Tabela 2, as diferenças estatísticas não são detectadas para os parâmetros do crescimento microbiano na cana-de-açúcar e em suas frações fibrosas. Esse problema foi detectado em análise de cinética de primeira ordem. MENDOZA et al. (1995) sugerem que os dados sejam analisados por tempo de incubação, dado que podem existir diferenças em alguns tempos de incubação, e a linearização com logaritmo natural altera o erro residual do modelo, não permitindo detectar estatisticamente algumas diferenças biologicamente importantes.

**TABELA 1.** Crescimento microbiano (densidade óptica) de microrganismos ruminais incubados em cana-de-açúcar e suas frações fibrosas (FDN e FDA)

Tempo (h)	Substrato			E.P.M.
	Cana-de-açúcar	FDN	FDA	
0,5	0,060	0,037	0,040	0,034
1,0	0,087	0,052	0,054	0,040
1,5	-0,129	0,068	0,074	0,058
2,0	0,156	0,094	0,097	0,070
2,5	0,148	0,099	0,088	0,059
3,0	0,159	0,118	0,095	0,066
3,5	0,200 <sup>a</sup>	0,155 <sup>ab</sup>	0,111 <sup>b</sup>	0,063
4,0	0,240 <sup>a</sup>	0,169 <sup>a</sup>	0,121 <sup>b</sup>	0,057
4,5	0,265 <sup>a</sup>	0,221 <sup>a</sup>	0,146 <sup>b</sup>	0,048
5,0	0,293 <sup>a</sup>	0,245 <sup>a</sup>	0,159 <sup>b</sup>	0,055
5,5	0,307 <sup>a</sup>	0,252 <sup>a</sup>	0,162 <sup>b</sup>	0,046
6,0	0,333 <sup>a</sup>	0,271 <sup>b</sup>	0,182	0,048
6,5	0,342 <sup>a</sup>	0,294 <sup>a</sup>	0,203	0,055
7,0	0,361 <sup>a</sup>	0,301 <sup>a</sup>	0,212	0,050
7,5	0,367 <sup>a</sup>	0,308 <sup>a</sup>	0,216	0,051
8,5	0,391 <sup>a</sup>	0,321 <sup>a</sup>	0,242	0,059

E.P.M. = erro-padrão da média

<sup>ab</sup> Médias com sobrescritos distintos, nas linhas, diferem entre si (teste de Tukey; P<0,05).**TABELA 2.** Efeito da adição de enzimas fibrolíticas no crescimento microbiano (densidade óptica) ao incubar microrganismos ruminais com cana-de-açúcar

Tempo (h)	Tratamentos		E.P.M.
	Sem enzimas	Com enzimas	
0,5	0,026 <sup>b</sup>	0,070 <sup>c</sup>	0,034
1,0	0,042 <sup>b</sup>	0,093 <sup>c</sup>	0,040
1,5	0,066 <sup>b</sup>	0,124 <sup>c</sup>	0,058
2,0	0,081 <sup>b</sup>	0,162 <sup>c</sup>	0,070
2,5	0,077 <sup>b</sup>	0,158 <sup>c</sup>	0,059
3,0	0,091 <sup>b</sup>	0,170 <sup>c</sup>	0,066
3,5	0,118 <sup>b</sup>	0,206 <sup>c</sup>	0,063
4,0	0,142 <sup>b</sup>	0,229 <sup>c</sup>	0,057
4,5	0,176 <sup>b</sup>	0,266 <sup>c</sup>	0,048
5,0	0,194 <sup>b</sup>	0,290 <sup>c</sup>	0,055
5,5	0,200 <sup>b</sup>	0,301 <sup>c</sup>	0,046
6,0	0,223 <sup>b</sup>	0,323 <sup>c</sup>	0,048
6,5	0,232 <sup>b</sup>	0,348 <sup>c</sup>	0,055
7,0	0,246 <sup>b</sup>	0,359 <sup>c</sup>	0,050
7,5	0,249 <sup>b</sup>	0,368 <sup>c</sup>	0,051
8,5	0,273 <sup>b</sup>	0,385 <sup>c</sup>	0,059

E.P.M. = erro-padrão da média

<sup>ab</sup> Médias com sobrescritos distintos, nas linhas, diferem entre si (teste de Tukey; P<0,05).

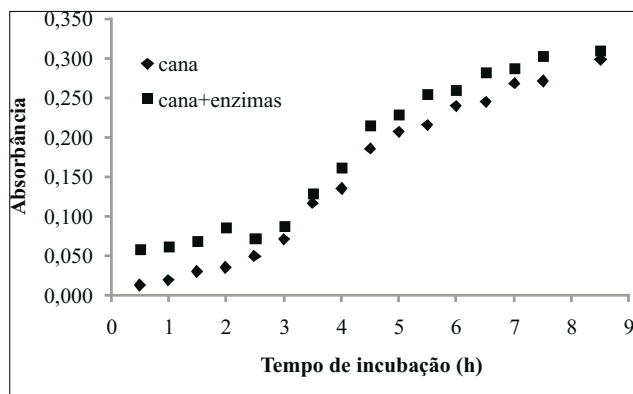


FIGURA 2. Crescimento de bactérias ruminais incubadas com cana-de-açúcar com ou sem enzimas fibrolíticas exógenas.

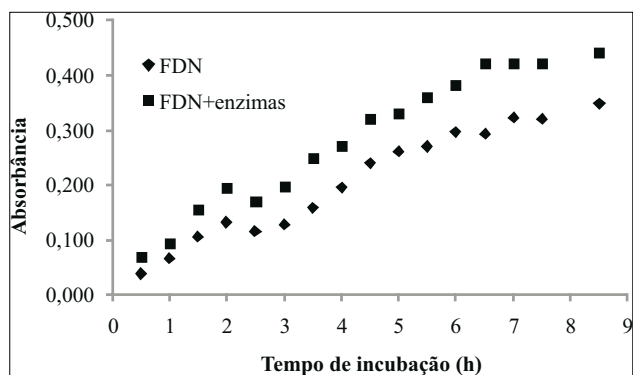


FIGURA 3. Crescimento de bactérias ruminais incubadas com FDN de cana-de-açúcar com ou sem enzimas fibrolíticas exógenas.

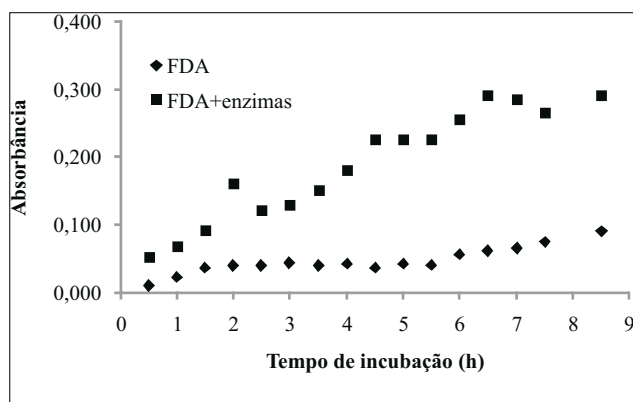


FIGURA 4. Crescimento de bactérias ruminais incubadas com FDA de cana-de-açúcar com ou sem enzimas fibrolíticas exógenas.

As taxas de crescimento e as taxas de geração foram similares para cana integral e para as frações FDN e FDA (Tabela 3). As taxas de crescimento

observadas neste experimento são menores que as reportadas para cultivos mistos em substratos lignocelulósicos (1,13/h) como os restos da cultura de milho (MIRANDA et al., 1999). Os microrganismos celulolíticos *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e *R. albus* têm a capacidade de degradar a celulose a uma taxa entre 0,05 e 0,10/h (WEIMER, 1996). É possível inferir que a limitada taxa de crescimento na cana-de-açúcar é influenciada pela lignificação da fibra (Quadro 1) e pode ser o principal limitante para o aproveitamento da cana-de-açúcar, tornando necessária a busca de alternativas para aumentar a digestibilidade destas frações com tratamentos físicos, químicos, enzimáticos e biológicos. O tempo de colonização tendeu a ser maior na cana integral (Tabela 3). Tem sido reportados valores de 2,5 a 3,0 h de tempo de colonização em incubações com restos da cultura de milho com 70% de FDN (MIRANDA et al., 1999), os quais são menores que os observados neste estudo. A fase lag na FDA da cana-de-açúcar confirma a importância da lignina como limitante na digestão desse alimento.

TABELA 3. Características do crescimento microbiano e degradabilidade *in vitro* da cana-de-açúcar e suas frações fibrosas

Variáveis*	Substrato			E.P.M.
	Cana-de-açúcar	FDN	FDA	
K	0,214	0,330	0,267	0,11
M	0,860	3,680	0,581	5,62
Lag	0,46	3,18	5,06	5,73
Ymax	3,11	1,68	2,17	1,39
$k_{0,5}$	3,53	2,50	2,98	1,14
DIVMS	0,701 <sup>a</sup>	0,302 <sup>b</sup>	0,191 <sup>c</sup>	0,038

\* k: taxa específica de crescimento (/h); m: coeficiente de manutenção; Ymáx: crescimento máximo; Lag: tempo de colonização (h);  $k_{0,5}$ : taxa de geração (/h); DIVMS: degradabilidade *in vitro* da MS.

<sup>abc</sup> Médias com sobrescritos distintos, nas linhas, diferem entre si (teste de Tukey; P<0,05).

A degradabilidade *in vitro* da cana-de-açúcar e suas frações fibrosas refletem a atividade microbiana e apontam os limitantes inerentes das paredes celulares para a digestão animal. A maior degradabilidade da cana-de-açúcar se deve à concentração de açúcares solúveis no conteúdo celular (BANDA & VALDEZ, 1976; AROEIRA et al., 1993a; AROEIRA et al., 1993b).

Apenas se observaram diferenças estatísticas na degradabilidade, sendo maior a da cana-de-açúcar, seguida por FDN e FDA. A degradabilidade *in vitro* da FDA observada neste estudo está dentro do intervalo de valores reportados (PATE, 1977) e coincide com a FDN potencialmente degradável reportada para subprodutos da cana (AMJED et al., 1992) associada à relação linear negativa entre a degradabilidade *in vitro* da FDN e a proporção FDN:lignina (PATE, 1977). A menor degradabilidade da FDA confirma a importância da lignina como limitante no aproveitamento da cana pelos microrganismos ruminais.

Na Tabela 4, são apresentados os principais efeitos das enzimas fibrolíticas nos parâmetros de crescimento microbiano e na degradabilidade *in vitro*. A adição da enzima aumentou a degradabilidade dos substratos em 3,81 unidades percentuais, o que pode ser a explicação do maior crescimento microbiano máximo, sem afetar outros parâmetros do crescimento. Tem sido reportados aumentos na degradabilidade *in vitro* da MS, da FDN e da FDA de gramíneas e leguminosas com a adição da enzima Fibrozyme® (FENG et al., 1996; TRICARICO et al., 1998; PINOS et al., 2001; PINOS et al., 2002a; PINOS et al., 2002b) e mesmo na digestibilidade *in vivo* (KRAUSE et al., 1988; BEAUCHEMIN et al., 1998). No entanto, os resultados têm sido muito variáveis, possivelmente em virtude da razão enzima:substrato e da degradação da enzima por proteases ruminais (HARRIS, 1998).

As enzimas utilizadas são uma combinação de celulasas e hemicelulasas produzidas por fungos, protegidas por glicosilação, e estima-se que podem permanecer ativas por volta de doze horas no rúmen (HARRIS, 1998; LYONS, 1998). PINOS (1999) estudou a composição e a degradação ruminal *in vitro* da enzima Fibrozyme e reportou que o complexo tem 93,6% de MS, 45,8% de FDN, 32,5% de FDA e 9,5% de cinzas, encontrando um tempo médio de degradação do complexo de 57 horas, com uma maior liberação de nitrogênio amoniacal depois de 24 horas.

O uso de enzimas microbianas celulolíticas exógenas para incrementar a digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar é uma alternativa viável, como mostram os resultados de GÓMEZ-VÁSQUEZ et al. (2003). Também alguns estudos com gramíneas e leguminosas de clima temperado têm mostrado que,

com a aplicação de enzimas fibrolíticas, podem ser melhorados a digestibilidade e o crescimento de novilhos em cerca de 30% (BEAUCHEMIN et al., 1996) e a produção de leite em até 10% (BEAUCHEMIN et al., 1998; KUNG et al., 1998; YANG et al., 1998). Juntamente com o conhecimento das estruturas da parede celular da cana-de-açúcar e das enzimas industriais, é possível desenvolver novas alternativas de tratamentos para melhorar o aproveitamento da celulose e da hemicelulose pelos ruminantes.

**TABELA 4.** Efeito da adição de enzimas fibrolíticas no crescimento microbiano e na degradabilidade *in vitro* da cana-de-açúcar

Variáveis	Tratamento		E.P.M.
	Sem enzimas	Com enzimas	
K	0,317	0,228	0,11
M	2,97	0,647	5,62
Lag	3,340	8,314	5,73
Ymáx	1,549 <sup>b</sup>	3,038 <sup>a</sup>	1,39
k <sub>0,5</sub>	2,736	3,253	1,13
DIVMS	0,387 <sup>a</sup>	0,425 <sup>b</sup>	0,021

\* k: taxa específica de crescimento (/h); m: coeficiente de manutenção; Ymáx: crescimento máximo; Lag: tempo de colonização (h); k<sub>0,5</sub>: taxa de geração (/h); DIVMS: degradabilidade *in vitro* da MS.

<sup>ab</sup> Médias com sobrescritos distintos, nas linhas, diferem entre si (teste de Tukey; P<0,05).

## CONCLUSÕES

O crescimento microbiano a partir da degradação da cana-de-açúcar é limitado pelas frações fibrosas, possivelmente pelo grau de lignificação das paredes celulares. A maior degradação *in vitro* da cana-de-açúcar em relação às suas frações fibrosas está associada à presença de açúcares solúveis.

A adição de enzimas fibrolíticas aumentou o crescimento bacteriano máximo e a degradabilidade da FDA, podendo-se concluir que é possível considerar as enzimas fibrolíticas como um aditivo potencial para melhorar o aproveitamento de dietas com cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

AKIN, D. E. Interactions of ruminal bacteria and fungi with southern forages. *Journal of Animal Science*, v. 63, p. 962-977, 1986.

- AMJED, M.; JUNG, H. G.; DONKER, J. D. Effect of alkali hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2877-2884, 1992.
- ARANDA, E. M.; RUIZ, P.; MENDOZA, G. D.; MARCOFF, C. F.; RAMOS, J. A.; Y ELÍAS A. Cambios en la digestión de tres variedades de caña de azúcar y sus fracciones de fibra. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**, Tomo 38, n. 2, p. 137-144, 2004.
- AROEIRA, R. S.; FIGUEIRA, D. G.; RODRIGUEZ, N. M.; SAMPAIO, I. B. M.; LOPES, F. C.; TORRES, E. M. P. Degradabilidade *in situ* dos nutrientes da cana-de-açúcar e do farelo de algodão em bovinos alimentados com farelo de algodão e cana-de-açúcar de três níveis de uréia. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 45, p. 221-233, 1993b.
- AROEIRA, R. S.; LIZIEIRE, R. S.; MATOS, L. L.; FIGUEIRA, D. G. Rumen degradability and rate of passage of sugar cane + urea based diets, supplemented with cottonseed or rice meals in Holstein x Zebu steers. **Journal of Animal Science**, v. 71 (suppl.1), p. 273, 1993a.
- BANDA, M.; VALDEZ, R. E. Efecto del estado de madurez sobre el valor nutritivo de la caña de azúcar. **Produção Animal nos Trópicos**, v. 1, p. 96-99, 1976.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, p. 641-644, 1996.
- BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of fibrolytic enzyme additives on extent of digestion and milk production of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 76 (Suppl. 1), p. 358, 1998.
- CLARY, W. P.; WELCH, B. L.; BOOTH, G. D. *In vitro* digestion experiments: importance of variation between inocula donors. **Journal of Wildlife Management**, v. 52, p. 358-361, 1988.
- DRAPPER, N.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 709 p.
- FENG, P. C.; HUNT, W.; PITCHARD, G. T.; JULIEN, D. W. E. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1349-1357, 1996.
- GOMEZ-VAZQUEZ, A.; PÉREZ, J.; MENDOZA, G. D.; ARANDA, E.; HERNÁNDEZ, A. Fibrolytic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane stargrass. **Livestock Production Science**, v. 82, p. 249-254, 2003.
- HARRIS, B. The emerging role of enzymes in ruminant diets: at long last, a breakthrough. Udder Information. **Dr. Harri's Ci. Anim. Bras., Goiânia**, v. 11, n. 3, p. 488-495, jul./set. 2010
- Guide to Maximizing Dairy Performance**. 1998. Disponível em: <<http://www.alltech-bio.com/udder98.htm>.pp1-13.> Acesso em: 12 jun. 2006.
- KRAUSE, M.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; FARR, B. I.; NORGAARD, P. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2912-2920, 1988.
- KUNG, L.; TREACHER, R. J.; COHEN, M. A. Enzyme-treated forages for lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 76 (Suppl. 1), p. 196, 1998.
- LYONS, T. P. The consumer is king: where will it all end for the feed industry. In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. (Eds.). **Bio-technology in the feed industry**. Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium. Loughborough: Nottingham University Press, 1998. p. 3-29.
- MENDOZA, M. G. D.; RICALDE, V. R.; ESPARZA, H. B.; VELAZQUEZ, Y. L. T. Nota: Efecto de dos cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en la degradación ruminal de la fibra neutro detergente de paja de trigo. **Investigación Agrícola, Producción y Sanidad Animales**, v. 10, p. 33-38, 1995.
- MERTENS, D. M. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. ASA-CSSA-SSSA, 677S. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, USA: Segoe RD. 1993. p. 535-571.
- MIRANDA, R. L. A.; COBOS, M. A. P.; MENDOZA, M. G. D.; GONZÁLEZ, M. S. S.; GARCÍA, B. C. M. Degradación *in vitro* de rastrojo de maíz con cultivos mixtos de bacterias ruminales. **Agrociencia**, v. 33, n. 2, p. 133-139. 1999.
- PATE, F. M. Nutritive value of sugar cane at different stages of maturity. **Tropical Animal Production**, v. 2, p. 108-109, 1977.
- PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, S. S.; MENDOZA-MARTÍNEZ, G. D.; BÁRCENA-GAMA R.; COBOS-PERALTA, M. Efecto de enzimas fibrolíticas glucosiladas en la digestibilidad *in vitro* de MS y MO de alfalfa (*Medicago sativa*) y ballico (*Lolium perenne*). **Revista Científica, FCV-LUZ** v. 11, n. 6, p. 505-509. 2001.
- PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, S. S.; MENDOZA-MARTÍNEZ, G. D.; BÁRCENA-GAMA R.; COBOS-PERALTA, M. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad *in vitro* de la pared celular del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). **Interciencia**, v. 27, n. 1, p. 28-32. 2002a.
- PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, S. S.; G.D. MENDOZA, G. D.; R. BÁRCENA, R.; COBOS, M. A.; HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA, M. E. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and

- rye-grass hay fed to lambs. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 11, p. 3016-3020. 2002b.
- PIRT, S. J. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. **Archives of Microbiology**, v. 133, p. 300-302, 1982.
- LÓPEZ, I.; ARANDA, I. E. M.; RAMOS, J. J. A.; MENDOZA, M. G. D. Evaluación nutricional de ocho variedades de caña de azúcar con potencial forrajero. **Revista Cubana Ciencia Agrícola**, v. 37, p. 381. 2003.
- RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, p. 604-610, 1980.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **S.A.S. User's Guide**: statistics version. 5. ed. Cary: SAS Institute Inc., 1985.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**: a biometrical approach. 2. ed. New York: McGraw-Hill Book Co., 1980. 633 p.
- TRICARICO, M.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. Effects of an exogenous microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. **Journal of Animal Science**, v. 76 (Suppl. 1), p. 289, 1998.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.
- WEIMER, P. J. Why don't ruminal bacteria digest cellulosa faster. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1496-1502, 1996.
- YANG, W. Z.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of fibrolitic enzyme additives on milk production of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 76 (Suppl. 1), p. 320, 1998.
- ZWIETERING, M. H.; DE KOOS, J. T.; HASENACK, B. E.; DE WIT, J. C.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1094-1101, 1991.

---

Protocolado em: 17 set. 2008. Aceito em: 20 maio 2010.