

Digestibilidade *in vitro* de milho moído suplementado com três níveis de enzima amilolítica exógena

Paula Lobo Ferreira de Assis¹, Cristine dos Santos Settimi Cysneiros², Reginaldo Nassar Ferrereira², Cirano José Ulhoa², Fernando Camilo Silvério Quintão⁴, João Teodoro Padua³

¹Universidade Federal de Goiás (UFG) – Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ)

Caixa Postal 131 – CEP 74001-970 Goiânia – GO - E-mail: (cysneiros cristine@hotmail.com)

²UFG – Instituto de Ciências Biológicas (ICB II) Caixa Postal 131 – CEP 74001-970 Goiânia – GO

³UFG – EVZ Caixa Postal 131 – CEP 74001-970 Goiânia – GO

⁴UFG – Escola de Agronomia (EA) Caixa Postal 131 – CEP 74001-970 Goiânia – GO

RESUMO

*Este trabalho teve por objetivo produzir uma solução de amilase de *Aspergillus awamori* e avaliar o efeito de sua adição no milho por meio da técnica de degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Os tratamentos testados foram: tratamento controle (sem enzima); 5 mL de enzima; 10 mL de enzima e 20 mL de enzima. Cada tratamento foi aplicado em 24 g de milho moído. Após os tratamentos, amostras de 500 mg foram acondicionadas em sacos de filtro-náilon (F57 - ANKOM®), lacrados a quente. A DIVMS foi avaliada pela técnica adaptada para o rúmen artificial. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. A adição de 20 mL da enzima aumentou a degradação do milho, até 24h de incubação, em relação ao tratamento controle. Entre os níveis de adição enzimática, a degradabilidade foi aumentada até o tempo de 18 horas com a adição do maior nível enzimático.*

Palavras-chave: amilase, degradabilidade, fungo.

INTRODUÇÃO

Quando o assunto é criação de bovinos, torna-se constante o número de pesquisas que envolvem a busca por aditivos que possam contribuir na alimentação animal. Mas, é notável a carência de dados obtidos no Brasil sobre a utilização de aditivos enzimáticos, como uma forma de auxiliar a eficiência no consumo e o desempenho animal.

Com o intuito de se obter alta produtividade e melhorias na criação de bovinos, geralmente, é necessária a formulação de dietas com altos teores de amido. A principal fonte de amido na dieta vem dos grãos de cereais, mais comumente do milho e do sorgo¹. Por isso, a ótima utilização do amido é fundamental para melhorar a eficiência da produção animal, sendo que a tecnologia enzimática pode contribuir para melhor aproveitamento deste alimento, auxiliando na conquista de melhores resultados.

A utilização de suplementos enzimáticos para manipular a digestão ruminal do amido, pode melhorar a produtividade além de atuar como um substituto dos promotores de crescimento nas



dietas dos animais de produção². O uso de enzimas amilolíticas exógenas apresenta-se promissor uma vez que as rações podem conter níveis de grão com 60% de amido.

Quando se fala em suplementação animal com enzimas amilolíticas como opção de melhorar a digestibilidade da ração e o desempenho animal, verifica-se que os resultados são controversos e muitas vezes não conclusivos, devido ao baixo número de pesquisas realizadas com o intuito de avaliar a aplicação desta biotecnologia³.

O objetivo deste trabalho foi produzir uma solução enzimática, utilizando o fungo *Aspergillus awamori* e avaliar o seu efeito sobre a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) de milho moído, quando submetidos a níveis diferentes de enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida nos Laboratórios de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão do ICB, UFG, localizados no município de Goiânia - GO.

Utilizou-se o fungo *Aspergillus awamori* para a produção da solução de amilase. Cinco discos de cultura (5 mm), contendo esporos do microrganismo foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 300 mL de meio de indução (fonte de carbono 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,1 g/L; sulfato de magnésio 0,5 g/L; sulfato de ferro 0,1/L; KH₂PO₄ 0,2 g/L). Como fonte de carbono, utilizou-se o milho, moído em moinho tipo Willey providos 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) a 30°C e velocidade de 180 rpm. Após 72 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada, esterilizada em filtro de *Trypanosoma cruzi* e alíquotas foram coletadas e centrifugadas, a 4000 rpm por 10 minutos, para realização do ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi realizado pelo método sacarificante⁴.

No ensaio de DIVMS, usou-se a técnica modificada para o fermentador ruminal (DAISYII)⁵, seguindo metodologia apresentada no manual de utilização do equipamento (ANKOM® Technology), fornecida pelo fabricante.

Para a coleta do líquido ruminal, foi utilizado um bovino nelore, com peso aproximado de 550 kg. O animal, mantido em baia coberta e piso cimentado, foi adaptado à dieta por período de 14 dias, antes da coleta do líquido, e teve livre acesso à água e sal mineral. A dieta padrão consistiu de volumoso à vontade e 1 kg de milho/dia.

Os tratamentos realizados foram: Controle (10 mL de água esterilizada); tratamento 1 (5 mL de enzimas, que corresponde a 216 unidades enzimáticas/Kg de matéria seca de milho); tratamento 2 (10 mL de enzimas, que corresponde a 432 unidades enzimáticas/Kg de matéria seca de milho) e tratamento 3 (20 mL de enzimas, correspondente a 864 unidades enzimáticas/Kg de matéria seca de milho).

As enzimas, após descongelamento, foram aspergidas nas amostras de milho moído. Após os tratamentos, foram adicionadas em sacos de filtro amostras de 0,5 g do milho moído (moinho tipo "Willey", peneira de crivo 1 mm e, em seguida, os sacos foram selados e incubados nos jarros contendo líquido ruminal e solução tampão, a 39°, pH 6,8 e meio anaeróbio.

Cada tratamento foi feito individualmente nos jarros da incubadora. As amostras tratadas (duplicata) foram retiradas nos tempos zero; 6; 12; 18; 24 e 48 horas de digestão, perfazendo um total de 12 sacos de filtro por jarro (4 no total). Foram realizadas duas baterias por tratamento, utilizando-se no total 96 sacos, por tratamento, mais os sacos correspondentes ao branco e ao controle.



O cálculo da DVIVMS, em porcentagem, foi realizado utilizando a fórmula (ANKOM® technology): $DVIVMS \% = 100 - ((F2 - (F * C1)) * 100 / F1)$. Em que: F = peso da tara do saco filtro; F1 = peso das amostras; F2 = peso final do saco filtro; C1 = Correção do saco de filtro em branco (peso final do saco após estufa/peso inicial do saco filtro).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, em que cada jarro de incubação foi considerado um rúmen artificial e uma parcela, sendo a média de dois saquinhos retirados em cada tempo, considerada uma repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio de software R⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da DIVMS mostraram que houve interação entre níveis de enzimas e período de incubação no rúmen ($p < 0,05$). Em relação ao controle, verificou-se que a adição de 20 mL da enzima foi o que promoveu maior degradabilidade, nos tempos de 0; 6; 12; 18 e 24 horas de incubação no rúmen (Tabela 1). Com o nível de 5 ml de enzimas, foi observado que o aumento da DIVMS, em comparação ao controle, ocorreu até o tempo de 6 horas. No entanto, para 10 mL de enzimas, a degradabilidade aumentou até o tempo de 12 horas, levando-se em consideração o tratamento controle.

No tempo de 0 hora, os aumentos observados na DIVMS para todos os tratamentos, em relação ao controle, podem ser atribuídos à atuação enzimática no substrato já no momento da aplicação da enzima, corroborando com o resultado encontrado por outros pesquisadores⁷. Esses autores verificaram incremento na digestibilidade, suplementando dietas de cordeiros à base de sorgo com amilase, com efeito linear na digestão do amido.

Nos níveis de adição enzimática, a digestibilidade da matéria seca foi aumentada até o tempo de 18 horas com adição de 20 mL da enzima, em relação aos menores níveis, não corroborando com os resultados obtidos em outra pesquisa⁷, que revelou efeito quadrático na digestibilidade aparente da matéria seca das dietas, em que níveis intermediários de adição enzimática proporcionaram maior digestibilidade da matéria seca.

Tabela 1. Médias dos valores de DIVMS (%) do milho moído nos tempos de incubação

Tratamentos	Tempos					
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h
Controle	2.43 cF*	8.26 cE	27.72 cD	45.18 bC	55.95 bB	79.73 aA
5 mL	12.66 bE	17.14 bE	31.71 bcD	40.35 cC	50.38 cB	81.83 aA
10 mL	17.39 aE	20.96 bE	35.09 bD	47.99 bC	57.83 abB	77.50 aA
20 mL	21.52 aF	28.06 aE	43.21 aD	55.40 aC	61.44 aB	81.96 aA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade
CV (%) Coluna= 7,25; CV (%) Linha= 5,75

A adição de enzimas no alimento promove mudanças na sua estrutura, tornando-o mais susceptíveis a hidrólise. Aumentos da taxa de degradação da dieta no rúmen estão relacionados



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

à maior facilidade na colonização dos alimentos pelas bactérias em relação do tratamento enzimático⁹.

CONCLUSÕES

A adição de enzima amilolítica exógena melhorou a DIVMS do milho moído, sendo que, neste experimento, 20 mL foi considerado o melhor nível de aplicação. Mais pesquisas são necessárias para elucidar o modo de ação e o nível de inclusão ideal para cada método de utilização.

REFERÊNCIAS

- (1) THEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1649-1662, 1986.
- (2) SOUZA, E. L.; HOFFMANN, E. H. E.; CASTILHO, V. M.; LIMA, V. A.; BELLINI, M. Z.; CRUZ, V. D.; CRUZ, R. Produção e Caracterização de α -Amilase produzida por *Rhizopus* sp. **Arquivos Biológicos e Tecnologia** v.39, n.4, p. 831-839. 1996.
- (3) ROJO RUBIO, R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; VALDEZ, O. D. M.; REBOLLAR, S. R.; JIMENEZ, D. C.; MARTÍNEZ, J. H.; RAZO, F. J. G. Enzimas amilolíticas exógenas na em la alimentación de ruminantes. **Universidad y Ciencia**, v. 02,n.23, p. 173 – 182, 2007.
- (4) MILLER, G. L. Use of dinitosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- (5) 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, p. 104-111, 1963.
- (6) R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012). 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>.
- (7) ROJO RUBIO, R.; MENDOZA, G. D.; GONZALEZ, S. S.; LANDOIS, L.; BARCENA, R.; CROSBY, M. M. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. **Animal Feed Science Technology** v, 124, p.655-665, 2005.
- (8) NSEREKO, V. L.; BEAUCHEMIN, K. A.; MORGAVI, D. P.; RODE, L.; FURTADO, M. A. F.; MCALLISTER, T. A.; IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; WANG, Y. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p.14-20, 2002.
- (9) COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzyme for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628 - 2638, 2003.