

Efeito de Amilase de *Aspergillus awamori* sobre a Digestibilidade *in vitro* de Milho

Camila Silva de Carvalho Costa¹, Cristine dos Santos Settimi Cysneiros², Cirano José Ulhoa², Camilla Antunes Fonseca³, Murillo Queiroz de Almeida Melo³, Marcus Vinícius Pereira Assunção³, Reginaldo Nassar Ferrereira²

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

RESUMO

*Avaliou-se o efeito de uma solução de amilase de *Aspergillus awamori* sobre a digestibilidade de milho com diferentes granulometrias. Os tratamentos foram: controle (0 unidade enzimática/Kg de matéria seca do milho); nível 1 (484,79 unidades enzimática/Kg de matéria seca do milho) e nível 2 (969,58 unidades enzimática/Kg de matéria seca do milho), que foram aplicados em milho com 1,18 mm; 2,00 mm; menor que 4,00 mm; maior que 4,00 mm e grão inteiro. A digestibilidade foi avaliada pela técnica adaptada para o rúmen artificial. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 (5 granulometrias e 3 níveis enzimáticos), com quatro repetições. Na granulometria de 1,18 mm, observou-se aumento da digestibilidade com adição de 484,79 unidades enzimática/Kg de matéria seca do milho em relação ao controle. Foram constatadas melhoras na digestibilidade do milho com granulometria menor que 4,00 mm, com adição de 484,79 e 969,58 unidades enzimática, em relação ao controle. Os resultados indicam que a amilase produzida possui efeito em ambiente ruminal.*

Palavras-chave: degradabilidade, enzima amilolítica, fungo.

INTRODUÇÃO

O amido representa o maior componente das dietas de bovinos de alta produção. A melhora na digestão deste composto no trato digestivo dos ruminantes representa aumento no desempenho animal. Na atualidade, a maior digestibilidade do amido é obtida pelo tratamento térmico do grão, o que representa alto gasto de energia elétrica, com custo elevado. Melhoras na produtividade animal podem ser obtidas por meio da utilização de aditivo enzimático na dieta de bovinos. A suplementação exógena de amilase, teoricamente, aumenta a disponibilidade dos produtos da hidrólise do amido no rúmen, com conseqüente alteração do processo de fermentação ruminal, proporcionando maior aporte dos nutrientes para o metabolismo e para produção animal¹. Enzimas amilases adicionadas às dietas dos ruminantes são produzidas por microrganismos específicos, não possuem função nutricional direta, mas melhoram a hidrólise do amido da dieta no rúmen. Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar uma solução de amilase e avaliar os efeitos da adição de três níveis enzimáticos em milho com diferentes granulometrias por meio do ensaio de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).



MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão do ICB, UFG, localizados no município de Goiânia - GO.

Para a produção da solução da enzima amilase (SE), utilizou-se o fungo *Aspergillus awamori*. Cinco discos de cultura (5 mm), com esporos do micro-organismo 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 Shaker, 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 e alíquotas foram coletadas e centrifugadas, a 4000 rpm por 10 minutos, para realização do ensaio enzimático. A atividade de amilase utilizada no experimento foi de 139,62 U/mL, que foi determinada pelo método sacarificante².

No ensaio de DIVMS, usou-se a técnica modificada para o fermentador ruminal (DAISYII)³, seguindo metodologia apresentada no manual de utilização do equipamento (ANKOM® Technology), fornecida pelo fabricante.

Para a coleta do líquido ruminal, foi utilizado um novilho mestiço ³/₄ de holandês, com peso aproximado de 370 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 alimentação foi à base de 1 kg de milho integral inteiro dia, fornecido às 8 h, e feno de Tifton 85, ad libitum.

Os tratamentos realizados foram: controle (0 unidade enzimática/Kg de matéria seca do milho); nível 1 (484,79 unidades enzimática/Kg de matéria seca do milho) e nível 2 (969,58 unidades enzimática/Kg de matéria seca do milho). Cada tratamento foi aplicado por aspersão, de forma uniforme, em 24 g de amostras do milho com cinco diferentes granulometrias, a saber: 1,18 mm; 2,00 mm; menor que 4,00 mm; maior que 4,00 mm e grão inteiro.

Amostras de 0,5 g do milho, após os tratamentos, foram colocadas em sacos de filtro-náilon (F57-ANKOM®), lacrados a quente. Para todas as granulometrias e tratamentos, em cada jarro do fermentador ruminal, quatro no total, contendo solução tampão e líquido ruminal, a 39°C, pH 6,8 e meio anaeróbio, foram colocadas equitativamente 32 bolsas (30 amostras, um branco e uma testemunha). A DIVMS foi avaliada após 24 horas de digestão. O cálculo da DVIVMS, em porcentagem, foi realizado utilizando a fórmula (ANKOM® technology): DVIVMS % = 100 - ((W3 - (W1 * C1)) * 100 / W2).

Em que: W1 = peso da tara do saco filtro; W2 = peso das amostras; W3 = peso final do saco de filtro depois da determinação in vitro; C1 = Correção do saco de filtro em branco (peso final do saco após estufa/peso inicial do saco filtro).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 (5 granulometrias e 3 níveis de enzimas), com quatro repetições. 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 R⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da DIVMS mostram que, para cada tratamento, houve diferença entre as granulometrias do milho (p < 0,01), obtendo-se maior DIVMS para a granulometria de 1,18 mm,



com valores de 65,95; 73,65 e 69,53% para controle; nível 1 e nível 2, respectivamente. Foi verificada interação entre nível enzimático e granulometria ($p < 0,01$), Tabela 1. Para a granulometria de 1,18 mm, constatou-se aumento da DIVMS na ordem de 11,68 e 5,43%, com adição de 484,79 unidades enzimática (nível 1) e 969,58 unidades enzimática (nível 2), em relação ao tratamento controle, respectivamente. Observou-se melhora na DIVMS do milho com granulometria menor que 4 mm, para os níveis enzimático 1 e 2, em comparação ao controle. Os valores obtidos foram 37,87; 48,39 e 28,77%, respectivamente.

Tabela 1. Médias da DIVMS (%) do milho no nível de enzimas e granulometria

Granulometria (mm)	Nível enzimático (mL)		
	Controle	Nível 1	Nível 2
1,18	65,95 aB	73, 65 aA	69, 53 aAB
2,0	38,39 bA	43, 38 bA	40, 59 cA
<4,0	28, 77 cC	37, 87 bB	48 39 bA
>4,0	23,96 cA	27, 96 cA	26, 08 dA
Grão inteiro	15,01 dA	17, 73 dA	14, 85 eA

Médias seguidas de letras diferentes, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. CV% = 7,77.

A maior digestibilidade observada para granulometria de 1,18 mm pode ser explicada pela superfície de contato enzima-substrato. Quanto maior a superfície de contato mais abrangente será a ação enzimática no substrato, com aumento da digestão do alimento.

Algumas das variabilidades associadas ao uso de enzimas exógenas nas dietas de ruminantes se devem a adição com insuficiente ou excessiva atividade enzimática. A falta de resposta a adição de enzimas pode ser indicativo de uma insuficiente suplementação da atividade enzimática⁵.

Neste experimento, verificamos que a adição de 484,79 unidades enzimática/Kg de matéria seca, em relação ao controle, aumentou a digestibilidade do milho nas granulometria de 1,18 e < 4 mm, indicando suficiente atividade enzimática nessa dosagem.

A eficácia reduzida da suplementação de altos níveis de incorporação na dieta não está clara. Quando enzimas exógenas são aplicadas em quantidades elevadas, o rompimento da estrutura superficial dos alimentos diminuiu porque o excesso de enzima exógena pode restringir a adesão microbiana ao alimento, diminuindo sua digestão⁶.

Verificamos no experimento que a utilização de 969,58 unidades enzimática/Kg de matéria seca do milho melhorou a DIVMS apenas para granulometria < 4 mm, o que pode ser explicado pela adequada relação entre superfície de contato e dosagem enzimática.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, a granulometria do milho interferiu na digestibilidade ruminal in vitro. A enzima amilase aumentou a DIVMS do milho com granulometria de 1,18 mm



III SIMBBTEC
Londrina 2013

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

e < 4,00 mm. Compreender a atividade enzimática e o nível adequado para aplicação na dieta de ruminante, bem como a produção em escala da amilase, são os desafios a serem alcançados.

REFERÊNCIAS

- (1) TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*- amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, n. 1, p. 136-150, 2008.
- (2) MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- (3) 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.
- (4) 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>.
- (5) 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..
- (6) 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.