



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM ECOLOGIA E PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL**

**EFEITO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS DE *Aspergillus awamori*
SOBRE A DIGESTÃO DO AMIDO EM BOVINOS**

PATRÍCIA RABELO DE FREITAS

**GOIÂNIA
ABRIL – 2012**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM ECOLOGIA E PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL**

**EFEITO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS DE *Aspergillus awamori*
SOBRE A DIGESTÃO DO AMIDO EM BOVINOS**

Autora: Patrícia Rabelo de Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Delma Machado Cantisani Padua

Co-orientador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar

Dissertação apresentada à Pontifícia Universidade Católica de Goiás, junto ao Programa de Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável, como parte das exigências para a obtenção do grau de MESTRE em Ecologia e Produção Sustentável.

GOIÂNIA
ABRIL - 2012



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM ECOLOGIA E PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL**

PATRÍCIA RABELO DE FREITAS

**EFEITO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS DE *Aspergillus awamori*
SOBRE A DIGESTÃO DO AMIDO EM BOVINOS**

Dissertação DEFENDIDA E APROVADA em 15/05/2012 pela Banca Examinadora

**Profa. Dra. Delma Machado Cantisani Padua
Orientadora
Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás**

**Prof. Dra. Maria Eloisa Cardoso da Rosa
Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás**

**Prof. Dr. Cirano José Uihôa
Universidade Federal de Goiás – UFG**

GOIÂNIA
ABRIL - 2012

DEDICATÓRIA

A Deus por me acompanhar, proteger, guiar e iluminar sempre o meu caminho;

Aos meus pais, Nicanor e Maria José, pelos ensinamentos, pelo eterno amor, pelo apoio e incentivo;

Ao meu avô presente e minha avó que se foi, os quais com sua experiência me passaram grandes ensinamentos de perseverança;

Ao meu filho, Guilherme, que com seu sorriso gracioso renova a vontade de sempre continuar;

Com amor e Gratidão
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. e coorientador da Universidade Federal de Goiás (UFG), Reginaldo Nassar pela confiança depositada, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela ajuda durante a construção deste trabalho.

A Profa. Dra. e orientadora Delma Machado Cantisani Padua pelo apoio e ajuda na realização e finalização desta conquista.

A Profa. Dra. e coordenadora do Mestrado de Ecologia e Produção Sustentável (MEPS) Maria Eloísa Cardoso da Rosa pela amizade, apoio, confiança e incentivo no término deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cirano José Uihôa do laboratório de Enzimologia da UFG, por todas as contribuições.

Aos professores do MEPS por transmitir ensinamentos valiosos.

A coordenadora do laboratório Cristine Cisneyros pelo carinho, amizade e ajuda durante o período experimental deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia da Digestão da UFG, pelo apoio.

Aos colegas de sala da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo convívio durante a realização das disciplinas.

As minhas amigas Silvia, Thassia, Luciane e Poliana que dividiram comigo os momentos bons e críticos durante o curso.

Ao meu companheiro Djean que me apoiou e acreditou na concretização deste sonho.

A FAPEG pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos aqueles que acreditaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Avaliou-se o efeito de uma solução de amilase produzida por *Aspergillus awamori* sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de milho. Foram realizados dois experimentos, onde o primeiro a solução de enzima amilase foi aplicada por pulverização em 24g de milho moído (2 mm) e o segundo a solução de enzima amilase foi aplicado no fluido ruminal. Os tratamentos foram: controle (0 enzima), T1 (5MI de enzima) e T2 (10MI de enzima) para cada experimento. O ensaio da DIVMS foi obtido usando a técnica de rúmens artificiais adaptada durante os períodos de 15'; 1,30", 3, 6, 12 e 24 horas. Para a coleta de líquido ruminal foi utilizado um bovino de peso aproximado de 380 kg. O animal foi mantido em baia e adaptado a dieta durante um período de 10 dias antes do recolhimento do líquido ruminal com acesso livre à água e sal mineral. Para os dois experimentos foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas 3 x 6, com quatro repetições (jarros). As parcelas foram constituídas por milho tratado com três diferentes níveis de enzima e as subparcelas por seis momentos de digestão. Para enzima amilase aplicada no líquido ruminal o resultado de DIVMS para os três tratamentos nos períodos de 3, 6 e 12 horas não diferiram estatisticamente entre si. Entre o tratamento controle e T1 houve diferença significativa nos tempos 15' e 1,30" horas. Foi observado maior DIVMS para o tratamento controle, em relação ao T1, com valores de 54,54% e 49,05 , e não houve diferença nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas. Entre o tratamento controle e T2 não houve diferença no tempo 15" e 24 horas. O controle foi superior a T2 28,74% e 10,53%, respectivamente. A DIVMS foi superior para o tratamento controle, indicando que os níveis de 5 e 10 ml de enzimas injectados no fluido ruminal não aumentaram a DIVMS. Para amilase aplicada por pulverização em 24g de milho moído, no tempo de 15', observou-se que o tratamento controle e T1 não diferiram. No entanto, o T2 melhorou a DIVMS em 55,54%, comparado ao grupo controle. O tratamento T1 aumentou a DIVMS apenas em tempos de 3 e 24 horas de incubação, em relação ao controle. Com a aplicação de 10 ml de enzima, a DIVMS aumentou em todos os tempos de incubação, em comparação com o controle.

Palavras-chave: ANKOM, amilase, degradabilidade, fungo, rúmem.

ABSTRACT

We evaluated the effect of a solution of amylase produced by *Aspergillus awamori* on the in vitro dry matter (DIVMS) of corn. Two experiments were conducted, where the first solution of the enzyme amylase was applied by spraying 24g ground corn (2 mm) and the second amylase enzyme solution was applied in rumen fluid. The treatments were: control (0 enzyme), T1 (5ml of enzyme) and T2 (10 ml of enzyme) for each experiment. The test DIVMS was obtained using the technique of artificial rumens adapted during periods of 15', 1.30', 3, 6, 12 and 24 hours. For the collection of rumen fluid was used for cattle weighing approximately 380 kg. The animal was kept at bay and adapted the diet for a period of 10 days before the collection of rumen fluid with free access to water and mineral salt. For the two experiments it was adopted a completely randomized design in a split-plot 3 x 6, with four replicates (jars). The plots consist of corn treated with three different enzyme levels and the subplots of six times of digestion. For amylase enzyme applied to the result of ruminal DIVMS for the three treatments at 3, 6 and 12 hours did not differ statistically. Between treatment and control was no significant difference in T1 times 15' and 1.30' hours. DIVMS was higher for the control treatment, with respect to T1, values of 54.54 and 49.05%, and no difference in days 3, 6, 12 and 24 hours. Between treatment and control T2 there was no difference in time 15' and 24 hours. The control was higher than T2 28.74% and 10.53% respectively. DIVMS was superior to the control treatment, indicating that levels of 5 and 10 ml of enzyme injected into the ruminal fluid increased in vitro data. For amylase applied by spraying 24 g of corn in time 15', it was observed that the treatment did not differ from control and T1. However, the T2 improved IVDMD of 55.54% compared to the control group. Treatment 1 DIVMS increased only in times of 3 and 24 hours of incubation, as compared to control. With the application of 10 ml of enzyme, in vitro data increased in all incubation times in comparison with the control.

Key Words: ANKOM, amylase, degradability, fungi, rumen.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Amido.....	5
2.2 Enzima amilase na alimentação animal.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Linhagem utilizada e manutenção do fungo.....	18
3.2 Produção, inoculação, filtragem e liofilização da solução enzimática.....	18
3.3 Determinação da atividade de amilase.....	19
3.4 Delineamento Experimental.....	19
3.5 Preparação das soluções tampões.....	21
3.6 Preparações dos sacos de náilon.....	22
3.7 Coleta do líquido ruminal e incubação.....	22
3.8 Digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS).....	23

3.9 Determinação de glicose e matéria seca.....	25
4.0 Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Resultados de Matéria Seca	27
4.2 Resultados de DIVMS.....	27
4.2.1 Aspersão da amilase sobre o substrato.....	27
4.2.2 Aplicação da amilase no líquido ruminal	29
4.3 Resultados de Glicose.....	31
4.3.1 Aspersão da amilase no substrato.....	31
4.3.2 Aplicação da amilase no líquido ruminal.....	32
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Quadro 1 – Resultados de Matéria seca para os diferentes níveis de Enzima.....	27
2. Quadro 2 – Médias de DIVMS (%) do milho moído submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação.....	28
3. Quadro 3 – Médias de DIVMS (%) do líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação.....	30
4. Quadro 4 – Médias de Glicose presente no líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação.....	32
5. Quadro 5 – Médias de Glicose presente no líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Figura 1 – Classificação das enzimas amilolíticas	13
2. Figura 2 – Representação Esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase e amiloglicosidae	14
3. Figura 3 – Sequência de eventos para a produção da enzima amilase.....	21
4. Figura 4 - Sequência de eventos para a incubação da enzima amilase.....	24
5. Figura 5 - Sequência de eventos para a determinação da matéria seca e glicose.....	25

1 INTRODUÇÃO

Atualmente uma das maiores preocupações da humanidade é o aumento da produção de alimentos para atender a demanda crescente da população sem degradar o meio ambiente.

É necessário criar novas tecnologias para aumentar a produção de maneira sustentável. Uma das inovações é a biotecnologia enzimática, a qual utiliza enzima na alimentação animal para melhor aproveitamento do alimento e para aumentar a produtividade.

A enzimologia industrial é um importante ramo da biotecnologia, pois permite às indústrias usarem processos mais econômicos, diminuindo o consumo de energia, sendo mais confiáveis com menor agressão ao meio ambiente.

As enzimas atuam na remoção dos fatores antinutricionais, tornando certos nutrientes disponíveis para a absorção e também aumentando o valor energético de ingredientes mais baratos. As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, devendo-se, principalmente, a vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão.

As principais metas de suplementação enzimática para os animais são: remover ou destruir fatores antinutricionais dos grãos; aumentar a digestibilidade total da ração; potencializar a ação das enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes.

As amilases são hidrolases capazes de degradar o amido e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores. São amplamente distribuídas na natureza, encontradas na indústria devido á grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais.

Pesquisas na área de suplementos enzimáticos para dietas de ruminantes têm sido realizadas principalmente com celulasas e hemicelulasas enquanto as atividades envolvidas no processo de digestão do amido têm sido pouco estudadas (TRICARITO et al., 2008).

Uma vez que o amido representa o maior componente nas dietas de bovinos de alta produtividade, a utilização de suplementos enzimáticos para manipular a digestão do amido no rúmen pode permitir melhora na produtividade. A utilização de uma enzima pode propiciar aumento de produtividade com menor capital investido.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de amilase obtida de *Aspergillus awamori* sobre a digestibilidade *In vitro* da matéria seca (DIVMS) do milho para bovinos em regime de confinamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com a necessidade de aumentar a produção de alimentos, e ao mesmo tempo preservar o meio ambiente deve-se ter uma visão modificada dos métodos de produção por parte dos produtores, tanto no ramo agrícola como no ramo da pecuária. Acompanhando esta tendência das políticas de desenvolvimento sustentável é notória a pressão que a sociedade vem exercendo no sentido de mudanças dos modelos atuais de exploração. A preservação dos recursos naturais e da biodiversidade são elementos que fazem parte da pauta de discussões e ações governamentais.

Com esse cenário, e a busca pelo aumento da produção de alimento, surge a necessidade de incorporar mais tecnologia aos sistemas de produção. A intensificação dos sistemas de produção pastoris pode ser considerado uma alternativa de exploração sustentável, com conseqüente redução na abertura de novas áreas para a produção agropecuária.

Visando sempre este aumento de produção aliado à redução de custos, a alimentação e tratamento dos animais também ocorrem de forma industrial. A alimentação é composta por uma mistura de grãos com alto teor de proteínas e outros ingredientes, buscando uma taxa de crescimento mais rápida.

O principal atalho para uma nação alcançar o desenvolvimento é utilizar de modo adequado, seu potencial científico para gerar inovações tecnológicas (CRESTANA, 2004). Nos últimos anos o agronegócio brasileiro apresentou excelente desempenho entre os setores econômicos nacionais, motivo pelo qual é denominado "Âncora Verde" do plano de estabilização econômica e das políticas macroeconômicas do governo (CRESTANA & SILVA, 2006).

A crescente demanda global por carne, em particular no Brasil, deverá aumentar a produção animal intensiva. Por conseguinte, temos também a produção de grandes poluentes como o nitrogênio (N), fósforo (P) e gases de efeito de estufa (GEE).

Segundo Kebreab et al. (2010) a manipulação dietética tem demonstrado eficiência na redução da poluição de nutrientes/minerais e das emissões de GEE. A diminuição de proteína bruta na dieta podem reduzir substancialmente a excreção de N e a volatilização de amônia, sem comprometer a produtividade. Da mesma forma, a redução da ingestão de P em bovinos leiteiros pode reduzir a excreção de P em até 10%. Alterações do tipo de N e P consumidos e do nível energético da dieta sobre a quantidade e o tipo de N e P excretado também foram relatadas. A manipulação da dieta também tem impacto sobre a quantidade de emissões de gases de efeito estufa, em particular, a proveniente de fermentação entérica. A alimentação do gado com dietas contendo elevado teor de trigo baixo de fibra, por exemplo, reduz a produção de acetato no rúmen e acarreta menor produção de metano. Emissões decorrentes de estrume de animais alimentados com alto teor de fibra na dieta tendem a ser maiores. Evidenciou-se também que a dieta afeta as emissões de esterco no solo. Em decorrência do aumento do nível de produção para atender à demanda global de carne de ruminantes e produtos lácteos, a manipulação dietética será útil para atender às preocupações ambientais.

Frente aos desafios atuais de aumentar a produção de alimento em sintonia com a preservação dos recursos naturais, a agropecuária vem se inovando tecnologicamente, desde os centros de pesquisa, passando pela indústria até alcançar as melhorias nos sistemas de produção. A alimentação animal, por

exemplo, vem sofrendo forte inovação tecnológica, por ser um fator primordial para o aumento da produtividade.

2.1 Amido

O amido é o principal componente de muitos grãos de leguminosas, representando 70 a 80% da composição dos grãos de cereais (ZEOULA et al., 1999). É encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, cevada, trigo, arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca, cujo tamanho e forma dos grãos são específicos para os distintos cereais (MORAES, 2004). O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal. Possui em sua constituição amilose (25%) e amilopectina (75%).

A amilose é um polímero linear contendo cerca de 6.000 unidades de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Apesar da consideração que a amilose é essencialmente linear, atualmente é evidenciado que a amilose não assume completamente esta característica (KARIM, et al., 2000).

A amilopectina consiste em cadeias lineares mais curtas de ligações α -1,4 contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligação α -1,6 com 15 a 45 unidades de glicose. Uma molécula complexa de amilopectina contém cerca de 2.000.000 de unidades de glicose, sendo considerada uma das maiores moléculas da natureza (VAN DER MAAREL et al., 2002).

O amido é um polímero de glicose de alta massa molecular, sendo juntamente com a celulose, um dos polímeros de origem vegetal mais amplamente disponível na natureza (BECK e ZIEGLER, 1989), considerando como um dos principais componentes da dieta humana e de outros animais.

Os carboidratos são importantes na nutrição dos ruminantes. Estes animais foram preparados pela natureza para consumirem alimentos fibrosos a partir dos quais recebem energia, proteína, minerais e vitaminas para atender as suas exigências nutricionais. Porém a necessidade de aumentar a produção de alimentos de origem animal determinou melhora na alimentação dos ruminantes por meio da utilização de suplementação com concentrados.

É crescente o número de trabalhos de pesquisa visando o aumento da produtividade dos ruminantes com o uso de concentrados, com o objetivo de não apenas melhorar a qualidade da proteína fornecida, mas também o fornecimento de energia, de maneira mais concentrada (LOPES et al., 2000). Assim os pesquisadores começaram a estudar o amido por ser um dos componentes mais importantes na dieta.

De acordo com Caetano (2008) a utilização de dietas com elevadas proporções de concentrado esta cada vez maior. Isto ocorre devido á dificuldade de manejo de grandes quantidades de volumoso e , principalmente, dos preços mais baixo por unidade de energia dos principais ingredientes dos concentrados. Com intuito de aumentar e melhorar a eficiência e reduzir custos de produção tem-se utilizado rações com altos teores de concentrado para os ruminantes, principalmente para bovíos confinados.

A adição de grandes quantidades de grãos de cereais na dieta de bovinos baseia-se no fato dos mesmos serem ricos em amido, que é o principal responsável pela energia necessária para manutenção e crescimento das bactérias ruminais (PASSINI et al., 2003). De todas as substâncias contidas na dieta, o amido é a de longe aquela que fornece a maior proporção da energia digestível consumida por um

bovino confinado. Problemas com sua digestibilidade , causados por processamento inadequado, certamente reduzirão o desempenho animal.

Pela grande importância, a fonte de grãos e seus processamentos vêm sendo estudados há anos. A maioria dos confinamentos comerciais seleciona os grãos que irão compor a dieta dos animais, baseados na estimativa de sua digestibilidade e no seu custo de oportunidade. Owens et al. (1997) revisaram os resultados de 605 comparações de fontes de amido e tipos de processamentos sobre o desempenho do gado de corte. Os autores concluíram que as fontes de amido de alta digestibilidade ou as que sofreram processamento para aumentar a disponibilidade do amido, de forma geral, aumentaram a energia metabolizável das rações e diminuíram o consumo de matéria seca. Esses efeitos parecem melhorar a eficiência alimentar dos animais.

A digestibilidade do amido pode variar grandemente dependendo de vários fatores como o tipo de cereal, teor de amilopectina e de amilose, camada externa do grânulo, presença de uma matriz protéica revestindo o grânulo de amido, e método de processamento do grão que pode aumentar a área de superfície do grão, aumentando a susceptibilidade do amido á ação enzimática e um significativo aumento da digestibilidade tanto no rumem como no intestino. (ZEOULA; CALDAS NETO, 2001).

Zeoula e Caldas Neto (2001) apresentaram em seu trabalho que a digestibilidade foi maior para grãos de milho floculado (98,9%) seguido de silagem de grão úmido (95,3%), milho laminado a vapor (93,2%), laminado (92,2%) e moído (90,0%).

Qualquer problema com a digestibilidade do amido contido na dieta poderá afetar o desempenho do animal. A digestibilidade do amido pode variar mediante alguns fatores como os vários métodos de processamento. Têm sido demonstrados os benefícios do processamento dos grãos de cereais, o que aumenta a digestibilidade ruminal do amido, e com isto, propicia mais energia disponível para o desenvolvimento da população microbiana, resultando em maior produção de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs). Porém além do custo de instalação, os processamentos possuem um gasto muito alto de energia, sendo um dos impedimentos para a execução desta metodologia.

A má utilização do amido é uma preocupação no Brasil, por isso alguns trabalhos vêm estudando as perdas de amido nas fezes (CAETANO, 2008), diferenças no consumo (ALMEIDA, 2005) e no desempenho (LANNA, 2004).

As maiores concentrações de amido nas fezes, além de estar relacionado com a digestibilidade do amido, indicam também uma provável alteração no local de digestão, passando do rumem par ao trato gastrointestinal posterior. Há uma divergência entre os pesquisadores em relação ao local de digestão para o amido. Durante a fermentação ruminal ocorrem perdas por calor e metano (OWENS; ZINN, 2005), enquanto a digestão no duodeno e jejuno pode não ser plenamente eficiente devido á alta taxa de passagem do grão, adaptação enzimática na digestão do amido e absorção e utilização da glicose pelas vísceras drenadas pela veia porta (NOCEK; TAMMINGA, 1991).

Alguns trabalhos (ZINN; OWENS; WARE, 2002; OWENS; ZINN, 2005) mostram que a digestão do amido da dieta pode ser monitorado pela sua concentração nas fezes. Estes trabalhos indicam que a correlação entre o teor de

amido fecal e digestibilidade do amido é alta. Vários trabalhos foram executados com o objetivo de quantificar o aproveitamento do amido em grãos processados (CAMPLING, 1991; ROWE; CHOCT; PETHICK, 1999; OWENZ; ZINN, 2005).

Caetano (2008) encontrou diferenças significativas do teor de amido fecal em relação ao tempo após o trato, demonstrando maiores teores de amido nas fezes nas primeiras horas após o fornecimento da dieta, parte da manhã. Existe diferença quanto ao teor de amido nas fezes de animais de diferentes grupos genéticos, indicando que animais Nelore puros perdem cerca de 28% mais amido que animais com algum sangue cruzado.

Assim um dos métodos utilizados para melhorar o aproveitamento do amido reduzindo perdas nas fezes e conseqüentemente melhorar o desempenho animal, é a manipulação dietética, utilizando enzimas exógenas na dieta de ruminantes.

2.2 Enzima amilase na alimentação animal

Enzimas são substâncias naturais envolvidas nos processos bioquímicos, que dentre outras funções, são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos em açúcares.

As enzimas são catalisadores orgânicos produzidos pelas células vivas e uma vez sintetizados por uma célula, poderão atuar independentemente da mesma, sobre condições apropriadas. As enzimas são reativas apenas com seus substratos específicos e não reativas com outros substratos, além de ser favoráveis ao meio ambiente (KAMEDA *et al.*, 2007).

Novas tecnologias, como produção biotecnológica de enzimas, são constantemente apresentadas. O intervalo entre o desenvolvimento e utilização prática das inovações geralmente é de vários anos. Na primeira etapa, estudos laboratoriais demonstram a potencialidade de utilização. A segunda etapa envolve a viabilização de uso prático, com desenvolvimento de processos industriais economicamente viáveis. As próximas etapas estão relacionadas à divulgação, comercialização e amadurecimento do projeto tecnológico. Atualmente, vários aditivos biotecnológicos têm sido rotineiramente usados na indústria animal. Todavia para ser adotada, ela necessita ser comprovada cientificamente e testada em condições de campo (FERNANDES e MALAGUIDO, 2007)

Conforme Minafra (2007) as novas aplicações da biotecnologia, amplamente debatidas pela comunidade científica, são de alta importância econômica e social, pois possibilitam o aumento expressivo da produtividade, melhora da qualidade de produtos e redução do impacto ambiental. As enzimas são produzidas por microorganismos específicos e sob condições assépticas e altamente controladas. As condições ideais de crescimento para esses microorganismos, normalmente, são bem conhecidas e testadas. A temperatura, os nutrientes e o suprimento de oxigênio são ajustados de modo a criar condições próprias para seu desenvolvimento.

As enzimas, vêm sendo utilizadas como catalizadores em processos industriais em nível mundial, implicando no surgimento de um novo campo de estudo e pesquisa, a tecnologia enzimática (PEREIRA, 2002). Esta linha de pesquisa tenta aliar as vantagens inatas das enzimas, sua especificidade e eficiência catalítica e,

encontrar metodologias viáveis que regulem sua instabilidade e reduza os custos de sua produção para aplicação na indústria de alimentação animal.

Pesquisas na área de suplementos enzimáticos para dietas de ruminantes têm sido realizadas principalmente com celulasas e hemicelulasas, enquanto as atividades envolvidas no processo de digestão do amido têm sido pouco estudadas. Considerando que o amido representa o maior componente nas dietas de bovinos de alta produtividade, a utilização de suplementos enzimáticos para manipular a digestão do amido no rúmen pode permitir melhora na produtividade (TRICARICO, 2008). A utilização de uma enzima na alimentação pode propiciar aumento de produtividade com menor capital investido.

Segundo Guenter (2004), as principais metas de suplementação enzimática para os animais são: remover ou destruir fatores antinutricionais dos grãos; aumentar a digestibilidade total da ração; potencializar a ação das enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes. Ghazalah et al. (2005) afirmam que a suplementação enzimática melhora o desempenho animal e permite a redução de energia na formulação das rações animais.

Com o gradual conhecimento da natureza das enzimas, extratos obtidos a partir de certos tecidos animais, como o do pâncreas e da mucosa do estômago, de tecidos vegetais, como o do malte e do mamão ou produzidas por bactérias, leveduras e fungos, foram encontradas muitas aplicações técnicas para as enzimas (LEADLAY, 1993). As amilases, por exemplo, encontram aplicações nas indústrias de alimentação animal.

A produção de enzimas amilolíticas teve início na primeira metade do século passado em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. As amilases promovem a hidrólise do amido em açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Essas enzimas são designadas amilolíticas porque promovem a degradação do amido. (HARGER, 1982).

As amilases são hidrolases capazes de degradar o amido e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores. São amplamente distribuídas na natureza, encontradas na indústria devido à grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais (MINAFRA, 2007)

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, apresentando grande importância biotecnológica, tais como aplicações nas indústrias têxteis, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica. Apesar de poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

GUPTA *et al* (2003) mostraram que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As

exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido.

COSTA (1996) apresenta um esquema (Figura 1) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

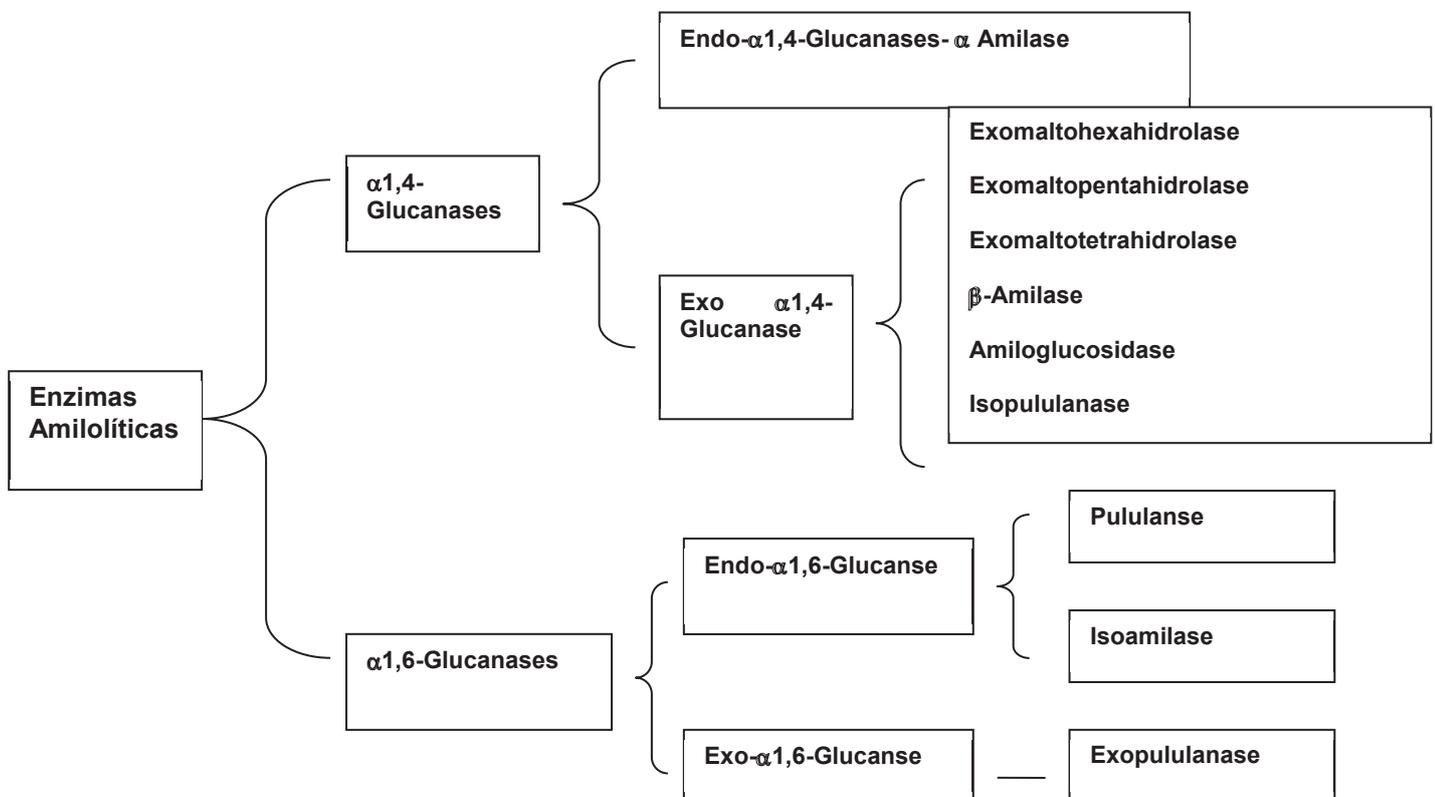


Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas

Fonte: COSTA (1996)

A Figura 2 demonstra uma representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas sobre uma molécula de amido, que é considerada molécula polissacarídica.

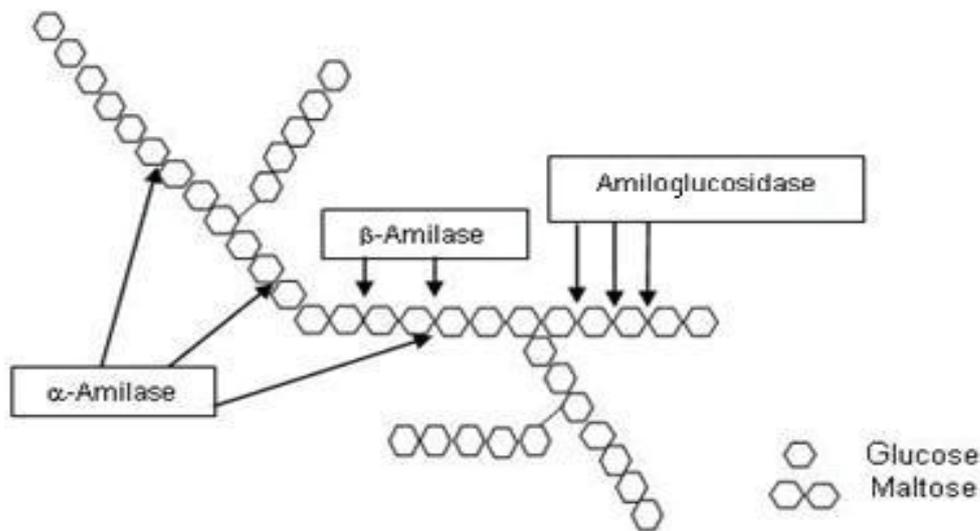


Figura 2 – Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase.

Fonte: COSTA (1996)

Os fungos destacam-se pela sua capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteína. *Aspergillus awamori* vem sendo utilizado pela indústria para produção de amilases, amiloglucosidases e proteases. Seu uso é vantajoso, pois é seguro para a fabricação de produtos alimentícios destinados ao consumo humano, sendo considerado não tóxico e não patogênico (CUI et al., 1998).

A companhia EDC (2004) divulga que alguns tipos de amilases são direcionadas para o uso em alimentação animal ou na agricultura, podendo ser aplicadas na produção de silagem, por exemplo. As enzimas são usadas como aditivos alimentares sendo que a escolha da enzima depende do tipo de ração e da espécie animal. Como exemplos podem ser citados os produtos enzimáticos produzidos no exterior para aplicação em ração animal. Um dos produtos derivam

dos fungos *A. oryzae* e *B. subtilis* combinando principalmente amilases, proteases e β -glucanases com outras enzimas, para aplicação em inoculantes de silagem, aditivos para compostagem e em ração animal. Outra enzima produzida é a α -amilase, derivada do Fungo *Aspergillus* sp. disponível na forma líquida ou em pó.

As amilases são empregadas para aumentar a digestibilidade das rações no sistema digestivo dos animais, diminuindo a quantidade de dejetos e gases liberados ao meio ambiente bem como contribui para o desenvolvimento e crescimento dos animais, porque é possível a sua introdução na dieta logo após o desmame (NOVOZYMES, 2004). Os animais novos não dispõem de sistema digestivo capaz de digerir a ração animal, então enzimas como amilases são adicionadas na ração animal para auxiliar no metabolismo de carboidratos, assim como as proteases auxiliam no metabolismo protéico e as lipases, no metabolismo lipídico.

O rúmen possui importantes populações bacterianas celulolíticas, grande quantidades de fungos e protozoários anaeróbicos. Os protozoários do rúmen não são essenciais para a digestão da fibra, e na ausência deles freqüentemente o numero de bactérias aumenta e mantém a digestão da fibra de celulose. Recentemente, as bactérias celulolíticas do rúmen foram estudadas extensamente e foram apontadas como os primeiros degradadores das fibras. Os fungos anaeróbicos são capazes de colonizar fragmentos de plantas e penetrar na cutícula e na parede celular de tecidos lignificados no rúmen do gado e de ovelhas nas dietas de alimentos fibrosos, e ter atividade celulolítica. Os fungos também podem desempenhar um importante papel sinérgico na digestão ruminal da fibra pelo rompimento físico do tecido lignificado, permitindo que outros microrganismos do

rúmen tenham acesso mais fácil ao talo e a porção digestível da planta. A composição e proporção de microrganismos do rúmen são afetadas por muitos fatores, tais como dieta, localização geográfica e interação animal hospedeiro (CHEN *et.al.*, 2008).

Nutricionistas de ruminantes têm interesse na manipulação do ecossistema microbiano do rúmen para aumentar a utilização e qualidade do alimento, melhorar a eficiência de produção dos ruminantes e aliviar os problemas associados com praticas de alimentação decorrente (LEE *et al.*, 2000).

O uso de enzimas como aditivos de rações ou suplementos alimentares, com a finalidade de atuarem dentro do rúmen, é uma perspectiva interessante sob ponto de vista de praticidade de uso. Porém, estas enzimas precisam ser estáveis nas condições físico-químicas do rúmen, como pH em torno de 6,0 e em temperaturas de ate 40°C. Alem disso, as enzimas ainda precisam ter certa resistência a presença de sais e a ação de proteases. Essas características são coincidentes com aquelas descritas por Vieille e Zeikus (2001) para termo enzimas, as quais tem mostrado ampla tolerância as variações de pH, resistência a agentes desnaturantes, alem da atividade e preservação de sua estabilidade em temperaturas acima da mesofílica.

A maioria dos trabalhos relata a utilização de preparados enzimáticos comerciais constituídos por enzimas xilanases e celulasas (endoglucanases) (EUN *et al.*, 2007; EUN & BEAUCHEMIN, 2007; COLOMBATTO *et al.*, 2007), outros relatam a utilização de enzimas como esterases (KRUEGER & ADESOGAN, 2008; KRUEGER *et al.*, 2008), amilases (TRICARICO *et al.*, 2007) e proteases (COLOMBATTO *et al.*, 2003a). Porem, o mecanismo de ação dessas enzimas em

ruminantes ainda não é bem definido, mas há evidências de que seja uma combinação de efeitos pré e pós-alimentação. Com relação aos efeitos de pré-alimentação, o índice de aplicação da enzima e o tempo de interação de enzima-alimento, criam um complexo enzima-alimento estável, que protege as enzimas de proteólises no rúmen. Esta ideia foi sustentada pelo fato de que quando enzimas foram diretamente adicionadas no rúmen em vez de aplicadas ao alimento, nenhuma melhora foi observada em relação à degradação da fibra. Contudo, quando celulases e xilanases foram aplicadas ao alimento apresentaram-se resistentes à proteólises do rúmen durante um período significativo de tempo. Quanto aos efeitos da enzima pós-alimentação, o pH ruminal foi considerado o mais importante. É conhecido que práticas modernas de alimentação levam frequentemente o pH ruminal ao sub-ótimo para a degradação da fibra. Dado o pH ótimo como ácido, a adição de enzimas fibrolíticas exógenas pode aliviar os efeitos adversos sobre a degradação da fibra (COLOMBATTO *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de produção, caracterização enzimática, incubação e de DIVMS foram conduzidos no período de abril de 2011 a agosto de 2011, no Laboratório de Enzimologia e no de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas II (ICB II), da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, localizado no município de Goiânia – Goiás.

3.1 Linhagem utilizada e manutenção do fungo

A amostra do fungo utilizada foi de *Aspergillus awamori* isolada do solo na Universidade de Brasília. O fungo foi cultivado em meio MEX [extrato de malte 3,0% (p/v) e Ágar 2,0% (p/v)], autoclavado a 120° C por 20 minutos. A cultura foi mantida por 4 dias a 30°C em estufa de ventilação forçada e, posteriormente, as placas foram estocadas a 4 °C para utilização.

3.2 Produção, inoculação, filtração e liofilização da solução enzimática

Três discos de cultura (5 mm), contendo esporos do fungo *Aspergillus awamori* foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 mL de meio de indução (extrato de levedura, 1,0 g; MgSO₄, 0,05 g; FeSO₄, 0,01g; CaCl₂.2H₂O, 0,01 g; KH₂PO₄, 0,02 g; (NH₄)₂SO₄, 0,125 g; Amido, 1%; Água destilada q.s.p. 100ml). Os erlenmeyers 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 48 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada a vácuo. Alíquotas foram retiradas e congeladas para a avaliação da atividade de amilase e posterior utilização.

A solução contendo a enzima amilase foi submetida a filtração a vácuo por filtros de papel, concentrada pelo processo de liofilização e ressuspensa (retorno ao estado líquido) para utilização. A solução enzimática foi mantida em geladeira a temperatura de 4 a 8 °C para utilização.

3.3 Determinação da atividade de amilase

A atividade amilolítica foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). A atividade enzimática encontrada foi de 46,54 U/ML.

A 40µl de tampão citrato-fosfato (50 mmol. L-1, pH 6,8), foram adicionados 60µl de amostra enzimática e 100µl de solução de amido (0,5%). A mistura foi incubada a 39°C por 15 minutos. Posteriormente, 1,0 mL de reagente ácido dinitrosalicílico {10 g.L-1 ácido dinitrosalicílico (DNS), 100 mL de NaOH (2 mmol.L-1), 300 g.L-1 de tartarato de sódio e potássio} foi adicionado aos tubos de ensaio. A mistura foi fervida por 5 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

3.4 Delineamento Experimental

Foram testados dois métodos de adição da enzima amilolítica com a finalidade de determinar a melhor forma de utilização e efeito, nos dois experimentos.

Na primeira forma a enzima amilase foi aspergida sobre o substrato (milho moído) e a segunda forma a enzima amilase foi aplicada diretamente no líquido ruminal.

No primeiro método a aspersão ocorreu em 24g de substrato, acondicionados em sacos de nilon. Os sacos de nilon contendo substrato tratado foram colocados dentro dos jarros da incubadora no momento da incubação. No segundo método a amilase foi aplicada diretamente nos jarros, no momento da incubação, contendo líquido ruminal, solução tampão e sacos de nilon com substrato.

Foram avaliados três tratamentos: tratamento utilizando 10 ml água (controle), tratamento com 5 ml de enzima (T1) e tratamento com 10 ml de enzima (T2).

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas 3 x 6, com quatro repetições (jarros). As parcelas foram constituídas por milho tratado com três diferentes níveis de enzima e as subparcelas por seis períodos de digestão do milho tratado.



Figura 3. Seqüência dos eventos para a produção da enzima amilase:. 1) Linhagem utilizada e manutenção do fungo em elermeyer de capacidade de 1 L; 2) Inoculação em aparelho Shacker; 3) Liofilização para concentrar a solução enzimática; 4) Filtragem á vácuo em filtros de papel.

3.5 Preparação das soluções tampões

Primeiramente foi misturado 266 ml da solução B (15 g de Na_2CO_3 e 1 g de $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$, para 1 L de água destilada) em 1330 ml da solução A (10 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de NaCl ; 0,1 g de $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de uréia, em 1 L de água destilada). A quantidade exata de A para B (relação 1:5) deve ser ajustada para obtenção do pH final 6,8 a 39 °C. Nenhum ajuste adicional de pH é necessário. A quantidade aproximada de 1600 ml da solução tampão foi adicionada por jarro, colocados na incubadora aproximadamente 4 hs antes da incubação para obtenção da temperatura de 39 °C.

3.6 Preparação dos sacos de náilon

Os sacos de filtro-náilon (F57 ANKOM[®]) foram identificados numericamente (48 amostras e 1 branco), mergulhados em acetona por 3 a 5 minutos, escoados e colocados em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por dois minutos e posteriormente em estufa a 105°C durante 24hs. A lavagem dos sacos em acetona foi executada para a remoção da solução surfactante que inibe a digestão microbiana. Após 40 minutos no dessecador, os sacos foram submetidos a pesagem (peso do saco de náilon vazio = W₁).

Amostras de 0,5g do milho tratado ou não por solução enzimática foram acondicionadas em sacos de filtro-náilon (F57 ANKOM[®]), e em seguida selados (peso do saco com amostra de milho = W₂). Os sacos contendo o substrato (milho) foram reservados para o momento da incubação *in vitro*.

3.7 Coleta do líquido ruminal e incubação

Para a coleta do líquido ruminal foi utilizado um bovino Nelore com peso aproximado de 380 kg provido de cânula no rúmen, mantido em baia individual, adaptado a dieta por período de 10 dias. A dieta, fornecida à vontade, após a coleta do líquido ruminal, consistiu de feno de Tifton com 7% de proteína bruta (PB) e 1 kg de milho.

Para cada tratamento no momento da incubação coletou-se 2000 ml de líquido ruminal, enviado ao laboratório por meio de garrafa térmica. O material foi batido em liquidificador à velocidade alta por 30 segundos, sendo em seguida filtrado e adicionados em jarros de vidro de 500 ml, contendo solução tampão a 39°C. Todo o processo ocorreu com a infusão de CO₂. Os materiais utilizados para o manuseio

do líquido ruminal foram aquecidos a temperatura de 39°C. A mistura do líquido em liquidificador tem o objetivo de desalojar as bactérias da massa ruminal, assegurando a população microbiana para a fermentação *in vitro*.

Posteriormente, os sacos de filtro nylon foram introduzidos nos jarros (4 no total) da incubadora (TE-150 TECNAL), contendo 400 ml de líquido ruminal e 1600 ml de solução tampão a 39°C.

Em meio anaeróbio foram incubados 48 sacos contendo amostra e um saco em branco (C1) para cada tratamento, sendo: jarro 1 sacos de número 1 a 12; jarro 2 sacos de número 13 a 24; jarro 3 sacos de número 25 a 36 e jarro 4 do 37 ao 48 e amostra em branco.

As amostras foram incubadas por 15'; 1,30'; 3; 6; 12 e 24 hs, para cada tratamento. Para cada horário de incubação foram retiradas 2 amostras, aleatoriamente, de cada jarro (8 amostras no total), sempre com infusão de CO₂ registrando o horário de retirada. Em seguida os sacos foram lavados por três vezes em água destilada e uma vez em acetona, escoados e acondicionadas em estufa de ventilação forçada a 105 °C por 24 hs. Posteriormente as amostras foram retiradas da estufa, mantidas em dessecador por 40 minutos, pesadas e registradas para cálculo da DIVMS (W₃).

3.8 Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

No ensaio de digestibilidade *in vitro* foi utilizada a metodologia descrita por TILLEY E TERRY (1963) modificada para o fermentador ruminal (DAISY), seguindo a metodologia apresentada no manual de utilização do equipamento (ANKOM[®] Technology), fornecida pelo fabricante.

Para calcular a DIVMS utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ DIVMS} = \frac{100 - (W_3 - (W_1 \times C_1))}{(W_2 \times MS)} \times 100$$

Em que: W_1 = Peso saco vazio; W_2 = Peso da amostra; W_3 = Peso final após DIVMS;
 C_1 = Peso do saco em branco; MS = Matéria Seca.



Figura 4 . Seqüência dos eventos para incubação da enzima amilase: 1) Secagem dos sacos de náilon em estufa; 2) Pesagem do substrato (milho moído); 3) Selagem dos sacos de náilon; 4) Coleta do líquido ruminal; 5) Incubação dos sacos de náilon com substrato nos jarros contendo líquido ruminal e solução tampão; 6) Incubação na incubadora Te-150 Tecnal.

3.9 Determinação de glicose e matéria seca

No momento da incubação foi retirado uma alíquota de líquido ruminal de cada jarro (4), por horário (15'; 1,30'; 3; 6; 12 e 24 hs), para cada tratamento e armazenadas em freezer para determinação de glicose.

Para determinação da glicose foi utilizado a metodologia do Kit comercial de Glicose Enzimática Líquida Doles. Os valores de glicose foram registrados e lançados em planilha.

O ensaio para determinação de matéria seca foi realizado para cada tratamento (controle, T1 e T2). O cadinho foi mantido em estufa por 2 horas a 105 °C para secagem, após 40 minutos em dessecador registrou-se o peso, em seguida foi adicionado 1,0 g da amostra (milho moído), mantendo em estufa a 105 C° durante 24hs e determinado o peso final. O ensaio foi realizado em duplicata.

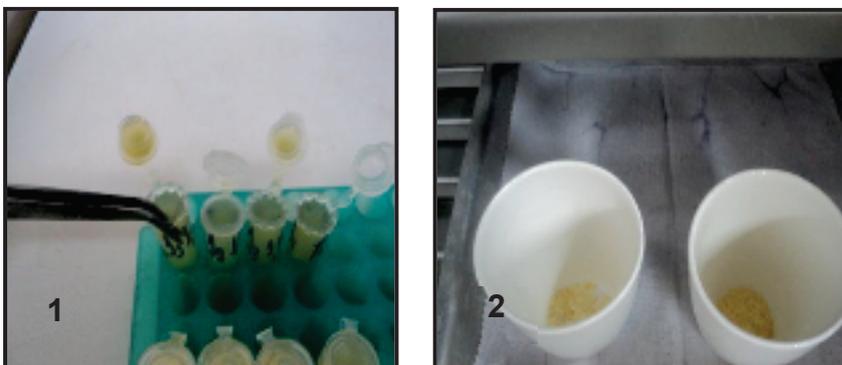


Figura 5 . Seqüência dos eventos para determinação de matéria seca e glicose: 1) Alíquota do líquido ruminal retirada no momento da incubação para determinação de glicose; 2) Cadinhos contendo o substrato (milho moído) para determinação de matéria seca.

4.0 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos com o efeito da enzima amilase no substrato e com o efeito da enzima adicionada diretamente no líquido ruminal, foram submetidos á análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software R (R DESENVOLVIMENTO CORE TEAM, 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados de Matéria seca

Para cada tratamento foi realizado o ensaio de determinação de matéria seca. Foram encontrados os valores descritos no quadro 1, os quais foram utilizados na fórmula para determinar a DIVMS.

Quadro 1 – Resultados de matéria seca para os diferentes níveis de enzima

NÍVEIS DE ENZIMA	MATÉRIA SECA	
	Enzima aspergida no substrato	Enzima adicionada ao líquido ruminal
Controle (0 mL)	52,80	53,02
T1 (5mL)	52,84	52,91
T2 (10 mL)	52,93	53,01

4.2 Resultados de DIVMS

4.2.1 Aspersão da amilase sobre o substrato

Verificou-se que no tempo inicial de 15 minutos, os tratamentos controle e T 1 não diferiram entre si. No quadro 1 com aplicação de T2 em 15 minutos foi observada melhora de 55,54% da digestibilidade, em relação ao controle. Esse resultado demonstra que o nível de 10 mL de enzima promoveu a hidrólise do amido antes da sua incubação no rúmen. Isso provavelmente ocorre pela especificidade da enzima amilase ter como seu substrato o amido. HARGER (1982) afirma que as enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido.

Quadro 2 – Médias de DIVMS (%) do milho moído submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

NÍVEL DE ENZIMA (ml)	PERÍODO DE INCUBAÇÃO RUMINAL (horas)					
	15'	1:30'	3	6	12	24
Controle (0)	22,82bD	23,93bD	23,57cD	29,13bC	38,06bB	53,29cA
T1 (5)	23,60bD	27,30bCD	28,08bCD	30,29bC	41,83bB	60,54bA
T2 (10)	35,50aD	41,58aC	38,50aCD	39,81aCD	60,60aB	73,21aA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Níveis de enzima - CV%= 7,28, GL%=2, QM%=1792,2544, F%=228,9354. Períodos de incubação: CV%=5,99, GL%=5, QM%=2211,3350, F%=417,8208. Colunas, classificação com letras minúsculas; Linhas, classificação com letras maiúsculas.

Quando se comparou os tratamentos controle e T1, nos tempos de incubação 15 minutos, 1:30 minutos, 6 horas e 12 horas observou-se que a DIVMS do milho não apresentou diferença significativa. Já para os tempos 3h foram de 23,58% e 28,08% e para 24h 53,30% e 60,54% respectivamente, apresentando diferença significativa. Isso indica que a concentração de 5 mL de enzima melhorou a DIVMS para tempo de 3 e 24 horas.

Muito da variabilidade da atuação enzimática são atribuídas a fatores tais como o tipo e atividade da enzima, as condições de cultura empregada (EUN & BEAUCHEMIN, 2007), nível de suplementação e enzima fornecida, estabilidade da enzima no aparelho digestivo (YANG et al., 2001; GIRALDO et al., 2008), composição da dieta, método de aplicação da enzima e o balanço energético dos animais teste. Respostas positivas tem sido obtidas com adicção de preparados enzimáticos à ração, mas quais as enzimas chave envolvidas e o mecanismo de ação ainda não são bem definidos (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Segundo o trabalho de Minafra (2007), pode-se observar que a enzima apresenta atividade alta na faixa de temperatura entre 30 a 70 °C, tendo o valor máximo de atividade enzimática na temperatura de 50 °C, apresentando estabilidade nos PH fisiológicos 3,0 a 8,0. Esse resultado é bom para a aplicabilidade na rações.

Nas condições do presente trabalho, foi verificado que os valores do controle e T2 diferiram estatisticamente, sendo que os resultados do T2 foram superiores aos do controle. O fato de T2 ser superior ao controle indica que o nível 10mL de enzima melhorou a DIVMS para todos os tempos de incubação. Estudos revisados por MEDEIROS e LANNA (1999) mostram que o uso de enzimas exógenas na dieta de ruminantes pode proporcionar melhora na digestibilidade da ração.

Segundo COLOMBATTO et al. (2007) há evidências de uma combinação de efeitos pré e pós-alimentação, onde índice de aplicação da enzima e o tempo de interação de enzima-alimento, criam um complexo enzima-alimento estável, que protege as enzimas exógenas de proteólises no rumem.

4.2.2 Aplicação da amilase no líquido ruminal

Com 15 minutos e 1 hora e 30' horas de incubação, foi observado maior DIVMS para o tratamento controle, em relação ao T1. No quadro 2 verificou-se ainda que o tratamento controle proporcionou maior DIVMS, em relação ao T2 com aumentos de 28,74% e 10,53%, para os tempos 15' e 24 horas, respectivamente.

Quadro 3 – Médias de DIVMS (%) do líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

NÍVEL DE ENZIMAS (ML)	PERÍODO DE INCUBAÇÃO RUMINAL (HORAS)					
	15'	1:30'	3	6	12	24
Controle(0)	14,96aC	14,24aC	12,45aC	13,88aC	24,06aB	48,06aA
T1 (5)	9,67bC	9,55bC	10,95aC	11,42aC	23,79aB	50,40aA
T2 (10)	11,61bC	13,46aC	13,35aC	14,13aC	22,00aB	43,49bA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Níveis de enzima: CV%= 7,86, GL%=2, QM%=26,5161, F%=10,6458. Períodos de incubação: CV%=7,84, GL%=5, QM%=2362.2851, F%=951,7127. Colunas, classificação com letras minúsculas; Linhas, classificação com letras maiúsculas.

Verificou-se que a DIVMS foi maior para o tratamento controle, indicando que os níveis de 5 mL e 10mL da enzima aplicados no líquido ruminal não aumentaram a DIVMS. Provavelmente, a falta de respostas a adição de 5 e 10 mL ocorreu pela inativação da enzima amilase devido a ação das proteases presentes no líquido ruminal. Dukes (1993) relata que certas proteínas naturais, escapam da degradação ruminal, mas podem ser prontamente hidrolizadas pelas enzimas proteolíticas gastrointestinais. A proteólise bacteriana começa com a atividade extracelular da protease para produzir peptídios, os quais são fagocitados e submetidos a hidrólise posterior dentro da célula bacteriana.

A enzima amilase, assim como outras enzimas utilizadas na alimentação de ruminantes devem resistir e conservar atividade considerável depois dos processos de fabricação e digestão. Os fatores que podem influenciar sua estabilidade, entre outros, são: a origem (microorganismo), o tipo de atividade, a composição da dieta, o modo de fazer a ração, o armazenamento, as condições

durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (FRANCESCH, 1996). Segundo Borges, (1997) a estrutura molecular da enzima é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes.

Trabalho correlato como o de COLOMBATTO et al., (2007) demonstra que quando enzimas foram adicionadas diretamente no líquido ruminal em vez de aplicadas ao alimento, nenhuma melhora foi observada.

4.3 Resultados de Glicose

4.3.1 Aspersão da amilase no substrato

Observou-se maiores níveis de glicose no líquido ruminal para o tratamento controle e T1 no tempo inicial de 15 minutos em relação aos outros tempos de incubação. No quadro 3 verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos T1 e T2 com 15 minutos de incubação, sendo o T1 superior ao T2. Não houve diferença significativa entre o tratamento controle e T1 para os tempos de incubação 1:30', 3, 6, e 12 horas. No T1 observou-se diferença significativa da atividade enzimática no tempo inicial sendo superior aos outros tempos de incubação.

Quadro 4 – Médias de glicose presente no líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

NÍVEL DE ENZIMAS (ML)	PERÍODO DE INCUBAÇÃO RUMINAL (HORAS)					
	15'	1:30'	3	6	12	24
Controle(0)	16,84bA	12,32aA	5,13aA	5,89aA	3,19bA	5,14bA
T1 (5)	74,91aA	13,75aB	3,28aB	4,04aB	2,63bB	2,02bB
T2 (10)	5,91bBC	5,11aC	3,51aC	9,16aBC	30,15aA	25,75aAB

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Níveis de enzima: CV%=81,46, GL%=2, QM%=458,0591, F%=4,2723. Períodos de incubação: CV%=74,85, GL%=5, QM%=1246,6830, F%=13,7706. Colunas, classificação com letras minúsculas; Linhas, classificação com letras maiúsculas.

4.3.2 Aplicação de amilase no líquido ruminal

Com a aplicação no líquido ruminal, não foi observado diferença significativa dos resultados de glicose para o tratamento controle, T1 e T2 nos tempos 15', 1:30', 3, 6 e 12 horas de incubação. Já para o tempo de 24 horas de incubação houve diferença significativo sendo o T2 superior aos demais tratamentos.

Quadro 5 – Médias de glicose presente no líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

NÍVEL DE ENZIMAS (ML)	PERÍODO DE INCUBAÇÃO RUMINAL (HORAS)					
	15'	1:30'	3	6	12	24
Controle(0)	4,09aA	1,88aA	2,68aA	3,52aA	2,13aA	2,56bA
T1 (5)	4,01aA	3,55aA	1,53aA	1,97aA	2,71aA	2,48bA
T2 (10)	1,91aB	3,97aB	5,74aB	2,72aB	5,41aB	25,24aA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Níveis de Enzima: CV%=115,93, GL%=2, QM%=179,4706, F%=7,0789. Período de incubação: CV%=92,25, GL%=5, QM%=96,0982, F%=5,9866. Colunas, classificação com letras minúsculas; Linhas, classificação com letras maiúsculas.

Diante dos resultados de glicose, tanto para enzima aspergida sobre o substrato como aplicada ao líquido ruminal, no tratamento 2 observa-se que, com 24 horas de incubação, houve maior ação da atividade enzimática. GUPTA (2003) e PANDEY (2005) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. A mesma ação foi verificada nos resultados de DIVMS demonstrados nas tabelas 1 e 2.

Com essas informações entende-se que o aumento da DIVMS com nível de 10 ml de enzima (T2) com 24 horas de incubação deve-se a ação da enzima. COLOMBATTO et al., (2007) observou valores de digestibilidade semelhante a este experimento sugerindo este efeito como a proteção enzimática sendo causada pela complexação do alimento com a enzima. Esta observação pode ser a mesma constatada no presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

A enzima amilase de *A awamori* aumentou significativamente a DIVMS do amido na concentração de 10ml, nos tempos de 12 e 24 horas de incubação quando aplicada sobre o milho triturado. O complexo enzimático adicionado diretamente no líquido ruminal não alterou a DIVMS do amido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. **Consumo e eficiência alimentar de bovinos em crescimento**. 2005. 182 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, n.2, p.95-117, 1989.

BORGES, F.M.O. Utilização de enzimas em dietas avícolas. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, n.20, p. 5-30, 1997.

BEAUCHEMIN, K.A. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81 (E.Suppl.2), p.E37-E47, fev., 2003.

CAETANO, M. **Estudo das perdas de amido em confinamentos brasileiros e do uso de amido fecal como ferramenta de manejo de bovinos confinados**. 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência animal e pastagens). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. p.11-34.

CAMPLING, R.C. Processing cereal grains for cattle-a review. **Livestock Production Science**, v.28, n. 3, p. 223-234, jul., 1991.

CHEN, X.L. et al. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid and solid-associated ruminal microbes in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v.141,n.1-2, p.1-14,mar. 2008.

COLOMBATTO, D. et al. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfafa stems. **Alimentação Animal Ciência e Tecnologia**, v.137, p. 150 -162, set. 2007.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. 1996. 203 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

CRESTANA, S. Inovação e desenvolvimento: Faces da mesma moeda. **Revista Inovação**, v.1, p.28-30, 2004.

CRESTANA, S.; SILVA, R. C. O impacto da pesquisa no desenvolvimento do agronegócio brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2006. CD-Rom.

CUI, Y.Q. et al. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Tecnologia Enzimática e Microbiana**, v. 23, p. 157-167, jul./ago. 1998.

DUKES, H.H.. Cap. 21 Digestão no estômago dos ruminantes. In: _____. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1993, cap. 21.

ENZYME DEVELOPMENT COMPANY. **Enzymes Applications in Animal Feed**. Disponível em: <<http://www.enzymedevelopment.com>> Acesso em: 20 de março de 2012.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. **Animal Feed Scienc and Technology**, v. 132, p. 298-315, jan. 2007.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 1440 – 1451, mar. 2007.

FERNANDES, P.; MALAGUIDO, A. Complexos Enzimáticos – Novos avanços na produção animal. Disponível em : <http://www.engormix.com/complexosezimáticos>. Acesso em : 15 de fevereiro de 2012.

FRANCESCH, M. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura. In: CURSO DE ESPECIALIZACIÓN AVANCES EN NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL, Madrid. **Anais...** Madrid: FEDNA, 1996. p.118-131.

GHAZALAH, A. A. et al. Effect of enzyme preparation on performance of broilers fed corn soybean meal based diets Egypt. **Poultry Science**, v. 25, p. 295-316, 2005.

GIRALDO, L.A et al. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratio. **Animal Feed Science and Technology**, v.141, p. 306-325, abr. 2008.

GUENTER, S.P. Practical experience with the use of enzymes 2004. Disponível na Internet <http://www.idre.ca/books/focus/821/chp6.html>. Acesso em: 10 de janeiro de 2012.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective, **Process Biochemistry**, v. 38, p.1599-1616, jun. 2003.

HARGER, C. SPRADA, D. HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. In: _____. **Bioquímica das fermentações**, [S.l.]: [s.n.], 1982. 56 p.

KARIM, A.A.; NORZIAH, M.H.; SEAW, C.C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v.71, n.11, p. 9-36, out. 2000.

KEBREAB E. et al. Impact of dietary manipulation on nutrient flows and greenhouse gas emissions in cattle. **R. Bras. Zootec.** vol.39 (supl. especial.), p. 458-464, jul 2010.

KAMEDA, E. et al. Removal of polymeric filter cake in petroleum wells: A study of commercial amylase stability. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v. 59, p. 263-270, nov. 2007.

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 84-94, ago. 2008.

KRUEGER, N. A. et al. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, p. 95-108, ago. 2008.

LANNA, D.P.D.; ALMEIDA, R. Exigências nutricionais e melhoramento genético para eficiência alimentar: Experiências e lições para um projeto nacional. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...Campo Grande :SBZ**, 2004, p. 248-259.

LEADLAY, P.F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82 p.

LEE, S.S; HA, J.K; CHENG, K. J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 201-217, dez. 2000.

LOPES, J.; STUMPF, W.J.R. Influência do Grão de Sorgo como Fonte de Amido em Ovinos Alimentados com Feno. Parâmetros Plasmáticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1183-1190, jul/ago. 2000.

MEDEIROS, S.R., LANNA, D.D.P. Uso de aditivos na bovinocultura de corte. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE, 1999, Goiânia. **Anais ... Goiânia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 1999. p.171-190.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959.

MINAFRA, C.S. **Produção e Suplementação com α -amilase de *Cryptococcus Flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na Dieta de Frangos de Corte de um a 21 dias de idade**. 2007. 141 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa. 2004, 416 p.

NIGAM, P., SINGH, D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n. 9, p. 770-778, set. 1995.

NOVOZYMES Latin America Ltda. **Nova Amilase torna Detergentes Líquidos mais Eficazes**. Disponível em: http://www.novozymes.com/library/Publications/Biotimes_Sprog/PTnewamylase.pdf. Acesso em 13 de janeiro de 2012.

NOCEK, J.E; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on Milk yield and composition. **Jornal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3598-3629, out 1991.

OWENS, F.; ZINN, R.A. Corn grain for cattle: Influence of processing on site and extent of digestion. In: SOUTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 2005. Nebraska. **Proceedings**...Nebraska, 2005. p.86-112.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. 760 p.

PASSINI, R. et al. Parâmetros de fermentação ruminal em bovinos alimentados com grãos de milho ou sorgo de alta umidade ensilados. **R. Brás. Zotec.**, v.32, n.5, p.1266-1274, out. 2003.

PEREIRA, S.E. **Imobilização e caracterização da enzima α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus***. 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.

R DESENVOLVIMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Austria, 2012. Disponível em: www.r-project.org. Acesso em: 25 de janeiro de 2012.

ROWE, J.B.; CHOCT, M.; PETHICK, C.W. Processing cereal grains for animal feeding. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 5, p. 721-736, 1999.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **J Br Grassl Soc**, v. 18, p. 104-111, 1963.

TRICARICO, J.M., JOHNSTON, J.D., DAWSON, K. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p.136-150, ago 2008.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C et al. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. **J. Biotechnol.**, v.94, n.2, p.137-155, mar 2002.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n.1, p. 1-43, mar 2001.

YANG, X. et al. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresour. Technol.** v. 78, n. 3, p. 277-280, jul. 2001.

ZEOULA, L.M. et al. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.28, n.5, p.898-905, 1999

ZEOULA, L.M, CALDAS NETO,S.F., Recentes avanços em amido na nutrição de gado leiteiro. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA LEITEIRA, 2., 2001, Lavras. **Anais**...Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. p. 249-284.

ZINN, R.A.; OWENS, F.N.; WARE, R.A. Flaking corn: processiing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **J. Anim Sci**, v. 80, n. 5, p. 1145-1156, mai 2002.