

GUILHERME DE SOUZA MOURA

**USO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO SOLID STATE FERMENTATION  
(SSF) EM RAÇÕES PARA TILÁPIA DO NILO**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M929u  
2011

Moura, Guilherme de Souza, 1974-  
    Uso do complexo enzimático solid state fermentation  
    (SSF) em rações para tilápia do Nilo / Guilherme de Souza  
    Moura. – Viçosa, MG, 2011.  
    xv, 63f. : il. ; 29cm.

Orientador: Eduardo Arruda Teixeira Lanna.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Peixe - Alimentação e rações. 2. Peixe - Nutrição.  
3. Enzimas. 4. Agricultura. 5. *Oreochromis niloticus*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 639.3

GUILHERME DE SOUZA MOURA

**USO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO SOLID STATE FERMENTATION  
(SSF) EM RAÇÕES PARA TILÁPIA DO NILO**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de setembro de 2011.

---

Prof. Juarez Lopes Donzele  
(Coorientador)

---

Prof. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

---

Prof. José Teixeira Seixas Filho

---

Prof. Luiz Fernando Teixeira Albino

---

Prof. Eduardo Arruda Teixeira Lanna  
(Orientador)

À Deus, pela presença constante e iluminação.

À minha esposa, Eveline, e meus filhos, Igor e Thiago, pelo amor, paciência, incentivo e compreensão.

Aos meus pais, Henrique e Deise, e meus irmãos, Gustavo e Viviane, pelo carinho, formação, amizade e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por intermédio do Departamento de Zootecnia (DZO), pela acolhida e oportunidade de realização deste curso.

Ao Professor Orientador Eduardo Arruda Teixeira Lanna, pela orientação, amizade e incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) e à Empresa Alltech, pelo financiamento da pesquisa.

Aos profissionais da Empresa Alltech do Brasil, em especial a Dr<sup>a</sup> Andrea Malaguido e Dr<sup>a</sup> Emanuelle Gemin, pela ajuda e amizade ao longo do curso de doutorado.

A Empresa Alltech dos Estados Unidos, em especial ao Dr. Keith Filer, Ben Shafer e Dr. Paulo Rigolin pela oportunidade, auxílio e acolhida.

Aos Professores Juarez Lopes Donzele, Maria Goreti Almeida Oliveira, Luiz Fernando Teixeira Albino, Márvio Lobão Teixeira de Abreu e José Teixeira Seixas Filho pela participação, sugestões e críticas apresentadas durante o curso de pós-graduação e condução desta pesquisa que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos da pós-graduação, em especial a Moisés, Fabrício, Sanae, Patrícia, Daniel e Camila pela ajuda, convivência e leal amizade.

Aos estagiários Rafael, Lúdia e Leandro pela amizade e fundamental ajuda na condução do experimento.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, pela amizade e auxílio durante todo o período do curso.

À minha esposa Eveline e meus filhos Igor e Thiago, pela paciência, carinho e incentivo na realização deste trabalho e por estar comigo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Henrique e Deise, pelo carinho, dedicação e ensinamentos ao longo da vida.

Aos meus irmãos, Gustavo e Viviane, pelo apoio e sincera amizade.

À minha sogra, Glória Zélia, pelo apoio e incentivo.

Aos meus familiares pelo prazeroso convívio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho e não foram citados.

## **BIOGRAFIA**

GUILHERME DE SOUZA MOURA, filho de Henrique Maria de Moura e Deise Conceição de Souza Moura, nasceu em Niterói, Estado do Rio de Janeiro, no dia 10 de agosto de 1974.

Em agosto de 2001, graduou-se em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, na cidade de Viçosa - MG.

No período de 2002 a 2003 foi bolsista de apoio técnico da Epamig, trabalhando na Fazenda Experimental de Leopoldina, Minas Gerais. Neste mesmo período, fez especialização em Piscicultura na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Em fevereiro de 2007, obteve o título de *Magister Scientiae* em Zootecnia, na área de Nutrição de Monogástricos, pela Universidade Federal de Viçosa - UFV, na cidade de Viçosa – MG.

Em março de 2008, foi admitido no programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Monogástricos.

Em 22 de setembro de 2011, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
ESTABILIDADE DO COMPLEXO ENZIMÁTICO SSF (SOLID STATE FERMENTATION) SUBMETIDO AO PROCESSAMENTO DE DIETAS E TEMPO DE ESTOCAGEM EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES.....	29
LITERATURA CITADA.....	30



	Página
AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DO COMPLEXO ENZIMÁTICO SSF (SOLID STATE FERMENTATION) EM RAÇÕES PELETIZADAS PARA TILÁPIA DO NILO.....	32
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÕES.....	44
LITERATURA CITADA.....	45
DIGESTIBILIDADE APARENTE DE NUTRIENTES E DE ENERGIA BRUTA EM RAÇÕES CONTENDO O COMPLEXO ENZIMÁTICO SSF PARA TILÁPIAS DO NILO.....	48
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÕES.....	59
LITERATURA CITADA.....	60
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	63

## LISTA DE TABELAS

	Página
001. Enzimas, substratos e efeitos das enzimas utilizadas em dietas para animais.....	05
001. Composição das rações experimentais (matéria natural).....	19
002. Atividades de enzimas do complexo enzimático SSF em rações durante o processamento.....	24
003. Atividade de enzimas do complexo enzimático SSF em rações durante o tempo de estocagem à 25°C.....	26
004. Atividade de enzimas do complexo enzimático SSF em rações durante o tempo de estocagem à -18°C.....	27
005. Atividade de enzimas do complexo enzimático SSF em rações estocadas em diferentes temperaturas.....	28
001. Composição das rações experimentais (matéria natural).....	38
002. Parâmetros físicos e químicos da água.....	40

	Página
003. Desempenho de tilápias do Nilo submetidas a rações contendo o complexo enzimático SSF.....	40
004. Níveis de sacarose, de glicose e de frutose por grama de quimo seco de tilápias do Nilo alimentadas com rações contendo o complexo enzimático SSF.....	43
001. Composição das rações experimentais (matéria natural).....	52
002. Níveis do complexo enzimático SSF e digestibilidade dos nutrientes e da energia bruta em tilápias do Nilo.....	56
003. Equações ajustadas para as variáveis de digestibilidade dos nutrientes e da energia bruta.....	56

## RESUMO

MOURA, Guilherme de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Uso do complexo enzimático solid state fermentation (SSF) em rações para tilápia do Nilo.** Orientador: Eduardo Arruda Teixeira Lanna. Coorientadores: Juarez Lopes Donzele e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

No primeiro experimento, objetivou-se avaliar a estabilidade ao processamento de ração e ao tempo de estocagem do complexo enzimático SSF (solid state fermentation). Foram formuladas duas dietas com composição nutricional idêntica, sendo uma dieta isenta de SSF e a outra contendo 50g/Kg de inclusão deste complexo enzimático. As amostras foram coletadas durante as seguintes etapas de processamento: mistura, após a peletização e após secagem em estufa. Para avaliação do tempo de estocagem, foi considerado como dia um, a ração pronta após secagem. Neste dia, foram feitas duas amostragens, sendo uma mantida em sala com temperatura ambiente de 25°C e outra mantida em freezer a -18°C. Foram feitas sub-amostragens no 15º, 30º, 45º e 60º dia. Em todas as amostras foram mensuradas a atividade das seguintes enzimas:  $\alpha$ -galactosidase, endoglucanase (carboxi-metil-celulase), xilanase, sacarase, amilase, lipase e tripsina. Para todas as amostras de controle, não foram observados atividades das enzimas analisadas. Entre as etapas de mistura e pós estufa não houve diferenças, exceto para a  $\alpha$ -galactosidase e a lipase que foram observados redução na atividade e a sacarase que foi observado aumento na atividade. Não foram verificados efeitos para as atividades de endoglucanase, sacarase, xilanase, amilase e tripsina entre o primeiro (após estufa) e o 60º dia de experimento para a temperatura de estocagem de 25°C. Para

à temperatura de estocagem de  $-18^{\circ}\text{C}$ , não foi observado diferenças somente em relação às atividades de endoglucanase e xilanase entre o primeiro e o último dia. Quanto à comparação entre os dois tratamentos térmicos ( $25^{\circ}\text{C}$  e  $-18^{\circ}\text{C}$ ), somente foi observada efeito para a atividade de galactosidase e tripsina aos 60 dias. Para todas as enzimas do SSF não houve diferença no período de 30 e 45 dias de estocagem. Conclui-se que as enzimas estudadas do complexo enzimático SSF permanecem estáveis durante o processamento de rações peletizadas à  $55^{\circ}\text{C}$ , mantendo a atividade por no mínimo 60 dias quando estocadas em ambiente de até  $25^{\circ}\text{C}$ . Para o segundo experimento, objetivou-se avaliar os efeitos do complexo enzimático SSF em rações para tilápias do Nilo e a disponibilização de sacarose e monossacarídeos no quimo destas. Foram utilizados 360 peixes com peso médio variando entre  $70\text{g} \pm 4,43$  em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (0, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm), seis repetições, totalizando 10 peixes por unidade experimental. Aos 60 dias do experimento foi avaliado: peso inicial, peso final, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e sobrevivência. Para avaliação de sacarose, glicose e frutose presente no quimo, a cada 15 dias, foi sacrificado um exemplar de cada unidade experimental. Os níveis destes carboidratos foram mensurados por meio de HPLC. Observou-se efeito linear em função do tratamento para peso final e ganho de peso. Para os demais parâmetros de desempenho, não foi verificado efeito. Quanto aos níveis de sacarose e de glicose no quimo foi observado efeito quadrático em função do tratamento, enquanto os níveis de frutose aumentaram linearmente. Conclui-se que o complexo enzimático SSF melhora o desempenho e aumenta a disponibilidade de sacarose e monossacarídeos no quimo de tilápias do Nilo. O terceiro experimento avaliou os efeitos do complexo enzimático SSF sobre a digestibilidade de nutrientes e de energia bruta em rações para tilápias do Nilo. Um total de 72 machos de tilápia do Nilo com peso médio de  $204,30 \pm 17,2$  g foram distribuídas aleatoriamente em seis cubas adaptadas para ensaio de digestibilidade. As rações experimentais foram isoprotéicas (30% PB) e isoenergéticas (3.000 kcal de ED/ kg), sendo adicionado o complexo enzimático SSF nos níveis de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm. A digestibilidade aparente foi mensurada pelo método indireto sendo usado o óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) como indicador de digestibilidade. Cada cuba recebeu um tratamento e as coletas das fezes foram realizadas durante a noite (19:00, 11:00, 02:00 e 05:00). O estudo foi realizado durante nove dias, com seis tratamentos e 3 repetições. Conclui-se

que a adição de complexo enzimático na ração melhora o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, energia bruta, cálcio e fósforo.

## ABSTRACT

MOURA, Guilherme de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2011. **Use of enzyme complex solid state fermentation (SSF) in diets for Nile tilapia** Adviser: Eduardo Arruda Teixeira Lanna. Co-advisers: Juarez Lopes Donzele and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

In the first experiment aimed to evaluate the stability of the enzyme complex SSF (solid state fermentation) during the feed processing and storage time. Two diets were formulated with the same nutritional composition, being a diet free of SSF and the other containing 50g of SSF/kg of diet. The samples were collected during the following processing steps: mixing, after pelleting and then dried. To evaluate the storage time, was considered as day one, ready to feed after drying. On this day, two samples were being kept in a room with ambient temperature of 25°C and another kept in a freezer at 18°C. Sub-samples were taken in the 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> day. All samples from the processing stage and storage period were sent to the laboratory, measured the activity of the following enzymes:  $\alpha$ -galactosidase, endoglucanase (carboxy-methyl-cellulase), xylanase, sucrase, amylase, lipase and trypsin. For all control samples, were not observed activities of the enzymes analyzed. Among the steps of mixing and post oven there were no differences, except for  $\alpha$ -galactosidase and lipase activities that were observed reduction and sucrase that was observed increase in activity. There were no

effects for the activities of endoglucanase, sucrase, xylanase, amylase and trypsin between the first (after oven) and the 60th day of the trial for the storage temperature of 25°C. For the storage temperature of -18°C, no differences were observed only in relation to the activities of endoglucanase and xylanase between the first and last day. Comparison between the two treatments (-25°C and 18°C) was only observed effect on the activity of galactosidase and trypsin at 60 days. For all enzymes of the SSF there was no difference in the period from 30 to 45 days of storage. It is concluded that the enzymes studied the SSF enzyme complex remain stable during the processing of pelleted feed at 55°C, maintaining activity for at least 60 days when stored at temperatures up to 25°C. For the second trial aimed to evaluate the effects of enzyme complex SSF in diets for Nile tilapia and the availability of sucrose and monosaccharides in these chime. We used 360 fish with an average weight ranging from  $4.43 \pm 70$ g in a completely randomized design with six treatments (0, 50, 100, 150, 200 and 250 ppm), six replicates, totaling 10 fish per experimental unit. At 60 days of the experiment was evaluated: initial weight, final weight, weight gain, feed conversion, specific growth rate and survival. For evaluation of sucrose, glucose and fructose present in the chyme, every 15 days, it was sacrificed a fish of each experimental unit. The levels of these carbohydrates were measured by HPLC. There was a linear effect of treatment according to final weight and weight gain. For the other performance parameters, no effect was observed. For sucrose and glucose levels of chime was observed quadratic effect as a function of treatment, while levels of fructose increased linearly. It is concluded that the enzyme complex SSF improves performance and increases the availability of sucrose and monosaccharides in the chime of Nile tilapia. The third trial evaluated the effects of the enzyme complex SSF on nutrient and gross energy digestibility in diets for Nile tilapia. A total of 72 males of Nile tilapia with average weight of  $204.30 \pm 17.2$  g were randomly assigned to six tanks adapted for digestibility trial. The experimental diets were isonitrogenous (30% CP) and isocaloric (3,000 kcal DE / kg), supplemented with the enzyme complex SSF levels of 0, 50, 100, 150, 200 and 250 ppm. The apparent digestibility was measured by the indirect method using chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) as an indicator of digestibility. Each tank received a treatment and stool collections were performed during the night (19:00, 11:00, 02:00 and 05:00). The study was conducted during nine days, with six treatments and three replicates. It is concluded that the addition of the enzyme complex in the diet improves



the apparent digestibility of dry matter, crude protein, gross energy, calcium and phosphorus.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pode ser considerada um dos peixes de maior potencial para a piscicultura mundial, pois apresenta características vantajosas em relação a muitas outras espécies. Por ser um peixe rústico e onívoro, alimenta-se de espécimes de baixo nível trófico e cresce com rações de baixo custo, quando criada em sistemas extensivos (Watanabe et al., 2002).

Com a intensificação dos sistemas de produção, conjugado à obtenção de uma variedade de híbridos e linhagens comerciais de grande aceitação, as tilápias tiveram o seu desempenho limitado à qualidade da dieta, pois estas foram privadas da alimentação natural (Pezzato et al., 2004). Em dietas para peixes, os ingredientes de origens vegetais normalmente utilizados são fontes de carboidratos e proteínas. No entanto, a presença de nutrientes não digeríveis não permite um melhor aproveitamento do alimento. Os polissacarídeos não amiláceos (PNAs), os oligossacarídeos e outros não carboidratos (glicoproteínas, ésteres fenólicos, lignina) estão presentes na parede celular dos vegetais, e estes estão relacionados negativamente com a digestibilidade da dieta (Rodrigues et al., 2002).

No farelo de soja, a fração de polissacarídeos (15 a 18%) é composta por polissacarídeos ácidos (8 a 10%), arabinogalactanas (5%), celulose (1 a 2%) e uma pequena fração de amido (0,5%) (Ott, 2005). Segundo Hiwowitz et al. (1972), o conteúdo de oligossacarídeos solúveis no farelo de soja é cerca de 10%. Noventa por cento deste são a estaquiase, rafinose e sacarose. Estes oligossacarídeos são  $\alpha$ -galactosídeos compostos por uma molécula de sacarose ligada à diferentes quantidades

de moléculas de D-galactose, em ligação  $\alpha(1,6)$ . Desta forma ocorre a formação da rafinose, estaquiose e verbascose, respectivamente (Kawawura, 1967).

Na cevada e na aveia são encontrados  $\beta$ -glucanos em grandes concentrações, enquanto que no trigo, triticale e centeio estão presentes as pentosanas e as arabinoxilanas (Campestrini et al., 2005).

A presença dos PNAs no quimo reduz a eficiência da ação das enzimas hidrolíticas endógena, pois estes aprisionam os grãos de amido e outros nutrientes no interior das células do endosperma. No trato gastrointestinal, estes compostos também determinam aumento da viscosidade do alimento, o que origina reduções na digestão e absorção de aminoácidos, carboidratos, minerais e outros nutrientes, com conseqüente queda na produtividade dos animais (Conte et al, 2002; Opalinski, et al., 2010). Além disso, a viscosidade da digesta interfere na microflora intestinal e nas funções fisiológicas do intestino (Choct et al., 2004).

Os nutrientes não digeríveis de ingredientes de origem vegetal, como a soja, não são disponibilizados somente com a utilização de tratamentos térmicos (Bohm et al., 2006). Portanto, é necessária a adoção de outras estratégias para remover os efeitos deletérios dessas substâncias. Essas situações limitam o uso de ingredientes de origem vegetal em dietas para monogástricos, especialmente nos animais jovens. Entretanto, pesquisas recentes comprovam que a degradação das paredes celulares dos ingredientes de origem vegetal permite maximização da ação enzimática endógena do animal sobre a degradação do amido, da gordura e da proteína, aumentando sua digestibilidade (Oliveira et al., 2007).

Há uma significativa variabilidade no valor nutritivo nas diferentes espécies de milho, como aquela observada para o trigo e a cevada (Lesson et al., 1993). As enzimas podem reduzir essa variação e acelerar a taxa de digestão de dietas à base de milho e sorgo (Pack et al., 1998). O tratamento de cascas e cotilédones de soja com enzimas degradadoras de parede celular (pectinase, xilanase e celulase) resultou na liberação de, pelo menos, 7% dos monossacarídeos componentes das frações não solúveis em água (Ouhida et al., 2002).

A influência da fibra no desempenho de peixes é ainda pouco estudada e pode estar relacionada à sua composição percentual em celulose, hemicelulose, lignina e sílica, entre outros (Meurer, 2003). Os resultados de pesquisas sobre o efeito de diferentes níveis de fibra bruta na dieta de peixes são contraditórios (Pereira-Filho, 1995). Além de ser considerada uma fonte de energia não disponível para a maioria dos

peixes (Pezzato, 1999), a celulose geralmente diminui o tempo de esvaziamento do trato gastrintestinal, ao contrário do que ocorre com PNAs solúveis. Provavelmente, ao promover a atuação da enzima celulase sobre a celulose, haveria maior contribuição energética da fibra bruta em relação à energia total da dieta, bem como maior tempo de retenção do bolo alimentar pelo trato digestivo, o que poderia refletir positivamente no desempenho dos peixes (Wenk, 2001).

Assim, a escolha da enzima celulase para compor complexos enzimáticos pode significar um fator preponderável para obtenção de resultados positivos sobre a digestibilidade aparente de MS, PB e principalmente energia bruta, assim como de outros nutrientes para os peixes. Entretanto, para confirmar isso, é necessário verificar os efeitos da adição de celulase, isoladamente nas dietas, a fim de determinar se esta enzima é capaz de aumentar o coeficiente de digestibilidade da energia bruta pelo maior aproveitamento do conteúdo de energia da fibra, mais especificamente da glicose (Oliveira et al., 2007).

Durante a degradação de um substrato complexo, várias enzimas agem em associação para uma digestão eficiente. O primeiro passo na degradação de um substrato insolúvel é a vinculação do complexo enzimático ou microrganismo ao substrato. Assim, a aderência é obrigatória para que ocorra a degradação dos componentes da planta. A aderência dos microrganismos e das enzimas que degradam os polissacarídeos não somente coloca os sistemas de enzimas em proximidade ao substrato, mas pode agir rompendo ligações entre celulose e polissacarídeos não-celulolíticos, bem como ligações dentro das fibrilas de celulose (Beauchemin et al., 2003).

Nos últimos anos, um método de produção de enzimas tem sido avaliado e melhorado através de diversos estudos. Este método envolve a produção de enzimas de uma forma diferente da tradicional, denominada “fermentação em estado sólido” (SSF, Solid State Fermentation). Este é um processo onde as enzimas são produzidas através do crescimento de fungos diretamente sobre um substrato sólido, como por exemplo, cereais ou derivados de cereais (Robison & Nigan, 2003). Uma das grandes vantagens deste método é que ao invés de produzir apenas uma enzima, o processo SSF permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas específico para os substratos encontrados nos diferentes alimentos. Uma vez alcançado o nível de atividade enzimática desejado no meio, a mistura da fermentação (conhecida como “koji”) é secada, granulada e usada como produto final (Pandey et al., 2001). Esse processo

elimina o desperdício causado pela remoção do líquido e posterior mistura da enzima com um veículo. Além disso, modificando a matéria-prima usada como meio para crescimento fúngico, é possível obter uma combinação enzimática final mais adequada à matéria-prima usada na ração (Robison & Nigan, 2003).

Os benefícios deste complexo enzimático obtido a partir de fermentação em estado sólido têm como base uma combinação natural e equilibrada de enzimas (protease,  $\alpha$ -amilase, lipase, celulase, xilanase, pectinase, fitase e  $\beta$ -glucanase) que permite um largo espectro de atuação. Como resultado da composição equilibrada de enzimas, a energia e os nutrientes da dieta como, proteína, aminoácidos, cálcio e fósforo apresentam maior disponibilidade para o organismo animal (Chauynarong et al., 2008).

Com a crescente pressão sobre a necessidade de reduzir a poluição ambiental, têm-se priorizado as pesquisas para minimizar as excreções de nitrogênio (N) e fósforo (P) pelos animais (Furuya et al., 2004). Esses nutrientes são os principais responsáveis pela eutrofização do ambiente aquático, principalmente nas criações intensivas, que utilizam exclusivamente rações balanceadas (Cyrino et al., 2000).

Então, diante destes fatores, as principais finalidades da suplementação enzimática são: remover ou destruir os fatores antinutricionais dos alimentos, aumentar a digestibilidade total da ração, potencializar a ação das enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes (Guenter, 2003), na tentativa de melhorar o desempenho e a rentabilidade da criação (Cousins, 1999). Com isso, na prática as enzimas são destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais e enzimas que esses animais não podem sintetizar (Guenter, 2003). As enzimas digestivas exógenas agem da mesma forma que as endógenas, apresentando um sítio ativo com a capacidade de atuar sobre um substrato específico, hidrolisando-o (Lehninger, 1995), conforme mostrado na tabela 1.

Existem três grupos de enzimas disponíveis no mercado: enzimas para alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja), enzimas para alimento de alta viscosidade (trigo, centeio, cevada, aveia, triticale e farelo de arroz) e enzima para degradar o ácido fítico dos grãos vegetais.

Para dietas à base de cereais de alta viscosidade, os complexos enzimáticos, na maioria das vezes, são compostos pelas enzimas glucanase, amilase, xilanase, celulase e hemicelulases, enquanto os compostos por amilase, protease e xilanases são usados nas dietas de baixa viscosidade (Zanella, 2001; Guenter, 2003).

Tabela 1- Enzimas, substratos e efeitos das enzimas utilizadas em dietas para animais

Enzima	Substrato	Efeitos
Xilanases	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade da digesta
Glucanases	B-glucanos	Redução da viscosidade da digesta
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de nutrientes
Proteases	Proteína	Suplementação das enzimas endógenas
Amilases	Amido	Suplementação das enzimas endógenas
Fitase	Ácido fítico	Melhora a utilização do fósforo dos vegetais
Galactosidase	Galactosídeos	Remoção de galactosídeos
Lipases	Lipídeos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais

Cleophas et al (2005)

Com isso e de acordo com o objetivo, as enzimas podem ser ministradas tanto na forma conjunta como em separado. A utilização da enzima em separado deve ser feita quando se tem o objetivo de degradar um determinado fator anti-nutricional conhecido que venha prejudicar o aproveitamento dos nutrientes da dieta ou quando se sabe que o uso de determinada enzima em conjunto com outra pode diminuir a atividade de ambas (Wenk et al., 1993). Na forma conjunta, existem os coquetéis, que são formados pela união de enzimas específicas, e os complexos enzimáticos, produzidos por microrganismos. O fornecimento de enzimas na forma conjunta é feito quando uma determinada dieta apresenta uma variada quantidade de fatores anti-nutricionais ou em rações de animais que estejam passando por estresse (desmame, vacinação, castração, desconforto térmico e outros), pois tal situação debilita a produção de enzimas endógenas (Ferket, 1993).

Devido a especificidade em suas reações, a ação de uma enzima isolada pode ser insuficiente para produzir o máximo benefício, sugerindo que misturas de enzimas sejam mais efetivas no aproveitamento dos nutrientes das dietas (Murakami et al., 2007). Essas considerações fortalecem a idéia de que os complexos enzimáticos e os coquetéis formados por enzimas com características sinérgicas e aditivas são mais efetivos no aproveitamento do conteúdo energético e protéico da dieta por agirem de forma complementar e simultânea (Campestrini et al., 2005).

Para justificar a inclusão em dietas de animais, as enzimas utilizadas na alimentação de monogástricos 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 (microrganismo), o tipo de atividade, a composição da dieta, a condição de processamento (temperatura), o armazenamento, as condições durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (Francesch, 1996). A estrutura molecular da enzima é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (Classem, 1993; Graham & Inborr, 1991).

Quanto à origem, as polissacaridases fúngicas possuem atividade ótima em pH mais baixo (4,0 a 5,5), enquanto as bacterianas atuam em pH próximo da neutralidade, de modo que a mistura de enzimas bacterianas e fúngicas pode ser mais efetiva do que uma fonte simples (Kernkamp & Duran, 1991).

A maioria das enzimas utilizada na alimentação animal é de origem fúngica, sendo estáveis à temperatura ambiente, porém, inativam-se rapidamente sob temperaturas superiores a 60°C, ainda que a estabilidade da enzima seja superior quando se incorpora ao alimento (Francesch, 1995). Segundo Graham & Inborr (1991), o calor pode inativar permanentemente as enzimas. Desta forma, uma enzima ideal deve ser capaz de suportar temperaturas acima de 70°C, normalmente alcançadas durante o processamento de rações.

Outro processo de fabricação de ração é a extrusão, cozimento este baseado em alta pressão, umidade controlada e temperatura elevada (em torno de 150°C). As rações extrusadas são as mais utilizadas na alimentação de peixes e cães (Saad et al., 2005). Nesse sentido, são necessárias pesquisas sobre estratégias que permitam a adição de enzimas exógenas às rações extrusadas, visto que as temperaturas alcançadas nesse processo representam uma grande limitação à estabilidade térmica destas enzimas (Logato, 1999; Costa et al., 2004).

Yu e Tsen (2003) avaliaram a estabilidade de várias enzimas ao desafio de pH, temperatura e íons metálicos sobre algumas condições, visando a suplementação em rações para coelhos. Os resultados mostraram que em glicina-HCl e pH 3,2, a celulase, a papaína e a bromelina foram tolerantes, ao contrário da amilase bacteriana e a protease. Já em pH 2,0, a celulase e papaína mostraram-se ainda resistentes, enquanto a bromelina foi completamente inativada. No sistema com conteúdo gástrico em pH 2,0, todas as enzimas testadas foram instáveis, porém, quando o pH foi igual a 3,2, a celulase ficou

bastante estável. Em relação à estabilidade térmica, concluiu-se que, com exceção da papaína, todas as enzimas testadas se mantiveram estáveis até 80°C por 30 segundos. No entanto, o prolongamento do tempo de tratamento com calor para cinco minutos não afetou as atividades da papaína e da celulase, mas diminuiu significativamente as atividades da bromelaína e da protease do *B. licheniformis*. Quanto à influência dos minerais na atividade enzimática, houve efeito inibitório sobre a bromelina e papaína. De acordo com os autores, este fator deve ser considerado na fabricação de rações, pois a estabilidade enzimática pode ser afetada pela inclusão de suplementos minerais.

Em animais, além do baixo pH estomacal, as enzimas exógenas estão expostas a uma variedade de enzimas proteolíticas presentes no trato digestório. Estas enzimas exógenas normalmente são resistentes às proteases microbianas, mas não necessariamente às proteases do trato digestivo dos animais (Chesson, 1987).

Para evitar este tipo de catabolismo enzima-enzima, algumas técnicas para proteger as enzimas têm sido desenvolvidas, como adsorção em carreadores, encapsulação ou sua inclusão após o processamento das rações (Ferket, 1993). Normalmente, quando a enzima é protegida o nível de atividade enzimática se mantém durante três meses em produtos líquidos e por seis meses na forma em pó em temperaturas inferiores a 25°C. Quando a enzima se encontra misturada na dieta, sua atividade pode ser mantida por, no mínimo, três meses, a 25°C (Cowan, 1993).

Do mesmo modo que ocorre com outros monogástricos, os peixes são incapazes de aproveitar muitos nutrientes devido à produção insuficiente ou ausência de enzimas específicas (Chadrabarti et al., 1995; Taniguchi e Takano, 2004). Conseqüentemente, os PNAs permanecem indigestíveis e, portanto, constituem uma fonte de energia indisponível para as espécies de peixes carnívoras e maioria das onívoras (Stone et al., 2003). Com isso, a inclusão de enzimas exógenas em dietas para peixes é uma alternativa para melhorar a digestibilidade da dieta e eliminar os efeitos negativos dos fatores antinutricionais. No entanto, para a formulação da dieta suplementada com a enzima, é necessário o conhecimento da espécie, principalmente a idade e o hábito alimentar (Kolkovski, 2001).

O aumento da digestibilidade em dietas com enzimas normalmente tem reflexos positivos no desempenho de peixes, uma vez que a ação enzimática disponibiliza mais nutrientes. Em larvas de pacu, a adição de pancreatina suína com atividade trípica de 96,465 nmol/min/g de ração melhorou o ganho de peso e a sobrevivência e alterou morfológicamente (sem prejuízos patológicos) os órgãos estudados (Tesser et al., 2006).



Em dois ensaios com tambaquis (*Colossoma Macropomum*), a inclusão de 0,05% de  $\alpha$ -amilase e 0,2% de lipase em dietas melhorou o ganho de peso em 51,68% e 39,73%, respectivamente, com melhorias na conversão alimentar e crescimento específico (Nunes et al., 2006). Segundo Hepher (1988), a inclusão de lipase exógena nas rações potencializa a digestão dos lipídios, disponibilizando energia de natureza não protéica e causando o efeito poupador da proteína para o desenvolvimento dos tecidos.

Em tilápias do Nilo, Lin et al. (2007) observaram que houve melhora significativa para crescimento específico e eficiência alimentar com o aumento de inclusão de um complexo enzimático formado por protease,  $\beta$ -glucanase e xilanase. Foram verificados também nesta mesma espécie por Zhong & Zhou (2005) que a inclusão de 0,1% xilanase teve efeitos positivos no crescimento e na digestibilidade dos nutrientes, mas não houve efeito na composição muscular.

Em pirarucu (*Arapaima gigas*), Cavero (2004) observou que a adição de amilase à ração não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento controle, mas a inclusão de protease e lipase melhoraram os índices zootécnicos. A inclusão de 0,1% de protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré paca (*Cichla temensis*) melhorou o ganho de peso em 8,6g durante o período experimental, com melhora na conversão alimentar (Soares et al., 2008). Em carpa comum, a taxa de crescimento do grupo controle e do grupo alimentado com dietas contendo protease foi de 99,4 e 105% com melhora de 1,85 para 1,75 na conversão alimentar, respectivamente. Estes valores correspondem a um aumento de 6,4% na taxa de crescimento e melhora de 5,4% na conversão alimentar (Liu et al., 2007).

Adicionando 400 mg de carboidrases para polissacarídeos não amiláceos por Kg de ração para Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*), Ai et al. (2007) observaram que houve melhora significativa para crescimento específico e eficiência alimentar. Ainda foi constatada redução na excreção de amônia nos tratamentos suplementados com enzima.

Diante do exposto, justifica-se a necessidade de avaliar os efeitos do processamento e do tempo de armazenamento na atividade de enzimas em dietas para peixes, bem como determinar o desempenho de tilápias do Nilo submetidas a dietas contendo enzimas.

Esta Tese foi redigida seguindo-se as normas para redação da Tese (UFV, 2000) em forma de capítulos, sendo que os três primeiros foram elaborados com base

nos critérios da Revista Brasileira de Zootecnia e o último formatado de acordo com as normas do “Aquaculture Journal”.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, W. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Comparative Biochemistry and physiology**, v.147, n.2, p.502, 2007.
- BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P.D. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**. Champaign, v.81, n.2, p.37-47, 2003.
- BÖHM, V.; KÜHNERT, S.; ROHM, H. Improving the nutritional quality of microwavevacuum dried strawberries: A preliminary study. **Food Science Technology International**, v.12, p.67-75, 2006.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPET, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.
- CAVERO, B.A.S. 2004. Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829). Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 79pp.
- CHADRABARTI, I.; GANI, M. A.; CHAKI, K. K.; SUR, R.; MISRA, K. K. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comparative Biochemistry Aquaculture**, Oxford, v.112, n. 1, p. 167-177, Sept. 1995.
- CHAUYNARONG, N.; IJI, P.A.; ISARIYODON, S.; MIKKELSEN, L. The influence of an exogenous microbial enzyme supplement on feed consumption, body growth and follicular development of pre-lay pullets on maize-soy diets. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.3, p.257-262, 2008.
- CHOCT M.; A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.92, p.53-61, 2004.

- CLASSEN, H. L. Enzimas usadas en el alimento. **Avicultura Professional**, v.10, n.4, p.162-168, 1993.
- CLÉOPHAS, G.M.L.; HARTINGSVELDT, W.V.; SOMERS, W.A.C. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. **World Poultry**, v.11, n.4, p.12-15, 1995.
- CHESSON, A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: HARESING, W.; COLE, P. J. A. (Ed.). **Recent advances in animal nutrition**. London: Butterworths, 1987. p.71-87.
- CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G.; FIALHO, E. T.; MUNIZ, J. A. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1289-1296, 2002.
- COSTA, F.G.P.; CLEMENTINO, R.H.; JÁCOME, I.M.T.D.; NASCIMENTO, G.A.J.; PEREIRA, W.E. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.2, p.63-71, 2004.
- COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL ACAV-EMBRAPA SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1999, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, 1999. p.118-132.
- COWAN, W.D. Understanding the manufacturing, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. **Journal Applied Poultry Research**, v.2, p.93-95, 1993.
- CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; MARTINO, R.C. Retenção de proteína e energia em juvenis de Black Bass. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, p.609-616, 2000.
- DIAS, J. C. C. A.; SANTIAGO, G. S.; FERREIRA, W. M.; SALIBA, E. O. S.; NARANJO, A. P. Avaliação da estabilidade *in vitro* de uma protease comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária, e Zootecnia**, v.54 n. 6, p. 618-622, 2002.
- FERKET, P. R. Practical use of feed enzymes for turkeys and broiler. **Journal Applied Poultry Research**, v.1, p.75-81, 1993.
- FRANCESCH, M.; PÉREZ-VENDRELL, A.M.; ESTEVE-GARCÍA, E.; BRUFAU, J. Enzyme supplementation of a barley and sunflower-based diet on laying hen performance. **Journal Applied Poultry Research**, v.4, p.32-40, 1995.
- FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante o período de reversão de sexo. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.26, n.3, p.299-303, 2004.
- GRAHAM, H.; INBORR, J. Enzymes in monogastric feeding. **Agro-Ind. Hitech**, v.2, 1991.
- GUENTER, W. **Practical experience with the use of enzymes**. 2003. Disponível em: <[http://www.idrc.ca/en/ev-30924-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://www.idrc.ca/en/ev-30924-201-1-DO_TOPIC.html)>. Acesso em: 16 de abril de 2010.
- HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. New York: Cambridge University Press, 1988. 388p.
- HYMOWITZ, T.; COLLINS, F.I.; PANCZNER, J.; WALKER, W.M. Relationship between the content of oil, protein and sugar in soybean seed. **Journal of Agriculture Science**, v.64, p.613-616, 1972.

- KAWAWURA, S. Quantitative paper chromatography of sugars of the cotyledon, hull, and hypocotyl of soybeans of selected varieties. Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawagen, v.15, p.117-131, 1967.
- KERNKANP, G.; DURAN, R. La cebada: una materia prima util para aves. In: SEMINARIO SOBRE EL EMPLEO DE ENZIMAS EN LA NUTRICION ANIMAL, Barcelona, 1991. **Anais...**Barcelona: FEDNA, 1991.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v.200, p.181-201, 2001.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. 1995. **Princípios de bioquímica**. Traduzido por Simões, A.A., Lodi, W.R. 2.ed., São Paulo: Sarvier. 841p, 1995.
- LESSON, S. A.; YERSIN, L.; VOLKER. Nutritive value of 1992 corn orgs. **Journal Applied Poultry Research**, Athens, v. 2, n. 3, p. 208-213, 1993.
- LIN, S.; MAI, K.; TAN, B. Effects of exogenous enzymes supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture research**, v.38, n.15, p.1645-1653, 2007.
- LIU, D.Y.L.; LENG, X.J.; LU, Y.H.; LI, X. Effects of Adding Protease(Aquagrow)in Diet on Growth and Digestive Protease Activities of Common Carp. **Fresh Water Fisheries**, v.5, n.13, p.85-91, 2007.
- LOGATO, P.V.R. **Nutrição e alimentação de peixes de água doce**. Lavras: Editora UFLA, 1999. v.1. 79 p.
- MEURER, F. Fibra bruta para alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.256-261, 2003.
- MURAKAMI, A. E.; FERNANDES, J.I.M.; SAKAMOTO, M.I. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Science Animal Science**, v.29, n.2, p.165-172, 2007.
- NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.1, p.139-143, 2006.
- OLIVEIRA, G.R.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F.; RODRIGUES, P.B.; FIALHO, E.T.; DIODATTI, F.C. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1945-1952, 2007.
- OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; CUNHA, F.; ROCHA, C.; BORGES, S.A. Adição de complexo enzimático e da granulometria da soja integral desativada sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciência Rural*, v.40, n.3, p.628-632, 2010.
- OTT, R.P. 2005. Utilização de carboidrases para frango de corte. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 65pp.
- OUHIDA, I.; PEREZ, J.F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1933-1938, 2002.
- PACK, C.; GROSSBERG, S.; MINGOLLA, E. How does cortical area MST use optic flow to navigate? *ARVO Abstracts*, v. 39, p. 1520, 1998.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. Nova Deli: Asiatech, 2001. 221p.
- PEREIRA FILHO, M. A importância da fibra na nutrição dos peixes. In: Simpósio Brasileiro De Aquicultura, 7., Encontro Brasileiro De Patologia De Organismos Aquáticos, 2., 1995, Peruibe. **Anais...** Peruibe: 1995. v.único, p.1-10.
- PEZZATO, L.E. Alimentação de peixes - Relação custo e benefício. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 36, Porto alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1999. p.109-118.
- PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. 2004 Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N.Tópicos Especiais em Piscicultura de água Doce Tropical Intensiva. São Paulo: Aquabio, v.1, p.75-170.
- ROBISON, T.; NIGAN, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.107-203, 2003.
- RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F.; FIALHO, E.T.; SILVA, H.O.; GONÇALVES, T.M. Digestibilidade dos nutrientes e desempenho de suínos em crescimento e terminação alimentados com rações à base de milho e sorgo suplementadas com enzimas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.2, p.91-100, 2002.
- SAAD, F.M.O.B.; DUARTE, A; SAAD, C.E.P.; LARA, L.B. Aspectos técnicos comerciais e avaliação da qualidade de alimentos para cães e gatos. Lavras: Gráfica universitária da UFLA, 2005, p.28-31.
- SOARES, E.C.; FILHO, M.P.; ROUBACH, R.; SILVA, R.C.S. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.971-976, 2008.
- STONE, D.A.J.; ALLAN, G.L.; ANDERSON, A.J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v.34, n.2, p.109-121, 2003.
- TANIGUCHI, A. Y.; TAKANO, K. Purification and properties of  $\beta$ -gactosidase from Tilapia intestine: Digestive enzyme to *Tilapia-X*. **Fisheries Science**, v.70, n.4, p.688-694, 2004.
- TESSER, M.B.; FLORES-QUINTANA, C.I.; CARNEIRO, D.J.; JUNIOR, J.M.P.; PORTELLA, M.C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2211-2218, 2006.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Normas para redação de teses**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 2p.
- WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trend, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, p.465-498, 2002.
- WENK, C.; KOLLIKER, R.M.E.; SSIKOMMER, R. Whole maize plants in diets for growing pigs: effect of 3 different enzymes on the feed utilization. in: WENK, C. and BOESSINGER, M. Enzymes in animal nutrition - 1 st symposium. **Proceedings...** Kartause Ittingen, Switzerland. October 13-16, p. 165-172, 1993.

- WENK, C. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. **Animal Feed Science and Technology**, v.90, p.21-33, 2001.
- YU, B.; TSEN, H. Y. An *in vitro* assessment of several enzymes for the supplementation of rabbit diets. **Animal Feed Science Technology**, v.40, n.4, p.309-320, 2003.
- ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. **Anais...** Simpósio de Nutrição Animal, Santa Maria/RS, 69p. p.37-49, 2001.
- ZHONG, G.F.; ZHOU, H.Q. The Effects of Xylanase and Multi-enzyme PS on the Production Performance, Digestibility and the Nutrient Ingredients of Muscles of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Zhejiang Ocean University**, v.3, n.7, p.1287-1290, 2005.

**Estabilidade do complexo enzimático solid state fermentation (SSF) submetido ao processamento de rações peletizadas e tempo de estocagem em diferentes temperaturas**

**RESUMO** - Objetivou-se avaliar o efeito do processamento e tempo de estocagem na estabilidade do complexo enzimático SSF em dietas para peixes. Foram formuladas duas dietas com a mesma composição nutricional, sendo a dieta controle isenta de SSF e a outra contendo 5% de inclusão deste complexo enzimático. As amostras foram coletadas durante as seguintes etapas de processamento: mistura, após a peletização e após secagem em estufa. Para avaliação do tempo de prateleira, foi considerado como dia um, a ração pronta após secagem. Neste dia, foram feitas duas amostragens, sendo uma mantida em sala com temperatura ambiente de 25°C e outra mantida em freezer a -18°C. Aos 15, 30, 45 e 60 dias foi feita uma sub-amostragem. Todas as amostras da etapa de processamento e do período de prateleira foram encaminhados para o laboratório, sendo mensurado a atividade das seguintes enzimas:  $\alpha$ -galactosidase, endoglucanase (carboxi-metil-celulase), xilanase, sacarase, amilase, lipase e tripsina. Não houve diferenças entre a mistura e a fase pós estufa, exceto para a atividade de  $\alpha$ -galactosidase, sacarase e lipase. Para a temperatura de estocagem de 25°C, não foram verificados efeitos para as atividades de endoglucanase, sacarase, xilanase, amilase e tripsina entre o primeiro (após estufa) e o 60º dia de experimento. Quanto à temperatura de estocagem de -18°C, somente não foi observado diferença para as atividades de endoglucanase e xilanase entre o primeiro e o último dia. Ao se comparar os dois tipos de estocagem (25°C e -18°C), somente foi observada diferença para a atividade de galactosidase e tripsina aos 60 dias. Para todas as enzimas do SSF não houve diferença no período de 30 e 45 dias de estocagem. Conclui-se que as enzimas estudadas do complexo enzimático SSF permanecem estáveis durante o processamento de rações peletizadas à 55°C, mantendo a atividade por no mínimo 60 dias quando estocadas em ambiente de até 25°C.

Palavras-chave: atividade enzimática, enzimas, nutrição animal, nutrição de peixes, peletização



## **Stability of the enzyme complex Solid State Fermentation (SSF) subjected to the processing of pelleting feed and storage time at different temperatures**

**ABSTRACT** - Aimed to evaluate the effect of processing and storage time on the stability of the enzyme complex SSF in diets for fish. Two diets were formulated with the same nutritional composition, and the control diet free of SSF and the other containing 5% inclusion of this enzyme complex. The samples were collected during the following processing steps: mixing, after pelleting and then dried. To evaluate the shelf life was considered as day one, ready to feed after drying. On this day, two samples were being kept in a room with ambient temperature of 25°C and another kept in a freezer at -18°C. 15, 30, 45 and 60 days were a sub-sampling. All samples from the processing step and the shelf life period were sent to the laboratory, measured the activity of the following enzymes:  $\alpha$ -galactosidase, endoglucanase (carboxy-methyl-cellulase), xylanase, sucrase, amylase, lipase and trypsin. There were no significant differences between the mixture and post-oven phase, except for the activity of  $\alpha$ -galactosidase, lipase, and sucrase. For the storage temperature of 25°C, no effects were observed for the activities of endoglucanase, sucrase, xylanase, amylase and trypsin between the first (after oven) and the 60<sup>th</sup> day of the experiment. As the storage temperature of -18°C, no difference was observed only for the activities of endoglucanase and xylanase between the first and last day. Comparing the two types of storage (25°C and -18°C), only difference was observed for the activity of galactosidase and trypsin at 60 days. For all enzymes there was no difference in the period from 30 to 45 days of storage. It is concluded that the enzymes studied the SSF enzyme complex remain stable during the processing of pelleted feed at 55°C, maintaining activity for at least 60 days when stored at temperatures up to 25°C.

Keywords: enzymatic activity, enzymes, fish nutrition, animal nutrition, pelleting

## Introdução

A utilização de enzimas exógenas na alimentação animal é uma prática que permite melhorar o aproveitamento nutricional de ingredientes que apresentam baixo coeficiente de digestibilidade, resultantes da própria composição ou da própria fisiologia do animal. Com isso, a suplementação dessas enzimas na alimentação de monogástricos pode suprir deficiências enzimáticas dos animais e melhorar a utilização de matérias-primas (Opalinski et al., 2010), bem como permitir o uso de produtos alternativos.

As enzimas são produzidas por meio de culturas aeróbicas, derivadas de fermentações fúngica, bacteriana e de leveduras (Broz et al., 1994) em condições de processamento muito bem controladas. A produção dessas enzimas envolve processos como fermentação, extração, separação e purificação. Atualmente, somente pequeno número de bactérias e fungos é empregado para produzir praticamente todas as enzimas industriais comuns (Inborr et al., 1991). As enzimas utilizadas são, em sua maioria, de origem fúngica e estáveis à temperatura ambiente, porém inativam-se rapidamente em temperaturas superiores a 60°C. A estabilidade da enzima é superior quando incorporada no alimento (Francesch et al., 1995), mas o calor da peletização pode inativá-las. Assim, uma enzima ideal deve ser capaz de suportar temperaturas entre 70 e 90°C, normalmente alcançadas durante o processo de peletização (Finnfeeds, 1991).

Em produtos líquidos, o nível de atividade enzimática é mantido durante três meses e na forma de pó, podem ser prolongadas por até seis meses, quando ambas estocadas em temperaturas inferiores a 25°C. Se misturada aos ingredientes da dieta, as enzimas podem ficar estáveis por mais de três meses a 25°C (Cowan, 1993).

Diante das opções de complexos enzimáticos, o “solid state fermentation (SSF)” parece se destacar pela suas características qualitativas. Além de ser produzido naturalmente em matriz sólida, apresenta várias enzimas que atuam em conjunto, disponibilizando mais nutrientes, o que pode vir a melhorar o desempenho dos animais. No entanto, estudos sobre a estabilidade das enzimas presentes neste complexo devem ser realizados, pois este é submetido a vários fatores físicos e químicos durante o processamento da dieta, estocagem e processos digestórios, o que pode reduzir ou inativar a sua atividade catalítica.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos do processamento e do tempo de estocagem sobre a estabilidade das enzimas do complexo enzimático SSF em dietas peletizadas para peixes.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido entre os meses de outubro de 2009 e janeiro de 2010, no Departamento de Zootecnia e no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

Foram formuladas duas rações isonutritivas, sendo que ambas continham 36% de PB e 2700 Kcal de ED/Kg de ração (Tabela 1). A ração controle foi formulada isenta de SSF e a outra ração experimental foi adicionada 5% deste complexo enzimático em substituição ao inerte. Os ingredientes foram pesados e colocados em saco plástico para mistura. Por cinco minutos, estes sacos foram sacudidos, promovendo uma mistura homogênea dos ingredientes.

Tabela 1. Composição das rações experimentais (matéria natural)  
 Table 1. Composition of the experimental diets (as fed)

Ingredientes (g/Kg) <i>Ingredients g/Kg</i>	Tratamentos Treatments	
	Controle Control	Com SSF With SSF
Farelo de soja ( <i>Soybean meal</i> )	504,7	504,7
Milho ( <i>Corn</i> )	163,4	163,4
Glúten 60 ( <i>Corn gluten 60</i> )	181,3	181,3
Farelo de trigo ( <i>Wheat meal</i> )	53,7	53,7
Óleo de soja ( <i>Soybean oil</i> )	10,2	10,2
Caulin ( <i>Caulin</i> )	50,0	-
Complexo enzimático SSF (Enzyme complex SSF) <sup>6</sup>	-	50,0
Fosfato bicálcico ( <i>Dicalcium phosphate</i> )	26,9	26,9
Premix vitamínico (Vitaminic mix) <sup>3</sup>	4,0	4,0
Premix mineral (Mineral mix) <sup>4</sup>	1,0	1,0
Vitamina C ( <i>Vitamin C</i> ) <sup>5</sup>	0,5	0,5
Sal ( <i>Salt</i> )	4,0	4,0
Antioxidante (BHT) ( <i>Antioxidant</i> )	0,2	0,2
Total	1000	1000
Composição calculada ( <i>Calculated composition</i> ) <sup>1</sup>		
Proteína bruta ( <i>Crude protein</i> ) (%)	36,00	36,00
Energia digestível (Kcal/Kg) <i>Digestible energy (Kcal/kg)</i> <sup>2</sup>	2700	2700
Fibra bruta ( <i>Crude fiber</i> ) (%)	3,69	3,69
Cálcio total ( <i>Total calcium</i> ) (%)	0,81	0,81
Fósforo total <i>Available phosphorus</i> (%)	0,93	0,93

<sup>1</sup> Composição calculada segundo Rostagno et al. (2005) (*composition according to Rostagno et al., 2005 tables*).

<sup>2</sup> Valores estimados com base nos coeficientes de digestibilidade dos ingredientes para os aminoácidos e fósforo, de acordo com Rostagno et al. (2005) e Furuya (2000), e de energia, de acordo com Boscolo et al. (2002c) e Pezzato et al. (2002).

*Estimated values based on the coefficients of digestibility of ingredient amino acids, phosphorus according to Rostagno et al., (2005) tables, and energy according to Boscolo et al. (2002c), and Pezzato et al. (2002).*

<sup>3</sup> Composição por quilograma do produto (*Composition per kilogram of product*): 1.200.000 UI de Vitamina A<sub>3</sub>; 200.000 UI de Vitamina D<sub>3</sub>; 1.200 mg de Vitamina E; 2.400 mg de Vitamina K<sub>3</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>1</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>2</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>6</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>12</sub>; 48 g de Vitamina C<sub>3</sub>; 1200 mg de ácido fólico (*folic acid*); 12.000 mg de pantotenato de Ca (*panthotenic acid*); 48 mg de biotina (*biotin*); 108 g de cloreto de colina (*cholin*); 24.000 mg de niacina (*niacin*)

<sup>4</sup> Composição por quilograma do produto (*Composition per kilogram of product*): 24.000 mg; Fe, 50.000 mg; Cu, 3.000 mg; Mn, 20.000 mg; Zn, 30.000 mg; I, 100 mg; Co, 10 mg; Se, 100 mg.

<sup>5</sup> Vit. C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo (*Vitamin C: calcic salt, 2-monophosphate of ascorbic acid-42% active principle*).

<sup>6</sup> AllzymeSSF, produzido pela Alltech Inc.

Esta mistura foi colocada em bacia e adicionou-se água à 55°C até que a massa chegasse ao ponto de liga. Logo após, a peletizadora recebeu a mistura úmida, tendo como produto os péletes ainda úmidos. Por 14 horas, estes péletes permaneceram em estufa de ventilação forçada à 55°C, o que promoveu a sua secagem.

O experimento teve início no momento do processamento das dietas experimentais, sendo as amostras coletadas durante as seguintes etapas: mistura, após a peletização e após 14 horas de secagem em estufa a 55°C. Para avaliação do tempo de estocagem, foi considerado como dia um, a ração pronta após secagem. Neste dia, foram feitas duas amostragens, sendo uma mantida em sala com temperatura ambiente a 25°C e outra mantida em freezer a -18°C.

Aos 15, 30, 45 e 60 dias foi feita uma sub-amostragem para os dois tipos de estocagem. Todas as amostras da etapa de processamento e do período de estocagem foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Bioquímicas (Bioagro), sendo mensurada a atividade das seguintes enzimas:  $\alpha$ -galactosidase, endoglucanase (carboximetil-celulase), xilanase, sacarase (invertase),  $\alpha$ -amilase, tripsina e lipase.

Para a avaliação da  $\alpha$ -galactosidase, endoglucanase, xilanase e sacarase foram macerados 200 mg de cada amostra de ração em 10 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM. Em seguida, o preparado foi centrifugado a 13000 rpm por dois minutos, sendo o sobrenadante (extrato) retirado e estocado em freezer -18°C para as análises enzimáticas.

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzido por meio do uso do reagente dinitrossalicilato (DNS), segundo Miller (1956). A mistura da reação foi constituída de 325  $\mu$ L de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5), 125  $\mu$ L de uma solução 10 mM de sacarose e 50  $\mu$ L de extrato enzimático. O ensaio foi conduzido em banho-maria por 15 minutos a 40°C. Para paralisar a reação, foi adicionado 1 mL do reativo de DNS, seguido pela imersão dos tubos de ensaio em banho de água fervente por 5 minutos.

As medidas espectrofotométricas foram tomadas a 540 nm, e os valores de absorvância convertidos em  $\mu$ moles de açúcar redutor, utilizando-se uma curva padrão construída a partir de quantidades de glicose variando entre 0,2 e 2  $\mu$ moles.

Para o ensaio da endoglucanase, 30  $\mu$ L da solução de enzima foi misturada com 400  $\mu$ L de carboximetilcelulose (0,625% p/v), sendo diluída em 70  $\mu$ L de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5. Esta solução foi colocada em banho-maria a 50°C por 30 minutos, sendo a reação paralisada segundo Miller (1956), utilizando-se de 500  $\mu$ L de DNS e banho de água fervente por 5 minutos. Após, foram feitas as medidas espectrofotométricas a 540 nm.

A atividade da xilanase foi determinada usando 70  $\mu$ L de solução tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5), 30  $\mu$ L do extrato enzimático e 400  $\mu$ L de solução xilano birch wood (1,25% p/v). A reação foi conduzida por 20 minutos a 40°C, sendo paralisada com 500  $\mu$ L de DNS e incubada em banho de água fervente por 5 minutos para o desenvolvimento da cor. A atividade foi determinada a 540 nm usando a curva padrão de glicose.

Na atividade de sacarase, 15  $\mu$ L do extrato enzimático foi adicionado em 125  $\mu$ L de solução de sacarase (2 g de sacarose p.a. em 50 mL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5) e 360  $\mu$ L de solução tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5). Esta solução foi colocada imediatamente em banho-maria a 30°C por 30 minutos, sendo a reação finalizada com 500  $\mu$ L de DNS. Posteriormente, a amostra foi levada ao banho em água fervente por 5 minutos, resfriada e feita a leitura em espectrofotômetro a 540nm.

Para a atividade de  $\alpha$ -amilase, tripsina e lipase, 0,5 g de amostra de ração foi macerada com 10 mL de solução tampão Tris-HCl 0,1M. Em seguida, este material foi colocado em tubo de polietileno e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. Com isso, foi retirado o sobrenadante para a determinação da atividade das enzimas.

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi baseada na hidrólise do amido, com liberação de moléculas de dextrina e maltose. Pela adição de iodo, o amido não hidrolisado adquire coloração azul. A atividade da amilase é inversamente proporcional à intensidade de cor azul e calculada pela comparação com um controle de substrato. A atividade foi determinada em espectrofotômetro óptico, em comprimento de onda de 660 nm, utilizando-se o kit de amilase colorimétrica da Bioclin, segundo Caraway (1959).

Quanto à atividade de tripsina foi utilizado o N-Benzoil-D,L-arginina p-nitroanilida (D,L-BApNA) como substrato, conforme o método descrito por Erlanger et al. (1961). Foram adicionados 10  $\mu$ L do extrato enzimático e, imediatamente, as velocidades iniciais foram obtidas pela formação do produto p-nitroalínina, por meio de determinação da absorvância a 410nm, em função do tempo. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 8800  $M^{-1} cm^{-1}$  para o produto.

Para atividade de lipase, foi utilizada a metodologia modificada de Cherry (1932), sendo usado o kit Bioclin. Esta metodologia consistiu na verificação da atuação da lipase presente no extrato enzimático da ração sobre um éster de glicerol, liberando um cromogênio, que foi quantitativamente determinado em espectrofotômetro a 410 nm. A intensidade de cor formada é proporcional à atividade de lípase.

Todas as análises enzimáticas foram feitas com três repetições em duplicata, sendo que para as análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, 2004). Para a avaliação das amostras do processamento e tempo de estocagem, as médias foram comparadas pelo Teste SNK (Student Newman Kells) a 0,05. Através do Teste F a 5% foram avaliados as médias das duas diferentes formas de estocagem (temperatura de 25°C e -18°C). Os resultados das atividades foram mensurados em termos de atividade enzimática relativa, considerando a primeira coleta (mistura) como 100%.

## Resultados e Discussão

Não foram observadas atividades das enzimas estudadas no tratamento controle em todas as amostras estudadas. Com isso, somente os resultados médios da atividade de enzimas na ração para peixes com o complexo enzimático SSF submetidas ao processamento e tempo de estocagem em diferentes temperaturas foram demonstradas.

No processamento (Tabela 2), não foi observado diferenças ( $p > 0,05$ ) entre a mistura e a etapa pós estufa para as atividades de endoglucanase, xilanase, amilase e tripsina. No entanto, para a atividade da  $\alpha$ -galactosidase houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) de 13,2%, ao contrário da sacarase e lipase, que aumentaram ( $p < 0,05$ ) em 8,3% e 5,5% a sua atividade, respectivamente.

Durante o processamento, os ingredientes foram submetidos à temperatura de 55°C na peletização, além das 14 horas em estufa à mesma temperatura. De uma maneira geral, o complexo enzimático SSF se manteve estável perante as adversidades físicas e químicas do experimento. No entanto, a galactosidase apresentou um padrão de atividade catalítica diferente em relação às outras enzimas. No processamento parece ter ocorrido uma desnaturação parcial desta enzima, o que reduziu a atividade após secagem em estufa, mas, com o passar dos dias foi ocorrendo uma renaturação, evidenciado pelo aumento gradativo de sua atividade.

Segundo Leningher et al. (1995), a estrutura nativa da enzima é que permite o aumento da ação enzimática. A maioria das enzimas é desnaturada em temperaturas acima de 50°C, o que pode levar a alterações na sua conformação e à perda do poder catalítico.



Tabela 2. Atividades de enzimas do complexo enzimático SSF em rações para peixes durante o processamento

Table 2. Enzymes activity from enzyme complex SSF in fish diets during the processing

Enzimas <i>Enzymes</i>	Amostragem <i>Sampling</i>			CV (%)
	Mistura <i>Mix</i>	Peletização <i>Pelleting</i>	Pós-estufa <i>Post oven</i>	
Galactosidase* <i>Galactosidase</i>	100a	97,9a	86,8b	4,165
Endoglucanase* <i>Endoglucanase</i>	100b	122,3a	101,7b	5,514
Sacarase* <i>Sacarase</i>	100c	120a	108,3b	3,355
Xilanase* <i>Xylanase</i>	100b	135,7a	102,4b	4,978
Amilase <i>Amylase</i>	100	105,1	102,5	2,014
Lipase* <i>Lipase</i>	100c	116,7a	105,5b	1,856
Tripsina* <i>Trypsin</i>	100b	115,1a	98,4b	0,833

\*Médias seguidas por letras distintas na mesma linha são diferentes pelo teste SNK ( $p < 0,05$ )

\* Means followed by distinct letters in the same line differ by SNK test ( $p < 0.05$ )

Os resultados das atividades das demais enzimas envolvidas neste estudo está coerente com os de Spring et al. (1996) que ao testar o efeito da temperatura da peletização (60°C a 100°C) sobre a atividade das enzimas celulase, amilase e pentosanase, em dietas à base de trigo e cevada, concluíram que elas mantêm sua atividade enzimática a uma temperatura de peletização de 80°C. Valores próximos foram obtidos por Silveira et al. (2010) observando que rações peletizadas à temperatura de 75°C não causou efeito deletério na atividade enzimática do complexo enzimático SSF.

De forma semelhante, Bedford (1996) também observou que um complexo enzimático formado pelas enzimas amilase, protease e xilanase, resistiu à temperatura de 85°C durante 15 minutos e a 2 minutos quando submetido a 90°C, durante o processo de peletização e pode ser armazenado durante 12 meses em temperatura de 22°C. Por outro lado, Colier e Hardy (1986) verificaram que após o processo de peletização a

70°C, a atividade residual para  $\alpha$ -amilase e proteases fúngicas e bacterianas foi de 52 a 77% e 34% a 65% da atividade original, respectivamente.

Para todas as enzimas, com exceção da  $\alpha$ -galactosidase e  $\alpha$ -amilase, ocorreu aumento da atividade catalítica após a peletização. Provavelmente, a umidade dos péletes favoreceu a ação enzimática, pois para ocorrer ação enzimática em um substrato com formação de produto há a necessidade da presença de água, ou seja, hidrólise.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias da atividade das enzimas presentes na dieta em temperatura de estocagem à 25°C. Não foram observados efeitos ( $p>0,05$ ) para as atividades de endoglucanase, sacarase, xilanase e amilase e tripsina entre o primeiro (após estufa) e o 60º dia de experimento. Para a atividade de  $\alpha$ -galactosidase e de tripsina houve aumento ( $p<0,05$ ) de 30,8% e 2,1%, enquanto que para a atividade de lipase foi verificado redução ( $p<0,05$ ) de 11,8%. Dos 15 aos 60 dias de estocagem, a endoglucanase, a sacarase, a xilanase, a amilase e a tripsina se mantiveram estáveis à temperatura de 25°C, ou seja, não sofreram perda de atividade ( $p>0,05$ ) ao longo do tempo.

Tabela 3. Atividades de enzimas do complexo enzimático SSF em rações para peixes durante o tempo de estocagem à 25°C

Table 3. Enzymes activity from enzyme complex SSF in fish diets during the storage time at 25°C

Enzimas <i>Enzymes</i>	Amostragem (dia) Sampling (day)					CV (%)
	1	15	30	45	60	
Galactosidase* <i>Galactosidase</i>	100,0c	103,9c	111,8bc	122,2ab	130,8a	5,678
Endoglucanase <i>Endoglucanase</i>	100,0	95,3	101,6	111,7	115,3	9,089
Sacarase <i>Sacarase</i>	100,0	99,6	95,0	77,9	82,8	11,818
Xilanase <i>Xylanase</i>	100,0	102,1	111,3	108,2	107,0	5,625
Amilase* <i>Amylase</i>	100,0a	100,5a	97,2b	98,8ab	99,1ab	0,951
Lipase* <i>Lipase</i>	100,0a	95,9ab	91,4bc	95,1ab	88,2c	2,621
Tripsina* <i>Trypsin</i>	100,0b	102,7a	102,6a	97,5c	102,1a	0,908

\*Médias seguidas por letras distintas na mesma linha são diferentes pelo teste SNK ( $p < 0,05$ )

\* Means followed by distinct letters in the same line differ by SNK test ( $p < 0,05$ )

Quanto à temperatura de estocagem de -18°C (Tabela 4), somente não foi observado diferença ( $p > 0,05$ ) para as atividades de endoglucanase e xilanase entre o primeiro e o último dia. A  $\alpha$ -galactosidase e a tripsina submetida a esta temperatura teve o comportamento catalítico semelhante às mesmas estocadas à 25°C, ou seja, ao 60º dia houve aumento ( $p < 0,05$ ) na atividade destas enzimas. Para a atividade de sacarase, amilase e lipase foram verificadas redução ( $p < 0,05$ ) de 17,2%, 0,9% e 11,8%, respectivamente, aos 60 dias de estocagem.

Tabela 4. Atividades de enzimas do complexo enzimático SSF em rações para peixes durante o tempo de estocagem à -18°C

Table 4. Enzymes activity from enzyme complex SSF in fish diets during the storage time at -18°C

Enzimas <i>Enzymes</i>	Amostragem (dia) Sampling (day)					CV (%)
	1	15	30	45	60	
Galactosidase* <i>Galactosidase</i>	100,0b	94,9b	115,9a	117,1a	111,3a	4,519
Endoglucanase <i>Endoglucanase</i>	100,0	101,6	116,7	125,4	117,8	10,813
Sacarase* <i>Sacarase</i>	100,0a	66,5b	73,5b	71,9b	71,8b	8,614
Xilanase <i>Xylanase</i>	100,0	114,6	109,2	112,5	104,3	7,014
Amilase* <i>Amylase</i>	100,0a	100,4a	96,0b	100,3a	97,3b	1,207
Lipase* <i>Lipase</i>	100,0a	99,72a	92,5c	94,7b	89,9d	1,256
Tripsina* <i>Trypsin</i>	100,0e	112,9a	102,6b	100,3d	100,6c	0,094

\*Médias seguidas por letras distintas na mesma linha são diferentes pelo teste SNK ( $p < 0,05$ )

\* Means followed by distinct letters in the same line differ by SNK test ( $p < 0,05$ )

O resultado da diferença entre as médias da atividade das enzimas estocadas em diferentes temperaturas se encontra na Tabela 5. Quando se comparou os dois tipos de estocagem (25°C e -18°C), somente foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) para a atividade de galactosidase e tripsina aos 60 dias. À temperatura de 25°C, estas enzimas apresentaram atividade maior do que quando submetidas à temperatura de -18°C, porém, ambas superiores à atividade inicial. Para todas as enzimas do SSF não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no período de 30 e 45 dias.

Este resultado indicou que rações peletizadas para peixes contendo o complexo enzimático SSF não necessita de ser conservado em temperaturas negativas até 60 dias, pois a forma de proteção deste produto confere estabilidade ao processamento e tempo de armazenamento.

Tabela 5. Atividades de enzimas do complexo enzimático SSF em rações estocadas em diferentes temperaturas

Table 4. Enzyme activity of SSF enzymatic complex in diet stocked in different temperature

Enzimas <i>Enzymes</i>	Tempo de estocagem (dias) <i>Stocking (days)</i>			
	15	30	45	60
Galactosidase 25°C* <i>Galactosidase</i>	103,9a	111,8	122,2	130,8a
Galactosidase -18°C <i>Galactosidase</i>	94,9b	115,9	117,1	111,3b
CV (%)	2,120	5,192	3,576	6,178
Endoglucanase 25°C <i>Endoglucanase</i>	95,3	101,6	111,7	115,3
Endoglucanase -18°C <i>Endoglucanase</i>	101,6	116,7	125,4	117,8
CV (%)	7,653	13,586	5,964	12,222
Sacarase 25°C* <i>Sacarase</i>	99,6b	95,0	77,9	82,8
Sacarase -18°C <i>Sacarase*</i>	114,6a	109,2	112,5	71,8
CV (%)	8,667	15,399	7,036	15,153
Xilanase 25°C* <i>Xylanase</i>	102,1a	111,3	108,2	107,0
Xilanase -18°C <i>Xylanase</i>	100,4b	96,0	100,3	104,3
CV (%)	2,726	3,619	10,520	5,989
Amilase 25°C <i>Amylase</i>	100,5	97,2	98,8	99,1
Amilase -18°C <i>Amylase</i>	99,72	92,5	94,7	97,3
CV (%)	0,848	1,267	1,454	1,103
Lipase 25°C* <i>Lipase</i>	95,9b	91,4	95,1	88,2
Lipase -18°C <i>Lipase</i>	112,9a	102,6	100,3	89,9
CV (%)	0,842	1,731	3,266	2,669
Tripsina 25°C* <i>Trypsin</i>	102,7a	102,6	97,5	102,1a
Tripsina -18°C <i>Trypsin</i>	94,9b	115,9	117,1	100,6b
CV (%)	0,306	0,090	1,427	0,112

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo Teste F ( $p < 0,05$ )

Means followed by distinct letters differ by F test ( $p < 0,05$ )

## **Conclusões**

As enzimas avaliadas do complexo enzimático SSF não perdem a estabilidade quando submetidas ao processamento de rações peletizadas à 55°C, mantendo a atividade por no mínimo 60 dias quando estocadas em ambiente de até 25°C.

## Literatura Citada

- BROZ, J.; OLDALE, P.; PERRIN-VOLTZ, A.H. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilization in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. **Brazilian Poultry Science**, v.35, p.273-280, 1994.
- CARAWAY, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, v.32, p.97-99, 1959.
- CHERRY, I.S., CRANDALL, L.A. **American Journal of Physiology**, p.100-266, 1932.
- COLIER, B.; HARDY, B. The use of enzymes in the pig and poultry feeds. **Feed Comp**, v. 6, p. 14-19, 1986.
- COWAN, W.D. Understanding the manufacturing, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. **Journal Applied Poultry Research**, v.2, p.93-95, 1993.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWWSKY, N.; CHEN, N. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, p.271-278, 1961.
- FINNFEEDS Internacional. Enzymes in animal nutrition. England: Technical Support Manual, 1991. p.11-16.
- FRANCESCH, M.; PÉREZ-VENDRELL, A.M.; ESTEVE-GARCÍA, E.; BRUFAU, J. Enzyme supplementation of a barley and sunflower-based diet on laying hen performance. **Journal Applied Poultry Research**, v.4, p.32-40, 1995.
- INBARR, J.; GRAHAM, H.; NISSINEN, V. Selección, producción, estabilización y control de calidad de las enzimas alimentarias. In: SEMINÁRIO SOBRE EL EMPLEO DE ENZIMAS EN LA NUTRICIÓN ANIMAL, 1991, Madrid. *Anais...Madrid*: [s.n.], 1991. Pb.1-5.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1956.
- OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; CUNHA, F.; ROCHA, C.; BORGES, S.A. Adição de complexo enzimático e da granulometria da soja integral desativada sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.628-632, 2010.
- SILVEIRA, M.H.D.; USSO, J.T.Z.; ROSSI, P.; RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; ZAUK, N.F.; RIBEIRO, C.L.G.; BRUM, P.A.R.; NUNES, J.K. Efeito da peletização em dietas contendo complexo enzimático para frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.2, p.326-333, 2010.
- SPRING P., NEWMAN K.E., WENK V., MESSIKOMMER R., VUKICVRANJES M. Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. **Poultry Science**, v.75, p.357-361, 1996.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG**: sistemas para análises estatísticas e genéticas: versão 9.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2004.
- BEDFORD, M. R. The effect of enzymes on digestion. **Journal Applied Poultry Research**, v.5, n.4, p.370-378, 1996

BRENES, A.; LÁZARO, R.; GARCIA, M. Utilización práctica de complejos enzimáticos en avicultura. In: CURSO DE ESPECIALIZACIÓN AVANCES EN NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL, 22., 1996, Madrid. *Anais... Madrid*: FEDNA, 1996. p.134-157.



## **Avaliação de níveis do complexo enzimático SSF (solid state fermentation) em rações peletizadas para tilápia do Nilo**

**RESUMO** - A inclusão de enzimas em rações para peixes pode ser uma alternativa para reduzir os fatores antinutricionais encontrada em ingredientes de origem vegetal e aumentar a disponibilidade de nutrientes. O efeito do complexo enzimático SSF sobre o desempenho e na disponibilização de sacarose e monossacarídeos no quimo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram avaliados. O estudo incluiu 360 peixes com peso médio variando entre  $70\text{g} \pm 4,43$  em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (0, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm de SSF) dispostas em seis repetições e 10 peixes por repetição. A cada 15 dias, uma tilápia de cada unidade experimental foi sacrificada para análise de carboidratos no quimo, com o uso de HPLC. Aos 60 dias do experimento foram avaliados: consumo de ração, peso inicial, peso final, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e sobrevivência. Houve efeito linear de acordo com o tratamento para peso final e ganho de peso. Para os outros parâmetros não foram observados efeitos. Quanto aos níveis de sacarose e de glicose no quimo foi observado efeito quadrático em função do tratamento, enquanto os níveis de frutose aumentaram linearmente. Conclui-se que a inclusão de 150 ppm do complexo enzimático SSF na ração melhora o desempenho da tilápia do Nilo e aumenta a disponibilidade de sacarose e monossacarídeos no quimo.

Palavras-chave: Aquicultura, enzimas, HPLC, nutrição de peixes, *Oreochromis niloticus*

## **Evaluation of enzyme complex SSF (solid state fermentation) levels in pelleted diets for Nile tilapia**

**ABSTRACT** - The inclusion of enzymes in diets for fish may be an alternative to reduce antinutritional factors found in ingredients of plant origin and increase the availability of nutrients. The effect of SSF enzyme complex on growth performance and the production of sucrose and monosaccharide's in the chyme of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* were evaluated. The study included 360 fish with average weight ranging between  $70\text{g} \pm 4.43$  in a completely randomized design with six dietary treatments (0, 50, 100, 150, 200 and 250 ppm) arranged in six replicates and 10 fish per replicate. Every 15 days, one tilapia of each experimental unit was sacrificed to carbohydrate analyses in the chyme, with the use of HPLC. At day 60 of the experiment the performance parameters were calculated. There was a linear effect according to treatment for weight gain and feed efficiency. There were not effects for other performance parameters. As to the levels of sucrose and glucose in the chyme, a quadratic effect was observed as a function of treatment, whereas fructose levels increased linearly. The authors concluded that the inclusion of the 150 ppm of enzyme complex SSF in diet improve the performance of Nile tilapia and increase the availability of sucrose and monosaccharides in the chyme.

Keywords: Aquaculture, enzymes, HPLC, fish nutrition, *Oreochromis niloticus*,

## Introdução

Atualmente, sabe-se que os avanços na nutrição de peixes estão associados à melhor eficiência de utilização dos nutrientes da dieta. No entanto, os alimentos de origem vegetal, normalmente, possuem fatores antinutricionais, o que pode acarretar resultados de desempenho não satisfatórios. Os grãos de cereais e de leguminosas normalmente possuem carboidratos de estrutura complexa que limitam a digestão do amido, da proteína e da gordura.

Devido a uma ampla gama de fatores antinutricionais em dietas à base de plantas, o uso de complexos enzimáticos é uma alternativa para melhorar a utilização dos nutrientes de ingredientes vegetais em peixes. Além de reduzir os custos de produção para melhorar a digestibilidade, reduz a carga de poluição dos dejetos, permitindo uma melhor sustentabilidade do sistema. Vários trabalhos científicos destacam os benefícios do uso de enzimas em dietas de animais (Conte et al., 2002; Li et al. (2004); Furuya et al. (2005); Murakami et al., 2007; Pascoal et al., 2008, Opalinski et al., 2010, Signor et al., 2010). Porém, os autores utilizam enzimas em rações experimentais a fim de avaliar o desempenho, não deixando muito claro qual foi o benefício exato do efeito enzimático.

Ao se utilizar enzimas em experimentos com alimentação *ad libitum*, o efeito das mesmas pode ser mascarado devido ao excesso de nutrientes disponíveis a partir da dieta. Desta forma, não se consegue visualizar o ganho de peso oriundo dos nutrientes da dieta do ganho de peso dos nutrientes fornecidos por ação enzimática. Problema semelhante pode ser observado quando se ajusta a alimentação em função do ganho de

biomassa do tratamento. Se o tratamento com uma enzima recebe mais dieta do que a testemunha, ele também sofre a influência do aumento da quantidade de alimentos.

Uma alternativa para observar os efeitos oriundos exclusivamente da ação enzimática é a utilização de uma taxa de alimentação controlada a nível sub-ótimo com apenas ajustes periódicos em função do tratamento testemunha, ou seja, os peixes recebem a mesma quantidade de alimento durante todo o período experimental. Mesmo os peixes com alguma resposta positiva ao tratamento enzimático sejam restritos para o crescimento em sua plenitude, é evidente que qualquer melhoria no desempenho deve-se à utilização de enzimas na dieta. Assim, elimina-se o efeito quantitativo da dieta do tratamento.

Entre as várias opções de coquetéis e complexos enzimáticos, um mecanismo alternativo denominado fermentação em estado sólido (solid state fermentation – SSF) permite a produção de enzimas por uma cultura de microorganismos em uma matriz sólida (Del Bianchi et al, 2001). O maior benefício deste aditivo é a sua combinação natural de enzimas (protease,  $\alpha$ -amilase, celulase, xilanase,  $\alpha$ -galactosidase, pectinases, fitase, endoglucanase, sacarase, e outros), que podem melhorar a digestibilidade dos ingredientes vegetais na dieta. Como resultado de uma composição equilibrada de enzimas, energia e nutrientes da dieta, tais como proteínas, aminoácidos, cálcio e fósforo, tornam-se mais disponível para o corpo do animal.

Diante disso, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos do complexo enzimático SSF sobre o desempenho da tilápia do Nilo e disponibilidade de sacarose, glicose e frutose gerada pelas carboidrases do complexo enzimático SSF encontrados no quimo dos peixes.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Peixes (Labnut) do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no período de agosto a novembro de 2009.

Foram utilizadas 360 tilápias do Nilo, linhagem tailandesa, com peso médio de  $70\text{g} \pm 4,43$ , distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos, seis repetições e dez peixes por aquário, que foi considerado a unidade experimental. O sistema de recirculação com temperatura controlada continha aquários de 130L, dotado de abastecimento individual de água e aeração. Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, oxigênio dissolvido, amônia e pH) foram monitorados semanalmente. Antes do início do experimento, os peixes passaram por um período de adaptação de uma semana.

Além das 36 unidades experimentais, um aquário a mais foi instalado no laboratório sob as mesmas condições das demais, a fim de se fazer o controle de crescimento. A função deste aquário foi acompanhar o desenvolvimento dos peixes e reajustar a taxa de alimentação dos tratamentos avaliados, evitando assim, problemas de amostragens e estresses. Utilizou-se uma taxa de alimentação sub-ótima de 15g/Kg da biomassa total, sendo as tilápias alimentadas com ração controle divididas em quatro refeições diárias (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00). A cada 15 dias, todos os peixes foram retirados e pesados individualmente, obtendo-se a média. Com isso, a taxa de alimentação foi reajustada conforme o aquário de controle de crescimento, sendo utilizado o ganho de peso quinzenal multiplicado por 90%, mantendo assim, o nível

sub-ótimo de arraçoamento. Com o ajuste do peso atual multiplicado pela taxa de alimentação, obteve-se a quantidade de ração oferecida por peixe.

No início do experimento, os peixes também foram alimentados a uma taxa de alimentação sub-ótima de 15g/Kg da biomassa média geral, distribuídas em quatro refeições. Porém, ao longo do experimento, a taxa de alimentação foi reajustada conforme o aquário de controle de crescimento.

Os tratamentos consistiram de uma ração controle e de outras rações contendo cinco níveis de inclusão do complexo enzimático SSF (50, 100, 150, 200 e 250 ppm). As rações experimentais foram isoprotéicas (32% PB) e isoenergéticas (3.000 kcal de ED/ kg), sendo os ingredientes moídos, pesados e misturados em saco plástico. Posteriormente, para os devidos tratamentos, o complexo enzimático SSF foi incorporado através de uma nova mistura. Esta mistura foi umedecida com água à 55°C e pelletizada em moedor de carne. Posteriormente, os péletes foram secos em estufa de ventilação forçada por 14 horas à 55°C. Todas as dietas foram encaminhadas para o Laboratório de Análises de Alimento do Departamento de Zootecnia (UFV) para avaliação da composição nutricional (Tabela 1).

Durante o decorrer do experimento, a cada 15 dias, uma tilápia de cada unidade experimental foi retirada após 50 minutos da terceira alimentação diária (14:00) e, imediatamente, colocada em banho de gelo para morte e paralisação das atividades digestórias, totalizando seis amostras de cada tratamento. Realizou-se incisão longitudinal ventral, com posterior isolamento da porção cranial do esôfago e da porção caudal do reto, por meio de ligaduras duplas, para evitar o extravasamento do quimo. Após o isolamento, o intestino médio e posterior foram removidos e acondicionados em frascos de polietileno. Este material foi liofilizado, moído e congelado a -80°C, sendo utilizado, posteriormente, para as análises de glicose, frutose e sacarose.

Tabela 1 – Composição das rações experimentais (matéria natural)  
 Table 1 – Percentage and chemical composition of the experimental diets (as fed)

Ingrediente (%) <i>Ingredients(%)</i>	Complexo enzimático SSF (ppm) <i>Enzyme complex SSF (ppm)</i>					
	0	50	100	150	200	250
Farelo de soja (Soybean meal)	458,0	458,0	458,0	458,0	458,0	458,0
Milho moído (Corn meal)	350,9	350,9	350,9	350,9	350,9	350,9
Farelo de Glúten (Corn glúten)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Farelo de trigo (Wheat meal)	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Fosfatobicálcico (Dicalcium phosphate)	27,4	27,4	27,4	27,4	27,4	27,4
Calcário calcítico (Limestone)	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35
Óleo de soja (Soya oil)	29,4	29,4	29,4	29,4	29,4	29,4
Suplemento vitamínico <sup>1</sup> (Vitaminic premix) <sup>1</sup>	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Suplemento mineral <sup>1</sup> (Mineral premix) <sup>1</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Vitamina C (Vitamin C)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal comum (Salt)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Complexo enzimático SSF <sup>(4)</sup> (SSF)	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Inerte (Caulin) (Inert)	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0
BHT (Antioxidante) (Antioxidant)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>Composição Analisada<sup>(2)</sup> e Calculada<sup>(3)</sup></b> <i>(Analysed<sup>(2)</sup> and calculated<sup>(3)</sup> composition)</i>						
Matéria seca (%) <sup>(2)</sup> Dry matter (%)	94,39	94,26	94,10	94,12	94,18	94,11
Proteína bruta (%) <sup>(2)</sup> Crude protein (%)	32,05	32,08	32,01	32,00	32,00	30,05
Energia bruta (Kcal/Kg) <sup>(2)</sup> Crude energy (Kcal/Kg) <sup>(2)</sup>	4539	4563	4540	4545	4540	4554
Energia digestível (Kcal/Kg) <sup>(3)</sup> Digestible energy (Kcal/Kg) <sup>(3)</sup>	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Fibra bruta (%) <sup>(3)</sup> Crude fiber (%) <sup>(3)</sup>	3,37	3,37	3,37	3,37	3,37	3,37
Extrato etéreo (%) <sup>(2)</sup> Etereo extract (%) <sup>(2)</sup>	5,36	5,26	5,26	5,39	5,33	5,46
Cálcio total (%) <sup>(2)</sup> Total calcium (%) <sup>(2)</sup>	0,94	0,91	0,92	0,92	0,93	0,91
Fósforo total (%) <sup>(2)</sup> Total phosphorus (%) <sup>(2)</sup>	0,93	0,91	0,90	0,92	0,92	0,91
Cinzas (%) <sup>(2)</sup> Ash (%) <sup>(2)</sup>	6,26	6,34	6,23	6,30	6,25	6,32
Lisina total (%) <sup>(3)</sup> Total lysine (%) <sup>(3)</sup>	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47
Ácido linoleico (%) <sup>(3)</sup> Linoleic acid (%) <sup>(3)</sup>	2,74	2,74	2,74	2,74	2,74	2,74

<sup>(1)</sup> Composição por quilograma do produto (*Composition per kilogram of product*): 1.200.000 UI de Vitamina A<sub>3</sub>; 200.000 UI de Vitamina D<sub>3</sub>; 1.200 mg de Vitamina E; 2.400 mg de Vitamina K<sub>3</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>1</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>2</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>6</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>12</sub>; 48 g de Vitamina C<sub>3</sub>; 1200 mg de ácido fólico (*folic acid*); 12.000 mg de pantotenato de Ca (*panthothenic acid*); 48 mg de biotina (*biotin*); 108 g de cloreto de colina (*cholin*); 24.000 mg de niacina (*niacin*); 50.000 mg de Fe; 3.000 mg de Cu; 20.000 mg de Mn; 30.000 mg de Zn; 100 mg de I; 10 mg de Co; 100 mg de Se. <sup>(2)</sup>Valores estimados com base nos coeficientes de digestibilidade dos ingredientes segundo Rostagno et al. (2005). <sup>(3)</sup>Estimated values based on the coefficients of ingredient digestibility according to Rostagno et al., (2005)

<sup>(4)</sup> Allzyme<sup>®</sup>SSF, Alltech Inc.

Aos 60 dias do experimento foram avaliados os seguintes índices zootécnicos: consumo de ração (g), ganho de peso (g), conversão alimentar (g/g), taxa de crescimento específico (%/dia) e sobrevivência (%).

As amostras liofilizadas foram levadas para o Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) para avaliação do nível de sacarose, glicose e frutose. Cada amostra foi desengordurada pelo Método Soxhlet. Com as amostras desengorduradas, açúcares solúveis individuais foram quantificados por HPLC (Shimadzu series 10A chromatography; column module CTO-10A; RI Detector RID-6A; Windows® software LC-10 version 2.2). Para isso foi utilizado uma supelcosil™ LC-NH<sub>2</sub>, que separa açúcares por tamanho molecular em um fluxo de 0,7mL/min, sendo a fase móvel formada pela mistura de acetronitrila-água (80:20 v/v) à 35°C (Guimarães et al., 2001).

A análise estatística das variáveis de desempenho e disponibilidade de carboidratos foram realizadas por análise de variância e de regressão através do programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (Universidade Federal de Viçosa, 2006). Modelos lineares ou quadráticos de cada parâmetro em função do complexo enzimático SSF foram testados e a escolha da melhor equação foi dada pelo maior coeficiente de determinação ( $r^2$ ), para a significância dos coeficientes de regressão pelo teste t a 0,05 de probabilidade e para sua adequação biológica.

## **Resultados e Discussão**

Os resultados de qualidade de água e de desempenho de tilápias do Nilo se encontram nas tabelas 2 e 3, respectivamente. O sistema de recirculação manteve a qualidade da água em níveis aceitáveis, conforme Boyd (1982), Piper et al. (1982) e Kubitzka (2000).



Tabela 2- Parâmetros físicos e químicos da água  
 Table 2- Parameters physic and chemistry of the water

Variáveis Físicos e Químicos <i>Physic and chemistry variables</i>		CV (%)
Temperatura (°C) <i>Temperature (°C)</i>	27,96	0,67
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ) <i>Dissolved oxygen (mg L<sup>-1</sup>)</i>	5,59	3,31
pH <i>pH</i>	6,40	3,41
Amônia total (ppm) <i>Total ammonia</i>	2,00	1,86
Amônia tóxica (ppm) <i>Toxic ammonia</i>	0,006	1,86

Tabela 3- Desempenho de tilápias do Nilo submetidas a rações contendo o complexo enzimático SSF

Table 3- Performance of Nile tilapia submitted the diets contained enzyme complex SSF

Parâmetros <i>Parameters</i>	Níveis de inclusão de SSF (ppm) <i>Levels of inclusion of SSF (ppm)</i>						CV (%)
	0	50	100	150	200	250	
Consumo de ração (g) <i>Feed intake (g)</i>	83,76	83,76	83,76	83,76	83,76	83,76	-
Peso Inicial (g) <i>Initial weight (g)</i>	70,42	70,85	69,87	69,52	71,62	71,50	6,668
Peso Final (g) <sup>1</sup> <i>Final weight (g)</i>	138,72	139,75	140,08	145,81	144,70	147,15	4,790
Ganho de Peso (g) <sup>2</sup> <i>Weight gain (g)</i>	68,30	68,90	70,21	76,30	73,06	75,65	10,066
Conversão Alimentar (g/g) <i>Feed conversion (g/g)</i>	1,23	1,22	1,20	1,11	1,16	1,14	10,053
T CE (%/dia) <i>SGR (%/dia)</i>	1,13	1,13	1,16	1,24	1,17	1,20	10,246
Sobrevivência (%) <i>Survival(%)</i>	98,3	100	100	96,7	96,7	100	4,342

<sup>1</sup>Efeito linear *Linear effect* (p<0,05): Y= 136,43 + 1,79213X; R<sup>2</sup>= 0,87

<sup>2</sup>Efeito linear *Linear effect* (p<0,05): Y= 66,5409 + 1,58023X; R<sup>2</sup>= 0,74

Não se observou variação (p>0,05) no consumo de ração entre os níveis do complexo enzimático estudados. Este resultado pode ser justificado pelo fato do fornecimento de ração ter sido quantitativamente igual para todos os tratamentos e de forma restrita. Os peixes ingeriram toda a dieta, ou seja, não foram observadas sobras de alimento.

Os níveis do complexo enzimático SSF influenciaram o ganho de peso dos peixes que aumentou (p<0,05) de forma linear segundo a equação: Y= 66,5409 +

1,58023X. Apesar do ganho de peso ter variado de forma linear, foi constatado que a partir do nível de 150 ppm do complexo enzimático SSF, não ocorreu aumento no valor absoluto deste parâmetro, indicando que este corresponderia ao nível de máxima eficiência destas enzimas. A melhora observada na taxa de crescimento dos peixes estaria relacionada à possível maior biodisponibilização de nutrientes promovida pela ação enzimática do complexo enzimático SSF. Efeito positivo da inclusão das enzimas amilase e lipase e da enzima pancreática suína sobre o ganho de peso de tambaquis e de pacus foram verificados, respectivamente, por Nunes et al. (2006) e por Tesser et al. (2006).

Não se observou efeito ( $p>0,05$ ) dos níveis do complexo enzimático SSF na conversão alimentar. Embora a conversão alimentar dos peixes não tenha variado significativamente entre os tratamentos, foi observado melhora gradativa de até 10,81% no valor absoluto da conversão alimentar até o nível de 150 ppm do complexo enzimático SSF.

Em um estudo conduzido com tilápias do Nilo, Signor et al. (2010) observaram que a inclusão de um complexo enzimático (amilase, protease, celulase, lipase, pectinase, xilanase,  $\alpha$ -glucanase e fitase) na dieta não interferiu no ganho de peso e carcaça, mas melhorou a conversão e eficiência alimentar de 1,50 e 0,67 para 1,26 e 0,80, respectivamente. Em pirarucu (*Arapaima gigas*), Cavero (2004) observou que a adição de protease e lipase na ração melhoraram os índices zootécnicos, ao contrário da amilase, que não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento controle. Em juvenis de tucunaré paca (*Cichla temensis*), Soares et al. (2008) também verificaram que a inclusão de protease exógena melhora os índices de conversão alimentar, ganho de peso e crescimento específico.

Não ocorreram variações ( $p>0,05$ ) no crescimento específico e nem na sobrevivência das tilápias entre os diferentes níveis de inclusão do Complexo enzimático SSF.

Os dados de disponibilidade de sacarose, glicose e frutose se encontram na Tabela 4.

Foi verificado efeito quadrático para a sacarose ( $p<0,05$ ) em função dos tratamentos. Este ocorrido indica atividade da  $\alpha$ -galactosidase nos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose presentes na ração, pois houve aumento considerável do seu produto no quimo, a sacarose. Este fato é benéfico, pois os oligossacarídeos são fatores antinutricionais que interferem negativamente no desempenho dos animais. De acordo com Coon et al. (1990), os oligossacarídeos da família dos  $\alpha$ -galactosídeos reduzem a energia da dieta, da digestão de fibras e do tempo de trânsito gastrointestinal. Além disso, a sua fermentação a nível intestinal promove aumento na produção de gases, causando desconforto ao animal.

Em um trabalho com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Farhangi & Carter (2007) verificaram que os peixes alimentados com dietas à base de tremoços sem casca (*Lupinus angustifolius*) suplementada com  $\alpha$ -galactosidase, melhoraram significativamente o ganho de peso, a eficiência protéica e a digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta.

Quanto aos níveis de glicose também foi observado efeito quadrático ( $p<0,05$ ) de acordo com os níveis de inclusão do complexo enzimático SSF na ração. A inclusão de 150 ppm deste aditivo aumentou o nível de glicose disponível no quimo em 9,57% em relação ao tratamento controle, o que pode ser atribuído a ação conjunta das carboidrases.

Tabela 4. Níveis de sacarose, de glicose e de frutose por grama de quimo seco de tilápias do Nilo alimentadas com rações contendo o complexo enzimático SSF

Table 4. Saccharose, glucose and fructose levels per gram of dry chime of Nile tilapia fed with diets contained the enzyme complex SSF

Carboidratos <i>Carbohydrates</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	Tratamentos (ppm) <i>Treatments (ppm)</i>				CV (%)
	0	100	150	200	
Sacarose <sup>1</sup> <i>Saccharose</i>	3,0465	3,7886	3,7891	3,3492	8,217
Glicose <sup>2</sup> <i>Glucose</i>	1,5576	1,6207	1,7066	1,6451	3,873
Frutose <sup>3</sup> <i>Fructose</i>	1,0423	1,0758	1,0927	1,0895	7,120

<sup>1</sup>Efeito quadrático *Quadratic effect* (p<0,05):  $Y = 3,041 + 0,01396X - 0,0000617X^2$ ;  $R^2 = 0,99$

<sup>2</sup>Efeito quadrático *Quadratic effect* (p<0,05):  $Y = 1,553 + 0,001425X - 0,000004439X^2$ ;  $R^2 = 0,76$

<sup>3</sup>Efeito linear *Linear effect* (p<0,05):  $Y = 1,0463 + 0,000256X$ ;  $R^2 = 0,90$

Simultaneamente aos níveis de glicose, a frutose aumentou de forma linear (p<0,05), o que é um forte indicativo da ação da sacarase. Com isso, os níveis de sacarose podem ser maiores do que os mensurados, pois parte desta presente nos ingredientes e do produto da ação da  $\alpha$ -galactosidase do complexo enzimático SSF nos oligossacarídeos podem ter sido hidrolisados por esta enzima.

Além disso, ressalta-se ainda que estes níveis podem ainda estar subestimados, pois, normalmente, quando se aumenta os níveis destes substratos, há um aumento na velocidade de absorção. Isto foi verificado por Stokes & Fromm (1964) em um trabalho com truta arco-íris, onde observaram aumento na absorção e transporte de glicose em temperaturas e concentrações de glicose mais elevadas.

Outro fator a ser considerado, é que com o melhor aproveitamento da glicose e frutose como fonte energética, a proteína pôde ser poupada para a função estrutural, ou seja, desenvolvimento dos tecidos. Isto pode ser confirmado pelos resultados obtidos nesse estudo, pois, os peixes que apresentaram o maior nível destes monossacarídeos no quimo foram os mesmos que obtiveram melhor desempenho. Este melhor aproveitamento energético com a inclusão do complexo enzimático SSF na dieta, além

de melhorar o desempenho dos animais, também pode ser uma alternativa para reduzir a excreção pela maior eficiência alimentar ou ainda diminuir o óleo da sua composição.

### **Conclusão**

A inclusão de 150 ppm do complexo enzimático SSF em rações peletizadas melhora o desempenho de tilápias do Nilo em função da maior biodisponibilidade de nutrientes.

## Literatura Citada

- BOYD, C.E. **Water quality management for pond fish culture**: developments in aquaculture and fisheries science. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1982. 318p.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.
- CAVERO, B.A.S. Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) (Cuvier, 1829). Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2004. 75p. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2004.
- CONTE, A.J.; TEIXEIRA, A.S.; BERTECHINI, A. G.; FIALHO, E.T.; MUNIZ, J.A. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, v.26, n.6, p.1289-1296, 2002.
- COON, C.N.; LESKE, K.L.; AKAVANISHAN, O., CHENG, T.K. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adults roosters. **Poultry Science**, v.69, p.787-793, 1990.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coords). **Biotecnologia industrial**. v.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, 541p.
- FARHANGI, MEHRDAD; CARTER, CHRIS G. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.38, n.12, p.1274-1282, 2007.
- FURUYA, W.M.; SANTOS, V.G.; BOTARO, D.; HAYASHI, C.; SILVA, L.C.R. Níveis de proteína e fitase em rações de terminação para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.8, n.1, p.11-17, 2005.
- GUIMARÃES, V.M., DE REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G., FELIX, C.R. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.
- HIMOWITZ, T.; COLLINS, F.I.; PANCSNER, J.; WALKER, W.M. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. **Journal of Agriculture Science**, v.64, p.613-616, 1972.
- KAWAWURA, S. Quantitative paper chromatography of the sugars of the cotyledon, hull, and hypocotyl of soybeans of selected varieties. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture**, v.15, p.117-131, 1967.

- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2000. 289p.
- LI, S., SAUER, W.C., HAUANG, S.X., *et al.* Effect of  $\beta$ -glucanase supplementation to hulls barley- or wheat-soybean meal diets on the digestibilities of energy, protein,  $\beta$ -glucans, and amino acids in young pigs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1649-1656. 1996.
- MURAKAMI, A. E.; FERNANDES, J.I.M.; SAKAMOTO, M. I.; SOUZA, L.M.G.; FURLAN, A.C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Science Animal Science**, v.29, n.2, p.165-172, 2007.
- NUNES, E.S.S., et al. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.
- OGUNKOYA, A. E.; PAGE, G. I.; ADEWOLU, M. A.; BUREAU, D. P. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 2005.
- OLIVEIRA, K. et al. Trânsito gastrintestinal e digestibilidade aparente de nutrientes em equinos alimentados com dietas contendo grãos secos ou silagem de grãos úmidos de triticale. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1799-1808, 2007b.
- OTT, R.P. Utilização de carboidrases para frango de corte. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. 65p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- PASCOAL, L.A.F.; SILVA, L.P.G.; MIRANDA, E.; MARTINS, T.D.D.; THOMAZ, M.C.; LAMENHA, M.I.A.; ALMEIDA, D.H. Complexo enzimático em dietas simples sobre os parâmetros séricos e a morfologia intestinal de leitões. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p. 117-129, jan/mar, 2008.
- PIPER, R.G.; McELWAIN, I.B.; ORME, L.E. **Fish hatchery management**. Washington: U.S. Department of Interior, 1982, 517p.
- ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 141p.
- SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G.G.; FREITAS, J.M.A. Desempenho de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.977-983, 2010.
- SOARES, C.S.; FILHO, M.P.; ROUBACH, R., SILVA, R.C.S. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla sp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.971-976, 2008.

- STOKES, R.M.; FROMM, P.O. Glucose absorption and metabolism by the gut of rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.13, p.53-62, 1964.
- STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v.34, n.2, p.109-121, 2003.
- TESSER, M.B.; FLORES-QUINTANA, C.I.; CARNEIRO, D.J.; JÚNIOR, J.M. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.35, n.6, p.2211-2218, 2006.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistemas para análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.2. Viçosa, MG: 2006. (CD-ROM).



## **Digestibilidade aparente de nutrientes e de energia bruta em rações contendo o complexo enzimático SSF para tilápias do Nilo**

**RESUMO** – Os efeitos do complexo enzimático SSF sobre a digestibilidade de nutrientes e de energia bruta em rações para tilápia do Nilo foram avaliadas. As rações experimentais foram isoprotéicas (30% PB) e isoenergéticas (3.000 kcal de ED/ kg), sendo adicionado o complexo enzimático SSF nos níveis de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm. A digestibilidade aparente foi medida pelo método indireto usando óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) como indicador de digestibilidade. Foram distribuídos 72 machos de tilápia do Nilo com peso médio de  $204,30 \pm 17,2$  g em seis cubas adaptadas para ensaio de digestibilidade. Cada cuba recebeu um tratamento e as coletas das fezes foram realizadas durante a noite (19:00, 11:00, 02:00 e 05:00). O estudo foi realizado durante nove dias, com seis tratamentos e 3 repetições. A adição de complexo enzimático na dieta melhorou o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, energia bruta, cálcio e fósforo. Entre os níveis testados, 250 ppm do complexo enzimático SSF dieta representa os valores mais expressivos de digestibilidade.

Palavras-chave: aquicultura, enzimologia, enzimas exógenas, nutrição animal, *Oreochromis niloticus*

## **Apparent digestibility of nutrients and gross energy in diets containing the enzyme complex SSF for Nile tilapia**

**ABSTRACT** - The effects of enzyme complex SSF on the digestibility of nutrients and gross energy in diets for Nile tilapia were evaluated. The experimental diets were isoprotein (30% CP), isoenergy (3.000 kcal/kg of GE) and supplemented with enzyme complex SSF at the levels of 0, 50, 100, 150, 200 and 250 ppm. The apparent digestibility was measured by the indirect method using chrome oxide (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) as an indicator of digestibility. A total of 72 male Nile tilapia (204.30 ± 17.2 g) were randomly allotted to six hatcheries adapted for the digestibility trial. Each hatchery got a treatment and the collect of the faeces were done during the night (7pm, 11pm, 2am and 5am). The trial was conducted during nine days, with six treatments and three replicates. The addition of enzyme complex in the diet improved the apparent digestibility coefficient of dry matter, crude protein, gross energy, calcium and phosphorus. Among the tested levels, 250 ppm of enzyme complex SSF provided the most expressive values.

Keywords: aquaculture, animal nutrition, exogenous enzymes, enzymology, *Oreochromis niloticus*

## Introdução

A piscicultura é uma das atividades agropecuárias que mais cresce no mundo. Com a redução dos estoques pesqueiros naturais e aumento da demanda por parte dos consumidores, o setor recebeu um forte estímulo para o seu crescimento. Desta forma, a produção de pescados se intensificou impulsionado pelo conhecimento mais minucioso das espécies e melhora nutricional e de manejo.

Dentre as várias espécies, a tilápia do Nilo vem se destacando na aqüicultura mundial, pois apresenta crescimento rápido, rusticidade, capacidade de adaptar-se em diferentes condições climáticas, carne de ótima qualidade, e por não apresentarem espinhos na forma de "Y" no seu filé. Além disso, pesquisas têm demonstrado que esta espécie tolera altos níveis de carboidratos, o que favorece a utilização de fontes protéicas oriundas de vegetais, substitutos alternativos à farinha de peixe (Furuya et al., 2000; Boscolo et al., 2002a; Boscolo et al., 2002b; Stone et al., 2003; Furuya et al., 2005).

Atualmente, sabe-se que os avanços na nutrição de peixes estão associados à melhor eficiência de utilização dos nutrientes da dieta. No entanto, os grãos de cereais e de leguminosas normalmente possuem carboidratos de estrutura complexa que limitam a digestão do amido, proteína e gordura. Além disso, o ácido fítico está também presente nestes ingredientes, o qual é um forte quelante de minerais essenciais como o cálcio, magnésio, ferro e zinco, o que pode acarretar deficiências. Com isso, a inclusão de enzimas nas formulações de dietas pode ser uma alternativa para melhorar a disponibilidade e, conseqüentemente, a digestibilidade de nutrientes e energia.

Diante das alternativas de complexos enzimáticos, o “solid state fermentation (SSF)” parece se destacar pela suas características qualitativas. Com a vantagem de ser

um produto natural, possui em sua composição enzimas capazes de degradar os mais variados fatores antinutricionais, além de complementar as enzimas produzidas endogenamente.

Diante do exposto, objetivou-se estudar os efeitos da inclusão do complexo enzimático SSF sobre a digestibilidade de nutrientes e de energia em tilápias do Nilo.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Peixes (LABNUT) do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Foram utilizadas 72 tilápias do Nilo, linhagem tailandesa, com peso médio de  $204,3 \pm 17,2$ , distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos, sendo destinada uma cuba de digestibilidade com 12 peixes para cada. O sistema de recirculação com temperatura controlada continha cubas de 130L, dotado de abastecimento individual de água e aeração. Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura, oxigênio dissolvido, amônia e pH) foram monitorados três vezes durante o período experimental.

As tilápias do Nilo foram alimentadas com rações contendo 0, 50, 100, 150, 200 e 250 ppm de complexo enzimático SSF, conforme Tabela 1. Antes do início do experimento, os peixes passaram por um período de adaptação de três dias. Os peixes foram alimentados a uma taxa de alimentação sub-ótima de 1,5% da biomassa total de cada cuba, distribuídas em 4 refeições (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00).

Tabela 1. Composição das rações experimentais (matéria natural)

Table 1. Composition of experimental diet (natural matter)

Ingredientes (g/Kg) <i>Ingredients (g/Kg)</i>	Níveis de SSF (ppm) <sup>(1)</sup> <i>Levels of SSF (ppm)</i>					
	0	50	100	150	200	250
Farelo de soja <i>Soya meal</i>	455,8	455,8	455,8	455,8	455,8	455,8
Milho <i>Corn grain</i>	350,0	350,0	350,0	350,0	350,0	350,0
Glúten de milho <i>Glúten meal 60</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Farelo de trigo <i>Wheat meal</i>	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Fosfato bicálcico <i>Dicalcium phosphate</i>	27,4	27,4	27,4	27,4	27,4	27,4
Calcário calcítico <i>Calcitic lime</i>	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35
Óleo de soja <i>Soya oil</i>	29,4	29,4	29,4	29,4	29,4	29,4
Suplemento vitamínico <sup>(1)</sup> <i>Vitaminic premix</i>	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Suplemento mineral <sup>(1)</sup> <i>Mineral premix</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Vitamina C <i>Vitamin C</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal <i>Salt</i>	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
Complexo enzimático SSF <sup>(2)</sup> <i>Complexo enzimático SSF</i>	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Inerte (Caulin) <i>Inert</i>	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0
BHT <i>BHT</i>	0,2	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Óxido de cromo III <i>Chrome oxide III</i>	5,0	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Composição analisada <sup>(3)</sup> e calculada <sup>(4)</sup> <i>Analysed and calculated composition</i>						
Matéria seca (%) <sup>(3)</sup> <i>Dry matter</i>	89,91	89,93	88,98	89,53	90,01	89,94
Proteína bruta (%) <sup>(3)</sup> <i>Crude protein</i>	31,41	31,55	31,39	31,46	31,29	31,43
Energia bruta (Kcal/Kg) <sup>(3)</sup> <i>Crude energy</i>	4549	4561	4538	4550	4560	4546
Energia digestível (Kcal/Kg) <sup>(2)</sup> <i>Digestible energy</i>	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Fibra bruta (%) <sup>(4)</sup> <i>Crude fiber</i>	3,37	3,37	3,37	3,37	3,37	3,37
Extrato etéreo (%) <sup>(3)</sup> <i>Ether extract</i>	5,26	5,29	5,36	5,26	5,19	5,23
Cálcio total (%) <sup>(3)</sup> <i>Calcium total</i>	0,94	0,91	0,90	0,91	0,95	0,92
Fósforo total (%) <sup>(3)</sup> <i>Total phosphorus</i>	0,95	0,93	0,96	0,93	0,94	0,93
Lisina total (%) <sup>(4)</sup> <i>Lysine total</i>	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47	1,47

Ácido linoleico (%) <sup>(4)</sup>	2,74	2,74	2,74	2,74	2,74	2,74
<i>Linoleic acid</i>						

<sup>(1)</sup> Composição por quilograma do produto (*Composition per kilogram of product*): 1.200.000 UI de Vitamina A<sub>3</sub>; 200.000 UI de Vitamina D<sub>3</sub>; 1.200 mg de Vitamina E; 2.400 mg de Vitamina K<sub>3</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>1</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>2</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>6</sub>; 4.800 mg de Vitamina B<sub>12</sub>; 48 g de Vitamina C<sub>3</sub>; 1200 mg de ácido fólico (*folic acid*); 12.000 mg de pantotenato de Ca (*panthotenic acid*); 48 mg de biotina (*biotin*); 108 g de cloreto de colina (*cholin*); 24.000 mg de niacina (*niacin*); 50.000 mg de Fe; 3.000 mg de Cu; 20.000 mg de Mn; 30.000 mg de Zn; 100 mg de I; 10 mg de Co; 100 mg de Se. <sup>(2)</sup>Valores estimados com base nos coeficientes de digestibilidade dos ingredientes segundo Rostagno et al. (2005). <sup>(2)</sup>*Estimated values based on the coefficients of digestibility of ingredient amino acids, phosphorus according to Rostagno et al., (2005)*

<sup>(2)</sup> Allzyme SSF - Níveis mínimos de garantia de atividade enzimática: α-amilase, 30 UA/g; β-glucanase, 200 UI/g; celulase, 40 UI/g; protease fungal, 700 UI/g; pectinase, 4000 UI/g; fitase, 300 UI/g; xilanase, 100 UI/g. Minimum levels of guarantee of enzyme activity: α-amylase, 30 UA/g; β-glucanase, 200 UI/g; cellulase, 40 UI/g; pectinase, 4000 UI/g; xylanase, 100 UI/g

As rações experimentais foram isoprotéicas (30% PB) e isoenergéticas (3.000 kcal de ED/ kg), sendo os ingredientes moídos, pesados e misturados em saco plástico. Posteriormente, para os devidos tratamentos, o complexo enzimático SSF foi incorporado através de uma nova mistura. Esta mistura foi umedecida com água à 55°C e peletizada em moedor de carne. Posteriormente, os péletes foram secos em estufa de ventilação forçada por 14 horas à 55°C.

Diariamente, 30 minutos após a última alimentação, cada cuba foi criteriosamente limpa, sendo removidas as fezes e as possíveis sobras de ração presentes naquele momento. Além disso, 40% da água de cada cuba foram renovadas com o intuito de auxiliar na limpeza. Com a cuba limpa, deu-se início ao período de coleta de fezes que foram realizados nos horários de 19:00, 23:00, 3:00 e 7:00. Durante nove dias, as fezes foram coletadas. Porém, devido à quantidade de fezes obtidas diariamente e visando as análises de nutrientes e energia, optou-se por formar um “pool” de amostras de três dias, em um total de três repetições.

O formato de funil das cubas possibilitou a coleta das amostras por gravidade, ou seja, as fezes foram encaminhadas para garrafas adaptadas na base da estrutura. Estas garrafas foram apoiadas em caixas térmicas com gelo, a fim de inibir a atividade enzimática e microbial do quimo. Nos horários estipulados acima, as garrafas foram removidas do sistema e encaminhadas para geladeira a 4°C, sendo substituídas por

outras. Pela manhã, após a última coleta, grande parte da água presente nas garrafas foi retirada e as fezes de cada tratamento foram estocadas em um mesmo recipiente por três dias de coleta, sendo diariamente congeladas em freezer a -16°C.

Ao final do experimento, todas as amostras foram liofilizadas, moídas e encaminhadas para o Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Zootecnia da UFV. Avaliou-se

matéria seca, proteína bruta, energia bruta, extrato etéreo, cálcio e fósforo. Os coeficientes de digestibilidade aparente foram obtidos, empregando-se o método indireto, com o marcador óxido de crômio-III, de acordo com a metodologia descrita por Austreng (1978). A determinação da concentração do óxido crômico foi realizada pelo método da absorção atômica (Willians et al., 1962) e o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) calculado segundo Nose (1966).

$$\text{CDA (\%)} = [100 - 100 \cdot (\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ dieta} \cdot \% \text{nutrientes fezes})] / [\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ fezes} \% \text{nutrientes dieta}]$$

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (Universidade Federal de Viçosa, 2006). Os dados foram interpretados por meio de análises de regressão em nível de 5% de probabilidade, sendo os efeitos dos níveis do complexo enzimático SSF analisados mediante o uso dos modelos de regressão linear, quadrático ou descontínuo Linear Response Plateau (LRP) conforme o melhor ajustamento obtido para cada variável e com base no fenômeno em estudo.

## Resultados e Discussão

O sistema de abastecimento de água e de aeração manteve a temperatura e a aeração uniformes durante o período experimental. Foram obtidos os valores de  $27,6 \pm 0,30^{\circ}\text{C}$  para temperatura da água,  $6,4 \pm 0,26$  para o pH,  $6,63 \pm 0,18$  ppm para o oxigênio dissolvido e de  $2,25 \times 10^{-3}$  para amônia tóxica. Todos os níveis avaliados estão dentro das faixas recomendadas por Boyd (1982), Piper et al. (1982) e Kubitzka (2000).

Os resultados médios dos parâmetros de digestibilidade estão apresentados na Tabela 2 e 3.

O consumo de ração foi igual para todos os tratamentos conforme a metodologia proposta, sendo que não foi observado sobras de ração.

Foi observado efeito linear ( $p < 0,05$ ) para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca em função dos níveis de inclusão do complexo enzimático SSF na ração. Houve melhora de 22,63% quando se utilizou o nível mais alto do complexo enzimático SSF em relação ao tratamento controle. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Tashibana et al. (2010) que verificaram melhora de 9,12% no coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca ao adicionar 300 g de um complexo enzimático formado por  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilanase em rações à base de triticales para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Para o coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta e da proteína bruta houve efeito linear ( $p < 0,05$ ) com o incremento dos níveis de inclusão do complexo enzimático SSF. As carboidrases e as proteases presentes neste aditivo biodisponibilizaram mais energia e aminoácidos, respectivamente, mostrando que é possível aumentar a eficiência alimentar, ou seja, melhorar o aproveitamento alimentar reduzindo a excreção com a inclusão deste complexo enzimático.



Tabela 2. Níveis do complexo enzimático SSF e digestibilidade dos nutrientes e da energia bruta de rações em tilápias do Nilo

Table 2. Enzyme complex SSF levels and digestibility of nutrients and gross energy of diets with Nile tilapias

Parâmetros (g/g) <i>Parameters(g/g)</i>	Níveis de inclusão de SSF (ppm) <i>Levels of inclusion of SSF(ppm)</i>						CV (%)
	0	50	100	150	200	250	
Matéria seca <sup>1</sup> <i>Dry matter<sup>1</sup></i>	0,5170	0,5282	0,5615	0,6038	0,6174	0,6340	3,221
Energia bruta <sup>1</sup> <i>Gross energy<sup>1</sup></i>	0,5612	0,5763	0,5852	0,6440	0,6672	0,6681	3,138
Proteína bruta <sup>1</sup> <i>Crude protein<sup>1</sup></i>	0,5372	0,5427	0,5787	0,6083	0,6168	0,6306	2,068
Extrato etéreo <i>Etereo extract</i>	0,9712	0,9765	0,9616	0,9701	0,9513	0,9614	2,035
Cálcio (%) <sup>1</sup> <i>Calcium<sup>1</sup></i>	0,8976	0,8991	0,8999	0,9247	0,9254	0,9267	1,532
Fósforo (%) <sup>2</sup> <i>Phosphorus<sup>2</sup></i>	0,8239	0,8315	0,8397	0,8765	0,8714	0,8771	0,965

<sup>1</sup>Efeito linear

<sup>2</sup>Linear Response Plateau (LRP)

Tabela 3. Equações ajustadas para as variáveis de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia bruta

Parâmetros <i>Parameters</i>	Modelo <i>Model</i>	Equação <i>Equation</i>	r <sup>2</sup>
Matéria seca <i>Dry matter</i>	Linear	Y = 0,487202 + 0,0256962X	0,97
Energia bruta <i>Gross energy</i>	Linear	Y = 0,530511 + 0,0246952X	0,92
Proteína bruta <i>Crude protein</i>	Linear	Y = 0,513071 + 0,0208257X	0,96
Cálcio <i>Calcium</i>	Linear	Y = 0,887033 + 0,00717619X	0,82
Fósforo <i>Phosphorus</i>	LRP	Y = 0,8169 + 0,00669999X	0,87

Em outro estudo conduzido com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Guimarães et al. (2009) observaram que os tratamentos que continham 0,3 e 0,4g de complexo enzimático (lipase, protease e carboidrase) / Kg proporcionaram melhora significativa da digestibilidade aparente de proteína bruta, energia bruta e carboidratos. Também foi verificado por Oliveira et al. (2007) que a digestibilidade aparente da

proteína bruta aumentou de 52,04% para 64,91% ao adicionar 50g / Kg de um complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase à ração de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Estes autores também observaram que para este mesmo nível de inclusão houve melhora na digestibilidade aparente da matéria seca e energia bruta.

Ao estudarem a incorporação de farelo de soja e um complexo enzimático composto por xilanase, amilase, celulase, protease e  $\beta$ -glucanase na ração de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Ogunkoya et al. (2005) observaram efeito positivo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, fósforo e energia. Em outro trabalho com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Farhangi & Carter (2007) verificaram que os peixes alimentados com dietas à base de tremoços sem casca (*Lupinus angustifolius*) suplementada com  $\alpha$ -galactosidase, melhoraram significativamente a eficiência protéica e a digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta.

Não foi observado efeito linear ( $p > 0,05$ ) para o coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo com o aumento dos níveis de inclusão do complexo enzimático SSF. Este resultado não corrobora com os observados por Guimarães et al. (2009) e Ogunkoya et al. (2005), que verificaram aumento na digestibilidade aparente do extrato etéreo ao adicionarem complexo enzimático às rações de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), respectivamente.

Quanto ao coeficiente de digestibilidade aparente do cálcio e do fósforo também foi verificado efeito linear ( $p < 0,05$ ) com o aumento dos níveis do complexo enzimático SSF na ração. Porém, o modelo descontínuo *Linear Response Plateau* se ajustou melhor aos dados de digestibilidade aparente do fósforo, estimando em 140,32 ppm de complexo enzimático SSF a partir do qual a digestibilidade permaneceu em um platô. A fitase presente no complexo enzimático estudado aumentou a disponibilidade de fósforo

e indiretamente a de cálcio, pois sabe-se que o fitato presente nos ingredientes de origem vegetal possui propriedades químicas de associar-se a alguns minerais, como fósforo, cálcio, zinco, ferro e cobre, além de algumas proteínas. Isso forma complexos insolúveis, diminuindo a biodisponibilidade destes nutrientes. Nesse mesmo sentido, utilizando fitase em rações para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Furuya et al. (2001) verificaram que a máxima disponibilidade do cálcio e do fósforo foi estimada ao incluir 702 e 688 UFA/Kg, respectivamente. Em outro trabalho com tilápias do Nilo, Furuya et al. (2005) verificaram que a digestibilidade aparente do fósforo aumentou de 26,41% para 56,10% ao adicionar 500 UFA/ Kg de ração.

Utilizando truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em um ensaio, Wang et al. (2009) observaram que a digestibilidade aparente do fósforo e do cálcio através de um pré-tratamento da dieta basal com fitase foi melhor do que a inclusão desta enzima via “spray”. Para redução da excreção pelo método “spray”, os autores recomendaram 3000 UFA/Kg de ração, sendo níveis menores do que 2000 UFA/Kg de ração se o objetivo for ganho de peso. Para o pré-tratamento, 1000 UFA foram suficientes para melhorar a digestibilidade dos minerais.

A inclusão do complexo enzimático SSF em rações para peixes pode ser uma alternativa nas formulações com altos níveis de ingredientes de origem vegetal. A vantagem de se utilizar complexos enzimáticos ou mesmo coquetéis é que ocorre aumento no espectro de ação, fazendo com que as enzimas trabalhem de forma sinérgica, tendo como produto o aumento na disponibilidade de nutrientes e de energia.

## **Conclusão**

Com exceção do extrato etéreo, a inclusão do complexo enzimático SSF em rações para tilápias do Nilo aumentou a digestibilidade aparente da matéria seca, da energia bruta, da proteína bruta, do cálcio e do fósforo.

## Literatura Citada

- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e crescimento **Revista Brasileira de Zootecnia** v.31, n.2, p.539-545, 2002a.
- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) **Revista Brasileira de Zootecnia** v.31, n.2, p.539-545, 2002b.
- BOYD, C.E. **Water quality management for pond fish culture**: developments in aquaculture and fisheries science. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1982. 318p.
- FARHANGI, M.; CARTER, C.G. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.38, n.12, p.1274-1282, 2007.
- FURUYA, W.M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V.R.B.; SOARES, C.M.S. Exigência de proteína para alevino revertido de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia** v.26, n.6, p.1912-1917, 2000.
- FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.30, n.3, p.924-929, 2001.
- FURUYA, W.M.; SANTOS, V.G.; BOTARO, D.; HAYASHI, C.; SILVA, L.C.R. Níveis de proteína e fitase em rações de terminação para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.8, n.1, p.11-17, 2005.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2000. 289p.
- LI, S., SAUER, W.C., HAUANG, S.X., *et al.* Effect of  $\beta$ -glucanase supplementation to hulled barley- or wheat-soybean meal diets on the digestibilities of energy, protein,  $\beta$ -glucans, and amino acids in young pigs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1649-1656. 1996.
- MURAKAMI, A. E.; FERNANDES, J.I.M.; SAKAMOTO, M. I.; SOUZA, L.M.G.; FURLAN, A.C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Science Animal Science**, v.29, n.2, p.165-172, 2007.

- NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.
- OGUNKOYA, A. E.; PAGE, G. I.; ADEWOLU, M. A.; BUREAU, D. P. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 2005.
- OLIVEIRA, K.; COSTA, C.; FAUSTINO, M.G.; GASQUE, V.S.; SANTOS, V.P.; LIMA, M.N.; FILHO, V.F.N.; ABDALLA, A.L. Trânsito gastrintestinal e digestibilidade aparente de nutrientes em eqüinos alimentados com dietas contendo grãos secos ou silagem de grãos úmidos de triticale. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1799-1808, 2007.
- OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; CUNHA, F.; ROCHA, C.; BORGES, S.A. Adição de complexo enzimático e da granulometria da soja integral desativada sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.628-632, 2010.
- PASCOAL, L.A.F.; SILVA, L.P.G.; MIRANDA, E.; MARTINS, T.D.D.; THOMAZ, M.C.; LAMENHA, M.I.A.; ALMEIDA, D.H. Complexo enzimático em dietas simples sobre os parâmetros séricos e a morfologia intestinal de leitões. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p.117-129, 2008.
- PIPER, R.G.; McELWAIN, I.B.; ORME, L.E. **Fish hatchery management**. Washington: U.S. Department of Interior, 1982, 517p.
- ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 141p.
- SOARES, C.S.; FILHO, M.P.; ROUBACH, R., SILVA, R.C.S. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla sp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.971-976, 2008.
- SOUZA, R.M.; BERTECHINE, A.G.; SOUZA, R.V.; RODRIGUES, P.B.; CARVALHO, J.C.C.; BRITO, J.A.G. Efeitos da suplementação enzimática e da forma física da ração sobre o desempenho e as características de carcaça de frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, v.32, n.2, p.584-590, 2008.
- STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v.34, n.2, p.109-121, 2003.
- TESSER, M.B.; FLORES-QUINTANA, C.I.; CARNEIRO, D.J.; JÚNIOR, J.M. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.35, n.6, p.2211-2218, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistemas para análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.2. Viçosa, MG: 2006. (CD-ROM).

WANG, F.; YANG, Y.H.; HAN, Z.Z.; DONG, H.W.; YANG, C.H.; ZOU, Z.Y. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture International**, v.17, p.143-157, 2009.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Foram realizados três experimentos com os objetivos de avaliar a estabilidade do complexo enzimático SSF ao processamento e ao tempo de estocagem de ração peletizada e os efeitos deste complexo no desempenho, na disponibilização de sacarose e monossacarídeos e na digestibilidade de nutrientes e de energia bruta para tilápias do Nilo. Concluiu-se que:

- quando submetidas ao processamento de rações peletizadas à 55°C as enzimas avaliadas do complexo enzimático SSF não perdem a estabilidade, mantendo a atividade por no mínimo 60 dias quando estocadas em ambiente de até 25°C.

- a maior biodisponibilização de nutrientes afetou positivamente o desempenho de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo o complexo enzimático SSF.

- a inclusão do complexo enzimático SSF em rações para tilápias do Nilo aumentou a digestibilidade aparente da matéria seca, da energia bruta, da proteína bruta, do cálcio e do fósforo