

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

Patrícia Rabelo De Freitas¹, Cirano José De Ulhôa², Reginaldo Ferreira Nassar², Crístielle Nunes Souto^{3*}, Vinicius Santana Mota¹, Delma Machado Cantisani Padua¹

¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Engler, 507 - Jardim Marlisa, Goiânia - GO, 74885-460

²Universidade Federal de Goiás (UFG), Instituto de Ciências Biológicas, - Alameda Palmeiras, S/n - Chácaras Califórnia, Goiânia - GO, 74710-310

³Universidade Federal de Goiás (UFG), Escola de Veterinária e Zootecnia, Rodovia Goiânia, km 8, s/n - Campus Samambaia, Goiânia - GO, 74001-970

Autor para correspondência: Crístielle Nunes Souto, cristielle_nunes@hotmail.com

RESUMO: Avaliou-se o efeito de uma solução de amilase produzida por *Aspergillus awamori* sobre a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) de milho. Foram realizados dois experimentos, onde o primeiro a solução de enzima amilase foi aplicada por pulverização em 24g de milho moído (2 mm) e o segundo a solução de enzima amilase foi aplicado no fluido ruminal. Os tratamentos foram: controle (0 mL de enzima), 5mL (5 mL de enzima) e 10 mL (10 mL de enzima) para cada experimento. Para a coleta de líquido ruminal foi utilizado um bovino de peso aproximado de 380 kg e o ensaio da DIVMS foi obtido usando a técnica de rúmen artificial adaptada. Para os dois experimentos foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas 3 x 6, com quatro repetições (jarros). As parcelas foram constituídas por milho tratado com três diferentes níveis de enzima e as subparcelas por seis momentos de digestão. Para enzima amilase aplicada no líquido ruminal o resultado de DIVMS para os três tratamentos nos períodos de 3, 6 e 12 horas não diferiram estatisticamente entre si. Entre o tratamento controle e 5 mL houve diferença significativa nos tempos 15'e 1,5 horas. Foi observado maior DIVMS para o tratamento controle, em relação aos 5 mL, com valores de 54,54% e 49,05, e não houve diferença nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas ($P>0,05$). Entre o tratamento controle e o tratamento com 10 mL de enzima não houve diferença no tempo 15' e 24 horas. A DIVMS do controle foi superior a tratamento 10 mL (28,74% e 10,53% respectivamente). A DIVMS foi superior para o tratamento controle, indicando que os níveis de 5 e 10 mL de enzimas injetados no fluido ruminal não aumentaram a DIVMS ($P>0,05$). Para amilase aplicada por pulverização em 24g de milho moído, no tempo de 15', observou-se que o tratamento controle e 5 mL não diferiram estatisticamente ($P>0,05$). No entanto, o 10 mL de enzima melhorou a DIVMS em 55,54%, quando comparado ao grupo controle. Foi possível concluir que o tratamento com 5 mL de enzima aumentou a DIVMS em tempos de 3 e 24 horas de incubação e com a aplicação de 10 mL de enzima a DIVMS aumentou em todos os tempos de incubação.

PALAVRAS-CHAVE: ANKOM, amilase, degradabilidade, fungo, rúmen.

EFFECT OF AMYLOLITICS ENZYMES OF THE *Aspergillus awamori* ON STARCH DIGESTION IN CATTLE

ABSTRACT: We evaluated the effect of a solution of amylase produced by *Aspergillus awamori* on the in vitro dry matter (DIMS) of corn. Two experiments were conducted, where the first solution of the enzyme amylase was applied by spraying 24g ground corn (2 mm) and the second amylase enzyme solution was applied in rumen fluid. He treatments were: control (0 enzyme), (5ml of enzyme) and T2 (10 ml of enzyme) for each experiment. The test DIVMS was obtained using the technique of artificial rumens adapted during periods of 15', 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours. For the collection of rumen fluid was used for cattle weighing approximately 380 kg. For both experiments was adopted a completely randomized design, with treatments consisting of corn treated with three different enzyme levels and repeated measures conducted in six times the digestion (15', 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours), with four replicates per treatment. For amylase enzyme applied to the result of ruminal DIVMS for the three treatments at 3, 6 and 12 hours did not differ statistically. Between treatment and control was

no significant difference in T1 times 15 'and 1.30' hours. DIVMS was higher for the control treatment, with respect to T1, values of 54.54 and 49.05%, and no difference in days 3, 6, 12 and 24 hours. Between treatment and control T2 there was no difference in time 15 "and 24 hours. The control was higher than T2 28.74% and 10.53% respectively. DIVMS was superior to the control treatment, indicating that levels of 5 and 10 ml of enzyme injected into the ruminal fluid increased in vitro data. For amylase applied by spraying 24 g of corn in time 15 ', it was observed that the treatment did not differ from control and T1. However, the T2 improved IVDMD of 55.54% compared to the control group. Treatment 1 DIVMS increased only in times of 3 and 24 hours of incubation, as compared to control. With the application of 10 ml of enzyme, in vitro data increased in all incubation times in comparison with the control.

KEY WORDS: ANKOM, amylase, degradability, fungi, rumen

INTRODUÇÃO

Atualmente uma das maiores preocupações da humanidade é o aumento da produção de alimentos para atender a demanda crescente da população sem degradar o meio ambiente. É necessário criar novas tecnologias para aumentar a produção de maneira sustentável. Uma das inovações é a biotecnologia enzimática, a qual utiliza enzima na alimentação animal para melhor aproveitamento do alimento e para aumentar a produtividade. A enzimologia industrial é um importante ramo da biotecnologia, pois permite às indústrias usarem processos mais econômicos, diminuindo o consumo de energia, sendo mais confiáveis com menor agressão ao meio ambiente (Kebreab et al., 2010).

As enzimas atuam na remoção dos fatores antinutricionais, tornando certos nutrientes disponíveis para a absorção e também aumentando o valor energético de ingredientes mais baratos. As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, devendo-se, principalmente, a vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão. As principais metas de suplementação enzimática para os animais são: remover ou destruir fatores antinutricionais dos grãos; aumentar a digestibilidade total da ração; potencializar a ação das enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes (Passini et al., 2003). As amilases são hidrolases capazes de degradar o amido e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores. São amplamente distribuídas na natureza, encontradas na indústria devida á grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais. Pesquisas na área de suplementos enzimáticos para dietas de ruminantes têm sido realizadas principalmente com celulasas e hemicelulasas enquanto as atividades envolvidas

no processo de digestão do amido têm sido pouco estudadas (Kameda et al., 2007; Tricarico et al., 2008).

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

Linhagem utilizada e manutenção do fungo

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

Produção, inoculação, filtragem e liofilização da solução enzimática

Três discos de cultura (5 mm), contendo esporos do fungo *Aspergillus awamori* foram

inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 mL de meio de indução (extrato de levedura, 1,0 g; MgSO₄, 0,05 g; FeSO₄, 0,01g; CaCl₂ 2H₂O, 0,01 g; KH₂PO₄, 0,02 g; (NH₄)₂SO₄, 0,125 g; Amido, 1%; Água destilada q.s.p. 100 mL). Os erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shacker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A) a 30°C e velocidade de 180 rpm. Após 48 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada a vácuo. Alíquotas foram retiradas e congeladas para a avaliação da atividade de amilase e posterior utilização.

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

Determinação da atividade de amilase

A atividade amilolítica foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcares redutores (Miller, 1959). A atividade enzimática encontrada foi de 46,54 U mL⁻¹. A 40µl de tampão citrato-fosfato (50 mmol. L⁻¹, pH 6,8), foram adicionados 60µl de amostra enzimática e 100µl de solução de amido (0,5%). A mistura foi incubada a 39 °C por 15 minutos. Posteriormente, 1,0 mL de reagente ácido dinitrosalicílico (10 g.L⁻¹) (DNS), 100 mL de NaOH (2 mmol.L⁻¹), 300 g.L⁻¹ de tartarato de sódio e potássio} foi adicionado aos tubos de ensaio. A mistura foi fervida por 5 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

Delineamento Experimental

Foram testados dois métodos de adição da enzima amilolítica com a finalidade de determinar a melhor forma de utilização e efeito, nos dois experimentos. Na primeira forma a enzima amilase foi aspergida sobre o substrato (milho moído) e a segunda forma a enzima amilase foi aplicada diretamente no líquido ruminal. No primeiro

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

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

Preparação das soluções tampões

Primeiramente foi misturado 266 mL da solução B (15 g de Na₂CO₃ e 1g de Na₂S₉H₂O, para 1 L de água destilada) em 1330 mL da solução A (10 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄ 7 H₂O; 0,5 g de NaCl; 0,1 g de CaCl₂ 2H₂O e 0,5 g de uréia, em 1 L de água destilada). A quantidade exata de A para B (relação 1:5) deve ser ajustada para obtenção do pH final 6,8 a 39 °C. Nenhum ajuste adicional de pH é necessário. A quantidade aproximada de 1600 mL da solução tampão foi adicionada por jarro, colocados na incubadora aproximadamente 4 horas antes da incubação para obtenção da temperatura de 39 °C.

Preparação dos sacos de náilon

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

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

Coleta do líquido ruminal e incubação

Para a coleta do líquido ruminal foi utilizado um bovino Nelore com peso aproximado de 380 kg provido de cânula no rúmen, mantido em baía individual, adaptado a dieta por período de 10 dias. A dieta, fornecida à vontade, após a coleta do líquido ruminal, consistiu de feno de Tifton com 7% de proteína bruta (PB) e 1 kg de milho. Para cada tratamento no momento da incubação coletou-se 2000 mL de líquido ruminal, enviado ao laboratório por meio de garrafa térmica. O material foi homogeneizado à velocidade alta por 30 segundos, sendo em seguida filtrado e adicionados em jarros de vidro de 500 mL, contendo solução tampão a 39°C. Todo o processo ocorreu com a infusão de CO₂. Os materiais utilizados para o manuseio do líquido ruminal foram aquecidos a temperatura de 39°C. A mistura do líquido em liquidificador tem o objetivo de desalojar as bactérias da massa ruminal, assegurando a população microbiana para a fermentação *in vitro*.

Posteriormente, os sacos de filtro náilon foram introduzidos nos jarros (4 no total) da incubadora (TE-150 TECNAL), contendo 400 mL de líquido ruminal e 1600 mL de solução tampão a 39°C. Em meio anaeróbio foram incubados 48 sacos contendo amostra e um saco em branco (C1) para cada tratamento, sendo: jarro 1 sacos de número 1 a 12; jarro 2 sacos de número 13 a 24; jarro 3 sacos de número 25 a 36 e jarro 4 do 37 ao 48 e amostra em branco.

As amostras foram incubadas por 15'; 1,5; 3; 6; 12 e 24 hs, para cada tratamento. Para cada horário de incubação foram retiradas 2 amostras, aleatoriamente de cada jarro (8 amostras no total), sempre com infusão de CO₂ registrando o horário de retirada. Em seguida os sacos foram lavados por três vezes em água destilada e uma vez em acetona, escoados e acondicionadas em estufa de ventilação forçada a 105 °C por 24hs. Posteriormente as amostras foram retiradas da estufa, mantidas em dessecador por 40 minutos, pesadas e registradas para cálculo da DIVMS (W_□).

Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

No ensaio de digestibilidade *in vitro* foi utilizada a metodologia descrita por (Tilley e Terry 1963) modificada para o fermentador ruminal (DAISY), seguindo a metodologia apresentada no manual de

utilização do equipamento (ANKOM® Technology), fornecida pelo fabricante.

Para calcular a DIVMS utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ DIVMS} = 100 - (W_{\square} - (W_{\square} \times C_{\square})) \times 100$$

$$(W_{\square} \times \text{MS})$$

Em que: W_□ = Peso saco vazio; W_□ = Peso da amostra; W_□ = Peso final após DIVMS; C_□ = Peso do saco em branco; MS = Matéria Seca.

Determinação de glicose e matéria seca

No momento da incubação foi retirada uma alíquota de líquido ruminal de cada jarro, por horário (15'; 1,5; 3; 6; 12 e 24hs), para cada tratamento e armazenadas em freezer para determinação de glicose.

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

O ensaio para determinação de matéria seca foi realizado para cada tratamento (controle, 5 mL e 10 mL). O cadinho foi mantido em estufa por 2 horas a 105 °C para secagem, após 40 minutos em dessecador registrou-se o peso, em seguida foi adicionado 1,0g da amostra (milho moído), mantendo em estufa a 105 °C durante 24hs e determinado o peso final. O ensaio foi realizado em duplicata.

Análise Estatística

Os dados dos experimentos com o efeito da enzima amilase no substrato e da enzima adicionada diretamente no líquido ruminal foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados de Matéria seca

Para cada tratamento foi realizado o ensaio de determinação de matéria seca. Foram encontrados os valores descritos na tabela 1, os quais foram utilizados na fórmula para determinar a DIVMS.

Resultados de DIVMS

Tabela 1. Média dos valores de matéria seca para os diferentes níveis de enzima

Níveis de enzima	MATERIA SECA	
	Enzima aspergida no substrato	Enzima adicionada ao líquido ruminal
Controle (0 mL)	52,80	53,02
5ML (5mL)	52,84	52,91
10ML (10 mL)	52,93	53,01

Aspersão da amilase sobre o substrato

Verificou-se que no tempo inicial de 15 minutos, os tratamentos controle e 5 mL não diferiram entre si. Na tabela 1 com aplicação de 10 mL em 15 minutos foi observada melhora de 55,54% da digestibilidade, em relação ao controle. Esse resultado demonstra que o nível de 10 mL de enzima promoveu a hidrólise do amido antes da sua incubação no rúmen. Isso provavelmente ocorre pela especificidade da enzima amilase ter como seu substrato o amido. Harger (1982) afirma que as enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido.

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

Muito da variabilidade da atuação enzimática são atribuídas a fatores tais como o tipo e atividade da enzima, as condições de cultura empregada (Eun & Beauchemin, 2007), nível de suplementação e enzima fornecida, estabilidade da enzima no aparelho digestivo (Yang et al., 2001; Giraldo et al., 2008), composição da dieta, método de aplicação da enzima e o balanço energético dos animais teste. Respostas positivas têm sido obtidas com adição de preparados enzimáticos à ração, mas quais as enzimas chave envolvidas e o mecanismo de ação ainda não são bem definidos (Beauchemin et al., 2003). Segundo o trabalho de Minafra (2007), pode-se observar que a enzima apresenta atividade alta na faixa de temperatura entre 30 a 70 °C, tendo o valor máximo de atividade enzimática na temperatura de 50 °C, apresentando estabilidade nos pH fisiológicos 3,0 a 8,0.

Nas condições do presente trabalho, foi verificado que os valores do controle e 10 mL diferiram

estatisticamente ($P < 0,05$), sendo que os resultados do tratamento 10 mL foram superiores aos do controle. Essa fato indica que o nível 10 mL de enzima melhorou a DIVMS para todos os tempos de incubação. Estudos revisados por (Medeiros e Lanna, 1999) mostram que o uso de enzimas exógenas na dieta de ruminantes pode proporcionar melhora na digestibilidade da ração. Segundo (Colombatto et al., 2007) há evidências de uma combinação de efeitos pré e pós-alimentação, onde índice de aplicação da enzima e o tempo de interação de enzima-alimento, criam um complexo enzima-alimento estável, que protege as enzimas exógenas de proteólises no rúmen.

Aplicação da amilase no líquido ruminal

Com 15 minutos e 1,5 horas de incubação, foi observado maior DIVMS para o tratamento controle, em relação ao tratamento com 5 mL de enzima. Na tabela 2 verificou-se ainda que o tratamento controle proporcionou maior DIVMS, em relação ao 10 mL com aumentos de 28,74% e 10,53%, para os tempos 15' e 24 horas, respectivamente. Verificou-se que a DIVMS foi maior para o tratamento controle, indicando que os níveis de 5 mL e 10 mL da enzima aplicados no líquido ruminal não aumentaram a DIVMS. Provavelmente, a falta de respostas à adição de 5 e 10 mL ocorreu pela inativação da enzima amilase devido a ação das proteases presentes no líquido ruminal. (Dukes 1993) relata que certas proteínas naturais, escapam da degradação ruminal, mas podem ser prontamente hidrolisadas pelas enzimas proteolíticas gastrointestinais. A proteólise bacteriana começa com a atividade extracelular da protease para produzir peptídios os quais são fagocitados e submetidos à hidrólise posterior dentro da célula bacteriana.

A enzima amilase, assim como outras enzimas utilizadas na alimentação de ruminantes deve 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, o modo de fazer a ração, o armazenamento, às condições durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (Francesch, 1996). Segundo (Borges, 1997) a estrutura molecular da enzima é bastante frágil e, conseqüentemente, podem ser desnaturados por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes.

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

Resultados de Glicose

Aspersão da amilase no substrato

Observaram-se maiores níveis de glicose no líquido ruminal para o tratamento controle e 5 mL no tempo inicial de 15 minutos em relação aos outros tempos de incubação. Na tabela 3 verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos 5 mL e 10 mL com 15 minutos de incubação, sendo o 5 mL superior ao 10 mL. Não houve diferença significativa entre o tratamento controle e 5 mL para os tempos de incubação 1,5; 3; 6 e 12 horas. No tratamento com 5

mL de enzima observou-se diferença significativa da atividade enzimática no tempo inicial sendo superior aos outros tempos de incubação.

Aplicação de amilase no líquido ruminal

Com a aplicação no líquido ruminal, não foi observado diferença significativa dos resultados de glicose para o tratamento controle, 5 mL e 10 mL nos tempos 15'; 1,5; 3; 6 e 12 horas de incubação. Já para o tempo de 24 horas de incubação houve diferença significativo sendo o 10 mL superior aos demais tratamentos.

Diante dos resultados de glicose, tanto para enzima aspergida sobre o substrato como aplicada ao líquido ruminal, no tratamento com 10 mL de enzima observa-se que, com 24 horas de incubação, houve maior ação da atividade enzimática. (Gupta, 2003 e Pandey 2005) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. A mesma ação foi verificada nos resultados de DIVMS demonstrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 2. Média dos valores de DIVMS (%) do milho moído submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

Nível de enzimas (mL)	Período de incubação ruminal (minutos e horas)					
	15'	1,5h	3h	6h	12h	24h
Controle (0 mL)	22,82bD	23,93bD	23,57cD	29,13bC	38,06bB	53,29cA
5ML (5 mL)	23,60bD	27,30bCD	28,08bCD	30,29bC	41,83bB	60,54bA
10ML (10mL)	35,50aD	41,58aC	38,50aCD	39,81aCD	60,60aB	73,21aA

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

Tabela 3. Média dos valores de DIVMS (%) do líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação.

Nível de enzimas (mL)	Período de incubação ruminal (minutos e horas)					
	15'	1,5h	3h	6h	12h	24h
Controle (0 mL)	14,96aC	14,24aC	12,45aC	24,06aB	38,06bB	48,06aA
5ML (5 mL)	9,67bC	9,55bC	10,95aC	11,42aC	23,79aB	50,40aA
10ML (10 mL)	11,61bC	13,46aC	13,35aC	14,13aC	22,00aB	43,59bA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Níveis de enzima: CV%= 7,86, GL%=2, QM%=26,5161, F%=10,6458. Períodos de incubação: CV%=7,84, GL%=5, QM%=2362,2851, F%=951,7127. Colunas, classificação com letras minúsculas; Linhas, classificação com letras maiúsculas.

Tabela 4. Médias dos valores de glicose presente no líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

Nível de enzimas (mL)	Período de incubação ruminal (minutos e horas)					
	15'	1,5h	3h	6h	12h	24h
Controle (0 mL)	16,84bA	12,32aA	5,13aA	5,8aA	3,19bA	5,14bA
5ML (5 mL)	74,91aA	13,75aB	3,28aB	4,04aB	2,63bB	2,02bB
10ML (10 mL)	5,91bBC	5,11aC	3,51aC	9,16aBC	30,15aA	25,75aAB

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

Tabela 5. Média de glicose presente no líquido ruminal submetido a diferentes níveis de enzima e os períodos de incubação

Nível de enzimas (mL)	Período de incubação ruminal (minutos e horas)					
	15'	1,5h	3h	6h	12h	24h
Controle (0 mL)	4,09aA	1,88aA	2,68aA	3,52aA	2,13aA	2,56bA
5ML (5 mL)	4,01aA	3,55aA	1,53aA	1,97aA	2,71aA	2,48bA
10ML (10 mL)	191aB	3,97aB	5,74aB	2,72aB	5,41aB	25,24aA

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

Com essas informações entende-se que o aumento da DIVMS com nível de 10 mL de enzima com 24 horas de incubação deve-se a ação da enzima. (Colombatto et al., 2007) observaram valores de digestibilidade semelhante a este experimento sugerindo este efeito como a proteção enzimática sendo causada pela complexação do alimento com a enzima. Esta observação pode ser a mesma constatada no presente trabalho. Assim, conclui-se que a enzima amilase de *Aspergillus awamori* aumentou significativamente a DIVMS do amido na concentração de 10 mL, nos tempos de 12 e 24 horas de incubação quando aplicada sobre o milho triturado. O complexo enzimático adicionado diretamente no líquido ruminal não alterou a DIVMS do amido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beauchemin, K.A.; Colombatto D.; Morgavi, D.P.; Yang, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. **2003**, 81, 37-47.

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

Colombatto, D.; Moulda, F.L.; Bhatb, M.K.; Owena, E. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the in vitro ruminal fermentation of alfafa stems. *Alimentação Animal Ciência e Tecnologia*, **2007**, 137, 150 – 162.

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

Eun, J. S.; Beauchemin, K. A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. *Animal Feed Science and Technology*. **2007**, 132, 298-315.

Francesch, M. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura. In: *Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación animal*, Madrid. Anais... Madrid: FEDNA, **1996**. 118-131.

- Giraldo, L.A.; Tejjidoa, M.L.; Ranillaa, M.J.; Carro, M.D. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology*, **2008**, 141, 306-325.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective, *Process Biochemistry*, **2003**, 38, 1599-1616.
- Harger, C.; Sprada, D.; Hiratsuka, E. Amilase fúngica In: *Bioquímica das fermentações*, **1982**. 56 p.
- Kameda, E.; Queiroz Neto, J.C.; Langone, M.A.P.; Coelho, M.A. Removal of polymeric filter cake in petroleum wells: A study of commercial amylase stability. *Journal of Petroleum Science & Engineering*, **2007**, 59, 263-270.
- Medeiros, S.R.; Lanna, D.D.P. Uso de aditivos na bovinocultura de corte. In: *Simpósio Goiano Sobre Produção De Bovinos De Corte*, 1999, Goiânia. Anais... Goiânia: *Colégio Brasileiro de Nutrição Animal*, **1999**, 171-190.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **1959**, 31, 3, 426-428.
- Minafra, C.S. Produção e Suplementação com α -amilase de *Cryptococcus Flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na Dieta de Frangos de Corte de um a 21 dias de idade. **2007**. p.141, Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Pandey, A. et al. *Enzyme Technology*. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, **2005**. 760 p.
- Passini, R.; Rodrigues, P.H.M.; Castro, A.L.; Silveira, A.C. Parâmetros de fermentação ruminal em bovinos alimentados com grãos de milho ou sorgo de alta umidade ensilados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **2003**, 32, 5, 1266-1274.
- Tricarico, J.M.; Johnston, J.D.; Dawson, K. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Animal Feed Science and Technology*, **2008**, 145, 136-150.
- Tilley, J.M.A.; Terry, R.A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J Br Grassl Soc.*, **1963**, 18, 104-111.
- Yang, X.; Chen, H. Gao, H.; Li, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, **2001**, 78, 3, 277-280.