

Avaliação de Enzimas Fibrolíticas sobre a Degradabilidade do Feno de Coast-Cross

Marcus Vinícius Pereira Assunção¹, Cristine dos Santos Settimi Cysneiros², Tatiany Tamiris Silva¹, Daniel Martins de Oliveira¹, Pedro Ivo de Figueiredo¹, Reginaldo Nassar Ferreira²

¹Universidade Federal de Goiás. – Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ).
Caixa Postal 131 – CEP 74001-970 Goiânia – GO - E-mail: (cysneiros cristine@hotmail.com)

²Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas (ICB II)
Caixa Postal 131 – 74001-970 Goiânia – GO

RESUMO

Avaliou-se o efeito de uma solução de enzimas celulolíticas de Humicola grisea sobre a degradabilidade do feno de Coast-Cross. Os tratamentos foram: controle (0 unidade enzimática/Kg de matéria seca do feno); 2,5 mL (1,53 unidades enzimática/Kg de matéria seca do feno) 10,0 mL (3,06 unidades enzimática/Kg de matéria seca do feno) e 5,0 mL (6,1 unidades enzimática/Kg de matéria seca do feno), que foram aplicados diretamente no líquido ruminal. A degradabilidade foi avaliada pela técnica adaptada para o rúmen artificial. O delineamento estatístico foi em blocos em esquema de parcelas subdivididas no tempo. A caracterização bioquímica mostrou que as enzimas produzidas apresentaram maior atividade em pH 6,0 e 50°C. Verificou-se que os níveis enzimáticos, em relação ao controle, não aumentaram a degradação do feno. Os resultados indicam que as enzimas fibrolíticas produzidas não tiveram efeito em ambiente ruminal.

Palavras-chave: Ankom, bovino, celulasas, degradação, fungo termofílico.

INTRODUÇÃO

Os bovinos possuem um ecossistema diverso e sofisticado de utilização dos carboidratos fibrosos da parede celular dos vegetais, graças à relação simbiótica com a população microbiana diversificada do rúmen. Ainda que os micro-organismos do rúmen consigam digerir celulose e outros carboidratos fibrosos, fatores relacionados à estrutura e composição da planta, como as interações físico-químicas entre a matriz de hemicelulose e lignina, e aspectos relacionados ao animal, como a mastigação, salivação e pH ruminal, podem limitar a extensão da digestão no rúmen, por representarem barreiras aos processos fibrolíticos.

Enzimas fibrolíticas exógenas são produzidas por cultura específica de bactérias ou fungos. São essenciais aos animais ruminantes por estarem envolvidas na hidrólise dos componentes complexos das dietas em moléculas orgânicas mais simples como glicose, celobiose, xilose, aminoácidos, ácidos graxos, que são então usadas pelos micro-organismos do rúmen e/ou pelo animal. Melhoras no desempenho dos ruminantes devido ao uso de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são atribuídas principalmente à maior degradação da fibra no rúmen, resultando em aumento da ingestão de energia disponível para os animais³.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de quatro níveis enzimáticos em feno de Tifton por meio do ensaio de degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).

MATERIAL E MÉTODOS

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

Para a produção da solução enzimática (SE), utilizou-se o fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Cinco discos de cultura (5 mm), com esporos do micro-organismo, foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 mL de meio de indução (fonte de carbono 5 g/L; extrato de levedura 3 g/L; sulfato de amônia 1,4 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L; sulfato de magnésio 0,3 g/L; elementos traços CuSO_4 , FeSO_4). Como fonte de carbono, utilizou-se o feno de Coast-cross, moído em moinho tipo Willey providos de peneira com malha de 1 mm de diâmetro. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shaker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S. A) a 42°C e velocidade de 120 rpm. Após 72 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada, esterilizada e alíquotas foram coletadas e centrifugadas, a 4000 rpm por 10 minutos, para posterior utilização.

Neste experimento, ensaios de pH ótimo foram realizados para verificar se as enzimas celulolíticas produzidas apresentavam atividade numa faixa de pH compatível com as condições do rúmen (5,0-7,0). As atividades das enzimas do complexo celulolítico foram avaliadas em tampão citrato fosfato 50 mmol.L⁻¹, nos valores de pH 5,0; 5,6; 6,0; 6,6 e 7,0. Os ensaios da temperatura ótima foram também realizados para avaliar se as enzimas produzidas mantiveram atividade na faixa de temperatura do rúmen (39-42° C). As enzimas foram avaliadas na faixa de 30 a 60°C, em tampão citrato fosfato 50 mmol.L⁻¹. No ensaio de termoestabilidade, as enzimas foram avaliadas nos tempos de 60, 120, 180 e 240 minutos, a 40°C e pH 6,6. Os testes foram realizados em tampão citrato fosfato 50 mmol. L⁻¹. As atividades das enzimas Fpase, endoglucanase e exocelulase foram 28,18; 15,03; 13,66 U/mL, respectivamente.

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

Para a coleta do líquido ruminal, foram utilizadas duas vacas mestiças (Jersey x girolando), com peso médio de 350 kg. Os animais, mantidos em baias cobertas e piso cimentado, foram adaptados à dieta por período de 14 dias, antes da coleta do líquido, com livre acesso à água e sal mineral. A dieta era à base de 2 kg de silagem de milho e 5 Kg de feno de Coast-cross, fornecida pela manhã.

Os tratamentos realizados foram: controle (0 unidade enzimática/Kg de matéria seca do feno); 2,5 mL (1,53 unidades enzimática/Kg de matéria seca do feno) 5,0 mL (3,06 unidades enzimática/Kg de matéria seca do feno) e 10,0 mL (6,1 unidades enzimática/Kg de matéria seca do feno). Cada tratamento foi aplicado diretamente no líquido ruminal.

Amostras de 0,5 g do feno foram colocadas em sacos de filtro-náilon (F57-ANKOM®), lacrados a quente. Para todos os tratamentos, em cada jarro do fermentador ruminal, quatro no total, contendo solução tampão, líquido ruminal, a 39°C, pH 6,8 e a solução enzimática, em meio anaeróbio, foram colocadas equitativamente 12 bolsas (10 amostras, um branco e uma testemunha). A DIVMS foi avaliada em 12, 24, 48 e 72 horas.

O cálculo da DIVMS, em porcentagem, foi realizado utilizando a fórmula (ANKOM® technology): $DIVMS \% = 100 - ((W3 - (W1 \cdot C1)) \cdot 100 / W2)$. Em que: W1 = peso da tara do saco filtro; W2 = peso das amostras; W3 = peso final do saco de filtro depois da determinação in vitro; C1 = correção do saco de filtro em branco (peso final do saco após estufa/peso inicial do saco filtro).

O delineamento experimental adotado foi o em blocos em esquema de parcelas subdivididas no tempo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio de software R⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento, verificou-se que as enzimas celulasas produzidas apresentaram 100% de atividade relativa em pH 6,0, mantendo boa atividade na faixa de 5,0 a 7,0, com valor médio de 70%, sugerindo que essas proteínas teriam atividade nas condições de pH do rúmen. O pH ótimo de celulasas depende do micro-organismo produtor, situando-se entre 5,0 e 6,0².

As enzimas para serem usadas como aditivos em dietas de bovinos devem permanecer estáveis em 39 a 42° C, uma vez que esta é a faixa de temperatura do rúmen, principal órgão digestivo dos ruminantes. A temperatura ótima, para as celulasas produzidas, foi de 50° C, com 100% de atividade relativa. As enzimas mantiveram atividade de 50,32%; 70,53% e 74,04%, a 30°C, 40°C e 60°C, respectivamente.

Celulasas de fungos termofílicos apresentam boa atividade em temperatura na faixa de 50 a 80° C². Neste experimento, verificou-se que as enzimas do *H. grisea* demonstraram atividade relativa na faixa de temperatura do rúmen.

Neste trabalho, foi observado que as celulasas produzidas apresentaram atividade relativa de 92%, permanecendo estáveis por 240 minutos. Em pesquisa realizada, verificou-se que celulasas de *H. grisea* apresentaram 88% de atividade relativa após 240 minutos de incubação, a 50, 60 e 70° C⁴. As enzimas devem apresentar ampla faixa de termoestabilidade para suportar a temperatura interna dos animais e variações de temperatura no processamento das rações para serem utilizadas na dieta animal. A termoestabilidade enzimática varia consideravelmente em função da sua origem, sendo as enzimas fúngicas as que possuem maior estabilidade térmica.

De acordo com os dados da DIVMS, foi observado que os níveis enzimáticos de 2,5, 5,0 e 10 mL em relação ao tratamento controle, não aumentaram ($p > 0,05$) a degradabilidade do feno, obtendo-se valores médios de 28,33; 28,83; 26,58 e 27,03%, respectivamente Tabela 1.

Tabela1. Médias da DIVMS (%) do feno de Coast-Cross nos níveis de enzimas

Degradabilidade (%)	Nível enzimático (mL)			
	Controle	2,5	5,0	10,0
	28,33a	28,83ab	26,58c	27,03bc

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Foi verificado, no entanto, aumento médio ($p < 0,05$) da degradabilidade nos tempos de incubação, com valores de 15,20; 21,33; 27,03; 35,45 e 39,45% para os tempos de 0; 12; 24; 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela 2), o que indica que o feno é constituído de compostos

químicos de lenta degradação, além do mais, as interações físico-químicas entre estes compostos podem aumentar a extensão da degradação no rúmen.

Tabela 2. Médias da DIVMS (%) do feno de Coast-Cross nos tempos de incubação

Degradabilidade (%)	Tempo de incubação (horas)				
	0	12	24	48	72
	15,20e	21,33d	27,03c	35,45b	39,45a

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que é possível usar preparações específicas de enzimas fibrolíticas para melhorar os processos associados à digestão do alimento no rúmen. A resposta é avaliada geralmente pelo aumento do desaparecimento da matéria seca ou do desaparecimento da fibra em detergente neutro de forrageiras suplementadas com enzimas. Acredita-se que enzimas exógenas consigam tornar a fibra solúvel ou o alimento mais disponível ao ataque dos micro-organismos do rúmen¹. Algumas das variabilidades associadas ao uso de enzimas exógenas nas dietas de bovinos estão relacionadas à suplementação com insuficiente ou excessiva quantidade de enzimas.

O ótimo nível enzimático depende do substrato. Em pesquisa utilizando diferentes taxas de aplicação de enzimas em feno de alfafa, silagem de milho e grãos de milho observou-se diferentes respostas. Com feno de alfafa, verificou-se redução no teor da fibra com adição de baixo nível enzimático, sem nenhuma alteração observada com altas taxas de aplicação. Quando enzimas exógenas são aplicadas em quantidades elevadas, o rompimento da estrutura superficial dos alimentos diminuiu porque o excesso de enzima pode restringir a adesão microbiana ao alimento, diminuindo sua degradação¹.

CONCLUSÕES

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* é um produtor de enzimas fibrolíticas de interesse na alimentação de ruminantes. As enzimas do complexo celulolítico apresentaram atividades na faixa de temperatura e pH observados no rúmen. As enzimas, nos três níveis testados, não aumentaram a DIVMS do feno de Coast-Cross, mas exerceram efeitos significativos sobre a degradação, após períodos prolongados de incubação ruminal.

REFERÊNCIAS

- BEAUCHEMIN, K. A. ET AL. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K. M. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461 – 488, 2000.
- MARTINS, A. D. S.; VIEIRA, P. D. F.; BERCHIELLI, T. T. Degradabilidade in situ e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n. 6, p. 1927-1936, 2007.
- OLIVEIRA, G.S.; ULHOA, C. J.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FARIA, F. P. An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 19-26, 2013.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>.