

M
S
C
M
S
C



Potencial de um extrato rico em enzimas obtido por fermentação sólida da dreche em rações para robalo (*Dicentrarchus labrax*)

Nelson Augusto Silva Fernandes

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Recursos Biológicos Aquáticos
2019

MSc

2.^o
CICLO

FCUP
2019



Potencial de um extrato rico em enzimas obtido por fermentação sólida da dreche em rações para robalo (*Dicentrarchus labrax*)

Nelson Augusto Silva
Fernandes



M
S
C

**Potencial de um extrato
rico em enzimas obtido
por fermentação sólida
da dreche em rações
para robalo
(*Dicentrarchus labrax*)**

Nelson Augusto Silva Fernandes

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

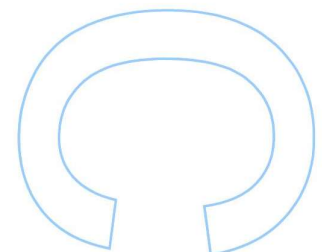
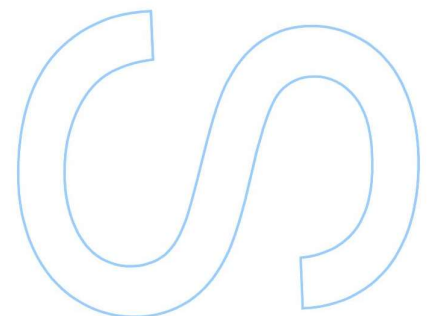
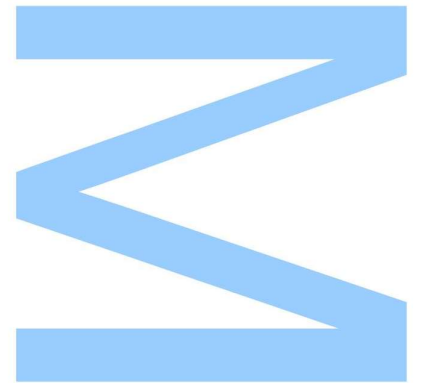
2019

Orientador

Doutora Carolina Castro, Investigadora, CIIMAR

Coorientador

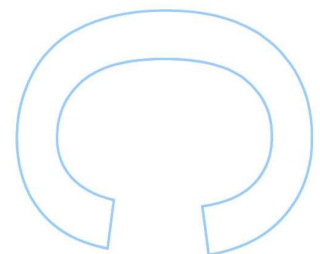
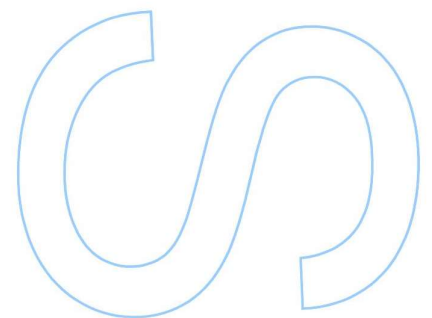
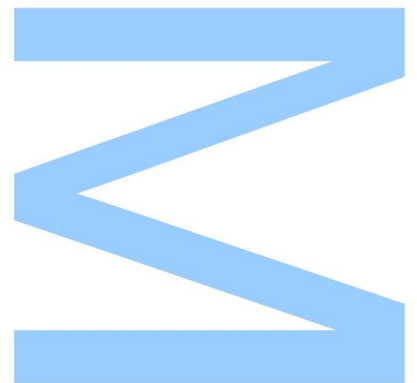
Doutora Helena Peres, Investigadora, CIIMAR





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Não posso deixar de agradecer a todos aqueles que fizeram com que este trabalho fosse possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Dr^a Helena Peres por me ter aceite no seu grupo, pela sua excelente orientação, apoio e conhecimento científico, o que me permitiu fazer parte desta experiência, enriquecedora a todos os níveis.

Um agradecimento muito especial e efusivo à minha orientadora, Dr^a Carolina Castro, pela sua disponibilidade e generosidade na partilha de conhecimentos. Seu imenso conhecimento científico, excelente orientação e incentivo contínuo foram essenciais para a realização desta tese.

Gostaria também de agradecer aos colegas da Universidade do Minho, em especial à Dr^a Helena Fernandes, pela simpatia e disponibilidade para ajudar sempre que foi necessário.

Ao Sr. Pedro, pela partilha de conhecimentos da sua vasta experiência, apoio e ajuda incansável na parte técnica e prática do trabalho.

Ao grupo NUTRIMU, assim como aos meus colegas de mestrado e todos os que trabalharam comigo nestes meses e, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Não teria sido possível chegar ao final desta dissertação sem a valiosa dedicação e amor da minha família. Um agradecimento especial aos meus pais e irmã, que sempre me apoiaram, incondicionalmente, me incentivaram a seguir os meus sonhos e a acreditar nas minhas capacidades.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos programas financiadores deste trabalho: Programa Operacional Mar2020, Portugal 2020, no âmbito do projeto InovFeed (ref. MAR-02.01.01-FEAMP-0111) e da operação BioTecNorte (NORTE-01-0145-FEDER-000004) financiado pelo fundo de desenvolvimento regional europeu (ERDF) no âmbito do Norte2020 - Programa Operacional Regional do Norte; Projeto SPO3, referência POCI-010145-FEDER-030377, financiado pelo ERDF e Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) Portuguesa.

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
dos Assuntos Marítimos
e das Pescas

Resumo

A crescente procura de peixe associada à diminuição das populações selvagens de pescado devido à sobrepesca, tem-se refletido num forte potencial de crescimento da indústria da aquacultura à escala mundial.

No entanto, o desenvolvimento sustentável desta atividade está fortemente limitado pelo facto de as rações para peixe dependerem substancialmente da inclusão de farinha de peixe (FP) e óleo de peixe (OP).

Até ao momento, do ponto de vista ambiental e económico, as matéria-primas vegetais (MPV) como a farinha de soja, milho e glúten de trigo, têm-se apresentado como as alternativas mais viáveis ao uso FP e OP nas rações para peixes. Contudo, a presença de fatores anti nutricionais na maioria desses ingredientes, interfere na aceitação da ração e no desempenho animal, prejudicando o metabolismo e a digestão. Estas desvantagens do ponto de vista nutricional podem limitar o uso das MPV nas rações para peixes, particularmente para espécies carnívoras marinhas, como o robalo (*Dicentrarchus labrax*), uma vez que estas estão metabolicamente adaptadas a dietas com baixos níveis de hidratos de carbono.

O uso de exoenzimas como aditivos alimentares para melhorar a digestibilidade dos nutrientes de alimentos à base de MPV tem sido amplamente investigado em aves e suínos. Na aquacultura, o uso da fitase para melhorar a utilização do fósforo emergiu com bastante facilidade. No entanto, apesar de seus efeitos promissores na melhoria da digestibilidade dos nutrientes pela hidrólise dos polissacarídeos não amiláceos (PNA) presentes nas matérias-primas de origem vegetal, o uso de carbohidrases não tem sido tão comum em espécies aquáticas.

O recurso ao uso de exoenzimas obtidas por processos biotecnológicos (ex: fermentação em estado sólido, FES) económicos e amigos do ambiente é uma abordagem inovadora e pouco explorada no contexto de aquacultura.

Neste sentido, o trabalho experimental desta tese teve como objetivo avaliar o potencial do uso de exoenzimas (celulase e xilanase) produzidas através do processo de FES em dietas ricas em MPV para robalo (*Dicentrarchus labrax*).

Foram formuladas três dietas isoproteicas (48% de proteína) e isolipídicas (16% de lipídios) com 15% de produtos provenientes da pesca (farinha de peixe e concentrado de proteína de peixe), 5% de hemoglobina e 61% de MPV (glúten de trigo, soja, trigo, farelo de arroz, girassol, colza). Em todas as dietas, o OP foi a principal fonte lipídica.

As dietas foram semelhantes nos teores de amido (10%), hemicelulose (2,4%), celulose (1,6%) e lignina (2,3%). Foi formulada uma dieta controlo sem conter o extrato. As duas restantes dietas foram formuladas de forma semelhante à dieta controlo, mas suplementadas com extrato enzimático a 0,1% e 0,4% obtido após FES da dreche com *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 (Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal). Este extrato foi uma combinação de celulase (1343 U g^{-1}) e xilanase (15885 U g^{-1}).

Foram realizados ensaios de crescimento e digestibilidade durante 8 semanas com 9 grupos de 15 juvenis de robalo, com peso corporal médio de $22 \pm 0,01 \text{ g}$ para avaliar crescimento, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade dos nutrientes no robalo.

Os efeitos mais relevantes da suplementação das exoenzimas, neste trabalho, estão relacionados com o aumento da digestibilidade da matéria seca e energia, não se verificando alterações significativas na digestibilidade da proteína. Verificou-se também que a suplementação com o extrato enzimático se traduziu em melhores eficiências alimentares suportando a hipótese que as exoenzimas aumentaram a disponibilidade dos nutrientes. O aumento da eficiência alimentar foi acompanhado por uma ligeira redução do alimento ingerido, o que se traduz a longo-prazo numa diminuição do custo da alimentação. No entanto, o aumento da eficiência alimentar não se traduziu numa melhoria significativa nos valores de crescimento e retenção de azoto e energia. Sendo assim, o desempenho dos peixes ao nível do crescimento, não foi afetado pelos níveis de inclusão das enzimas. A suplementação do extrato enzimático também não teve efeitos na composição corporal.

Os resultados positivos deste estudo, ao nível da digestibilidade de nutrientes demonstraram existir viabilidade para a utilização do extrato enzimático produzidos pela fermentação da dreche, através do processo FES, em rações à base de MPV para robalo. Desta forma, espera-se que a informação obtida neste estudo seja relevante para a formulação de rações à base de MPV, contribuindo, assim, para o desenvolvimento sustentável da aquacultura.

Palavras-chave: Aquacultura, robalo, dreche, matérias-primas vegetais (MPV), fermentação em estado sólido (FES), exoenzimas, digestibilidade, crescimento

Abstract

Growing fish demand coupled with declining wild fish stocks, due to overfishing, has been reflected in the strong growth potential of the aquaculture industry worldwide.

However, the sustainable development of this activity is strongly limited by the fact that fish feeds depend substantially on the inclusion of fishmeal (FM) and fish oil (FO).

So far, from an environmental and economic point of view, plant feedstuffs (PF) such as soy flour, corn and wheat gluten have been presented as the most viable alternatives to the use of FM and FO in fish feed. However, the presence of anti-nutritional factors in most of these ingredients, interferes with feed acceptance and animal performance, impairing metabolism and digestion. These nutritional disadvantages may limit the use of PF in fish feed, particularly for marine carnivorous species such as sea bass (*Dicentrarchus labrax*), as they are metabolically adapted to diets with low levels of carbohydrates.

The use of exogenous enzymes as food additives to improve nutrient digestibility of plant-based feed has been widely researched in poultry and pigs. In aquaculture, the use of phytase to improve phosphorus utilization emerged quite easily. However, the use of carbohydrases has not been so common in aquatic species, despite their promising effects on improving nutrient digestibility by hydrolysis of non-starch polysaccharides (NSP) present in plant-based raw materials.

The use of cost-effective, environmentally friendly exogenous enzymes obtained from biotechnological processes (eg solid state fermentation, SSF) is an innovative approach and little explored in the context of aquaculture.

In this sense, the experimental work of this thesis aimed to evaluate the potential use of exogenous enzymes (cellulase and xylanase) produced by SFF process in diets rich in PF for sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

Three isoproteic (48% protein) and isolipid (16% lipid) diets were formulated with 15% fish products (fishmeal and fish protein concentrate), 5% haemoglobin and 61% plant foods (gluten), wheat, soy, wheat, rice bran, sunflower, rapeseed). In all diets, FO was the main lipid source. Diets were similar in starch (10%), hemicellulose (2.4%), cellulose (1.6%) and lignin (2.3%) contents. A control diet was performed without containing the extract. The remaining two diets were formulated similarly to the control diet but supplemented with 0.1% and 0.4% enzymatic extract obtained after SSF from brewer spent grain (BSG) with *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 (University of Minho Micoteca,

Braga, Portugal) as enzyme production. This extract was a combination of cellulase (1343 U g⁻¹) and xylanase (15885 U g⁻¹).

Growth and digestibility trials were performed simultaneously for 8 weeks with 9 groups of 15 sea bass juveniles, with an average body weight of 22±0.01 g to evaluate growth, feed intake, feed efficiency and nutrient digestibility in sea bass.

The most relevant effects of exogenous enzyme supplementation in this work are related to the increased digestibility of dry matter and energy, with no significant changes in protein digestibility. It was also found that supplementation with enzyme extract resulted in better feed efficiencies supporting the hypothesis that exogenous enzymes increased nutrient availability. Increased feed efficiency was accompanied by a slight reduction in feed intake, which translates into a reduction in the cost of feed. However, increased feed efficiency was not reflected in a significant improvement in the values of growth and retention of nitrogen and energy. Therefore, fish performance at growth level was not affected by enzyme inclusion levels. Enzyme extract supplementation also had no effect on body composition.

The positive results of this study in terms of nutrient digestibility demonstrated the existence of viability for the use of enzyme extract produced by fermentation of BSG, through the SSF process, in diets rich in PF for European seabass. Thus, it is expected that the information obtained in this study will be relevant to the formulation of feeds based on PF, thus contributing to the sustainable development of aquaculture.

Keywords: Aquaculture, European seabass, brewer's spent grain, plant feedstuffs; solid state fermentation (SSF), exogenous enzymes, digestibility, growth

Divulgação Científica

Parte do trabalho desenvolvido no âmbito desta tese foi apresentado sob a forma de poster numa conferência internacional “Aquaculture Europe 2019” em Berlim, Alemanha.

Fernandes H., Moyano, F.J., Fernandes, N., Salgado, J., Aires, T., Belo, I., Oliva-Teles, A., Peres, H., Castro, C. 2019. *In Vitro* evaluation of the interaction between exogenous carbohydrases produced by solid-state fermentation of brewer’s spent grain and digestives enzymes. Aquaculture Europe 2019, Berlim, Alemanha. 7-10 Outubro, 2019

O resumo elaborado para esta Conferência está disponível pág. 67-68 na secção Anexo.

Índice

Divulgação Científica.....	5
1. Introdução	11
1.1 Sustentabilidade da aquacultura vs formulação das dietas	11
1.2 Fermentação em estado sólido (FES).....	19
1.2.1. Vantagens da FES.....	21
1.3 – Dreche	21
1.4 – Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>): caraterísticas, biologia e necessidades nutricionais.....	25
1.5 – Substituição de FP e OP por MPV – revisão da literatura	28
2. Material e métodos	30
2.1 Microorganismo e substrato	30
2.2 FES da dreche e obtenção do extrato enzimático.....	30
2.3 Determinação da atividade enzimática	30
2.4 Dietas experimentais.....	31
2.5 Ensaio de crescimento e de digestibilidade	33
2.6 Determinação da composição das dietas, ingredientes, fezes e carcaças .	34
2.6.1 Humidade	34
2.6.2 Cinzas	34
2.6.3 Proteína Bruta	34
2.6.4 Lípidos	34
2.6.5 Energia bruta.....	35
2.6.6 Óxido de crómio.....	35
2.6.7 Polissacarídeos não amiláceos e amido	35
2.7 Determinação da digestibilidade aparente	35
2.8 Análise Estatística.....	35
3. Resultados	36
3.1 – Atividade enzimática	36

3.2 – Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA)	36
3.3 – Crescimento e utilização de nutrientes	36
3.4 – Composição corporal	37
Discussão	38
Conclusão	44
Bibliografia	45
Anexos	61

Índice de Figuras

Fig. 1 – Captura anual de pescado e produção de aquacultura, em milhões de toneladas.	11
Fig. 2 – Crescimento da população mundial vs Consumo de peixe per capita.	12
Fig. 3 – Processo de obtenção da dreche cervejeira a partir dos grãos de cevada ...	22
Fig. 4 – Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>).	25
Fig. 5 – Evolução da produção do robalo de Aquacultura.....	26
Fig. 6 – Sistema ensaio digestibilidade: a. perspetiva geral dos 12 tanques; b. coluna de sedimentação; c. recolha de fezes.....	34

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição de ingredientes de origem vegetal (% matéria seca, MS) utilizados em dietas para peixes.....	14
Tabela 2 – Efeitos de exoenzimas em várias espécies de peixes alimentados com ração à base de ingredientes vegetais.....	16
Tabela 3 – Composição química da dreche.....	23
Tabela 4 – Ingredientes e composição química das dietas experimentais.....	32
Tabela 5 – Coeficiente da Digestibilidade Aparente (CDA) das dietas experimentais.	36
Tabela 6 – Crescimento e eficiência alimentar do robalo alimentado com as dietas experimentais	37
Tabela 7 – Composição corporal (% peso fresco), valor energético, índice hepatossomático e índice visceral do robalo alimentado com as dietas experimentais	37

Índice de Abreviaturas

AAE – Aminoácidos Essenciais	PCM – Peso Corporal Médio
AGE – Ácidos Gordos Essenciais	PD – Proteína Digestível
AGPI – Ácidos Gordos Polinsaturados	PMI – Peso Médio Inicial
AI – Alimento Ingerido	PMF – Peso Médio Final
CEP – Coeficiente Eficácia Proteica	PNA – Polissacarídeo Não Amiláceo
CTR – Controlo	RA – Retenção Azotada
DHA – Docosahexanóico	RE – Retenção Energética
ECA – Eficiência Conversão Alimentar	TCE – Taxa de Crescimento Específico
EED – Extrato Enzimático da Dreche	
ED – Energia Digestível	
EIC – Energia Inicial da Carcaça	
EFC – Energia Final da Carcaça	
EPA – Eicosapentanóico	
EPM – Erro Padrão Médio	
FAN – Fatores Antinutricionais	
FES – Fermentação em Estado Sólido	
FP – Farinha de Peixe	
GPD – Ganho de Peso Diário	
IHS – Índice Hepatosomático	
IV – Índice Visceral	
MS – Matéria Seca	
NIC – N Inicial da Carcaça	
NFC – N Final da Carcaça	
OP – Óleo de Peixe	
PCB – Bifenilos Policlorados	

1. Introdução

1.1 Sustentabilidade da aquacultura vs formulação das dietas

A aquacultura é considerada a indústria com maior e mais rápido crescimento na produção de alimentos, tendo contribuído em 2017 com cerca de 111 milhões de toneladas de produção de organismos aquáticos (inclui peixe, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas) (FishStatJ, 2019). Atualmente, cerca de 50% do peixe para consumo humano é fornecido através da aquacultura (FAO, 2018). A incapacidade da produção proveniente das capturas por pesca em satisfazer as necessidades mundiais de pescado, bem como o crescente reconhecimento dos benefícios destes produtos na alimentação humana, levou a este aumento significativo da produção de pescado através de aquacultura (Figura 1). O peixe representa não só uma valiosa fonte de proteína de elevada qualidade e micronutrientes, mas também de ácidos gordos ómega-3 de cadeia longa, reconhecidos pelos seus benefícios num vasto conjunto de patologias humanas, nomeadamente doenças cardiovasculares, inflamatórias e neurológicas (Tocher, 2015).

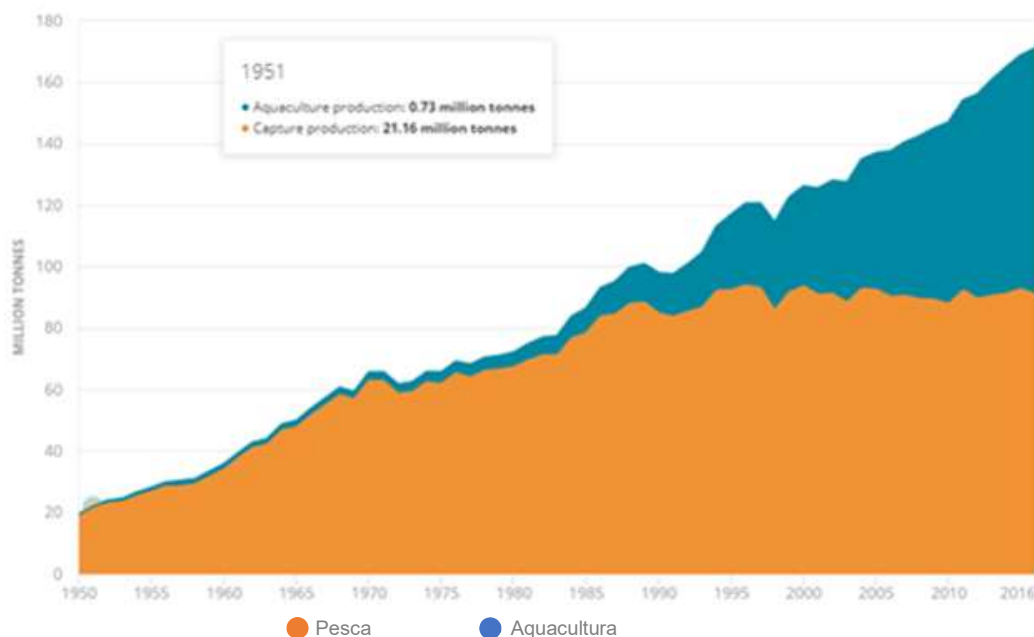


Fig. 1 – Captura anual de pescado e produção de aquacultura, em milhões de toneladas. Adaptado de FAO, 2018

Em linha com o mencionado anteriormente, entre 1961 e 2016, o aumento médio anual do consumo mundial de peixe (3,2%) ultrapassou o crescimento da população humana

(1,6%) e superou em 2,8% o consumo de carne de todos os animais terrestres (FAO, 2018). Em termos de consumo *per capita*, o consumo de peixe aumentou de 9,0 kg em 1961 para 20,3 kg em 2016 (FAO, 2018) (Figura 2).

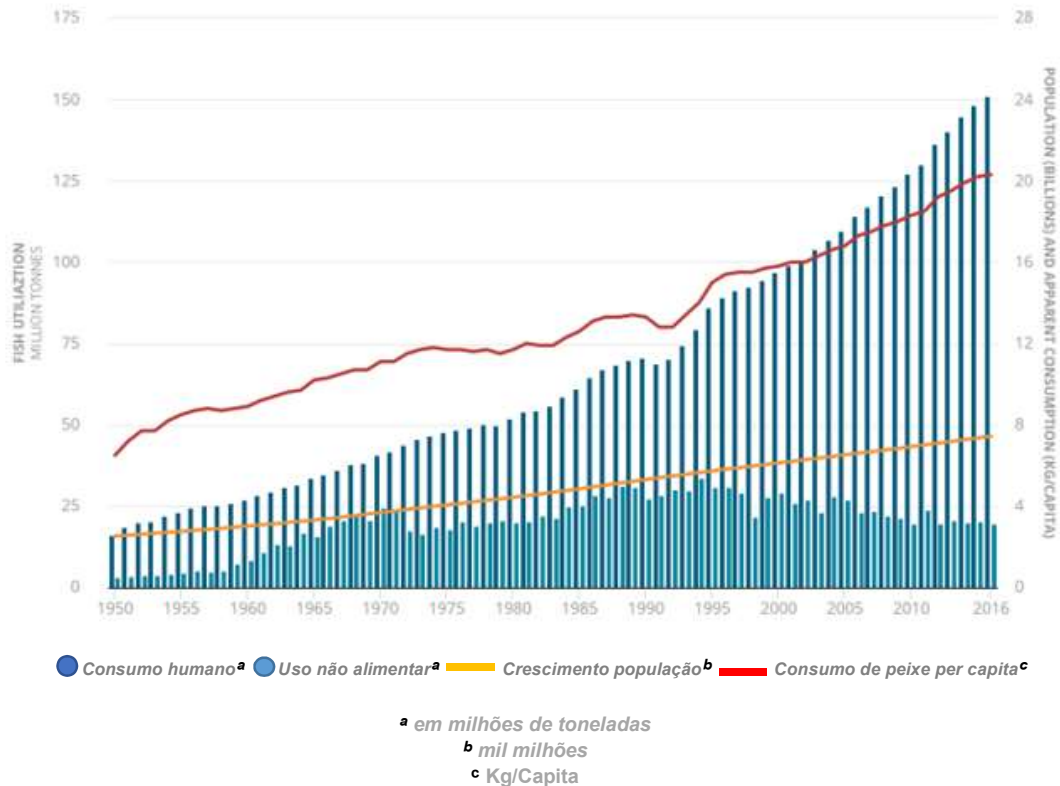


Fig. 2 – Crescimento da população mundial vs Consumo de peixe per capita. Adaptado de FAO, 2018

De acordo com os dados da FAO (2018), em 2015, 17% da proteína animal consumida pela população mundial teve origem no consumo de peixe.

Os dados acima apresentados são reveladores da importância que a aquacultura tem vindo a adquirir no panorama do abastecimento alimentar mundial.

Contudo, o aumento da produção da aquacultura está fortemente dependente do aumento da produção de rações. Por sua vez, a formulação das rações está também dependente da FP e OP como fontes principais de proteína e lípidos, particularmente em espécies de peixe carnívoras de níveis tróficos superiores (ex: salmonídeos, peixes planos marinhos, etc).

O elevado custo da FP e OP, derivado em grande medida da sobre-exploração dos recursos pesqueiros e crescente procura no mercado, tem gerado fortes restrições no

uso destas matérias-primas nas rações para aquacultura (Oliva-Teles et al., 2015). A procura de fontes de proteína e lípidos alternativas à FP e OP tornou-se, por isso, uma prioridade para o desenvolvimento sustentável da aquacultura (Hardy, 2010; Hassaan et al., 2015; Novelli et al., 2017). Do ponto de vista de segurança ambiental e custo de produção, as MPV representam as alternativas mais sustentáveis à FP e OP atualmente disponíveis no mercado (NRC, 2011; Olsen & Hasan, 2012; Oliva-Teles et al., 2015). Para além disso, asseguram maior segurança alimentar, ao reduzirem a probabilidade de introdução de contaminantes como bifenilos policlorados (PCB) e dioxinas, muitas vezes associados ao uso de FP e OP nas rações (Naylor et al, 2009).

No que diz respeito ao uso de MPV como fonte de proteína, a sua substituição total por FP tem mostrado ser exequível em rações para espécies de peixes de níveis tróficos inferiores (NRC, 2011; Magalhães et al., 2016). No entanto, no caso de espécies de peixe de níveis tróficos superiores, níveis de substituição de FP acima dos 75% constitui ainda um desafio (Naylor et al., 2009; NRC, 2011; Oliva-Teles et al., 2015).

De fato, a FP é uma matéria-prima altamente digerível e uma excelente fonte de proteína, com alto valor biológico, um equilíbrio ideal de aminoácidos essenciais, rico em ácidos gordos insaturados e com alta palatabilidade (Gatlin et al., 2007). Pelo contrário, a maioria das MPV utilizadas (tais como soja, o trigo, a ervilha, a colza, o glúten de trigo, etc) apresentam algumas limitações, nomeadamente um perfil de aminoácidos e ácidos gordos desequilibrados, elevado teor de amido e presença de uma diversidade de fatores antinutricionais (FAN) (inibidores de proteases, lectinas, saponinas, PNA, fitato-P) (Kousoulaki et al., 2015; Martin & Kroll, 2017), conforme demonstrado em alguns exemplos na tabela 1. Entre os FAN, os PNA - grupo heterogéneo de polissacarídeos (ex: celulose, hemicelulose, lenhina, etc) compostos predominantemente por várias unidades de hexoses e pentoses (ex: galactose, glicose, arabinose, xilose e manose) - têm ganho particular preocupação, nomeadamente pelo seu impacto negativo na digestão, absorção e utilização dos nutrientes (van Barneveld, 1999; Sinha et al., 2011). Esta desvantagem do ponto de vista nutricional está associada à inexistência nos peixes carnívoros de uma maquinaria enzimática e microbiota capazes de degradar os PNA (Krogdahl et al., 2005; Liu et al., 2016; Villasante et al., 2019).

Para além do impacto negativo no aproveitamento dos nutrientes das MPV e, consequentemente a níveis mais elevados de excreção para o meio ambiente (Naylor

et al., 2009), os FAN, em geral, provocam também alterações na fisiologia intestinal (Martin & Kroll, 2017), comprometendo o desempenho e saúde dos peixes.

Tabela 1 – Composição de ingredientes de origem vegetal (% matéria seca, MS) utilizados em dietas para peixes (Feedipedia, 2019). Adaptado de Sinha et al., 2011.

Ingredientes	PNA		
	Lenhina	Celulose	Hemicelulose
Cereais			
Grão de cevada	1,1	5,3	15,3
Grão de milho	0,6	2,4	9,2
Farelo de milho	2,2	12,3	29,7
Grão de trigo	1,1	2,5	10,3
Farelo de trigo	3,8	9,6	31,8
Grão de centeio	1,1	2,1	9,89
Farelo de centeio	2,0	6,3	20,7
Farelo de aveia	2,9	1,8	11,1
Glúten de milho	1,2	9,4	29,0
Leguminosas			
Sementes de ervilha	0,4	6,6	7,2
Sementes de tremçoço	1,2	18,5	4,6
Oleaginosas			
Sementes de soja	1,2	7,7	13,2
Linhaça	5,0	5,3	11,4
Sementes de girassol	6,3	13,2	10,1
Sementes de algodão	10,6	25,5	12,5
Colza	9,5	10,9	10,7

PNA: Polissacarídeo não amiláceo

De forma a promover uma melhoria na composição nutricional das MPV e minimizar os efeitos adversos associados à utilização destas nas rações para peixes, diversas estratégias têm sido exploradas (Gatlin et al., 2007; Naylor et al., 2009; NRC, 2011; Olsen & Hasan, 2012). A aplicação de técnicas de processamento como extrusão, extração de álcool ou aquosa, tratamento enzimático (Drew et al, 2007) ou modificação genética tem sido eficaz na redução ou eliminação dos efeitos negativos dos FAN, ao melhorar a digestibilidade da proteína e energia de algumas MPV. Em alguns casos, é removida uma grande quantidade de FAN, como por exemplo o gossipol, composto

polifenólico tóxico presente na semente de algodão (Anderson et al., 2006), que pode ser reduzido através da reprodução seletiva tradicional ou com recurso a ferramentas de manipulação genética. No entanto, em muitos casos, concentrações consideráveis de FAN são mantidas mesmo após o processamento (Oliva-Teles et al., 1994; Venou et al., 2003, 2006; Barrows et al., 2007; Kokou et al., 2012, 2015), afetando assim o desempenho dos animais e aumentando a excreção de nutrientes (Kokou & Fountoulaki, 2018).

Enquanto estas estratégias mostraram melhorar a digestibilidade da proteína e energia de algumas MPV, a digestibilidade de muitas outras matérias-primas permanece baixa. A reduzida atividade enzimática, bem como a falta de um microbiota bem desenvolvido no trato digestivo de peixes carnívoros são possíveis causas para este baixo aproveitamento de nutrientes presentes em matérias-primas de origem vegetal. Em peixes e outros animais monogástricos, enzimas como β -glucanases ou β -xilanases que digerem os PNA são escassas ou inexistentes (Kuz'mina, 1996; Sinha et al., 2011), e, por isso, não conseguem digerir e utilizar os PNA como fonte de energia. Daí a necessidade do uso das exoenzimas nas formulações das rações para monogástricos, com o intuito de promover um melhor aproveitamento dos nutrientes presentes nos alimentos, uma vez que, de acordo com Choct (2006) as exoenzimas, podem aumentar a disponibilidade dos nutrientes, levando a uma maior eficiência na utilização dos alimentos.

O uso destas enzimas como aditivos alimentares tem sido investigado extensivamente em aves e suínos como forma de reduzir os efeitos negativos dos PNA e do fitato-P, aumentando assim a utilização de hidratos de carbono e fósforo, respetivamente (Adeola e Cowieson, 2011).

Atualmente, este tipo de enzimas já começou a ser testado em peixes, tendo já demonstrado efeitos positivos na digestibilidade dos nutrientes e crescimento, em espécies como a dourada (*Sparus aurata*) (Kokou et al., 2012), o robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*) (Ai et al., 2007) a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ogunkoya et al., 2006; Farhangi & Carter, 2007; Dalsgaard et al, 2012) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Carter et al., 1994).

As exoenzimas mais utilizadas na alimentação animal são a β -xilanase e a β -glucanase. Outras enzimas disponíveis no mercado incluem as celulases, hemicelulases, fitases, proteases, α -amílase, β -mananase; α -galactosidade e pectinase (Adeola & Cowieson, 2011). Na tabela 2, são apresentados alguns dos efeitos do uso de exoenzimas a nível de digestibilidade dos nutrientes e desempenho de peixes alimentados com rações à base de MPV.

Tabela 2 – Efeitos de exoenzimas em várias espécies de peixes alimentados com ração à base de ingredientes vegetais. Adaptado de Castillo & Gatlin, 2015.

Espécie	Nível trófico	Enzima (s)	Nível de inclusão	Subproduto vegetal	Efeitos	Ref ^a Bibliográfica
Salmão Atlântico, <i>Salmo salar</i>	4,5±0,3	Mix enzimático (tripsina, protease, amiloglucosidase, amilase e celulase)	10 g/Kg dieta (mix)	Farinha de soja	Aumento do consumo da ração, do peso e da taxa de crescimento; melhor eficiência alimentar	Carter et al. (1994)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	4,1±0,3	Superzyme CS (xilanase, amilase, celulase, protease e β-glucanase)	1-2,5 g/Kg (Superzyme CS)	Farinha de soja	Sem efeitos no crescimento e ligeiro efeito na digestibilidade dos nutrientes	Ogunkoya et al. (2006)
Robalo japonês, <i>Lateolabrax japonicus</i>	3,1±0,3	Mix enzimático (fitase, glucanase, pentosanase, celulase e xilanase)	0,2 g/Kg (fitase) 0,4 g/Kg (glucanase, pentosanase e celulase) 0,8 g/Kg (xilanase)	Farinha de soja, colza e amendoim	Melhoria significativa da taxa de crescimento e eficiência alimentar; Aumento substancial da retenção de fósforo e azoto	Ai et al. (2007)
Tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i> × <i>O. aureus</i>	2,0	Cocktail enzimático (protease, β-glucanase e xilanase)	1-1,5 g/Kg (mix)	Farinha de soja, colza e semente de algodão	Aumento significativo da taxa de crescimento, eficiência alimentar e digestibilidade da matéria seca; redução no consumo da ração; Aumento significativo da produção de enzimas digestivas endógenas	Lin et al. (2007)
Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	2,0	Celulase	1-5 g/kg (celulase)	Farinha de Canola	Sem efeitos no crescimento e digestibilidade dos nutrientes	Yigit & Olmez, (2011)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	4,1±0,3	RONOZYME®VP (β-glucanase) RONOZYME®WX (xilanase) Protease	0,067 g/Kg (β-glucanase) 0,208 g/Kg (xilanase) 0,228 g/Kg (protease)	Farinha de soja, semente de girassol e colza	Melhoria na digestibilidade dos nutrientes, especialmente dos lípidos. Sem efeitos no desempenho dos peixes nem na retenção azotada	Dalsgaard et al. (2012)

(Continua na página seguinte)

Tabela 2 (continuação)

Espécie	Nível trófico	Enzima (s)	Nível de inclusão	Subproduto vegetal	Efeitos	Ref ^a Bibliográfica
Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	2,0	Cocktail enzimático (pepsina, papaína e α -amilase)	3,2-6,4 g/Kg (pepsina) 6,4-12,8 g/Kg (papaína) 0,8-1,6 g/Kg (amilase)	Glúten de milho e farinha de soja	Aumento significativo na taxa de crescimento e eficiência alimentar. Melhoria dos índices hematológicos	Goda et al. (2012)
Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	2,0	RONOZYME® Hiphos (fitase) RONOZYME® ProAct (protease) RONOZYME® WX (xilanase)	0,075 g/Kg (fitase) 0,03 g/Kg (protease) 0,025 g/Kg (xilanase)	--	Melhoria no crescimento, eficiência alimentar; sem efeitos nos índices somáticos	Adeoye et al. (2016)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	4,1±0,3	Mix enzimático (fitase, celulase, pectinase)	0,33-1 g/Kg	Farinha de canola, farinha de soja, glúten de milho	Sem efeitos no crescimento, eficiência alimentar e digestibilidade dos nutrientes	Yigit & Keser (2016)
Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	2,0	Extrato enzimático (fitases e proteases)	0,25 g/Kg (fitase) 1 g/Kg (protease)	Farinha de soja	Melhoria na digestibilidade dos nutrientes; melhoria na biodisponibilidade de fósforo, magnésio e cálcio	Novelli et al. (2017)
Pregado, <i>Scophthalmus maximus</i>	4,4	Synergen™ (FES de <i>A. niger</i>) Naturgrain®TS (xilanase e celulase)	0,4 g/Kg (Synergen) 0,4 g/Kg (Naturgrain)	DDGS de milho, farinha de soja, glúten de milho e glúten de trigo	Melhoria na digestibilidade da matéria seca; aumento da riqueza e diversidade do microbiota; aumento da atividade das enzimas digestivas; Naturgrain mais eficiente no aumento da digestibilidade dos nutrientes	Diógenes et al. (2018)
Robalo, <i>Dicentrarchus labrax</i>	3,5±0,5	Synergen™ (FES de <i>A. niger</i>) Naturgrain®TS (xilanase e celulase)	0,2-0,4 g/Kg (Synergen) 0,2-0,4 g/Kg (Naturgrain)	Farinha de soja, glúten de milho, glúten de trigo, trigo e proteína de ervilha isolada	Melhoria na digestibilidade dos nutrientes (mais eficaz com Naturgrain)	Magalhães et al. (2018)
Dourada, <i>Sparus aurata</i>	3,7	Naturgrain®TS (xilanase e celulase)	1 g/Kg (Naturgrain)	Farinha de soja, glúten de trigo e farinha de trigo	Sem efeitos no crescimento; aumento da eficiência alimentar; redução do stress oxidativo hepático	Diógenes et al. (2019)

Contudo, em aquacultura, a suplementação de dietas com exoenzimas tem-se focado sobretudo no uso de fitases como forma de aumentar a biodisponibilidade/utilização de fósforo das dietas à base de ingredientes vegetais. As carbohidrases, embora menos exploradas em rações para peixes (Adeola & Cowieson, 2011), apresentam, no entanto, um enorme potencial de crescimento no mercado de suplementação animal. Para além de promoverem a hidrólise dos PNA, um dos mais importantes benefícios associados à suplementação com carbohidrases prende-se com a redução da viscosidade do conteúdo digestivo induzido pelos PNA. O aumento da viscosidade intestinal induzida pelos PNA, tem sido associado a uma redução na absorção e utilização de nutrientes (Choct, 1997, 2001; Sinha et al., 2011), à diminuição da digestibilidade dos aminoácidos e lípidos (Refstie et al., 1999; Sinha et al., 2011), ao aumento da fermentação intestinal e do conteúdo de matéria seca (Leenhowers et al., 2006; Sinha et al., 2011) o que leva ao acumular de partículas propícias à adesão microbiana, promovendo a proliferação de bactérias nocivas (Vahjen et al., 1998). Ao reduzir a viscosidade intestinal, a suplementação com carbohidrases reverte esses efeitos negativos, promovendo o crescimento de bactérias benéficas e melhorando a utilização dos nutrientes (Vahjen et al., 2007), a saúde intestinal e global do animal (Adeola & Cowieson, 2011).

Os estudos relativos ao uso de exoenzimas em dietas para peixes têm-se centrado principalmente no uso de enzimas ou mistura de enzimas purificadas disponíveis comercialmente (ex: Synergen®, Natugrain®TS, FARMAVET (TR)) obtidos principalmente por processos biotecnológicos como a fermentação submersa ou FES. A maioria destas soluções comerciais são atualmente bastante dispendiosas. Neste sentido, torna-se necessário explorar formas alternativas (ex: processos biotecnológicos, organismos, matérias-primas e subprodutos agro-industriais) para a obtenção de enzimas a baixo-custo e de forma sustentável. Estudos como o de Novelli et al. (2017) suportam a produção de enzimas, através da FES, utilizando subprodutos agro-industriais como uma alternativa viável na alimentação animal, uma vez que obtiveram resultados positivos a nível da digestibilidade de nutrientes na Tilápia do Nilo.

1.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES tem sido descrita como um processo biotecnológico alternativo em que ocorre o crescimento de microrganismos em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água (Del Bianchi et al., 2001; Singhanian et al., 2010; Moura et al., 2012). No entanto, o substrato tem de ter humidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (Thomas et al., 2013; Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017).

A FES é utilizada numa ampla variedade de aplicações que vão desde o desenvolvimento de bioprocessos, como biorremediação e biodegradação de compostos perigosos à produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, incluindo micopesticidas e bioherbicidas, biossurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos e outros compostos bioativos, como por exemplo, compostos fenólicos (Singhanian et al., 2010; Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017).

A produção de enzimas através da FES tem sido uma referência para este tipo de processo, devido à grande variedade de enzimas que podem ser produzidas, possivelmente, à escala industrial, como por exemplo, pectinases, proteases, celulases, α -amilases, xilanasas, lipases e fitases (Salar et al. 2012; Dey & Kuhad, 2014; Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017).

A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato da FES na produção dessas enzimas tem gerado um interesse acrescido na utilização deste processo biotecnológico devido aos benefícios ambientais relacionados (Thomas et al., 2013) uma vez que permite a redução do custo final do produto e a implementação de uma cadeia de produtos fechada, sustentável e amiga do ambiente (Fleuri et al., 2013).

Os nutrientes presentes no substrato agroindustrial sustentam o crescimento dos microrganismos que, devido ao seu metabolismo natural, conseguem segregar enzimas, enquanto crescem no substrato sólido (Kumar & Kanwar, 2012; Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017).

Algumas das enzimas produzidas pela FES são capazes de hidrolisar as paredes celulares das plantas e, nesse processo, pode ocorrer a libertação de compostos bioativos. Nesse sentido, a FES tem sido utilizada para a produção de compostos

bioactivos com atividade antioxidante como, por exemplo, compostos fenólicos (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017).

Esta tecnologia pode ser usada com recurso a diferentes tipos de microrganismos, nomeadamente fungos e bactérias (Pandey et al., 1999; Singh et al., 2008; Carboué et al., 2016). Dadas as características metabólicas dos fungos (crescimento apical, actividade enzimática e capacidade de crescimento em meios com elevada pressão osmótica), estes são o grupo de microrganismos mais utilizado neste tipo de tecnologia (Durand, 2003). No contexto da produção de carbohidrases, fungos do género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Neocallimastix*, *Piromonas*, e *Sphaeromonas* destacam-se pela sua capacidade de produzir celulasas (Fleuri et al., 2013). As celulasas são proteínas multi-enzimáticas que se dividem em endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.176) (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) e são capazes de converter a celulose em glicose. Para isso, é necessária uma ação sinérgica destas três enzimas, através da quebra das ligações β -1,4-glicosídicas (Pérez et al., 2002; Behera & Ray, 2016). Para além de celulasas, espécies de alguns destes géneros (ex: *Aspergillus ibericus*) mostraram ter capacidade para produzir xilanases (Salgado et al., 2014). As xilanases (EC 3.2.1.8) são glicosidasas, que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas (β -1,4) convertendo o xilano em xilose (Xiangyang & Chandrakant, 2017). As celulasas e as xilanases são, por isso, enzimas capazes de quebrar ligações de hemicelulose e celulose na lenhina (Sousa et al., 2018).

A produtividade enzimática da FES, é definida pelo microrganismo e as condições de cultivo. Parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, azoto e fósforo, pH, humidade e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação e decisivos para alcançar uma boa produção de enzimas (Krishna, 2005; Singhanian et al., 2010). Resumidamente, a FES engloba diferentes etapas que vão desde um pré-tratamento, inoculação, incubação e extração a uma fase final de ultrafiltração ou liofilização.

Para além do uso da FES na produção de enzimas, o processo de fermentação ao promover uma degradação parcial ou total dos PNA e a inibição da ação de certos FAN permite aumentar o valor nutricional (teor de proteína, aminoácidos, lípidos e micronutrientes) de ingredientes como MPV e/ou subprodutos agro-industriais (Dias et al., 2016; Leite et al., 2016). Para além disso, no produto final, o microrganismo utilizado no processo de fermentação constitui, também uma fonte adicional de proteína bem

como de moléculas bioativas (ex: compostos fenólicos), com potenciais benefícios no estado imunitário e de saúde do animal (Fleuri et al., 2013; Dias et al., 2016).

1.2.1. Vantagens da FES

Uma das maiores vantagens deste método é que ao invés de produzir apenas uma enzima, permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas, específico para os substratos presentes nos alimentos/rações. Além disso, alterando a matéria-prima usada como meio de crescimento fúngico, é possível obter uma combinação enzimática final mais adequada aos ingredientes utilizados na ração (Filer, 2001). Entre outras vantagens deste processo de fermentação destacam-se:

- A alta concentração de atividade enzimática;
- Estabilidade das enzimas ao calor, no armazenamento, e com atividades enzimáticas sinérgicas;
- As condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural dos fungos filamentosos o que possibilita uma melhor adaptação dos fungos para crescer e produzir maior quantidade de enzimas (Hölker & Lenz, 2005; Castro et al., 2015; Hansen et al., 2015);
- Apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH (Singhania et al., 2010; Rodríguez Zúñiga et al., 2011).
- A FES é uma alternativa atraente à fermentação submersa, uma vez que permite um baixo consumo de água e, conseqüentemente, uma menor produção de águas residuais (Singhania et al., 2008; Ali & Zulkali, 2011);
- Uma vantagem adicional da FES, em relação às culturas submersas é o custo porque, além da simplicidade e economia do processo em termos de espaço, meio, equipamentos e energia (Mitchell et al., 2006), utiliza como matéria-prima, resíduos descartados pela indústria, causando uma diminuição no impacto ambiental (Leal et al., 2002; Pandey et al., 2007).

1.3 – Dreche

Nos últimos anos tem-se verificado uma tendência crescente para a utilização eficiente, de baixo custo e ambientalmente racional de subprodutos agrícolas e alimentares (Dulf et al., 2015).

A dreche é o subproduto mais abundante resultante da indústria cervejeira, representando cerca de 85% do total de subprodutos produzidos (Mussatto et al., 2006).

A sua utilização e valorização são cruciais dos pontos de vista económico e ambiental (Aliyu & Bala, 2011), uma vez que constitui um resíduo de uma das principais indústrias em Portugal (figura 3).

Estima-se que por cada 100 litros de cerveja fabricada, sejam produzidos cerca de 20 quilogramas de dreche (Mussatto, 2009; Gupta et al., 2010), e só na Europa são produzidos mais de 3 milhões de toneladas de dreche por ano (Faulds et al., 2009).

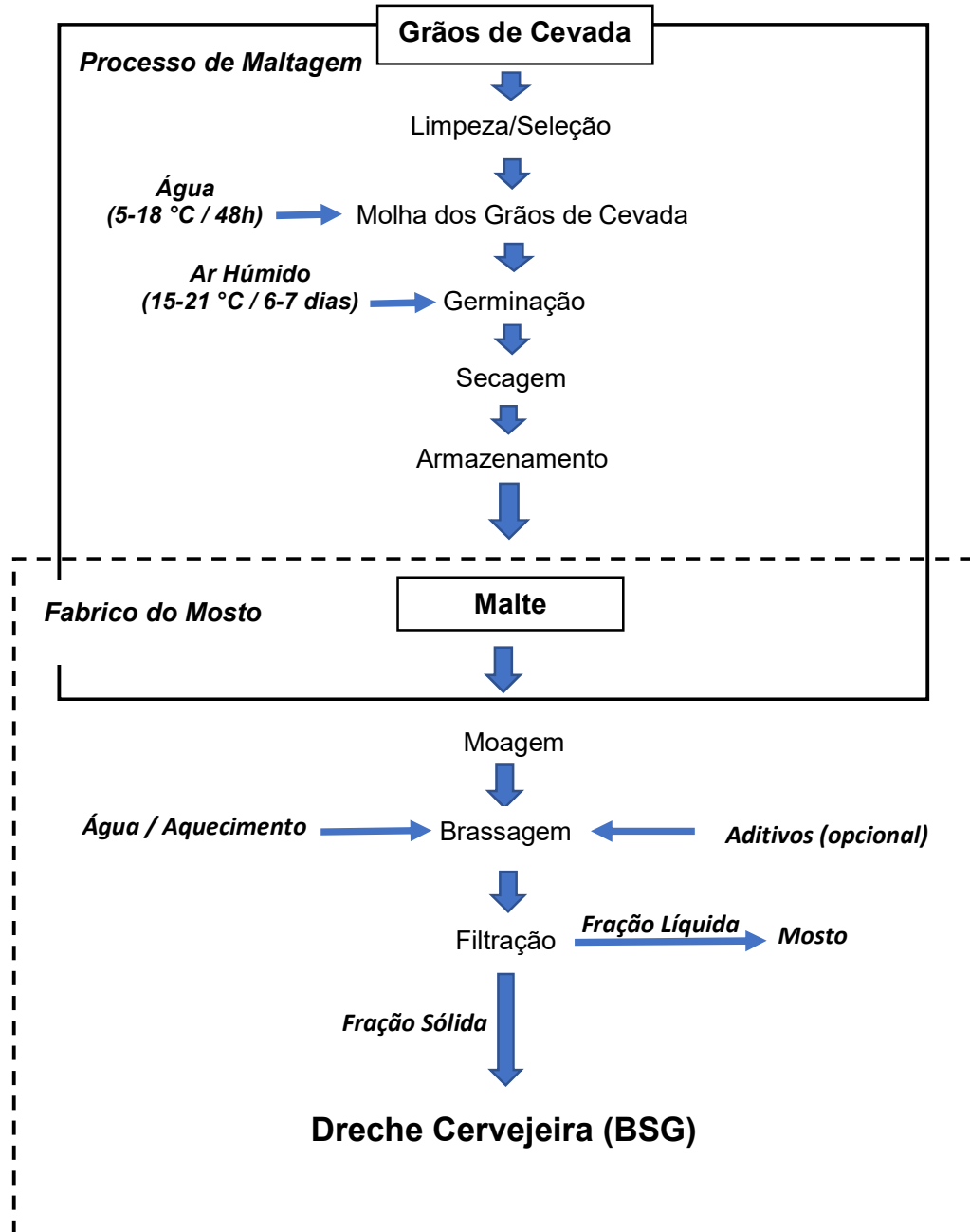


Fig. 3 – Processo de obtenção da dreche cervejeira a partir dos grãos de cevada (Adaptado de Mussatto et al., 2006)

De uma forma geral, a dreche é um material lenhinocelulósico constituído por resíduos de cereais, como a cevada, o trigo ou a aveia. Este subproduto é rico em proteínas (20%) e fibras (70%) (hemicelulose, lenhina e celulose) (Gupta et al., 2010; Lopez et al., 2010). A celulose e a hemicelulose juntas, correspondem a cerca de 50% da composição da dreche, o que significa que tem grandes quantidades de açúcares, tais como a xilose, glucose e a arabinose. Na composição da dreche fazem também parte vários minerais, tais como, cálcio, cobalto, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, selénio, sódio e enxofre. Esta também possui 10 vitaminas como a biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, riboflavina e tiamina (Mussatto, 2009; Gupta et al., 2010).

Os lípidos presentes na dreche incluem triacilglicerídeos, diacilglicerídeos, ácidos gordos, esteróides, entre outros. No que diz respeito aos aminoácidos, a leucina, valina, alanina, serina, glicina, ácido glutâmico e ácido aspártico são os que estão presentes em maiores quantidades, enquanto os aminoácidos tirosina, prolina, treonina, arginina e lisina aparecem em menores quantidades. Também estão presentes os aminoácidos cisteína, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina e triptofano (Mussatto, 2009).

A composição química da dreche varia de acordo com a variedade de cevada, época de colheita, condições de trituração, condições da maltagem e brassagem e a qualidade e o tipo de suplementos utilizados (Mussatto, 2009; Gupta et al., 2010; Lopez et al., 2010; Robertson et al., 2010).

Na tabela 3 são apresentados alguns valores da composição química da dreche, resultados dos estudos encontrados na literatura (Bartolomeu & Gomez-Cordoves, 1999; Kanauchi et al., 2001; Russ et al., 2005; Mussatto & Roberto, 2006; Faulds et al., 2008; Mussatto et al., 2008).

Tabela 3 – Composição química da dreche

Componentes (% peso seco)	Bartolomeu & Gomez- Cordoves, (1999)	Kanauchi et al. (2001)	Russ et al. (2005)	Mussatto & Roberto (2006)	Mussatto et al. (2008)	Faulds et al. (2008)
Celulose	17	25,4	23-25	16,8	16,8±0,8	-
Hemicelulose	39	21,8	30-35	28,4	28,4±2,0	18
Lenhina	4	11,9	7-8	27,8	27,8±0,3	20,1
Proteínas	24	24	19-23	15,2	-	17,6
Lípidos	6	10,6	-	-	-	5,24
Cinzas	-	2.4	4-5,5	4,6	4,6±0,2	-

Devido ao seu elevado teor de humidade (75-80%), à sua natureza orgânica e ao elevado conteúdo em açúcares fermentáveis, a dreche é um material que se degrada rapidamente à temperatura ambiente (El-Shafey et al., 2004; Robertson et al., 2010). A exposição prolongada ao ar favorece a proliferação de microrganismos, causando a perda de nutrientes e a formação de produtos tóxicos. A deterioração da dreche ocorre após um período médio de cerca de 7 a 10 dias, e em condições de temperatura mais elevada (30-40 °C) e humidade, a sua deterioração pode ocorrer em menos de uma semana (El-Shafey et al., 2004). A tendência para a proliferação de microrganismos na dreche, levanta problemas para a sua utilização como produto a nível alimentar. Assim, têm sido propostos vários métodos para estabilizar e armazenar a dreche. A preservação química, pela utilização de ácidos, tais como o láctico, fórmico, acético ou benzóico pode ser utilizada para a preservação da qualidade e do valor nutricional de dreche. Outras propostas para a preservação da dreche passam pela secagem, liofilização e congelação (El-Shafey et al., 2004; Mussatto et al., 2006; Robertson et al., 2010; Aliyu & Bala, 2011).

Apesar de a dreche ser um produto de difícil conservação à temperatura ambiente, ela apresenta na sua composição, proteína, celulose, hemicelulose e lenhina, o que valoriza a sua utilização como matéria-prima para diversas aplicações, nomeadamente:

- Alimentação animal uma vez que é fonte de azoto, como a ureia e aminoácidos essenciais;
- Biotecnologia na medida em que pode ser utilizada como substrato para o crescimento de microrganismos e para a produção de enzimas (Mussatto et al., 2006; Mussatto, 2009).

A utilização da dreche como substrato na FES é uma solução atrativa pois, devido à sua natureza lenhinocelulósica, pode ser um indutor da produção de enzimas lenhinocelulósicas.

As proteínas da dreche ou os hidrolisados de proteínas da dreche podem ser usados como agentes emulsionantes, enriquecimento nutricional dos alimentos, bem como fonte de aminoácidos nos meios de fermentação (Forssell et al., 2008).

1.4 – Robalo (*Dicentrarchus labrax*): caraterísticas, biologia e necessidades nutricionais



Fig. 4 – Robalo (*Dicentrarchus labrax*). © FAO Fishery & Aquaculture

O Robalo (figura 4), *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) é um peixe teleósteo da família Moronidae, da ordem dos Perciformes e pode ser encontrado em todo o Mediterrâneo, no mar Negro e no Atlântico Nordeste, Noruega e Senegal (Wheeler, 1975).

Sendo uma espécie eurialina e euritérmica, é capaz de viver dentro de uma ampla faixa de salinidade entre água doce e meios onde a salinidade atinge cerca de 60‰ (Varsamos, 2002); e com temperaturas mínimas e máximas estimadas em 4-6 °C (Dülger et al., 2012) e 33-35 °C (Dülger et al., 2012). Habitam águas costeiras, a uma profundidade de cerca de 100 m, mas são mais comuns em águas pouco profundas, estuários e lagoas de águas salobras, e ocasionalmente, podem ser encontrados em rios, embora a desova e eclosão ocorram no mar (Pickett & Pawson, 1994). Os ovos e as larvas migram passivamente em direção às zonas costeiras, as larvas procuram ambientes de baixa salinidade e os juvenis tendem a entrar em lagoas e zonas estuarinas (Moustakas et al., 2004). No final do período juvenil, fazem migrações esporádicas e ocasionais, antes de nadar em alto-mar e migrar para longas distâncias (Pickett & Pawson, 1994). O robalo é um predador voraz (nível trófico 3,5), que se alimenta de crustáceos, moluscos e peixes. Os juvenis alimentam-se de invertebrados e vão, progressivamente, comendo peixe. São conhecidos por atingir mais de 70 cm de comprimento e um peso corporal de 6 kg. Na natureza, a maturidade sexual dos machos é atingida entre os 2 a 4 anos no Mediterrâneo e entre os 4 e 7 anos no Atlântico (30 a 40 cm de comprimento); as fêmeas atingem a maturidade sexual entre os 5 e 8 anos de idade (36-46 cm de comprimento). A desova ocorre uma vez por ano, geralmente durante o inverno (Fishbase, 2019; FAO, 2019).

A aquacultura do robalo (*Dicentrarchus labrax*) teve início nos anos 60 e baseou-se na produção de juvenis sob condições de cultivo extensivo e semi-intensivo em lagoas costeiras. O desenvolvimento de tecnologias reprodutivas foi crucial para o desenvolvimento desta indústria (Coves et al., 1991; Divanach & Kentouri, 2000) e, atualmente, a produção em larga escala desta espécie é feita em gaiolas intensivas.

Foi a primeira espécie de peixe marinho não-salmonídeo a ser produzido na Europa e é, atualmente, uma das espécies mais importantes exploradas comercialmente na área do Mediterrâneo. A Grécia, Turquia, Itália, Espanha, Croácia e Egito constituem os principais produtores (FAO, 2019). Em 2017, a produção de robalo de aquacultura atingiu 215 636 toneladas globalmente, o seu valor mais alto de sempre (FishStatJ, 2019) (Figura 5).

Relativamente às suas necessidades nutricionais, estudos indicam que para juvenis os níveis proteicos necessários para o crescimento são em torno de 48% e não são influenciados pela temperatura (Peres & Oliva-Teles, 1999a).

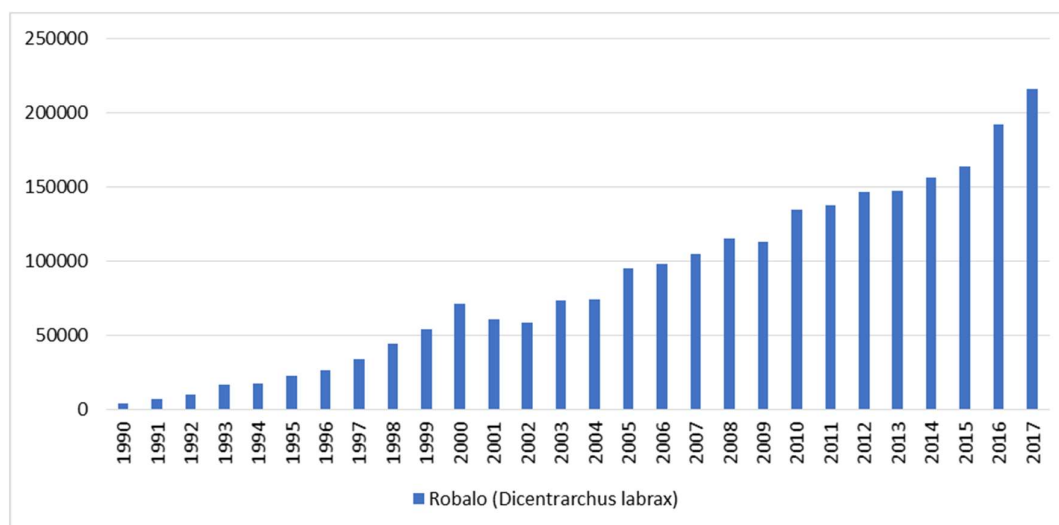


Fig. 5 – Evolução da produção do robalo de Aquacultura. Fonte: FAO, Fishstat 2019

Os peixes não têm exigências absolutas de proteína, mas requerem os aminoácidos que compõem as proteínas (Oliva-Teles, 2000). O robalo necessita dos mesmos dez aminoácidos essenciais (AAE) que os outros peixes ou crustáceos (NRC, 1993). As necessidades do robalo para AAE, em termos de percentagem da proteína da dieta, são: arginina (3,9-4,6%), fenilalanina (2,6%), histidina (1,6%), isoleucina (2,6%), leucina

(4,3%), lisina (4,8%), metionina (2,3%), treonina (2,6-2,7%), triptofano (0,5-0,7%) e valina (2,9%) (Kaushik, 1998; Kaushik et al., 1998; Tibaldi & Kaushik, 2002).

Para a taurina, considerado aminoácido condicionalmente essencial, Martins et al. (2018), concluiu que juvenis de robalo necessitam de 0,47-0,5% de matéria seca de taurina para o melhor desempenho no crescimento e retenção de azoto.

Relativamente aos lípidos, vários estudos indicam que a inclusão de lípidos na dieta acima de 12% não tem efeitos benéficos ao nível do crescimento (Alliot et al., 1974; Metailler et al., 1981; Pérez et al., 1997; Peres & Oliva-Teles, 1999b). Pelo contrário, outros estudos registaram melhor desempenho dos peixes com a inclusão crescente de lípidos até 18-19% (Lanari et al., 1999). Não obstante, parece ser unânime que dietas com 30% de lípidos não são recomendadas, quer seja pelos seus efeitos negativos sobre a ingestão voluntária de ração (Boujard et al., 2004) ou sobre o crescimento (Peres & Oliva-Teles, 1999b; Oliva-Teles, 2012).

No que respeita aos ácidos gordos essenciais (AGE), o robalo, tal como outros peixes marinhos, tem necessidades absolutas em ácidos gordos polinsaturados (AGPI) de cadeia longa da série n-3, nomeadamente em eicosapentanóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexanóico (DHA, 22:6n-3), pois não os consegue sintetizar e têm, por isso, de ser fornecidos na dieta (Sargent et al., 2002; Bell & Koppe 2010; NRC 2011; Oliva-Teles, 2012). As estimativas atuais sugerem um requisito de cerca de 1% de AGPI n-3 de cadeia longa (Coutteau et al., 1996). Embora se espere que existam também necessidades em AGPI de cadeia longa da série n-6, as mesmas, até ao momento, não foram determinadas (NRC, 2011).

Segundo Oliva-Teles (2000), a relação entre a proteína digestível (PD) e a energia digestível (ED) das dietas afeta a taxa de crescimento e a eficiência de utilização de ração. Embora dados iniciais indiquem valores entre 25-30 mg PD / KJ ED (Metailler et al., 1981), Dias et al. (1998) sugere que o rácio PD/ED para robalo deve ser 19 mg PD / KJ ED.

Os peixes não possuem necessidades de hidratos de carbono (Enes et al., 2009; Oliva-Teles 2012). Contudo, a inclusão destes nas dietas reduz o uso de proteínas e lípidos para fins energéticos (Wilson, 1994; Stone, 2003). A utilização de hidratos de carbono pelos peixes varia entre espécies, e no caso do robalo, sendo um peixe carnívoro, tolera menor teor de hidratos de carbono do que os peixes herbívoros e omnívoros (Oliva-Teles, 2012). Acredita-se que a incorporação de hidratos de carbono em dietas para

robalo seja limitada a 20%, pois níveis altos de amido (> 30%) parecem reduzir a taxa de crescimento e a eficiência da utilização de alimentos (Enes et al., 2011).

Os dados sobre os requisitos quantitativos em vitaminas do robalo são extremamente escassos. Fournier et al. (2000) demonstraram que o robalo tem um requisito mínimo de 5 mg de vitamina C por kg de dieta para garantir o seu crescimento e manter a concentração normal de colagénio na pele, embora níveis mais altos fossem necessários com base na hidroxiprolina de corpo inteiro e concentração de ácido ascórbico no fígado (Oliva-Teles, 2000).

Estudos indicam que as exigências vitamínicas estabelecidas para os salmonídeos (NRC, 1993) não diferem dos requisitos do robalo para a maioria das vitaminas solúveis e, por isso, podem ser aplicadas nas dietas do robalo (Kaushik et al., 1998). Os dados recomendados sobre as necessidades vitamínicas para os alevins do robalo, em proporções de mg/Kg na dieta, são: Vitamina E (50); Vitamina K (10); Tiamina (1); Riboflavina (4); Piridoxina (3); Ácido pantoténico (20); Nacina (10); Ácido fólico (1); Vitamina B12 (0,01); Colina (1000); Inositol (300); Biotina (0,15) e Vitamina C (50) (Kaushik, 1998; Kaushik et al., 1998; Tibaldi & Kaushik, 2002). Os mesmos autores recomendam 2500 UI/Kg de vitamina A e 2400 UI/Kg de vitamina D.

Contrariamente aos peixes herbívoros, no robalo, sendo uma espécie carnívora de água fria, devido à baixa temperatura da água e ao reduzido tamanho do tubo digestivo, o microbiota intestinal não contribui de modo significativo para satisfazer as necessidades vitamínicas (NRC 2011; Oliva-Teles, 2012).

Relativamente aos requisitos em minerais para o robalo, os dados são escassos. Neste contexto, as necessidades em fósforo foram estimadas em 0,65% da dieta em matéria seca (Oliva-Teles & Pimentel-Rodrigues, 2004).

1.5 – Substituição de FP e OP por MPV – revisão da literatura

De acordo com a literatura, a substituição da FP entre 20 a 60% por várias fontes de proteína vegetal (farinha de soja, glúten de milho, farinha de semente de tremçoço, farinha de ervilha, concentrado de proteína de colza) em dietas para robalo (Gouveia & Davies, 1998, 2000; Lanari & D'Agaro, 2005) não afeta o crescimento ou utilização de nutrientes. A sua substituição total ou quase total por uma mistura apropriada de fontes de proteína vegetal e suplementação de aminoácidos também foi alcançada sem afetar o desempenho de crescimento do robalo europeu (Kaushik et al., 2004; Messina et al., 2013). No entanto, num estudo posterior, Geay et al., (2011) concluiu que substituição

total da proteína animal por proteína vegetal levou a um impacto negativo no crescimento do robalo, o que sugere que devem ser feitos mais estudos abordando o impacto de dietas totalmente à base de MPV.

Em relação à substituição de OP por fontes de óleo vegetal (OV), os dados obtidos até o momento demonstram que em dietas com 20-25% de lípidos, a substituição de mais de 60% de OP reduziu o crescimento do robalo (Mourente et al., 2005). Isso pode indicar uma deficiência de AGE, uma vez que, fornecendo um teor mínimo de AGE na dieta, é possível substituir até 60-66% do OP por uma única fonte (óleo de soja, óleo de colza e óleo de linhaça) ou uma mistura (colza, linhaça, palma, azeitona óleos de soja, girassol e / ou sementes de algodão em diferentes proporções) do OV sem comprometer o crescimento do robalo (Izquierdo et al., 2003; Figueiredo-Silva et al., 2005; Mourente et al., 2005; Richard et al., 2006; Castro et al., 2015).

Apesar de estudos apoiarem que um crescimento adequado do robalo pode ser alcançado quando as necessidades de AAE e AGE são atendidas, independentemente dos ingredientes utilizados, há fortes evidências de que esses ingredientes alternativos afetam negativamente a composição da carcaça, o valor nutricional do filete (Izquierdo et al., 2003; Geay et al., 2011), a deposição de lípidos (Kaushik et al., 2004), o colesterol plasmático (Kaushik et al., 2004; Richard et al., 2006; Messina et al., 2013) e o estado imunológico (Mourente et al., 2005, 2007; Geay et al., 2011).

2. Material e métodos

2.1 Microorganismo e substrato

O fungo utilizado foi o *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 cedido pela Micoteca da Universidade do Minho. O substrato utilizado foi a dreche, proveniente da indústria cervejeira- Unicer-Bebidas de Portugal, SA (Matosinhos, Portugal) e foi obtida na etapa filtração, do processo de produção de mosto, tendo como matérias-primas o malte Pilsen, a cevada e Gritz de milho.

2.2 FES da dreche e obtenção do extrato enzimático

Numa primeira fase procedeu-se à secagem da dreche em estufa a 55 °C. As fermentações foram realizadas em tabuleiros contendo 400 g de dreche previamente seca e esterilizada a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, a humidade foi ajustada com água destilada a 75% e cada tabuleiro inoculado com uma suspensão de esporos de *A. ibericus* com uma concentração de 10^6 células ml⁻¹. De seguida, os tabuleiros ficaram em incubação a 25 °C durante 7 dias. Após os 7 dias de fermentação, a extração das enzimas foi realizada usando água destilada numa razão de 1:5 (peso/volume), com agitação constante durante 1 hora. Após esse período, a dreche fermentada foi filtrada através de uma rede e o líquido recuperado foi centrifugado a 7000 g durante 10 minutos.

2.3 Determinação da atividade enzimática

Após o processo de liofilização, procedeu-se à determinação da atividade enzimática da endo-1,4-β-xilanase (xilanase) e da endo-1,4-β-glucanase (celulase), de forma a caracterizar o extrato e definir os níveis de inclusão do mesmo na dieta.

Para a atividade da celulase, utilizou-se carboximetilcelulose (2%) em tampão de citrato 0,05 N (pH 4,8), como substrato, e a reação decorreu a 50 °C durante 30 minutos. Os açúcares livres foram determinados pelo método DNS¹, tal como descrito por Miller (1959). Foi definida uma unidade de atividade enzimática como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μmol de glicose por minuto nas condições da reação.

Para a xilanase, foi utilizado xilano (1%) em tampão de citrato 0,05 N (pH 4,8), e a reação foi incubada a 50 °C durante 15 minutos. Os açúcares libertados foram medidos pelo método DNS, conforme descrito anteriormente. Foi definida uma unidade de atividade

¹ DNS: Dinitrosalicylic

enzimática como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μmol por minuto de açúcares redutores de xilose nas condições da reação.

A unidade (U) da atividade enzimática foi expressa em unidades por grama de substrato seco obtida por FES. A atividade enzimática foi novamente analisada após o processo de fabrico das dietas.

2.4 Dietas experimentais

Foram formuladas três dietas experimentais isoproteicas (48% proteína) e isolipídicas (16% lípidos), de acordo com as exigências nutricionais do robalo (Peres & Oliva-Teles, 1999a, 1999b), com 15% de produtos de peixe (FP e concentrado de proteína de peixe), 5% de hemoglobina e 61% de MPV (glúten de trigo, soja, trigo forrageiro, sêmea de arroz, bagaço de girassol, bagaço de colza). Em todas as dietas, o OP foi a principal fonte lipídica. As dietas foram semelhantes nos teores de amido (10%), hemicelulose (2,4%), celulose (1,6%) e lenhina (2,3%). Foi realizada uma dieta controlo sem conter o extrato. As duas restantes dietas foram formuladas de forma semelhante à dieta controlo, mas suplementadas com extrato enzimático obtido por FES a 0,1 e 0,4% (Tabela 4), que correspondem, respetivamente, a 1000 e 4000 U celulase/Kg de dieta. O valor de 1000 U celulase/Kg de dieta foi escolhido tendo por base o trabalho de Magalhães et al. (2016).

O extrato enzimático foi obtido após FES da dreche com *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 (Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal). Este extrato foi uma combinação de celulase (1343 U g^{-1}) e xilanase (15885 U g^{-1}). Todos os ingredientes foram finamente moídos, analisados quimicamente e misturados utilizando uma granuladora laboratorial CPM (California Pellet Mill, Crawfordsville, IN, USA). Em todas as dietas foi incorporado óxido de crómio como indicador externo da digestibilidade. A composição química das dietas foi determinada de acordo com os procedimentos descritos no ponto 2.6.

Tabela 4 – Ingredientes e composição química das dietas experimentais

	Dietas		
	CTR	0,1EED	0,4EED
<i>Ingredientes (% matéria seca)</i>			
Farinha de peixe ¹	9,8	9,8	9,8
CPSP G ²	4,9	4,9	4,9
Farinha de gluten de trigo ³	18,6	18,6	18,7
Farinha de soja ⁴	9,8	9,8	9,8
Farelo de arroz ⁵	9,8	9,8	9,8
Farinha de girassol ⁶	8,8	8,8	8,8
Farinha de colza ⁷	7,8	7,8	7,9
Farinha de trigo ⁸	5,4	5,3	4,8
Hemoglobina ⁹	4,9	4,9	4,9
Taurina ¹⁰	0,5	0,5	0,5
Lisina ¹⁰	0,6	0,6	0,6
Metionina ¹⁰	0,2	0,2	0,2
Óleo de Peixe	12,3	12,3	12,3
Complexo vitamínico ¹¹	1,0	1,0	1,0
Cloreto de Colina (50%)	0,5	0,5	0,5
Complexo mineral ¹²	1,0	1,0	1,0
Aglutinante ¹³	1,0	1,0	1,0
CaHPO ₄	1,0	1,0	1,0
Hidrolisado de camarão ¹⁴	1,2	1,2	1,2
Betaína ¹⁵	0,2	0,2	0,2
Óxido de Crómio	0,5	0,5	0,5
EED ¹⁶	0,0	0,1	0,4
<i>Composição química (% matéria seca)</i>			
Matéria seca (%)	92,9	92,3	94,6
Proteína bruta	47,9	48,1	48,8
Lípidos	16,3	16,4	15,9
Cinzas	6,8	6,7	6,6
Matéria orgânica	93,2	93,3	93,4
Energia bruta (kJ g ⁻¹)	24,1	24,2	24,1
Óxido de crómio	0,4	0,5	0,4
Amido	2,56	2,58	2,57
Hemicelulose	1,79	1,77	1,66
Celulose	3,04	2,74	2,51
Lenhina	0,65	0,59	0,55

PB: Proteína bruta; L: Lípidos; MS: Matéria seca; EED: Extrato enzimático da dreche; CTR: Controlo

¹Secagem a vapor LT-FM, Pesquera Centinela, Chile (PB: 71,2%; L: 11,1%).

² Concentrado de proteína de peixe; Sopropêche G, França (PB: 79,7%; L: 18,4%MS)

³Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (PB: 86,9%; L: 1,0%).

⁴Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (PB: 53,8%; L: 1,8%).

⁵Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (PB: 14,1%; L: 1,0%).

⁶Sorgal, S.A. Ovar, Portugal. (PB: 29,0%; L: 1,8%).

⁷Sorgal, S.A. Ovar, Portugal. (PB: 41,5%; L: 1,9%).

⁸Sorgal, S.A. Ovar, Portugal. (PB: 12,4%; L: 0,9%).

⁹APC Europe S.A.S.A. (PB: 94,5%; L: 0,4%).

¹⁰Taurina, L-lisina e DL-Metionina, Sorgal, S.A. Ovar, Portugal.

¹¹Vitaminas (mg kg⁻¹ dieta): retinol, 18000 (IU kg⁻¹ dieta); calciferol, 2000 (IU kg⁻¹ dieta); alfa tocoferol, 35; menadiona bissulfito de sódio, 10; tiamina, 15; riboflavina, 25; pantotenato de cálcio, 50; ácido nicotínico, 200; piridoxina, 5; ácido fólico, 10; cianocobalamina, 0,02; biotina, 1,5; ácido ascórbico monofosfato, 50; inositol, 400.

¹²Minerais (mg kg⁻¹ dieta): sulfato de cobalto, 1,91; sulfato de cobre, 19,6; sulfato de ferro, 200; fluoreto de sódio, 2,21; iodeto de potássio, 0,78; óxido de magnésio, 830; óxido de manganês, 26; selenito de sódio, 0,66; óxido de zinco, 37,5; fosfato dicálcico, 8,02 (g kg⁻¹ dieta); cloreto de potássio, 1,15 (g kg⁻¹ dieta); cloreto de sódio, 0,4 (g kg⁻¹ dieta).

¹³Liptosa, Espanha.

¹⁴Sorgal, S.A. Ovar, Portugal. (P: 69,8%; L: 12,1%).

¹⁵Sorgal, S.A. Ovar, Portugal.

¹⁶Extrato liofilizado obtido através da fermentação em estado sólido da dreche com *Aspergillus ibericus* (O extrato enzimático foi uma combinação de celulase (1343 U g⁻¹) e xilanase (15885 U g⁻¹)

2.5 Ensaios de crescimento e de digestibilidade

Os ensaios de crescimento e digestibilidade foram realizados na Estação de Zoologia Marítima da Universidade do Porto, com 9 grupos de 15 juvenis de robalo, com peso corporal médio de $22 \pm 0,01$ g para testar as três dietas experimentais, de forma a aferir o potencial do extrato produzido durante o processo de FES da dreche no crescimento, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade dos nutrientes. Os dois ensaios foram realizados no mesmo sistema e o período experimental teve uma duração de 8 semanas, sendo que o ensaio de digestibilidade começou nos últimos 11 dias. Os robalos tiveram um período de adaptação ao sistema experimental de 15 dias. Cada grupo foi distribuído por tanques de 60 L equipados num sistema de recirculação de água, com água do mar filtrada e arejamento através de pedras difusoras e o fluxo de água foi estabelecido em cerca de 5 L min^{-1} por tanque. As dietas foram distribuídas em triplicado e aleatoriamente, e os peixes alimentados duas vezes ao dia à saciedade visual, 6 dias por semana. Para a realização do ensaio de digestibilidade, cada tanque estava equipado com uma coluna de sedimentação de fezes, de acordo com o desenho experimental de Cho et al. (1982) (figura 6). Após o período de adaptação dos peixes, as fezes depositadas na coluna de sedimentação foram recolhidas diariamente, antes da alimentação da manhã. Depois de recolhidas foram centrifugadas a 3000 g e congeladas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. A recolha de fezes decorreu durante 11 dias, até se obter uma quantidade suficiente para análise. Tanques, tubagens e colunas de sedimentação foram limpos diariamente, 30 minutos após a refeição da tarde. Durante os ensaios, a temperatura e salinidade da água foram verificadas uma vez por dia, tendo-se obtido uma média de $23,8 \pm 0,14 \text{ }^\circ\text{C}$ para a temperatura e $32 \pm 0,93\text{‰}$ para a salinidade

Após as 8 semanas do período experimental, os peixes foram pesados para determinação dos parâmetros de crescimento. Oito peixes da população inicial e três peixes de cada tanque foram amostrados, aleatoriamente, para análise da composição da carcaça. Adicionalmente foram amostrados mais três peixes de cada tanque para determinação dos índices hepatossomático e visceral, calculados através dos pesos das vísceras e fígados.



Fig. 6 – Sistema ensaio digestibilidade: a. perspectiva geral dos 12 tanques; b. coluna de sedimentação; c. recolha de fezes

2.6 Determinação da composição das dietas, ingredientes, fezes e carcaças

As análises químicas de ingredientes, dietas e fezes foram realizadas de acordo com os métodos padrão (AOAC, 2016) da seguinte forma:

2.6.1 Humidade

Por secagem das amostras numa estufa a 105 °C até atingir peso constante;

2.6.2 Cinzas

Por incineração numa mufla a 450 °C durante 16 horas;

2.6.3 Proteína Bruta (N × 6.25)

Foi determinada segundo o método de Kjeldahl após digestão ácida, em amostras de 0,5 g, para análise de matérias-primas, dietas e carcaças, e de 0,15 g para análise das fezes, usando para o efeito uma unidade de digestão e unidade de destilação Kjeltex (modelos 1015 e 1026, Tecator Systems, Höganäs, Suécia). A proteína bruta foi calculada multiplicando o teor em azoto total pelo fator empírico de 6,25.

2.6.4 Lípidos

Determinados por extração com éter de petróleo utilizando um sistema de extração Soxtec (Tecator Systems; unidade de extração modelo 1043 e unidade de serviço modelo 1046).

2.6.5 Energia bruta

Determinada por combustão direta de amostras numa bomba calorimétrica adiabática (modelo PARR 6200; PARR Instruments, Moline, IL, USA).

2.6.6 Óxido de crómio

Determinado por digestão ácida segundo a metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966).

2.6.7 Polissacarídeos não amiláceos e amido

O teor em amido, lenhina, celulose e hemicelulose nas dietas foi determinado segundo a metodologia descrita em Salgado et al. (2015). Resumidamente, para a celulose, hemicelulose e lenhina, os substratos da FES, foram analisados por uma hidrólise ácida quantitativa de duas fases (a primeira fase com ácido sulfúrico (densidade de 72%) a 30 °C durante 1 hora e a segunda fase com ácido sulfúrico (densidade de 4%) a 121 °C durante 1 hora. O amido foi determinado usando o método DNS e para isso foi necessária a extração com água 1:5 (p/v), após a FES.

2.7 Determinação da digestibilidade aparente

A equação (1) foi utilizada para determinar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA %) da matéria seca, lípidos e energia foi a seguinte:

$$\text{CDA (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ D} \times \text{NF}}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ F} \times \text{ND}}\right) \times 100 \quad (1)$$

Cr₂O₃ D: percentagem de óxido de crómio na dieta

Cr₂O₃ F: percentagem de óxido de crómio nas fezes

ND: percentagem de nutriente ou energia na dieta

NF: percentagem de nutriente ou energia nas fezes

2.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote de software (SPSS 24.0 para Windows).

Após validação dos pressupostos: teste de normalidade (teste Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Levene), os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) em que o nível de incorporação do extrato foi a variável independente. Diferenças significativas entre médias (P<0,05) foram calculadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

3. Resultados

3.1 – Atividade enzimática

Após o processo de fabrico, as dietas suplementadas com 0,1 e 0,4% do extrato, apresentaram uma atividade enzimática de 1,76 e 5,76 U g⁻¹ de celulase, e 5,11 e 8,80 U g⁻¹ de xilanase, respetivamente.

3.2 – Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA)

Os dados relativos ao CDA relativas à matéria seca, proteínas, amido e energia são apresentados na tabela 5.

O CDA da matéria seca e da energia foi substancialmente mais alto na dieta com maior inclusão do extrato – 0,4EED (72,8 e 83,4, respetivamente) quando comparado com a dieta controlo (67,7 e 78,3, respetivamente). O CDA do amido melhorou de 64,3% da dieta controlo para 73,8% na dieta 0,4EED. Para a digestibilidade da proteína não se verificaram diferenças significativas entre dietas.

Tabela 5 – Coeficiente da Digestibilidade Aparente (CDA) das dietas experimentais

Dietas	CTR	0,1EED	0,4EED	EPM
Matéria seca	67,7 ^a	68,0 ^a	72,8 ^b	0,94
Proteína	96,2	96,4	96,4	0,12
Amido	64,3 ^a	65,3 ^a	73,8 ^b	0,75
Energia	78,3 ^a	79,9 ^a	83,4 ^b	0,86

EED: Extrato enzimático da dreche; CTR: Controlo

Valores apresentados como média (n=3 tanques) e erro padrão médio (EPM).

Diferentes expoentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas entre dietas (teste Tukey, $P < 0,05$).

3.3 – Crescimento e utilização de nutrientes

Os dados relativos ao crescimento dos robalos e à eficiência de utilização das dietas experimentais encontram-se apresentados na tabela 6.

O desempenho dos peixes ao nível do crescimento, expresso como peso médio final, ganho de peso e taxa de crescimento específico, não foi afetado pelos níveis de inclusão das enzimas. No final das 8 semanas do ensaio de crescimento, os peixes atingiram um peso médio final entre 35 e 37g, sem diferenças significativas entre grupos. Apesar de não existirem diferenças significativas ao nível do alimento ingerido, verificou-se uma tendência de diminuição do alimento ingerido com o aumento de inclusão das enzimas. Observou-se um aumento da eficiência alimentar, que não se traduziu numa melhoria significativa ns valores de retenção de azoto e energia, expresso em função do alimento

ingerido. Não se verificou alterações significativas na taxa de sobrevivência, entre os grupos.

Tabela 6 – Crescimento e eficiência alimentar do robalo alimentado com as dietas experimentais

Dietas	CTR	0,1EED	0,4EED	EPM
PMI ¹ (g)	22,0	22,0	22,0	0,01
PMF ¹ (g)	35,1	35,7	36,8	0,51
GPD ² (g/kg/dia)	8,95	9,29	9,84	0,27
TCE ³	0,92	0,96	1,02	0,03
AI ⁴ (g/kg/dia)	13,7	12,6	11,4	0,56
ECA ⁵	0,65 ^a	0,74 ^{ab}	0,88 ^b	0,04
CEP ⁶	1,36 ^a	1,54 ^{ab}	1,80 ^b	0,08
RN ⁷ (g/kg/day)	0,24	0,25	0,24	0,01
RN (%NI) ⁸	22,6	25,7	26,8	0,99
RE ⁹ (kJ/kg/day)	72,5	64,4	88,0	6,15
RE (%EI) ¹⁰	22,0	21,2	32,2	2,38
Mortalidade (%)	8,9	13,3	17,8	3,14

EED: Extrato enzimático da dreche; CTR: Controlo

*Valores apresentados como média (n=3 tanques) e erro padrão médio (EPM). Valores situados na mesma linha, com expoentes diferentes, são significativamente diferentes entre si (teste Tukey; P <0,05).

¹PMI e PMF: Peso médio inicial e final;

²GPD: Ganho de peso diário

³TCE: Taxa de crescimento específico (PMF1/3-PMI1/3)/tempo em dias) ×100;

⁴AI: Alimento ingerido

⁵ECA: Eficiência de conversão alimentar (ganho de peso fresco/matéria seca ingerida);

⁶CEP: Coeficiente de eficácia proteica (ganho de peso fresco/proteína ingerida);

⁷RN: Retenção azotada (PMF×NFC-PMI×NIC) / (PCM × tempo em dias); PCM: peso corporal médio (PMI+PMF) / 2; NIC e NFC: Conteúdo de N inicial e final da carcaça

⁸RN: Retenção azotada (%NI) (RN⁷/NI) ×100; NI: Azoto ingerido

⁹RE: Retenção energética (PMF×EFC-PMI×EIC) / (PCM × tempo em dias); EIC e EFC: Conteúdo de energia inicial e final da carcaça

¹⁰RE: Retenção energética (%EI) (RE⁹/EI) ×100; EI: Energia ingerida

3.4 – Composição corporal

Os valores obtidos para a composição corporal dos robalos alimentados com as dietas experimentais estão indicados na tabela 7. Não foram encontradas diferenças significativas ao nível da composição corporal, entre dietas.

Tabela 7 – Composição corporal (% peso fresco), valor energético, índice hepatossomático e índice visceral do robalo alimentado com as dietas experimentais

	Inicial	CTR	0,1EED	0,4EED	EPM
Matéria seca	36,0	32,7	32,2	30,6	1,17
Proteína	14,8	15,5	15,5	15,0	0,19
Lípidos	15,8	13,2	13,0	14,1	0,61
Energia (kJ/g)	9,11	8,73	8,27	7,61	0,48
Cinzas	4,51	4,56	4,55	4,98	0,19
IHS ¹	–	1,67	1,74	1,86	0,09
IV ²	–	11,88	12,24	12,02	0,49

EED: Extrato enzimático da dreche; CTR: Controlo

Valores apresentados como média (n=3 tanques) e erro padrão médio (EPM). Valores situados na mesma linha, com expoentes diferentes, são significativamente diferentes entre si (teste Tukey; P <0,05).

¹ IHS: Índice Hepatossomático (peso do fígado/ peso do peixe inteiro) × 100 (n=9 peixes)

² IV: Índice Visceral (peso das vísceras/ peso do peixe inteiro) × 100 (n=9 peixes)

Discussão

Sabe-se que peixes carnívoros, como o robalo, digerem mal hidratos de carbono complexos; os amidos podem ser digeridos, mas a maioria dos PNA não são digeridos (Enes et al., 2011). Elevados níveis de PNA presentes nas dietas à base de MPV estão associados à redução da digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e energia assim como efeitos negativos ao nível do crescimento (Francis et al., 2001; Thompson et al., 2008; Castillo & Gatlin, 2015).

A suplementação de exoenzimas nas dietas é atualmente uma prática comum na alimentação de aves e suínos, para minimizar estes efeitos negativos (Adeola & Cowieson, 2011). No entanto, para espécies de aquacultura, a investigação tem-se focado principalmente no uso de fitases (Kumar et al., 2012) e, apenas recentemente, a suplementação com carbohidrases ganhou relevância de forma a reduzir os efeitos anti-nutricionais de pentoses e β -glucanos, que são os PNA presentes em maior quantidade nos ingredientes à base de MPV (Adeola & Cowieson, 2011; Castillo & Gatlin, 2015). Neste contexto, um crescente número de trabalhos relativos ao uso de carbohidrases em dietas para peixes têm sido publicados nos últimos anos (Carter et al., 1994; Ogunkoya et al., 2006; Ai et al., 2007; Lin et al., 2007; Yigit & Olmez, 2011; Dalsgaard et al., 2012; Adeoye et al., 2016; Yigit & Keser, 2016; Magalhães et al., 2018; Diógenes et al., 2018; 2019). Contudo, a maioria dos trabalhos tem-se direccionado no uso de exoenzimas purificadas disponíveis comercialmente e, na maioria dos casos, do ponto de vista económico, bastante dispendiosos.

No contexto das exoenzimas disponíveis no mercado, a oferta varia desde enzimas isoladas, misturas de vários tipos de enzimas ou mesmo extratos enriquecidos em enzimas e outros compostos bioactivos produzidos. Comercialmente, a maioria das celulasas e xilanasas são produzidas através da fermentação submersa devido à facilidade de fermentação e controlo dos fatores de fermentação (Tolan & Foody, 1999). No entanto, os fungos filamentosos que são considerados como bons produtores de xilanasas e celulasas, apresentam melhor desempenho usando a FES, uma vez que o substrato sólido permite simular o habitat natural dos fungos (Mitchell et al., 2006). Além disso, a FES pode ser mais vantajosa, pois possui maior produtividade volumétrica, maior estabilidade do produto, baixo risco de contaminação, menor impacto ambiental e baixo custo (Mitchell et al., 2006). Outra vantagem é a utilização de subprodutos agroindustriais de baixo custo que atuam como fonte de carbono e energia e, assim, reduzem a necessidade de recorrer a meios de cultura dispendiosos (Ang et al., 2013).

De forma a tentar produzir extractos enriquecidos em carbohidrases, principalmente à base de xilanase (endo-1,4- β -xilanase) e celulase (endo-1,4- β -glucanase), comercialmente competitivos e com potencial aplicação para dietas de peixes carnívoros recorreu-se no presente trabalho à tecnologia de FES utilizando como substrato um subproduto da indústria cervejeira, a dreche. De acordo com o trabalho de Sousa et al. (2018), a dreche, quando comparado com outros subprodutos agroindustriais (bagaço de uva, bagaço de azeitona e ramos de videira), mostrou ser o melhor substrato ao ser fermentada por *A. ibericus*, para produção de xilanas e celulasas. Por outro lado, *A. ibericus*, embora seja um fungo pouco estudado, tem mostrado resultados bastante promissores na produção de enzimas com recurso a vários substratos (Sousa et al., 2018; Fernandes et al., 2019).

No contexto deste trabalho, apenas se direccionou o potencial do extrato enquanto fonte de carbohidrases. No entanto, estes tipos de extratos são ricos em outro tipo de enzimas (proteases e lipases) e compostos bioativos (ex: compostos antioxidantes) que poderão trazer efeitos benéficos ao peixe. Para além disso, contrariamente a muitas das opções disponíveis comercialmente, estes extratos são produzidos por processos naturais e do ponto de vista do consumidor muito mais apelativos para ser adicionados às rações de peixes para consumo humano. Contudo, o uso deste tipo de extratos, conotados como naturais e produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo, em dietas para peixes tem sido pouco explorado. Até ao momento, ao que os autores apuraram, apenas Novelli et al. (2017) avaliou o potencial de extratos, produzidos por FES usando como substrato farinha de soja e farinha de trigo e os fungos *Aspergillus niger* e *A. oryzae* para a produção de exoenzimas em dietas para Tilápia do Nilo, tendo reportado efeitos positivos ao nível da digestibilidade dos nutrientes. No presente estudo, os efeitos mais relevantes foram ao nível da dieta 0,4EED, onde se verificou um aumento significativo da digestibilidade da matéria seca, energia e amido, mas não da proteína. O CDA da matéria seca fornece uma estimativa da digestibilidade geral dos ingredientes e, normalmente, um valor baixo indica uma grande quantidade de componentes indigeríveis na dieta (Shi et al., 2017). Em dietas com 60% de FP em juvenis de robalo (12 g), Oliva-Teles & Gonçalves (2001) obtiveram valores substancialmente altos de digestibilidade da matéria seca (87%) e energia (96%). Contrariamente, no presente trabalho, o CDA da matéria seca e energia da dieta controlo foi relativamente baixo, 68% e 78%, respetivamente, o que não é de todo inesperado, uma vez que as dietas tinham uma concentração alta de MPV, compostas maioritariamente por PNA e, por isso, não digeríveis por peixes carnívoros, como o robalo, pois estes não possuem as

enzimas necessárias para os degradar (Krogdahl et al., 2005). Comparativamente com a dieta controlo, o CDA da matéria seca da dieta 0,4EED aumentou de 67% para 72% e o CDA da energia aumentou de 78% para 83%. Este aumento da digestibilidade da energia e da matéria seca parece indicar que as carbohidrases presentes no extrato utilizado foram capazes de hidrolisar os PNA presentes na dieta e, possivelmente, promovido uma diminuição na viscosidade intestinal, facilitando o acesso das enzimas digestivas endógenas aos nutrientes, aumentando assim a sua biodisponibilidade (Dalsgaard et al., 2012; Castillo & Gatlin, 2015).

A informação disponível sobre a influência da suplementação de carbohidrases na digestibilidade e disponibilidade de nutrientes dos peixes, é ainda controversa. Enquanto alguns autores não verificaram efeitos ao nível da digestibilidade dos nutrientes (Ogunkoya et al., 2006; Yigit & Olmez, 2011; Yigit & Keser, 2016), outros reportaram aumento da digestibilidade da proteína, lípidos, amido, energia e/ou matéria seca com a suplementação de carbohidrases nas dietas (Novelli et al., 2017; Diógenes et al., 2018; Magalhães et al., 2018; Diógenes et al., 2019).

Em relação à digestibilidade da proteína, os trabalhos existentes revelaram não existir uma resposta coerente. Neste contexto, Diógenes et al. (2018) e Magalhães et al. (2018) observaram que o uso de mistura de enzimas comercial à base de celulase e xilanase purificadas (Naturgrain®) em dietas ricas em MPV para pregado e robalo, promoveu um aumento da digestibilidade da matéria seca, proteína e energia, evidenciando que a suplementação com carbohidrases melhorou a digestibilidade da proteína quer seja por aumentar a digestibilidade geral das proteínas ou por hidrolisar os nutrientes proteicos (Cowieson et al., 2006). Por outro lado, usando um complexo enzimático natural Synergen™ produzida por FES, os mesmos autores não observaram resultados tão expressivos como com os que obtiveram com o Naturgrain®. De igual forma, a suplementação com um cocktail enzimático (glucanase, protease e xilanase), celulase e outro tipo de cocktail enzimático (celulase, fitase e pectinase), em dietas para outras espécies de peixe como a tilápia do Nilo (Lin et al., 2007; Yigit & Olmez, 2011) e a truta arco-íris (Yigit & Keser, 2016), respetivamente, não se traduziu em alterações ao nível da digestibilidade da proteína. Efeitos significativos na digestibilidade da proteína também não se observaram quando o extrato em estudo foi adicionado às dietas à base de MPV do robalo. A ação das exoenzimas e a sua eficácia ao nível da digestibilidade dos nutrientes é modulada pela composição das matérias-primas das dietas, espécies de peixes utilizadas (nomeadamente diferentes níveis tróficos), temperatura da água,

níveis e tipos de suplementação com exoenzimas. A grande diversidade de variáveis entre os diferentes trabalhos poderá explicar em certa medida a falta de homogeneidade nos resultados obtidos. Para além disso, independentemente dos tratamentos experimentais, e em concordância com o trabalho de Kaushik et al. (2004) em robalos alimentados com dietas com elevado conteúdo em proteína de origem vegetal, a digestibilidade da proteína obtida no presente trabalho foi relativamente elevada (96%). Este facto poderá de certa forma camuflar potenciais efeitos do extrato na digestibilidade da proteína.

Em linha com o aumento da digestibilidade da matéria seca, energia e amido, verificou-se que a suplementação com o extrato enzimático se traduziu em melhores eficiências alimentares e coeficiente de eficácia proteica (CEP). Para além disso, embora sem diferenças significativas, verificou-se na dieta com maior nível de incorporação do extracto um aumento nas retenções azotadas e energéticas. O aumento do CEP pode indicar que a melhoria da digestibilidade dos hidratos de carbono na dieta direccionou o uso das proteínas preferencialmente para fins de crescimento e não tanto para fins energéticos. O aumento da eficiência alimentar, por sua vez, foi acompanhado por uma ligeira redução do alimento ingerido, o que do ponto de vista económico se poderá traduzir, a longo prazo, numa grande poupança em termos dos custos com alimentação. Normalmente, o alimento ingerido é regulado pela ingestão da energia digerível e, portanto, pode-se inferir que o peixe poderá ter mais energia disponível com as dietas suplementadas com o extrato enzimático (Cho & Kaushik, 1985; Peres et al., 2011).

Apesar de estes resultados não se terem refletido num maior crescimento dos robalos alimentados com as dietas suplementadas com o extrato enzimático (ausência de efeitos no peso médio final, ganho de peso e taxa de crescimento específico) suportam a hipótese de que as exoenzimas promoveram uma maior disponibilidade dos nutrientes. É de realçar que o período de ensaio (8 semanas) poderá não ter sido suficiente para que o potencial máximo do extracto se ter reflectido no crescimento. Neste contexto, será de equacionar o prolongamento dos ensaios experimentais em ensaios futuros com este tipo de extractos enzimáticos ou, eventualmente, testar concentrações superiores.

Goda et al. (2012) observou ao longo do período experimental de 17 semanas um aumento da taxa de crescimento em tilápias alimentadas com dietas suplementadas com 2% de um cocktail enzimático (pepsina, papaína e α -amilase). Por outro lado, Yigit & Keser (2016), não verificaram efeitos no crescimento da truta arco-íris em dietas com

adição de 0,1% de um mix de pectinase, xilanase e celulase durante 12 semanas. A suplementação das dietas com carboidrases, combinada com outras exoenzimas também demonstrou efeitos benéficos no crescimento e eficiência alimentar em outras espécies de peixes, nomeadamente: Na tilapia do Nilo, o uso de um cocktail de carboidrases e proteases melhorou o crescimento e eficiência alimentar e simultaneamente, uma diminuição na ingestão voluntária da dieta (Lin et al., 2007; Goda et al., 2012); Em outras espécies como o estorjão-branco (*Huso huso*), o salmão do mar Cáspio e salmão do Atlântico, o uso de uma mistura de carboidrases e proteases, promoveu o aumento do crescimento e eficiência alimentar (Carter et al., 1994; Ghomi et al., 2012; Zamini et al., 2014) bem como da atividade das enzimas endógenas (Ghomi et al., 2012). A combinação de carboidrases com fitase foi também testada em dietas para o robalo Japonês com benefícios a nível do crescimento e retenções azotadas (Ai et al., 2007). No entanto, em outros trabalhos o efeito benéfico de dietas suplementadas com carboidrases ao nível do crescimento não foi observado, nomeadamente, na tilapia (Yigit & Olmez, 2011), na truta arco-íris (Ogunkoya et al., 2006; Dalsgaard et al., 2012; Yigit & Keser, 2016) e na dourada (Diógenes et al., 2019).

Tal como mencionado anteriormente para os efeitos ao nível da digestibilidade, a variação nos resultados obtidos ao nível do crescimento entre os diferentes estudos, poderá estar relacionada com a variação dos fatores mencionados (quantidade e características dos ingredientes das dietas, tipo e concentração de enzimas, espécie, tamanho e hábitos alimentares dos peixes e temperatura da água) (Castillo & Gatlin, 2015). De facto, Dalsgaard et al. (2012) verificou que, para a truta arco-íris, os efeitos benéficos da suplementação das carboidrases em dietas com níveis elevados de proteína de origem vegetal, estão fortemente dependentes do tipo de matéria-prima vegetal utilizada. Nesse trabalho, os autores observaram que o extracto enzimático foi mais eficaz, ao nível da digestibilidade dos nutrientes, nas dietas à base de farinha de soja do que nas dietas à base de farinha de girassol ou farinha de canola.

Ao nível da composição corporal do robalo, a suplementação do extrato enzimático não promoveu qualquer tipo de alteração. Yigit & Olmez (2011) indicaram que a suplementação de celulase numa dieta à base de canola não teve efeitos na composição corporal da tilapia. Lin et al. (2007), num estudo sobre tilapia alimentada por um complexo enzimático comercial (protease, glucanase e xilanase) também concluiu que não houve diferenças significativas na composição corporal, ao nível da proteína, lípidos e cinzas. A composição corporal é um aspeto importante da qualidade

nutricional (Kamal et al., 2007; Breck, 2014) e infere sobre o valor nutricional e a qualidade de consumo dos peixes (Azam et al., 2004). A composição corporal dos peixes é afetada por espécies (Ali et al., 2005), parâmetros ambientais (Ali et al., 2001), nutrição e tamanho corporal (Ebrahimi & Ouraji, 2012). O facto de, neste estudo, não ter havido alterações na composição corporal pode ser benéfico para o consumidor. No entanto, para sustentar esta hipótese, teriam de ser feitas análises sensoriais em peixes de tamanho comercial para comprovar se o extrato não tem impacto a nível nutricional e outros parâmetros.

Tal como referido anteriormente, os resultados contraditórios existentes na literatura relativos ao efeito das exoenzimas realçam a necessidade de avaliar, cuidadosamente, os benefícios de diferentes exoenzimas de acordo com as espécies, formulação da dieta e nível de suplementação enzimático. Além disso, as diferenças da temperatura da água podem também contribuir para explicar a eficácia das exoenzimas. De facto, a maioria das enzimas comerciais foi desenvolvida para animais homeotérmicos e é mais ativa em altas temperaturas. Torna-se essencial entender o potencial e as limitações das exoenzimas, pois, se aplicadas de maneira inadequada, levarão ao desperdício de recursos (Adeola & Cowieson, 2011; Diógenes et al., 2018).

Outro factor a considerar na comparação dos trabalhos e interpretação dos resultados é a diversidade de produtos que contêm essas exoenzimas (enzimas isoladas, misturas de vários tipos de enzimas ou mesmo extratos enriquecidos em enzimas e outros compostos bioactivos produzidos). No caso particular deste trabalho, os extratos produzidos por FES não contêm exclusivamente carbohidrases. Para além de carbohidrases, outro tipo de enzimas (proteases, lipases, etc) e compostos bioactivos (ex: antioxidantes) podem ser produzidos durante o processo de FES (Tišma et al., 2018). Neste sentido, os resultados promissores obtidos neste trabalho podem ser o resultado sinérgico da mistura de compostos bioactivos presentes no extrato testado (carbohidrases, compostos antioxidantes, proteases etc). Futuramente, será pertinente fazer uma melhor caracterização dos compostos bioactivos presentes no extrato testado.

Para além disso, será importante realizar estudos posteriores que avaliem a função digestiva e saúde intestinal, e o sabor do peixe no sentido de perceber se a melhoria da digestibilidade está relacionada com o aumento da atividade das enzimas endógenas e se houve alterações fisiológicas e morfológicas intestinais, uma vez que a alimentação à base de MPV com elevados níveis de PNA, pode limitar a atividade das enzimas

digestivas (Sinha et al., 2011) provocando alterações no trato digestivo e aumento da viscosidade intestinal. Dado que vários fatores poderão afetar a produção de enzimas digestivas no peixe, tais como, hábitos alimentares, preferências alimentares, formulação das dietas e fatores anti nutricionais (Pavasovic et al., 2007), os efeitos pela adição das enzimas podem ser mais eficientes numa espécie do que noutras. A capacidade de espécies de nível trófico inferior em utilizar eficientemente dietas com baixo teor de FP é maior do que a de espécies carnívoras de nível trófico superior (NRC, 2011). Finalmente, é importante mencionar que após a formulação das dietas a atividade enzimática, como por exemplo da xilanase, foi menor do que era expectável (baseada na atividade do extrato). Embora as dietas não tenham sofrido processo de extrusão, o calor produzido durante o processo de fabrico das mesmas poderá ter de alguma forma desnaturado as enzimas. No futuro, será importante equacionar possíveis formas de proteger os extractos de forma a evitar a desnaturação das proteínas como por exemplo o “coating” com agar ou outras substâncias.

Conclusão

No geral, este trabalho mostrou que a suplementação com um extrato enzimático obtido a partir da FES da dreche aumentou a digestibilidade da matéria seca, amido e energia em dietas para juvenis de robalo. Apesar de não se terem verificado diferenças significativas no crescimento, houve uma melhoria substancial na eficiência alimentar. Melhorias na digestibilidade dos nutrientes e eficiências alimentares poderão significar uma grande redução da excreção do material não digerível para o meio ambiente e, simultaneamente, ganhos económicos com a poupança em gastos com ração. Desta forma, é possível contribuir para um desenvolvimento económico e ambientalmente sustentável da aquacultura. Para além disso, face aos resultados obtidos, foi demonstrada a enorme potencialidade do uso em rações para peixe de extratos enzimáticos ricos em carbohidrases, produzidos de forma económica e ambientalmente sustentável, utilizando o processo biotecnológico de FES e como substrato um sub-produto agro-industrial local, a dreche.

Bibliografia

- Adeola, O., Cowieson, A.J., 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.* 89, 3189–3218. Adeoye, A.A., Jaramillo-Torres, A., Fox, S.W., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016.
- Adeoye A.A., Yomla R., Jaramillo-Torres A., Rodiles A., Merrifield D.L., Davies S.J., 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture* 463. 61–70
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, W., Xu, W., Tan, B., Zhang, C., Li, H., 2007. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 147, 502–508
- Ali, H.K., Zulkali, M., 2011. Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly.* 25.
- Ali, M., Iqbal, F., Salam, A., Iram, S., Athar, M. 2005. Comparative study of body composition of different fish species from brackish water pond. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2:359-364.
- Ali, M., Salam, A., Iqbal, F., 2001. Effect of environmental variables on body composition parameters of *Channa punctata*. *Journal of Research (Science)* 12:200-206.
- Aliyu, S., Bala, M, 2010. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(3), pp. 324-331
- Alliot, E., Febvre, A., Metailler, R., Pastoureaud, A., 1974. Besoins nutritifs du bar (*Dicentrarchus labrax L.*). Etude du taux de protéine et du taux de lipid dans le régime. *Actes de Colloque CNEXO 1*, 215–228.
- Anderson, M. J.; Blanton, J. R., Jr.; Gleghorn, J.; Kim, S. W.; Johnson, J. W., 2006. *Ascophyllum nodosum* supplementation strategies that improve overall carcass merit of implanted English crossbred cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 19 (10): 1514-1518
- Ang S.K., Shaza E.M., Abidah Y., Suraini A.A., Madihah M. S., 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry.* 48. 1293-1302.
- AOAC, 2016. Official methods of analysis of AOAC international. AOAC International, Maryland, Rockville, p 3172

- Azam, K., Ali, M. Y., Asaduzzaman, M., Basher, M. Z., Hossain, M. M., 2004. Biochemical Assessment of Selected Fresh Fish. *Journal of Biological Sciences* 4:9-10
- Barrows, F.T., Stone, D.A., Hardy, R.W., 2007. The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 265 (1-4), 244-252.
- Bartolomeu B., Gomez-Cordoves, C., 1999. Barley spent grain: Release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *J Sci Food Agr* 79(3), 435-439.
- Behera S. S., Ray R.C., 2016. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int J Biol Macromol.* 86:656-69.
- Bell, J.G., Koppe, W., 2010. Lipids in aquafeeds. Fish Oil Replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. P. 21-59
- Boujard, T., Anne, G., Denis, C., Corraze, G., Dutto, G., Eric, G., Kaushik, S., 2004. Regulation of feed intake, growth, nutrient and energy utilisation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high fat diets. *Aquaculture* (0044-8486) (Elsevier), 2004-03, Vol. 231, N. 1-4, P. 529-545. 231.
- Breck, J. E. 2014. Body composition in fishes: body size matters. *Aquaculture* 433:40-40.
- Carboué Q, Tranier M-S, Perraud-Gaime I, Roussos S, 2016. Production of microbial enzymes by solid-state fermentation for food applications. *Microbial enzyme technology in food applications*. CRC Press, New York, 437-451
- Carter C.G., McCarthy I.D., Houlihan D.F., 1994. Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *Can. J. Zool.* 72: 609-617.
- Castillo, S., Gatlin III D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435. 286-292
- Castro, C., Corraze, G., Panserat, S., Oliva-Teles, A., 2015. Effects of fish oil replacement by a vegetable oil blend on digestibility, postprandial serum metabolite profile, lipid and glucose metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*. 21 P. 592-603.
- Cho, C.Y., Kaushik, S.J., 1985. Effect of Protein Intake on Metabolizable and Net Energy Values of Fish Diets. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M. and Bell, J.G., Eds., *Nutrition and Feeding in Fish*, Academic Press, London, 95-117.

- Cho, C.Y., Slinger, S., Bayley, H., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 25–41.
- Choct, M., 1997. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed Mill. Int.* 191, 13–26
- Choct, M., 2006. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *Worlds Poult. Sci. J.*, 62, 5–15.
- Choct, M., Cadogan D.J., 2001. How effective are supplemental enzymes in pig diets? P.D. Cranwell (Ed.), *Manipulating pig production VII*, Australasian Pig Science Association, Werribee, VIC, Australia, pp. 240-253
- Coutteau, P., Van Sorgeloos G., Sorgeloos P., 1996. A standard experimental diet for the study of fatty acid requirements of weaning and first on-growing stages of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L.: comparison of extruded and extruded/coated diets. 49(1):49-59.
- Coves D, Dewavrin G, Breuil G, N. D, 1991. Culture of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In: *Handbook of Mariculture* (ed by McVey JP). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3-20.
- Cowieson, A. J., Hruby, M., Pierson, E. E. M., 2006. Evolving enzyme technology: Impact on commercial poultry nutrition. *Nutrition Research Reviews*, 19, 90–103.
- Dalsgaard, J., Verhac, V., Hjermitsev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., Klausen, M., Pedersen, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 171, 181–191
- Del Bianchi L., Capalbo D.M.F., Moraes I.O., 2001. *Fermentação em estado sólido*. Schimmedell, U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani (Eds.), *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, Edgard Blücher Ltda., São Paulo
- Dey TB, Kuhad RC, 2014. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnol Rep.*; V4:120–127
- Dias M.G., Magalhães R., Sousa D., Salgado J., Aires T., Oliva-Teles A., Belo I., Peres H., 2016. Apparent digestibility and digestive enzymes activities of dried distiller grains with solubles (DDGS) solid after solid state fermentation by *Aspergillus ibericus* in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Europe*.

- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy ratio in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169–186.
- Diógenes, A.F., Basto A., Estevão-Rodrigues T.T., Mountinho S., Oliva-Teles, A., Peres, 2019. Soybean meal replacement by corn distillers dried grains with solubles (DDGS) and exogenous non-starch polysaccharidases supplementation in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 500, 435-442
- Diógenes, A.F., Castro, C., Carvalho, M., Magalhães, R., Estevão-Rodrigues, T.T., Serra, C.R., Oliva-Teles, A., Peres, 2018. Exogenous enzymes supplementation enhances diet digestibility and digestive function and affects intestinal microbiota of turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles fed distillers' dried grains with solubles (DDGS) based diets. *Aquaculture* 486, 42-50.
- Divanach P, Kentouri M, 2000. Hatchery techniques for specific diversification in mediterranean finfish larviculture. CIHEAM - Options Mediterraneenes, 75-87.
- Drew, M. D., Borgeson, T. L., Thiessen, D. L., 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 138 (2): 118-136
- Dulf F., Vodnar, D., Dulf, E., Tosa, M., 2015. Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities, and Lipid Fractions from Berry Pomaces Obtained by Solid-State Fermentation of Two Sambucus Species with *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63
- Dülger, N., Kumlu, M., Turkmen, S., Ölçülü, A., Eroldogan, T., Yılmaz, H. A., Öçal, N., 2012. Thermal tolerance of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles acclimated to three temperature levels. *Journal of Thermal Biology*. 37. 79-82.
- Durand A., 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13:113–125
- Ebrahimi, I. G., Ouraji, H., 2012. Growth performance and body composition of kutum fingerlings, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901), in response to dietary protein levels. *Turkish Journal of Zoology* 36:551-558.
- El-Shafey, E.I. Gameiro M.L.F., Correia P.F.M., Carvalho J.M.R., 2004. Dewatering of Brewer's Spent Grain Using a Membrane Filter Press: A Pilot Plant Study, *Separation Science and Technology*, 39:14, 3237-3261
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35, 519-539.

- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2011. Dietary Carbohydrate Utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. *Reviews in Fisheries Science*. 19, 201-215.
- FAO 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome.
- FAO 2019. © FAO 2005-2019. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchus labrax*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Bagni, M. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 18 February 2005. [Consultado a 31 Agosto 2019].
- Farhangi, M., Carter, C.G., 2007. 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*, 38: 1274-1282.
- Faulds, C.B., Collins, S., Robertson, J.A., Treimo, J., Eijsink, V.G.H., Hinz, S.W.A., Schols, H.A., Buchert, J., Waldron, K.W., 2009. Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers' spent grain. *J Cereal Sci* 50(3), 332-336
- Faulds, C.B., Robertson, J.A., Waldron, K.W., 2008. Effect of pH on the solubilization of brewers' spent grain by microbial carbohydrases and proteases. *J Agric Food Chem* 56(16), 7038-7043.
- Fernandes, H., Salgado, J.M., Martins, N., Peres, H., Oliva-Teles, A., Belo, I., 2019. Sequential bioprocessing of *Ulva rigida* to produce lignocellulolytic enzymes and to improve its nutritional value as aquaculture feed. *Bioresource Technology*, 281, 277-285
- Figueiredo S.A., Rocha, E.; Dias, J., 2005. Partial replacement of fish oil by soybean oil lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquac. Nutr.*, v.11, p.147-155.
- Filer, K., 2001. The newest old way to make enzymes. *Feed Mix.*, 9: 27-29.
- Fishbase, 2019. *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). European seabass. Consultado 21 Maio, 2019. <http://www.fishbase.org/summary/Dicentrarchus-labrax.html>
- FishStatJ - Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 21 July 2016. [Cited 31 August 2019]. <http://www.fao.org/fishery/>
- Fleuri L.F., Kawaguti H.Y., Pedrosa V.A., Vianello F., Lima G.P.P., Novelli P.K., Okino-Delgado C.H., 2013. Exploration of Microorganisms Producing Bioactive Molecules of Industrial

- Interest by Solid State Fermentation. In: Lima G., Vianello F. (eds) *Food Quality, Safety and Technology*. Springer, Vienna
- Forsell, P., Kontkanen, H., Schols, H. A., Hinz, S., Eijnsink, V. G. H., Treimo, J., Robertson, J. A., Waldron, K. W., Faulds, C. B., Buchert, J., 2008. "Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes" . *Journal of the Institute of Brewing*, 114 (4), 306-314.
- Fournier, V., Gouillou-Coustans, M.F., Kaushik, S.J., 2000. Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Nutrition* 130, 617–620
- Francis G, Harinder P.S., Makkar K.B., 2001. Anti nutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197–227
- Furukawa, A., Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish diet. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 32, 502-506.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G.S., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*. 38, 551-579.
- Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J. L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C. L., Mazurais, D., 2011. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics* 12.
- Ghomi, M.R., Shahriari R. Langroudi F., Nikoo M., von Elert E., 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. *Aquac Int* 20: 249-254.
- Goda A.M., Mabrouk H.A., Wafa M.A., El-Afifi T.M., 2012. Effect of using baker's yeast and exogenous digestive enzymes as growth promoters on growth, feed utilization and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Journal of Agricultural Science and Technology*. B. 2012;2(1B).

- Gouveia, A., Davies, S.J., 1998. Preliminary nutritional evaluation of pea seed meal (*Pisum sativum*) for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 166, 311–320.
- Gouveia, A., Davies, S.J., 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182, 183–193
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., Gallagher, E., 2010. Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 318–328.
- Hansen, G.H., Lübeck, M., Frisvad, J.C., Lübeck, P.S., Anderson, B., 2015. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v.50, n.9, p.1327-1341
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41.
- Hassaan, M.S., Soltan, M.A., Abdel-Moez, A.M., 2015. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces Cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 201, 89–98.
- Hölker, U., Lenz, J., 2005. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v.8, n.3, p.301-306,
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L.E., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for seabream and sea bass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9:397-407.
- Kamal, R., Khan, A. N., Rahman, M. A., Ahamed. F., 2007. Biochemical composition of some small indigenous fresh water fishes from the river Mouri, Klulna, Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10:1559-1561.
- Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Araki, Y., 2001. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis." *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59 (2), 59-62.
- Kaushik, S.J., Coves, D., Dutto, G., Blanc, D., 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 230, 391-404.

- Kaushik, S.J., Gouillou-Coustans, M.F., Cho, C.Y., 1998. Application of the recommendations on vitamin requirements of finfish by NRC (1993) to salmonids and sea bass using practical and purified diets. *Aquaculture*, 161: 463–474.
- Kaushik, S.J., 1998. Whole body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA needs. *Aquatic Living Resources*, 11: 355–358.
- Kokou F., Fountoulaki E., 2018. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients, *Aquaculture*, V 495, P. 295-310.
- Kokou, F., Rigos, G., Henry, M., Kentouri, M., Alexis, M., 2012. Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 364: 74-81
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M., Kentouri, M., 2015. Effects of fish meal replacement by a soybean protein on growth, histology, selected immune and oxidative status markers of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46 (2), 115–128
- Kousoulaki, K., Sæther, Bjørn-Steinar, Albrektsen, Sissel, Noble, C., 2015. Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: A practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquaculture Nutrition*. 21
- Krishna C., 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit Rev Biotechnol*. 25(1-2):1-30.
- Krogdahl, A., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* 11, 103–122.
- Kumar A., Kanwar S.S., 2012. Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. *Dyn Biochem, Process Biotechnol Mol Biol.*;V6(1):13–27
- Kumar, V., Akinleye, A., Makkar, H.P.S., Angulo-Escalante, M.A., Becker, K., 2012. Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 96 (1): 37-46
- Kuz'mina V.V., 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts, *Aquaculture*, Volume 148, Issue 1, Pages 25-37

- Lanari, D., D'Agaro E., 2005. Alternative plant protein sources in sea bass diets. *Ital J Anim Sci* 4:365-374
- Lanari, D., Poli, B.M., Ballestrazzi, R., Lupi, P., D'Agaro, E., Mecatti, M., 1999. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture* 179, 351–364.
- Leal. M.C.M.R, Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., Sant'anna Jr. G.L., 2002. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Brazillian Journal of Chemical Engineering.*, v.19, p.175-180
- Leenhouwers, J.I., Adjei-Boateng, D., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2006. Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. *Aquacult. Nutr.*, 12, 111–116.
- Leite, P., Salgado, J.M., Venâncio, A., Domínguez, J.M., Belo, I., 2016. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresource technology* 214, 737-746.
- Lin, S., Mai, K., Tan, B., 2007. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquac. Res.* 38, 1645–1653.
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci Rep.*, 6, 24340.
- Lizardi-Jiménez, M. A., Hernández-Martínez, R., 2017. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, 7(1), 44.
- Lopez, B., Pontiggia, R.M., Fernandez, H., 2010. Process for drying brewer's spent grains. Patent US2008/084135
- Magalhães R., Díaz-Rosales P., Diógenes A.F., Enes P., Oliva-Teles A., Peres H., 2018. Improved digestibility of plant ingredient-based diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) with exogenous enzyme supplementation. *Aquaculture Nutrition*.24:1287-1295
- Magalhães R., Lopes T., Martins N., Díaz-Rosales P., Couto A., Pousão-Ferreira P., Oliva-Teles A., Peres H., 2016. Carbohydrases supplementation increased nutriente utilization in

- white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed high soybean meal diets. *Aquaculture*. 43-50.
- Martin, Samuel, Król, Elżbieta, 2017. Nutrigenomics and immune function in fish: New insights from omics technologies. *Developmental & Comparative Immunology*. 75.
- Martins N., Estevão-Rodríguez T., Diógenes A.F., Diaz-Rosales P., Oliva-Teles A., Peres H., 2018. Taurine requirement for growth and nitrogen accretion of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) juveniles
- Messina, M., Piccolo, G., Tulli, F., Messina, C. M., Cardinaletti, G., Tibaldi, E., 2013. Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing wheat gluten and legume meals as substitutes for fish meal. *Aquaculture* 376:6-14.
- Metailler, R., Aldrin, J.F., Messager, J.L., Mevel, G., Stephan, G., 1981. Feeding of European sea bass *Dicentrarchus labrax*: Role of protein and energy source. *Journal of World Mariculture Society* 12, 117–118.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovic, M., 2006. Introduction to solid state fermentation bioreactors. *Solid-state Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer, Heidelberg, Berlin pp 33-44.
- Moura, Guilherme de Souza, Lanna, E.A.T., Filer, K., Falkoski, D.L., Donzele, J.L., Oliveira, M.G.A, Rezende, S.T., 2012. Effects of enzyme complex SSF (solid state fermentation) in pellet diets for Nile tilapia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(10), 2139-2143
- Mourente, G., Good, J. E., Thompson, K. D., Bell, J. G., 2007. Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Br. J. Nutr.* 98: 770-779.
- Mourente, G., Good, J.E., Bell, J.G., 2005. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2a, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult. Nutr.* 11:25-40

- Moustakas, C.T., Watanabe, O.W., K.A. Copeland, 2004. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival and osmoregulatory ability of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture*, 229, 159-179.
- Mussatto S.I., 2009. Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products. In: Singh nee' Nigam P, Pandey A (eds.). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer, 313-326.
- Mussatto S.I., Roberto I.C., 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 268-274.
- Mussatto S.I., Rocha G.J.M., Roberto I.C., 2008. Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. *Cellulose* 15:641-649.
- Mussatto, S. I.; Dragone, G., Roberto, I. C., 2006. "Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications." *Journal of Cereal Science*, 43 (1), 205-212.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 106(36): 15103-15110.
- Novelli K.P., Barros M.M., Pezzato L.E., Araujo E.P., Botelho R.M., Fleuri L.F., 2017. Enzymes produced by agro-industrial roducts enhance digestible values for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding. *Aquaculture*. 481, 1-7
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington D. C., USA
- NRC (National Research Council), 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academic Press, Washington, DC, USA (376).
- Ogunkoya, A.E., Page, G.I., Adewolu, M.A., Bureau, D.P., 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 254, 466–475.
- Oliva-Teles A., Gouveia A.J., Gomes E., Rema P., 1994. The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, Volume 124, 1–4, 343-349
- Oliva-Teles, A., 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition *Aquaculture International*, 8: 477.

- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*. 35, 83-108.
- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H., 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeed. Feed and feeding practices in aquaculture. In: Davis, A. (Ed.), *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Woodhead Publishing Limited, Waltham, MA, USA, 203–233.
- Oliva-Teles, A., Gonçalves, P., 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccaromyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquacult.*, 202 (3-4): 269-278
- Oliva-Teles, A., Pimentel-Rodrigues A., 2004. Phosphorus requirement of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles
- Olsen, R.L., Hasan, M.R., 2012. A Limited Supply of Fishmeal: Impact on Future Increases in Global Aquaculture Production. *Trends in Food Science & Technology*, 27, 120-128.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P, 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* 77:149–162
- Pandey A, Soccol C.R., Larroche C., 2007. Current Developments in Solid-state Fermentation, in: A. Pandey, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Springer Science/Asiatech Publishers, Inc., New York, USA/New Delhi, India, pp. 13–25.
- Pavasovic, A., Anderson, A.J., Mather, P.B., Richardson, N.A., 2007. Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Research* 38, 644-652.
- Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A., 2011. Lack of compensatory growth response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles following starvation and subsequent refeeding. *Aquaculture* 318, 384-388.
- Peres, M.H., Oliva-Teles, A., 1999(a). Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 170, 337-348.
- Peres, M.H., Oliva-Teles, A., 1999(b). Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 179, 325-334.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview *Int Microbiol*. 5(2):53-63

- Pérez, L., Gonzalez, H., Jover, M., Fernández-Carmona, J., 1997. Growth of European sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets containing varying levels of protein, lipid and carbohydrate. *Aquaculture* 156, 183–193.
- Picket, G.D., M.G. Pawson, 1994. Sea bass: biology, exploitation and conservation. *In Fish and Fisheries Series*, Vol. 12 (Ed. T. J. Pitcher), pp. 1-235.
- Refstie, S., Svihus, B., Shearer, K. D., Storebakken, T., 1999. Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharides content in different soyabean products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 79: 331-345
- Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S., Corraze, G., 2006. Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261:1077– 1087
- Robertson, J.A., l'anson, K.J., Brocklehurst, T.F., Faulds, C.B., Waldron, K.W., 2010. Effect of storage conditions on the microbial ecology and biochemical stability of cell wall components in brewers' spent grain. *J Agric Food Chem* 58 (12), 7266-7272
- Rodríguez-Zúñiga, U.F., Farinas, C.S., Neto, V.B., Couri, S., Crestana, S., 2011. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(8), 912-919
- Russ, W., Mörtel, H., Meyer-Pittroff, R., 2005. Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Construction and Building Materials* 19, 117-126.
- Salar R.K., Certik M., Brezova V., 2012. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol Bioprocess Eng.*,17(1):109–116.
- Salgado J.M, Abrunhosa L., Venâncio A., Domínguez J.M., Belo I., 2014. Screening of winery and olive mill wastes for lignocellulolytic enzyme production from *Aspergillus* species by solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 4. 10
- Salgado J.M, Abrunhosa L., Venâncio A., Domínguez J.M., Belo I., (2015). Enhancing the Bioconversion of Winery and Olive Mill Waste Mixtures into Lignocellulolytic Enzymes and Animal Feed by *Aspergillus uvarum* Using a Packed-Bed Bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (42), 9306-9314
- Sargent, J.R., Tocher, D., Bell, J.G., 2002. Fish Nutrition. The lipids. 181-257.

- Shi, X., Luo Z., Chen F., Huang C., Zhu X.-M., Liu X., 2017. Effects of dietary cellulase addition on grown performance, nutrient digestibility and digestive enzyme activities of juvenile crucian carp *Carassius auratus*. *Aquaculture Nutrition*. 23: 618-628.
- Singh S.K., Sczakas G., Soccol C.R., Pandey A., 2008. Production of enzymes by solid-state fermentation. *Current developments in solid-state fermentation*. Springer, New York, pp 183–204
- Singhania, R., Patel, A., Soccol, C., Pandey, A., 2008. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44. 13-18.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, 2010. A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, p.541-549
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition—a review. *Food Chem*. 127, 1409–1426.
- Smits, C.H., Annison, G., 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultry Sci. J*. 52, 203–221.
- Sousa D., Venâncio A., Belo I., Salgado J.M., 2018. Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *J Sci Food Agric* 2018; 98: 5248-5256
- Stone, D.A.J., 2003. Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science*. 11, 337-369.
- Thomas L, Larroche C, Pandey A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.*, 81:146–161
- Thompson, K.R, Rawles S.D., Metts L.S., Smith R.G, Wimsatt A., Gannam A.L., Twibell R.G., Johnson R.B., Brady Y.J., Webster C.D., 2008. Digestibility of dry matter, protein, lipid, and organic matter of two fish meals, two poultry by-product meals, soybean meal, and distiller's dried grains with solubles in practical diets for sunshine bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. *J World Aquac Soc*. 39:352–363.
- Tibaldi, E., Kaushik, S.J., 2002. Amino acid requirements of Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63: 59–65.

- Tišma, M., Jurić, A., Bucić-Kojić, A., Panjičko, M., Planinić, M., 2018. Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols: Biovalorization of brewers' spent grain. *Journal of the Institute of Brewing*. 124. 10.1002/jib.479.
- Tocher, D.R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*. 449, 94-107.
- Tolan J, Foody B., 1999. Cellulase from submerged fermentation. *Recent Prog Bioconvers Lignocellulosics*; 65:41–67.
- Vahjen, W., Glaser, K., Schafer, K., Simon, O., 1998. Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *J. Agric. Sci.* 130, 489–500.
- Vahjen, W., Osswald, T., Schafer, K., Ortwin, S., 2007. Comparison of a xylanase and a complex of non-starch polysaccharide-degrading enzymes with regard to performance and bacterial metabolism in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 61, 90–102.
- van Barneveld, R. J., 1999. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr. Res. Rev.*, 12: 203-230
- Varsamos, S., 2002. Tolerance range and osmoregulation in hyper saline conditions in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *L. Mar. Biol.*, 138, 909-915.
- Venou, B., Alexis, M.N., Fountoulaki, E., Haralabous, J., 2006. Effects of extrusion and inclusion level of soybean meal on diet digestibility, performance and nutrient utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 261 (1), 343–356
- Venou, B., Alexis, M.N., Fountoulaki, E., Nengas, I., Apostolopoulou, M., Castritsi-Cathariou, I., 2003. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 225 (1–4), 207–223.
- Villasante A., Ramírez C., Catalán N., Opazo R., Dantagnan P., Romero J., 2019. Effect of Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio on Gut Microbiota in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Animals* 9, 89.
- Wheeler, A., 1975. *Fishes of the World*; Macmillan Publishing Co., Inc. New York
- Wilson R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish, *Aquaculture*, Volume 124, Issues 1–4, 1994, Pages 67-80

- Xiangyang L., Chandrakant K., 2017. Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Pages 267-298
- Yigit N.O, Keser E., 2016. Effect of cellulose, phytase and pectinase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) fry fed diets containing canola meal. *J Appl Ichthyol*;32(5):938–42
- Yigit, N.O., Olmez, M., 2011. Effects of cellulase addition to canola meal in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. *Aquac. Nutr.* 17, e494–e500.
- Zamini, A., Gholipour K. H., Esmaeili, A., Ramezani, S., Zorriehzakra, J., 2014. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Comparative Clinical Pathology*. 23.

Anexos

ANEXO I – Resumo elaborado para a Conferência Aquaculture Europe 2019

IN VITRO EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN EXOGENOUS CARBOHYDRASES PRODUCED BY SOLID-STATE FERMENTATION OF BREWERS' SPENT GRAIN AND DIGESTIVE ENZYMES

Helena Fernandes^{1,5}; Francisco J. Moyano²; Nelson Fernandes¹; José Salgado³; Tiago Aires⁴; Isabel Belo³; Aires Oliva-Teles^{*1,5}; Helena Peres^{1,5}; Carolina Castro⁵

^{1*}Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal; ²Dpto. Biología y Geología, CEIMAR, University of Almería, Almería, Spain ³CEB – Centre of Biological Engineering of University of Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal; ⁴Sorgal, Sociedade de Óleos e Rações, SA, Ovar, Portugal; ⁵CIMAR/CIIMAR-Centro Interdisciplinar Marinha e Ambiental,, Universidade do Porto, Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões, Av. General Norton de Matos 4450-208 Matosinhos, Portugal.
 e-mail: aoteles@fc.up.pt

Introduction

The presence of non-starch polysaccharides (NSP) in most plant feedstuffs (PF) has been associated with adverse effects on carnivorous fish nutrient digestibility and, ultimately, on growth and health. The lack of enzymatic machinery and well-developed microbiota in the digestive tract of carnivorous fish for processing NSP are possible causes for such effects. A promising nutritional strategy to improve nutrient digestibility of plant-based diets is the use of exogenous enzymes (e.g. carbohydrases, proteases) as feed additives. Solid-state fermentation (SSF) is an eco-friendly and cost-effective biotechnology process that allows converting inexpensive agro-industrial by-products into added-value products such as carbohydrases. As a low-cost and lignocellulosic by-product of the brewing industry, brewery spent grain (BSG) is an attractive substrate for microbial enzyme production by SSF. The present study was designed to assess the potential of a carbohydrase enzyme extract obtained by SSF to release total amino acids (AA) and monosaccharides (pentoses) from plant-based diets in an *in vitro* gastrointestinal model with enzyme extracts of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

Material and methods

Three isoproteic (48% crude protein) and isolipidic (16% crude lipids) diets were formulated with 15% fishery products (fish meal and fish protein concentrate), 5% hemoglobin, and 61% plant feedstuffs (wheat gluten, soybean, wheat, rice bran, sunflower, rapeseed). In all diets fish oil was the main lipid source. Diets were similar in starch (10%), hemicellulose (2.4%), cellulose (1.6%) and lignin (2.3%) contents. The diets were unsupplemented (control) or supplemented with an enzyme extract obtained by SSF at 0.1 or 0.4%. The enzyme extract was obtained from SSF of BSG using *Aspergillus ibericus* MUM 03.49 as the inducer for enzyme production. The enzyme extract was a combination of cellulase (1343U g⁻¹ crude extract) and xylanase (15885U g⁻¹ crude extract).

The *in vitro* methodology involved two-step hydrolysis designed to simulate stomach and intestinal digestion of European sea bass, as described in Morales and Moyano (2010). Briefly, the digestion was simulated using the following conditions: samples of each diet (between 20 and 80 mg mL⁻¹) were incubated in triplicate in a 10 mL closed reactor at 25°C simulating gastric and intestinal digestions. The gastric digestion was done at pH of 5.0 with 9846 U mg⁻¹ acid proteases and the intestinal digestion was done at pH of 8.5 with 507 U mg⁻¹ alkaline proteases from sea bass stomach and intestine, respectively. A negative control assay including inactivated fish enzyme extracts was also carried out. The release of hydrolysis products, AA and pentoses, were monitored along the course of each digestion phase (at 0, 0.5, 1, 2h for gastric digestion; at 3, 4, 5, and 6h for intestinal digestion). Results are presented as total amount of product released during the different digestion phases.

Results and Discussion

Table I. Total amino acids (AA, mg g⁻¹) and pentoses (µg g⁻¹) released by gastric (G) and intestinal (I) digestion of the experimental diets with active (A) or inactive (W) fish enzyme extracts¹

Diet	Control				0.1% BSG				0.4% BSG			
	G		I		G		I		G		I	
Digestion phase	A	W	A	W	A	W	A	W	A	W	A	W
Incubation mixture												
AA	18.7 ±0.1	14.9 ±0.1	27.3 ±0.5	24.3 ±0.2	19.2 ±0.3	18.3 ±0.4	27.7 ±0.5	11.4 ±0.0	18.9±0.0	17.3 ±0.3	29.4 ±0.1	23.9 ±0.6
Pentoses	179.1 ±26.8 ^a	197.2 ±10.9 ^a	232.1 ±32.0 ^a	267.0 ±27.5 ^a	198.3 ±40.5 ^b	217.1 ±7.5 ^b	282.3 ±65.3 ^b	355.2 ±10.1 ^b	261.5 ±48.4 ^c	291.2 ±11.3 ^c	328.3 ±26.2 ^c	394.3 ±13.2 ^c
3-way ANOVA (P-value)												
Factor	diet	digestion phase	incubation mixture	diet x digestion phase		diet x reaction mixture		digestion phase x reaction mixture		diet x digestion phase x reaction mixture		
AA	≤0.001	≤0.001	≤0.001	≤0.001		≤0.001		≤0.001		≤0.001		
Pentose	≤0.001	≤0.001	≤0.001	0.179		0.663		0.103		0.774		

¹Value are mean ± SD (n = 3). When significant interaction between factors was found, one-way ANOVA was performed for each factor. Different superscript letters stand for statistical differences across experimental diets as determined by the Tukey test (P < 0.05).

After the pelleting process, 0.1 and 0.4 % BSG supplemented diets presented 1.76 and 5.76 U g⁻¹ cellulase activities and 5.11 and 8.80 U g⁻¹ xylanase activities, respectively. The simulated gastric and intestinal digestion demonstrated that AA release remained unaffected by dietary treatments (Table I). In contrast, a significant increment of pentoses release in the presence of increased incorporation of extracts in the diets was observed throughout gastric and intestinal incubations. Independently of dietary treatment, AA and pentoses release were higher at intestinal than at gastric digestion. In all dietary treatments, inactivation of fish enzyme extracts (W), promoted higher pentoses release than active fish enzyme extracts(A). Contrarily, inactivation of fish enzyme extracts did not affect AA release from experimental diets, except in the 0.1% BSG diet.

In conclusion, dietary supplementation of plant-based diets with 0.1 or 0.4 % enzyme extracts obtained by SSF of BSG seems to contribute to enhancing monosaccharide availability. Results also suggest that fish enzyme extracts interact with carbohydrases extract reducing their ability to hydrolyze NSP. Thus, coating the enzyme extract should be considered to maximize their potential. Studies *in vivo* still need to be performed to confirm the results of the present *in vitro* results.

Acknowledgments: supported by POCI-01-0145-FEDER-030377 and MAR-02.01.01-FEAMP-0111. HF and CC supported by grants SFRH/BD/131219/2017; SFRH/BPD/114942/2016, respectively.

References: Morales GA, Moyano FJ (2010). *Aquaculture* 306: 244–251.