

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

NANDARA SOARES DE OLIVEIRA

**DESEMPENHO E SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FARELO DE SOJA
FERMENTADO**

**LAGES
2021**

**DESEMPENHO E SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FARELO DE SOJA
FERMENTADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, da Universidade do Estado
de Santa Catarina, como requisito para obtenção
do título de Doutora em Ciência Animal, área de
concentração em Produção Animal. Orientador:
Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat

**LAGES
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Oliveira, Nandara

Desempenho e saúde intestinal de juvenis de jundiá alimentados com dietas contendo farelo de soja fermentado / Nandara Oliveira. -- 2021.

72 p.

Orientador: Thiago Fabregat

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

1. Rhamdia quelen. 2. Fermentação. 3. Nutrição. 4. Enzimas digestivas. I. Fabregat, Thiago. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu pai,
João Soares de Oliveira (*in memoriam*), por todo amor,
educação e esforço. E ao meu
irmão, Lucas Soares de Oliveira,
essa conquista também é de
vocês.

AGRADECIMENTOS

Sou grata aos meus pais que apesar das dificuldades não mediram esforços para que eu tivesse uma boa educação.

À minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

Ao meu namorado, Tercio Fehlauer, pelo carinho, incentivo e paciência nos momentos difíceis.

Ao professor Thiago El Hadi Fabregat, pela orientação, aprendizado e paciência durante esses anos.

Aos amigos e colegas de laboratório Larissa da Cunha, Kayane Besen, Natália Ha, Luiz Augusto Cipriani e Rafaela Gomes pelo auxilio durante a realização deste trabalho, e aos demais colegas pela convivência e troca de conhecimentos.

À UDESC, seus professores e funcionários pela oportunidade de cursar em uma instituição de qualidade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigada.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original". Albert Einstein

RESUMO

A fermentação é um processo em que microrganismos degrada macromoléculas em compostos solúveis de baixo peso molecular. Existem evidências de resultados positivos sobre os efeitos dos fermentados sobre a saúde dos peixes, mas ainda são limitados. Para estudar essa questão foram realizados dois experimentos com duração de 56 dias. No experimento 1 o objetivo foi avaliar o nível de inclusão do farelo de soja fermentado pela bactéria *Lactobacillus acidophilus* (FSFL), sobre o desempenho e saúde intestinal de juvenis de jundiá. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Foram utilizados 240 juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) ($3,0 \pm 0,5$ g) que foram distribuídos em 20 caixas de polietileno. Foram formuladas cinco dietas isoproteicas (39% de proteína bruta) e isoenergéticas (cerca de 4300 kcal de energia bruta/kg) com cinco níveis de inclusão (0, 7, 14, 21 e 28%) do FSFL. No experimento 2, o objetivo foi comparar o efeito de dietas contendo farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) com farelo de soja fermentado por Aquate® (FSFA) sobre o desempenho zootécnico e saúde intestinal de juvenis de jundiá. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, e os tratamentos corresponderam à adição de 0, 7 e 14% de FSFL e 7 e 14% de FSFA. Foram utilizados 240 juvenis de jundiá ($17,44 \pm 4,08$ g) distribuídos em 20 caixas de polietileno. No experimento 1 a inclusão de até 21% de FSFL não afetou o desempenho dos jundiás. Os peixes alimentados com a dieta contendo 28% de FSFL tiveram menor ganho de peso em relação ao tratamento controle. A inclusão de 14% de FSFL diminuiu a concentração de bactérias vibrionáceas presentes no intestino em relação ao tratamento controle. No experimento 2 a inclusão de FSFL e FSFS aumentou o número de células caliciformes. A atividade da amilase intestinal aumentou com a inclusão de FSFL 7%. Os estudos mostram que podemos incluir até 21% de FSFL e 14% de FSFA sem prejudicar o desempenho zootécnico, morfologia intestinal de juvenis de jundiá. A quantidade de bactérias patogênicas no intestino diminuiu com a inclusão de 14% de FSFL. A inclusão de 7% de FSFL aumenta a atividade da amilase intestinal de juvenis de jundiá. O farelo de soja fermentado é um ingrediente que traz benefícios à saúde intestinal de juvenis de jundiá.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*; fermentação; nutrição; enzimas digestivas.

ABSTRACT

Fermentation is a process in which microorganisms break down macromolecules into soluble low molecular weight compounds. There is evidence of positive results about the effects of fermentates on fish health, but they are still limited. To study this question, two experiments were carried out with a duration of 56 days. In experiment 1, the objective was to evaluate the level of inclusion of soybean meal fermented by the bacterium Lactobacillus acidophilus (FSFL), on the performance and intestinal health of juveniles of silver catfish. The experiment was carried out in a completely randomized design with five treatments and four replications. 240 juveniles of silver catfish (*Rhamdia quelen*) (3.0 ± 0.5 g) were used and distributed in 20 polyethylene boxes. Five isoproteic (39% crude protein) and isoenergetic diets (about 4300 kcal of crude energy / kg) were formulated with five FSFL inclusion levels (0, 7, 14, 21 and 28%). In experiment 2, the objective was to compare the effect of diets containing soybean meal fermented by Lactobacillus acidophilus (FSFL) with soybean meal fermented by Aquate® (FSFA) on the zootechnical performance and intestinal health of juveniles of silver catfish. The experiment was carried out in a completely randomized design with five treatments and four replications, and the treatments corresponded to the addition of 0, 7 and 14% FSFL and 7 and 14% FSFA. 240 juveniles of silver catfish (17.44 ± 4.08 g) were distributed in 20 polyethylene boxes. In experiment 1, the inclusion of up to 21% of FSFL did not affect the performance of the silver catfish. Fish fed a diet containing 28% FSFL had less weight gain compared to the control treatment. The inclusion of 14% FSFL decreased the concentration of vibrionaceous bacteria present in the intestine in relation to the control treatment. In experiment 2, the inclusion of FSFL and FSFS increased the number of goblet cells. Intestinal amylase activity increased with the inclusion of FSFL 7%. Studies show that we can include up to 21% FSFL and 14% FSFA without impairing zootechnical performance, intestinal morphology of juveniles of silver catfish. The amount of pathogenic bacteria in the intestine decreases with the inclusion of 14% FSFL. The inclusion of 7% of FSFL increases the intestinal amylase activity of juveniles of silver catfish. Studies have shown that fermented soybean meal is an ingredient that benefits the intestinal health of juvenile silver catfish.

Keywords: *Rhamdia quelen*; fermentation; nutrition; digestive enzymes.

APRESENTAÇÃO

Esta tese contém três capítulos, sendo que nesses se encontram os seguintes manuscritos:

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.

CAPÍTULO 2 – Manuscrito elaborado na forma de artigo científico com o título “O farelo de soja fermentado pode melhorar a saúde intestinal de juvenis de jundiá?”

CAPÍTULO 3 – Manuscrito elaborado na forma de artigo científico com o título: “O enriquecimento do farelo de soja fermentado pode melhorar a saúde intestinal de juvenis de jundiá?”

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

Figura 1. Contagem de bactérias láticas de farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> em diferentes tempos de fermentação.....	35
Figura 2. Avaliações de pH no farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> em diferentes tempos de fermentação.....	35
Figura 3. Atividade de amilase (UA/mg) no farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> em diferentes tempos de fermentação.....	36
Figura 4. Atividade da enzima protease no farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> em diferentes tempos de fermentação.....	37
Figura 5. Proteína solúvel (mg/L) de farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> em diferentes tempos de fermentação utilizando o método de Bradford.....	37

Capítulo 3

Figura 1. Análise microbiológica de farelo de soja fermentado com Aquate® (FSFA) e farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> (FSFL) em diferentes tempos de fermentação.....	55
---	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Composição bromatológica e dos aminoácidos da farinha de peixe, farelo de soja e farelo de soja fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (FSFL).....	16
Tabela 2. Exemplos de peptídeos bioativos do fermentado de soja.....	16
Tabela 3. Trabalhos publicados que utilizaram alimento fermentado na alimentação animal.....	18
Tabela 4. Composição de aminoácidos (g/ 100 g de proteína) da farinha de peixe, farelo de soja e farelo de soja fermentado com diferentes microrganismos.....	22
Tabela 5. Resultados de trabalhos que utilizaram farelo de soja em substituição a farinha de peixe na alimentação de peixes e não tiveram o desempenho afetado.....	23

Capítulo 2

Tabela 1. Composição bromatológica e dos aminoácidos da farinha de peixe, farelo de soja e farelo de soja fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (FSFL).....	38
Tabela 2. Formulação e composição analisada das dietas experimentais.....	39
Tabela 3. Desempenho zootécnico de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FSFL.....	43
Tabela 4. Concentração de vibrionáceas, bactérias heterotróficas totais e total microrganismos lácticos (UFC.g ⁻¹ intestino) de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fermentado de soja.....	43
Tabela 5. Atividade enzimática intestinal de juvenis de jundiá jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FSFL.....	44
Tabela 6. Histologia intestinal de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FSFL.....	44

Capítulo 3

Tabela 1. Níveis de garantia do Aquate®.....	55
Tabela 2. Composição bromatológica do farelo de soja, farelo de soja fermentado com Aquate® e farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i>	56
Tabela 3. Composição das dietas experimentais.....	57

Tabela 4. Desempenho (médias ± desvio padrão) de juvenis de jundiá alimentados com dietas farelo de soja fermentado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e Aquate®.....	61
Tabela 5. Histologia intestinal de juvenis de jundiá jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fermentado de soja com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e Aquate®.....	61
Tabela 6. Atividade enzimática intestinal de juvenis de jundiá jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fermentado de soja com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e Aquate®.....	61

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1. Introdução.....	14
2. Revisão Bibliográfica	16
2.1 Alimentos fermentados	16
2.3 Microrganismos utilizados na fermentação	20
2.2 Fermentado de soja	21
2.4 <i>Rhamdia quelen</i>	24
3. Referências.....	26
CAPITULO 2- O FARELO DE SOJA FERMENTADO PODE MELHORAR A SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ?.....	31
1. Introdução.....	33
2. Materiais e métodos	34
2.1 Delineamento experimental	34
2.2 Produção e caracterização do fermentado	34
2.3 Dietas experimentais	39
2.4 Animais e instalação	40
2.5 Desempenho produtivo e coleta de amostras	40
2.6 Avaliações microbiológicas	41
2.7 Análises enzimáticas	41
2.8 Morfometria intestinal	42
2.9 Análises estatísticas	42
3. Resultados	43
4. Discussão	44
5. Conclusão	46
6. Referências.....	47
CAPITULO 3- O ENRIQUECIMENTO DO FARELO DE SOJA FERMENTADO PODE MELHORAR A SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE JUNDIÁ?.....	51
1. Introdução.....	53
2. Material e métodos	54
2.1 Delineamento experimental	54
2.2 Produção e caracterização do fermentado	54
2.3 Dietas experimentais	57

2.4 Animais e instalações.....	58
2.5 Desempenho produtivo e coleta de amostras.....	58
2.6 Morfometria intestinal	59
2.7 Análises enzimáticas.....	59
2.8 Análises estatísticas	60
3. Resultados	60
4. Discussão	62
5. Conclusão	64
6. Referências.....	65
7. Considerações finais.....	71

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O aumento populacional fez com que crescesse o consumo de peixes em todo o mundo (DELGADO et al, 2020). Para atender a essa demanda por pescado, tornou-se necessária a expansão e intensificação da produção (CALIXTO et al., 2020). Essas práticas podem levar a uma depressão imunológica e fisiológica dos peixes e, consequentemente, alta mortalidade, fazendo com que o setor busque por rações de qualidade (NEDAEI et al., 2019). Diferentes ingredientes têm sido estudados a fim de garantir que os animais possuam um desempenho satisfatório, e aumente sua resistência aos patógenos (SHAO et al., 2019) A fermentação é uma estratégia para atribuir propriedades funcionais a ingredientes amplamente utilizados nas dietas (SANJUKTA; RAI, 2016). Durante o processo de fermentação os microrganismos quebram as ligações peptídicas, e disponibilizam peptídeos com diferentes massas moleculares e sequências de aminoácidos (AZARM; LEE, 2014). Estas sequências apresentam atividades biológicas muito diversas e benéficas (SANJUKTA; RAI, 2016).

O farelo de soja é um ingrediente que tem sido comumente utilizado na fermentação por ser uma fonte proteica mais acessível e possuir um perfil de aminoácidos equilibrado (JIANG et al., 2017). Em estudos com peixes, o uso do farelo de soja fermentado demonstrou resultados positivos sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos, do metabolismo lipídico e da saúde hepato-intestinal, bem como, efeito antioxidante (CHOI et al., 2020; HE et al; 2020; WANG et al., 2019; NOVRIADI et al., 2018; JIANG et al., 2018; SEONG et al., 2018; WANG et al., 2016). Melhora nas respostas imunes inespecíficas e na atividade de enzimas digestivas também foram observadas (CHOI et al., 2020; HE et al., 2020; SEONG et al., 2018; FOTEDAR, 2017; LEE et al., 2016; SOTOUDEH et al., 2016; SHIU et al., 2015).

A escolha da cultura inicial de bactérias utilizada para fermentação é muito importante, uma vez que esta permite o controle sobre o processo, acelera e orienta quais tipos de microrganismos estarão presentes e padroniza o produto final (LEROY et al., 2004). Os *Lactobacillus* tem sido bastante utilizado na fermentação pois são consideradas bactérias não patogênicas e seguras (SELLA et al., 2014). Assim como o *Enterococcus faecium*, um membro da microflora intestinal dos peixes, é um probiótico reconhecido com efeitos inibitórios contra enteropatógenos (LEE et al., 2016). Além da fermentação bacteriana, temos a fermentação fúngica. Assim como na fermentação bacteriana, na

fermentação fúngica o tamanho da proteína é reduzido e aumenta-se o valor nutricional da ração (MUKHERJEE et al., 2016).

Em geral os trabalhos utilizando o farelo de soja fermentado na dieta de peixes abordam-no apenas como ingrediente nas dietas. Recentemente mais pesquisas têm avaliado o uso do fermentado e seu impacto na saúde (LEE et al., 2016), porém ainda são necessários mais estudos. Diante disso, o objetivo geral desta tese foi avaliar o efeito do nível de inclusão e do enriquecimento do farelo de soja fermentado sobre o desempenho zootécnico e saúde intestinal de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Alimentos fermentados

A fermentação de alimentos é uma ferramenta biotecnológica utilizada atualmente por seus benefícios à saúde. Este processo é utilizado desde os tempos antigos para preservar os alimentos perecíveis (SANJUKTA; RAI, 2016). Os fermentados podem ser definidos como aqueles alimentos ou bebidas que servem como substratos para microrganismos cujas enzimas (amilases, proteases, lipases entre outras), transformam compostos orgânicos complexos em componentes menores (HUTKINS, 2006). As fermentações podem ser classificadas em alcoólica, acética e lática (Tabela 1), de acordo com metabólitos e microrganismos envolvidos, e consequentemente, o produto desta fermentação. (CARVALHO, 2016).

Tabela 1. Tipos de fermentação

Tipo	Matéria-prima	Produto	Agente	Exemplo
Alcoólica	Açúcares solúveis	Etanol + CO ₂	<i>S. cerevisiae</i>	Vinho e cerveja
Acética	Etanol	Ácido acético	<i>Acetobacter</i>	Vinagre de vinho
Lática	Carboidrato	Ácido Lático	<i>Lactoacillus</i>	Azeitonas, soja

Adaptado de Carvalho, 2016

Durante a fermentação, os microrganismos quebram as cadeias proteicas, liberando pequenas cadeias de aminoácidos, peptídeos bioativos, que são inativos dentro da sequência proteica original (SANJUKTA; RAI, 2016.). Os peptídeos bioativos, dependendo de sua sequência de aminoácidos, podem influenciar os principais sistemas do organismo, como cardiovascular, digestivo, nervoso e imunológico (SANJUKTA; RAI, 2016). Algumas das propriedades dos peptídeos bioativos do fermentado de soja são a melhora do sistema imunológico, diminuição de lipídeos no sangue, aumento da atividade cerebral e controle de infecção, normalidade do movimento intestinal (Tabela 2) (SINGH et al., 2014).

Tabela 2. Exemplos de peptídeos bioativos do fermentado de soja.

Bioatividade	Peptídeos
Prevenção do câncer	Met-Leu-Pro-Ser-Try-Ser-Pro-Try
Anti-hipertensivo	Tyr-Val-Val-Phe-Lys
Diminuição do colesterol	Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg
Estimulação da fagocitose	His-Cys-Gln-Arg-Pro-Arg e Gln-Arg-Pro-Arg
Antioxidante	Tyr, Met, His, Lys, e Trp
Imunomodulador	His-Cys-Gln-Arg-Pro-Arg e Gln- Arg-Pro-Arg

Met: metionina; Leu: leucina; Pro: prolina; Ser: serina; Try: triptofano; Val: valina; Phe: fenilalanina; Lys: lisina; His: histidina; Cys: cisteína; Gln: glutamina; Arg: arginina. Adaptado de Singh et al., 2014

A escolha da cultura inicial de bactérias utilizada para fermentação é muito importante, uma vez que esta permite o controle sobre o processo, acelera e orienta quais tipos de microrganismos estarão presentes e padroniza o produto final (LEROY et al., 2004). Alimentos fermentados também servem frequentemente como transportadores de bactérias probióticas (REZAC et al., 2018). No entanto, o fato de um alimento ser produzido por fermentação não indica necessariamente que contenha microrganismos vivos (HUTKINS, 2006). Durante o processo de secagem da ração pode ocorrer a inativação dos microrganismos pela ação do calor (REZAC et al., 2018). Mesmo alimentos fermentados não processados termicamente podem conter baixos níveis de organismos vivos devido às condições ambientais desfavoráveis que reduzem as populações microbianas ao longo do tempo (TAMANG et al., 2016). A ausência de microrganismo vivos no produto final não impede um papel funcional positivo, as vitaminas, inativação de fatores antinutricionais continuarão presentes no momento do consumo (REZAC et al., 2018).

Nos últimos anos, aumentou as pesquisas com uso de produtos fermentados como ingrediente na alimentação animal como um meio de aumentar o desempenho dos animais (AZARM; LEE 2014)). A fermentação aumenta a utilização de proteína pelos animais ao torna-la mais facilmente digerível (JIANG et al., 2018) e reduz os fatores antinutricionais como o ácido fítico, por meio da redução do pH, que otimiza a atividade de fitase endógena, removendo assim a maioria deste ácido (MARCO et al., 2017). Melhora o perfil de aminoácidos, possui microrganismos probióticos, promove crescimento, melhorando a absorção de nutrientes e respostas imunes exercidas e efeitos antioxidantes (DOSSOU et al., 2018), favorece a morfologia intestinal e as atividades das enzimas digestivas (FENG et al., 2007). Na tabela a seguir (Tabela 3) alguns trabalhos que utilizaram ingredientes fermentados na alimentação animal e obtiveram resultados positivos em relação a saúde dos animais.

Tabela 3. Trabalhos publicados que utilizaram alimento fermentado na alimentação animal.

Autor	Espécie	Ingrediente fermentado e nível de inclusão	Nível	Resultado
Dawood et al. 2021	Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	Farinha de subproduto de aves fermentado por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15-20%	Aumento da enzima digestiva e da função imunológica e crescimento
Zhang et al., 2020	Kinguio (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	Folhas de moringa fermentadas por <i>Aspergillus niger</i>	40%	Aumento do crescimento, resposta antioxidante e resistência a doenças
Li et al., 2020 A	Achigã	Farelo de soja fermentado por <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	14%	Aumento o crescimento e imunidade não específica
Li et al., 2020 B	Pregado (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Farelo de soja fermentado por <i>Enterococcus faecium</i>	36%	Aumento o crescimento, capacidade antioxidante e imunidade
Xu et al., 2020	Caranguejo-luva chinês (<i>Eriocheir sinensis</i>)	Farelo de soja fermentado por <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15%	Melhora na enzimas digestivas e na capacidade de absorção de aminoácidos
Dossou et al., 2018	Pargo-japonês (<i>Pagrus major</i>)	Farelo de colza fermentado com <i>Aspergillus oryzae</i>	25-50%	Aumentou crescimento, utilização de nutrientes, resposta imune e efeito anti-oxidante
Novriadi et al., 2017	Pampo-verdadeiro (<i>Trachinotus carolinus</i>)	Farelo de soja fermentado por <i>Aspergillus oryzae and Bacillus subtilis</i>	50%	Preveniu alterações histológicas no fígado

Jiang et al., 2017	Achigã	Farelo de soja fermentado por <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>	40%	Aumentou crescimento
Ding et al., 2015	Camarão (<i>Macrobrachium nipponense</i>)	Farelo de soja fermentado por <i>Pediococcus acidilactic</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>candida utilis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i> ;	25%	Melhorou crescimento

2.3 Microrganismos utilizados na fermentação

A fermentação microbiana é realizada usando fungos ou cepas bacterianas (MUKHERJEE et al., 2016). Os *Lactobacillus* tem sido bastante utilizado na fermentação pois são consideradas bactérias não patogênicas e seguras (SELLE et al., 2014). É não-flagelado, não-móvel, não forma esporos, e é intolerante ao sal. O pH ótimo para crescimento é de 5,5 a 6,0, e pode ocorrer a uma temperatura tão alta quanto 45 ° C, mas o crescimento ótimo ocorre dentro de 35–40° C, e (OZOGUL; HAMED, 2016). Utilizam como fonte energética carboidratos como amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, salicina, sacarose e trealose (GOMES; MALCATA, 1999). Segundo Ganzle (2015) durante a fermentação dos alimentos os *Lactobacillus* inibem outros microrganismos competidores ao combinar a rápida utilização de carboidratos e produção de ácidos láticos. A maioria das culturas probióticas são dos gêneros *Lactobacillus* (SELLE et al., 2014). As bactérias pertencentes ao grupo *acidophilus* produzem uma variedade de compostos antimicrobianos, o que faz com que diminua a quantidade de bactérias patogênicas (GOPAL, 2011).

Dentre as bactérias fermentadoras também temos o *Enterococcus faecium*, um membro da microflora intestinal dos peixes, é um probiótico reconhecido com efeitos inibitórios contra enteropatógenos (LEE et al., 2020). As bactérias do gênero *Enterococcus* são pertencentes ao grupo Gram-positivo, se apresentam como cocos isolados ou agrupados em cadeias curtas (AZEVEDO, 2013). São anaeróbios facultativos e a temperatura ótima de crescimento é 35°C, embora a maioria se desenvolva entre 20 e 45°C, crescem em meios contendo altas concentrações de sal e em pH de até 9,6 (DONATO, 2007). Fermentam diferentes carboidratos dentre eles manitol, arabinose, sacarose, rafinose e sorbitol (AZEVEDO, 2013). Estudos anteriores relataram que *E. faecium* poderia induzir respostas imunes e inibir a infecção causada por *Edwardsiella tarda* em enguia europeia (*Anguilla anguilla* L.) (CHANG; LIU, 2002) e *Lactococcus garvieae* em solha verde-oliva (*Paralichthys olivaceus*) (KIM et al., 2012). A inclusão de *E. faecium* pode melhorar o desempenho de crescimento, as respostas imunes e atividade antioxidante em tilápia (LEE et al., 2020)

Além da fermentação bacteriana, temos a fermentação fúngica. Dentre as espécies utilizadas temos a *Saccharomyces cerevisiae*. É um fungo unicelular, anaeróbio facultativo, utiliza glicose, maltose e sacarose como fonte de energia (DUARTE, 2011). Segundo o mesmo autor, a temperatura ótima de seu crescimento entre 20 e 30°C, e pH

entre 4,5 e 5,5. Esta levedura produz metabólitos diferentes, como enzimas, oligossacarídeos, aminoácidos, peptídeos, ácidos orgânicos e vitaminas (DAWOOD; KOSHIO, 2019). Assim como na fermentação bacteriana, na fermentação fúngica o tamanho da proteína é reduzido. A fermentação fúngica aumenta o valor nutricional da ração, aumentando a extrato etéreo e o conteúdo de proteína bruta (MUKHERJEE et al., 2016). Quando utilizada como probióticos nas dietas, a *S cerevisiae* pode ter um impacto positivo no desempenho do crescimento, nas respostas imunes e na resistência a doenças de várias espécies de peixes cultivadas (DAWOOD et al., 2020).

2.2 Fermentado de soja

O farelo de soja tem sido utilizado como substituto parcial da farinha de peixe devido ao seu alto teor proteico, perfil de aminoácidos平衡ados e sua digestibilidade relativamente alta e baixo custo (LIANG et al., 2017). A fermentação quebra as ligações peptídicas, tornando os peptídeos de cadeia curta mais disponíveis (SONG et al., 2014), também pode ocorrer a formação de aldeídos que conferem características sensoriais agradáveis, melhorando a aceitabilidade da soja (ESTEVES, 2017). A fermentação utilizando diferentes tipos de microrganismo resulta em composição de aminoácidos distintas, aumentando a quantidade dos mesmos, em relação à soja sem fermentação (Tabela 4).

Tabela 4. Composição de aminoácidos (g/ 100 g de proteína) da farinha de peixe, farelo de soja e farelo de soja fermentado com diferentes microrganismos.

	Microrganismos utilizados:							
	Farinha de peixe	Farelo de soja	<i>Candida utilis-</i> Zhou et al 2011	<i>Bacillus-</i> Kader 2011	<i>Aspergillus</i> <i>oryzae-</i> Dai et al, 2017	<i>Sacharomices</i> <i>cerevisiae</i> Sharawy et al. 2016	<i>Bacillus</i> <i>subtilis-</i> Shiu et al 2015	<i>Bacillus spp.-</i> Yamamoto et al. 2010
Proteína	68	45	58	-	44,82	50	50,2	48,3
Lisina	5,25	2,68	3,04	3,52	6,28	2,75	3,1	3,1
Metionina	1,57	0,59	0,63	0,38	2,49	0,57	0,5	0,8
Arginina	4,64	3,38	3,45	3,16	6,20	2,84	3,5	3,6
Treonina	2,53	1,71	2,01	1,85	3,71	1,82	2	1,9
Leucina	5,36	3,35	3,68	3,22	8,08	3,89	3,8	3,9
Isoleucina	3,29	1,99	2,17	1,78	4,88	1,99	2,2	2,3
Valina	3,79	2,09	2,33	3,20	5,83	2,03	2,3	2,4
Histidina	1,57	1,17	1,22	1,89	3,85	1,13	1,5	1,2
Fenilalanina	3,11	2,21	2,41	3,69	7,32	2,21	27	2,6

Na Tabela 5 estão apresentados estudos que abordaram o uso do fermentado de farelo de soja, com diferentes microrganismos, em substituição a farinha de peixe na alimentação de peixes. Os estudos mostram que esta substituição não prejudica o desempenho zootécnico dos animais, até mesmo em níveis mais elevados (47,65%) como no caso da truta (*Oncorhynchus mykiss*). Estudos já mostraram a possibilidade do uso do farelo de soja fermentado como substituto da farinha de peixe, porém são necessários mais estudos abordando os impactos e benefícios dessa substituição na saúde dos animais.

Tabela 5. Resultados de trabalhos que utilizaram farelo de soja em substituição a farinha de peixe na alimentação de peixes e não tiveram o desempenho afetado.

Autor	Espécie	Microrganismo	Nível
He et al., 2020	<i>Micropterus salmoides</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Lactobacillus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30%
Choi et al., 2019	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40%
Seong et al., 2018	<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	27,9%
Liang et al., 2017	<i>Lateolabrax japonicus</i>	-	25%
Lee et al., 2016	<i>Sebastes schlegeli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	40%
Wang et al., 2016	<i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	45%
Hassaan et al., 2015	<i>Oreochromis Niloticus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37,4%
Zhou et al., 2011	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> ,	<i>Candida utilis</i>	20%
Yamamoto et al., 2010	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Bacillus sp</i>	47,6%

2.4 *Rhamdia quelen*

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe de água doce nativo da América do Sul, encontrado desde a Argentina até o México, vivendo em lagos e partes profundas de rios (MATHIAS et al., 2018). É uma espécie que possui grande importância econômica e seu cultivo vem crescendo rapidamente principalmente no sul do Brasil (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018). Em 2019 foram produzidas 678,14 toneladas de jundiás em Santa Catarina (EPAGRI, 2019). Seu cultivo ganhou destaque devido a sua rusticidade ao manejo, bom crescimento durante o inverno, além da boa aceitação pelos consumidores por seu sabor agradável, ausência de espinhos intramusculares e bom rendimento de carcaça (GUILOSKI et al., 2018).

Os alevinos possuem rápido crescimento, atingindo 5 cm de comprimento padrão com 30 dias de idade em sistemas artificiais. Os animais submetidos à escuridão têm crescimento maior quando comparado aos expostos ao fotoperíodo normal (GOMES et al., 2000). O crescimento do jundiá aumenta com o incremento da temperatura, principalmente nos primeiros anos (MATHIAS et al., 2018). Até o quarto ano de vida os machos tem maior taxa de crescimento, após esse período as fêmeas passam a crescer mais rapidamente (GOMES et al., 2000).

Trata-se de uma espécie onívora, com tendência ao carnivorismo, se alimentando desde peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, até detritos orgânicos (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018). É generalista em relação à escolha do alimento, sendo encontrado em seu conteúdo gastrointestinal organismos além do habitat bentônico (GOMES et al., 2000). Segundo Signor et al., (2004) nas rações é recomendado utilizar 38% de proteína bruta para alevinos · proporcionando bom desempenho dos animais e aumento na deposição de proteína corporal. No entanto, esta espécie responde positivamente a níveis superiores de proteína bruta (SIGNOR et al., 2004).

Nos últimos anos o jundiá tem sido utilizado como modelo no estudo de ingredientes e aditivos. Sutili et al (2019) testou o efeito da suplementação de sistemas nanoestruturados carreadores de citral sobre as respostas imunes inatas e a microbiota intestinal, e observou redução da população bacteriana total no intestino do peixe. O nível de inclusão de 5% de hidrolisado de proteíco de sardinha causou aumento na atividade enzimática digestiva e nas populações de bactérias ácido-lácticas, quando suplementado nas dietas de jundiás (HA et al., 2019). Uczay et al. (2019) incluíram o farelo de soja hidrolisado nas dietas e o crescimento do jundiá foi maior em todos os níveis de inclusão quando comparado à dieta controle. Mauerwerk et al. (2021) avaliou os efeitos do glicerol

na alimentação de alevinos e até 7,5% da inclusão de glicerol ou mesmo a substituição total do milho sem afetar parâmetros morfométricos e de desempenho ou causando danos à saúde. Diante desses resultados, pode-se concluir que o farelo de soja fermentado é um ingrediente promissor, trazendo benefícios ao crescimento e saúde na aquicultura. E com base em estudos anteriores essa espécie foi escolhida como modelo biológico dos estudos que compõem esta tese.

3. Referências

AZARM, H. M.; LEE, S. Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 994-1003, 2014.

AZEVEDO, M. E. F. IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS SPP.* E AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA Á VANCOMICINA EM AMOSTRAS DE PACIENTES DE HOSPITAIS DE MANAUS. Tese de doutorado. Unesp Botucatu. 2013.

BANDEIRA JUNIOR, G., DOS SANTOS, A. C., SOUZA, C. DE F., BALDISSERA, M. D., MOREIRA, K. L. DOS S., DA VEIGA, M. L., BALDISSEROTTO, B. Citrobacter freundii infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*): Hematological and histological alterations. **Microbial Pathogenesis**. 2018.

CALIXTO, E. S.; SANTOS, D. F. B.; LANGE, D.; GALDIANO, M. S.; RAHMAN, I. U. Aquaculture in Brazil and worldwide: overview and perspectives. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v.5, n. 1, p. 98-107. 2020.

CARVALHO, I. T. D. Microbiologia dos alimentos. 2016. Universidade federal rural de Pernambuco. EDUFPE. 84 p. 1ed.

DAWOOD, M. A.; KOSHIO, S. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 987-1002, 2020.

DELGADO, C. L.; WADA, N.; ROSEGRANT, M. W.; MEIJER, S.; AHMED, M. The future of fish: issues and trends to 2020. 2020.

DING, Z.; ZHANG, Y.; YE, J.; DU, Z.; KONG, Y. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 44, n. 1, p. 295-301. 2015.

DONATO, S. T. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E SEMI-AUTOMATIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS SPP.* FRENTE À BIOLOGIA MOLECULAR EM IDENTIFICAÇÕES DISCREPANTES. Tese de mestrado. Universidade Federal do Ceará. 2007.

DOSSOU, S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; DAWOOD, M. A.; EL BASUINI, M. F.; OLIVIER, A. Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 490, p. 228-235. 2018.

DUARTE, J. C. ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM SUPORTES NO PROCESSO DE

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. 2011.

EPAGRI- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Gráfico e tabelas de produção de peixes. Disponível em:
<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMTc1MTg4YzYtZGM0NC00M2I0LWE3N2EtYWY1OGYyZWY5YTczIwidCI6ImExN2QwM2ZjLTRiYWMtNGI2OC1iZDY4LWUzOTYzYTJlYzRlNiJ9>. Acesso em 04 de abril de 2021.

ESTEVES, T. C. F. **Influência do processo de obtenção de extrato fermentado e não fermentado de soja preta sobre compostos bioativos e capacidade antioxidante.** Tese de doutorado. Rio de Janeiro. 2017.

FENG, J.; LIU, X.; XU, Z. R.; LU, Y. P.; LIU, Y. Y. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 8, p. 1845-1850, 2007.

GAENZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015.

GOMES, L. D. C., GOLOMBIESKI, J. I., GOMES, A. R. C., BALDISSEROTTO, Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GOPAL, P. K. Lactic Acid Bacteria| *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. 2011.

GUIOSKI, I.C.; PIANCIN, L.D.S.; DAGOSTIN, A.C.; CALADO, S.L. M.; FÁVARO, L.F.; BOSCHEN, S.L.; CESTARI, M.M., SILVA DE ASSIS, H.C. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 139, 291–300. 2017

HA, N.; JESUS, G. F. A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S.; SUGAI, J. K., PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture**, v. 500, p. 99-106. 2019.

HASSAAN, M. S.; SOLTAN, M. A.; ABDEL-MOEZ, A. M. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 89-98. 2015.

HE, M.; YU, Y.; LI, X.; POOLSAWAT, L.; YANG, P., BIAN, Y.; LENG, X. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diets of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, nutrition utilization and intestinal histology. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 10, p. 4302-4314, 2020.

HUTKINS, R. W. Fermented vegetables. **Microbiology and Technology of fermented foods**, p. 223-259, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama geral da pecuária brasileira em 2017. Produção da Pecuária Municipal, v.41, 2017.

JIANG, Y.; ZHAO, P. F.; LIN, S. M.; TANG, R. J.; CHEN, Y. J.; LUO, L. Partial substitution of soybean meal with fermented soybean residue in diets for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n.4, p. 1213-1222. 2017.

KADER, M. A.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; BULBUL, M., HONDA, Y.; LAINING, A. rowth, nutrient utilization, oxidative condition, and element composition of juvenile red sea bream *Pagrus major* fed with fermented soybean meal and scallop by-product blend as fishmeal replacement. **Fisheries Science**, v. 77, n. 1, p. 119-128, 2011.

KIM, Y.-R E.-Y. KIM, S.-Y. CHOI, M.T. HOSSAIN, R. OH, W.-S. HEO, J.M. LEE, Y.C. CHO,I.-S. Kong, Effect of a probiotic strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 526-529, 2012.

LEE, S. M.; AZARM, H. M.; CHANG, K. H. Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture**, v. 459, p. 110-116. 2016.

LEROY, F.; VUYST, L.; Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIANG, X. F.; HU, L.; DONG, Y. C.; WU, X. F.; QIN, Y. C.; ZHENG, Y. H; XUE, M. Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 229, p. 1-12. 2017.

MARCO, M. L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C. J.; COTTER, P. D., FOLIGNÉ, B.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current opinion in biotechnology**, v. 44, p. 94-102, 2017.

MATHIAS, F. T., FOCKINK, D. H., DISNER, G. R., PRODOCIMO, V., RIBAS, J. L. C., RAMOS, L. P., SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of low concentrations of ibuprofen

on freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 105–113. 2018.

MAUERWERK, MT; ZADINELO, IW; JÚNIOR, MCZ; BALEN, RE; BOMBARDELLI, RA; DA SILVA, LCR, ... & MEURER, F. Glycerol effects on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerling feeding: Morphometric, zootechnical and blood parameters. **Aquaculture**, v. 535, p. 736361, 2021.

MUKHERJEE, R.; CHAKRABORTY, R.; DUTTA, A. Role of fermentation in improving nutritional quality of soybean meal—a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 11, p. 1523. 2016.

NEDAEI, S.; NOORI, A.; VALIPOUR, A.; KHANIPOUR, A. A.; HOSEINIFAR, S. H. Effects of dietary galactooligosaccharide enriched commercial prebiotic on growth performance, innate immune response, stress resistance, intestinal microbiota and digestive enzyme activity in Narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). **Aquaculture**, v. 499, p. 80-89. 2019

NOVRIADI, R.; RHODES, M.; POWELL, M.; HANSON, T.; DAVIS, D. A. Effects of soybean meal replacement with fermented soybean meal on growth, serum biochemistry and morphological condition of liver and distal intestine of Florida pompano *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture nutrition**, v. 24, n. 3, p. 1066-1075. 2018.

ÖZOGUL, F., HAMED, I.; GOKDOGAN, S. The impact of natural clinoptilolite on ammonia, cadaverine and other polyamine formation by food-borne pathogen in lysine decarboxylase broth. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 703-710, 2016.

REZAC, S., KOK, C. R., HEERMANN, M., & HUTKINS, R. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1785, 2018.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-10. 2016.

SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. Carboidratos das fibras de cotilédones e proteínas de produtos derivados de soja (*Glycine max* (L.) Merril). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, 2008.

SHAO, J.; WANG, B.; LIU, M.; JIANG, K.; WANG, L.; WANG, M. Replacement of fishmeal by fermented soybean meal could enhance the growth performance but not significantly influence the intestinal microbiota of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 504, p. 354-360. 2019.

SHARAWY, Z.; GODA, A. M. S.; HASSAAN, M. S. Partial or total replacement of fish meal by solid state fermented soybean meal with *Saccharomyces cerevisiae* in diets for Indian prawn shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Postlarvae. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 90-99. 2016.

SHIU, Y. L.; HSIEH, S. L.; GUEI, W. C.; TSAI, Y. T.; CHIU, C. H.; LIU, C. H. Using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet 466 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, H amilton). **Aquaculture Research**, v. 46, n. 6, p. 1403-1416, 2015.

SIGNOR, A., SIGNOR, A. A., FEIDEN, A., BOSCOLO, W. R., REIDEL, A., & HAYASHI, C. Exigência de proteína bruta para alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. **Varia Scientia**, v. 4, n. 8, p. 79-89, 2004.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179. 2014.

SONG, Y.S.; PÉREZ, V.G.; PETTIGREW J.E.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; DE MEJIA E.G. Fermentation of soybean meal and its inclusion in diets for newly weaned pigs reduced diarrhea and measures of immunoreactivity in the plasma. **Anim Feed Sci Technol**, v.159, p. 41–49. 2014.

SUTILI, FJ, KREUTZ, LC, FLORES, FC, DA SILVA, CDB, KIRSTEN, KS, VOLOSKI, APDS, ... & BALDISSEROTTO, B. Effect of dietary supplementation with citral-loaded nanostructured systems on innate immune responses and gut microbiota of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Functional Foods** , v. 60, p. 103454, 2019.

TAMANG, J. P., SHIN, D. H., JUNG, S. J., & CHAE, S. W. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 578, 2016.

UCZAY, J.; BATTISTI, E. K.; LAZZARI, R.; PESSATTI, M. L.; SCHNEIDER, T. L. S.; HERMES, L. B.; FABREGAT, T. E. H. P. Fish meal replaced by hydrolysed soybean meal in diets increases growth and improves the antioxidant defense system of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Research**. v. 50, n. 5, p. 1438-1447, 2019

WANG, L.; ZHOU, H.; HE, R.; XU; W., MAI, K.; HE, G. Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 464, p. 87-94. 2016.

YAMAMOTO, T.; IWASHITA, Y.; MATSUNARI, H.; SUGITA, T.; FURUITA, H.; AKIMOTO, A.; SUZUKI, N. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 309, n. 4, p. 173-180. 2010.

ZHOU, F.; SONG, W.; SHAO, Q.; PENG, X.; XIAO, J.; HUA, Y.; Ng, W. K. Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 2, p. 184-197. 2011.

Capítulo 2- O farelo de soja fermentado pode melhorar a saúde intestinal de juvenis de jundiá?

Resumo

A fermentação é um método que pode promover a qualidade de ingredientes da ração, inativar fatores antinutricionais, melhorar a biodisponibilidade nutricional e aumentar as proteínas solúveis e pequenos peptídeos. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) sobre o desempenho zootécnico e saúde intestinal de juvenis de jundiá. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, e os tratamentos corresponderam à adição de 0, 7, 14, 21 e 28% de fermentado de soja às dietas. Foram utilizados 240 juvenis de jundiá ($3,0 \pm 0,5$ g) distribuídos em 20 caixas de polietileno. O experimento teve duração de 56 dias. Os seguintes parâmetros de desempenho serão avaliados: peso médio final, ganho de peso (GP, g = peso médio final – peso médio inicial), conversão alimentar aparente (CA= consumo de ração/ ganho de peso), e sobrevivência. No final do experimento foram coletados dois peixes por repetição para análises de histomorfometria intestinal, dois peixes por repetição para as análises microbiológicas e 2 peixes por repetição para as análises de atividade enzimática. A inclusão de até 21% de FSFL não afetou o desempenho dos juvenis de jundiá. Os peixes alimentados com a dieta contendo 28% de FSFL tiveram menor ganho de peso em relação ao tratamento controle. A inclusão de 14% de FSFL diminuiu a concentração de bactérias vibrionáceas presentes no intestino em relação ao tratamento controle. A quantidade de bactérias láticas e bactérias heterotróficas totais não diferiram entre os tratamentos. A inclusão de FSFL não alterou a atividade da amilase, protease alcalina e lipase no trato digestório. A inclusão de FSFL não alterou a largura, altura total e parcial das vilosidades intestinais. Conclui-se que a inclusão de até 21% de fermentado de soja não prejudica o desempenho zootécnico, morfologia intestinal e atividade enzimática de juvenis de jundiá. A quantidade de bactérias patogênicas no intestino diminui com a inclusão de 14% de fermentado de soja.

Palavras-chave: Fermentação, *Rhamdia quelen*; nutrição de peixes; enzimas digestivas; histologia intestinal

Abstract

Fermentation is a method that can promote the quality of feed ingredients, inactivate antinutritional factors, improve nutritional bioavailability and increase soluble proteins and small peptides. The objective of this work is to evaluate the effect of diets containing different levels of inclusion of soybean meal fermented by *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) on the zootechnical performance and intestinal health of juveniles of silver catfish. The experiment was carried out in a completely randomized design with five treatments and four replications, and the treatments corresponded to the addition of 0, 7, 14, 21 and 28% of soy fermented to the diets. 240 juveniles of silver catfish (3.0 ± 0.5 g) were distributed in 20 polyethylene boxes. The experiment lasted 56 days. The following lots of performance parameters will be evaluated: final average weight, weight gain (GP, $g = \text{final average weight} - \text{initial average weight}$), apparent feed conversion (AC = feed intake / weight gain), and survival. At the end of the experiment, two fish were collected per repetition for analysis of intestinal histomorphometry, two fish per repetition for microbiological analyzes and 2 fish per repetition for analyzes of enzymatic activity. The inclusion of up to 21% of FSFL did not affect the performance of silver catfish juveniles. Fish fed a diet containing 28% FSFL had less weight gain compared to the control treatment. The inclusion of 14% of FSFL decreased the concentration of vibriophageous bacteria present in the intestine in relation to the control treatment. The amount of lactic bacteria and total heterotrophic bacteria did not differ between treatments. The inclusion of FSFL did not alter the activity of amylase, alkaline protease and lipase in the digestive tract. The inclusion of FSFL did not change the width, total and partial height of the intestinal villi. It is concluded that the inclusion of up to 21% of soy fermented does not affect the zootechnical performance, intestinal morphology and enzymatic activity of juveniles of silver catfish. The amount of pathogenic bacteria in the intestine decreases with the inclusion of 14% soy fermented.

Keywords: Fermentation, *Rhamdia quelen*; fish nutrition; digestive enzymes; intestinal histology

1. Introdução

Alimentos fermentados são consumidos na alimentação humana há muitos anos, devido a sua qualidade nutricional e funcional (MUKHERJEE et al., 2016). Nos últimos anos, o uso de produtos fermentados como ingrediente na aquicultura atraiu a atenção dos pesquisadores, principalmente como substituto da farinha de peixe (LIANG et al., 2017; JIANG et al., 2017; LEE et al., 2016; SHARAWY et al., 2016; WANG et al., 2016). A fermentação é um método que pode promover a qualidade de ingredientes da ração, inativar fatores antinutricionais, melhorar a biodisponibilidade nutricional e aumentar as proteínas solúveis e pequenos peptídeos (CHOI et al., 2020)

O farelo de soja é um ingrediente que tem sido comumente utilizado na fermentação por ser uma fonte proteica de baixo preço e possuir um perfil de aminoácidos equilibrado (JIANG et al., 2017). A fermentação melhora algumas propriedades do farelo de soja, como a diminuição dos fatores antinutricionais que atrapalham a digestão, melhora da utilização de proteína, melhora valor nutricional e do sabor (JIANG et al., 2018). Em estudos com peixes, o uso do farelo de soja fermentado demonstrou resultados positivos sobre ganho de peso (SEONG et al., 2018; LIANG et al., 2017; LEE et al., 2016; SHIU et al., 2015), melhora na composição da microbiota intestinal (CATALÁN et al., 2018; HE et al., 2020; LI et al., 2020). Melhorar a atividade enzimática (DAWOOD et al., 2020; PHULIA et al. 2017; SOTOUDEH et al., 2016; SHAMNA et al., 2014) e da morfometria intestinal (DAWOOD 2021; DAWOOD et al., 2020; WU et al., 2020; CHACHAJ et al., 2019; FENG et al., 2007).

Neste estudo o jundiá (*Rhamdia quelen*) foi utilizado como modelo biológico. Esta espécie já foi utilizada na avaliação do efeito de alimentos funcionais sobre a saúde intestinal (HA et al., 2019). Níveis elevados de farelo de soja podem ser incluídos em sua dieta (LAZZARI et al., 2010, 2008) e o uso do farelo de soja hidrolisado já foi avaliado com efeitos positivos sobre a resposta antioxidant (UCZAY et al., 2019). Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) sobre o desempenho zootécnico e saúde intestinal de juvenis de jundiá.

2. Materiais e métodos

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Piscicultura da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil. Foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, e os tratamentos corresponderam à adição de 0, 7, 14, 21 e 28% de fermentado de soja às dietas.

2.2 Produção e caracterização do fermentado

O farelo de soja foi fermentado utilizando inóculos da bactéria *Lactobacillus acidophilus* da marca Aché® utilizando a uma adaptação da metodologia de Azarm e Lee (2014). O farelo de soja foi adquirido de fornecedor local e a bactéria de estabelecimento comercial. Inicialmente o farelo de soja foi autoclavado a 100° por 20 minutos. Após esfriar, foram inoculados 44 gramas de bactéria (10^9 UFC) a cada um quilo de farelo de soja e misturando uniformemente. Também foi adicionado 50% do peso do farelo de soja em água deionizada e a mistura foi colocada em bandeja esterilizada com álcool 70°. A mistura foi mantida com uma altura de dois centímetros e a bandeja foi colocada na estufa a 36°C. A cada 12 horas o material era pesado e a água evaporada reposta com nova homogeneização, de modo que a umidade foi mantida em 50%. A cada 24 horas, até o tempo máximo de 96 horas foram coletadas amostras do material em três ciclos de produção diferentes para análises de bactérias lácticas, pH, atividade enzimática e proteína solúvel, de forma a determinar o tempo ótimo de fermentação. Após o tempo de fermentação o FSFL foi seco em estufa até atingir peso constante e posteriormente mantido no freezer até o momento da utilização.

Para a contagem de bactérias lácticas as amostras de um grama do FSFL foram diluídas serialmente (1:10), em solução salina estéril a 0,65% (SSE), e semeadas no meio de cultura ágar MRS. Os fermentados semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa e a temperatura mantida a 35 graus Celsius. Foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC), após 48 horas de incubação no ágar (Figura 1).

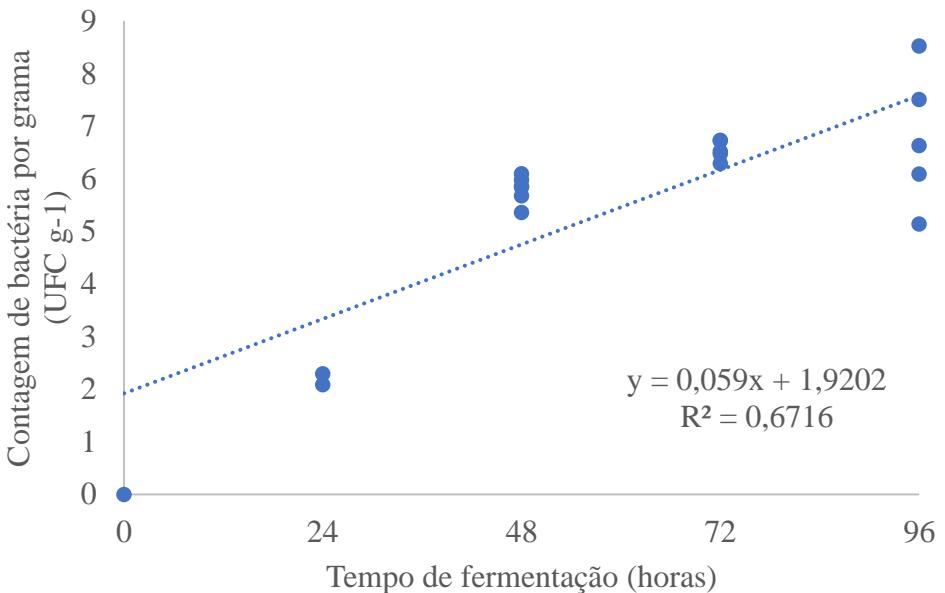


Figura 1. Contagem de bactérias láticas de farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* em diferentes tempos de fermentação.

O pH foi medido em solução, de acordo com o método potenciométrico, descrito pela Association of Official Analytical Chemists (LANE, 1995). Dez gramas de FSFL nos diferentes tempos de fermentação foram colocados em um erlenmeyer de 250 ml, onde foi adicionado 100 mL de água destilada a 25°C. Após adição de água, o conteúdo foi misturado em um agitador eletrônico (marca DiagTech, modelo DT3110H) por 30 minutos. O conteúdo foi alocado em um becker de 500 ml, ficou em descanso por 10 minutos e, em seguida, mediu-se o pH (pHmetro da marca Alfakit, modelo AT-355) (Figura 2).

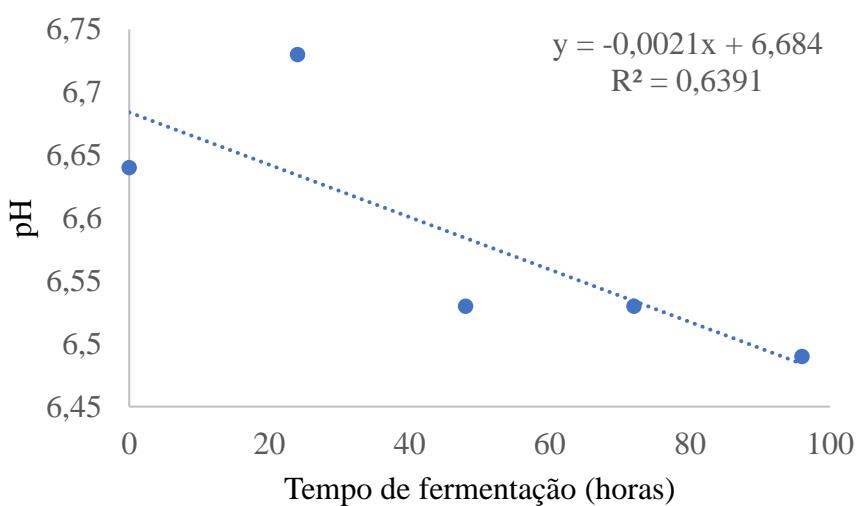


Figura 2. Avaliações de pH no farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* em diferentes tempos de fermentação.

Foram realizadas análises de atividade enzimática de amilase e protease alcalina nos diferentes tempos de fermentação do FSFL. As amostras foram colocadas em tubos tipo falcon onde foram diluídos em água destilada resfriada (1:6, p/v). Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm, e os sobrenadantes foram usados nas análises. Todos os ensaios foram analisados em duplicata nos três ciclos de produção descritos anteriormente. A atividade da amilase (Figura 3) foi medida a $\lambda = 580$ nm usando amido solúvel dissolvido (0,3%) em solução tampão de Na_2HPO_4 (pH 7,4) como substrato (MÉTAIS; BIETH, 1968). Uma unidade de atividade da amilase (U) foi definida como mg de amido hidrolisado em 30 min a 37 °C por ml de extrato enzimático (Figura 3).

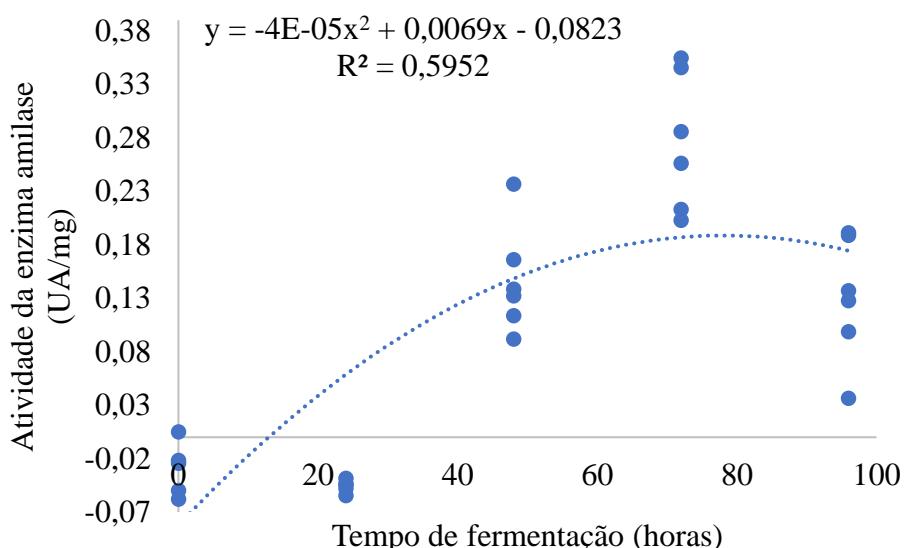


Figura 3. Atividade de amilase (UA/mg) no farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* em diferentes tempos de fermentação.

A atividade da protease alcalina total (Figura 4) foi determinada após 30 min de incubação a 25°C, utilizando caseína a 0,5% (p/v) como substrato em Tris-HCl 50 mM (pH 8.0). A reação foi parada com ácido tricloroacético (20% p/v), o extrato foi centrifugado (5000 rpm, 20 min) e a absorbância do sobrenadante foi medida a $\lambda = 280$ nm à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade da protease (U) por ml foi definida como 1 μmol de caseína hidrolisada por min por ml de extrato enzimático (GARCÍA-CARREÑO e HAARD, 1993).

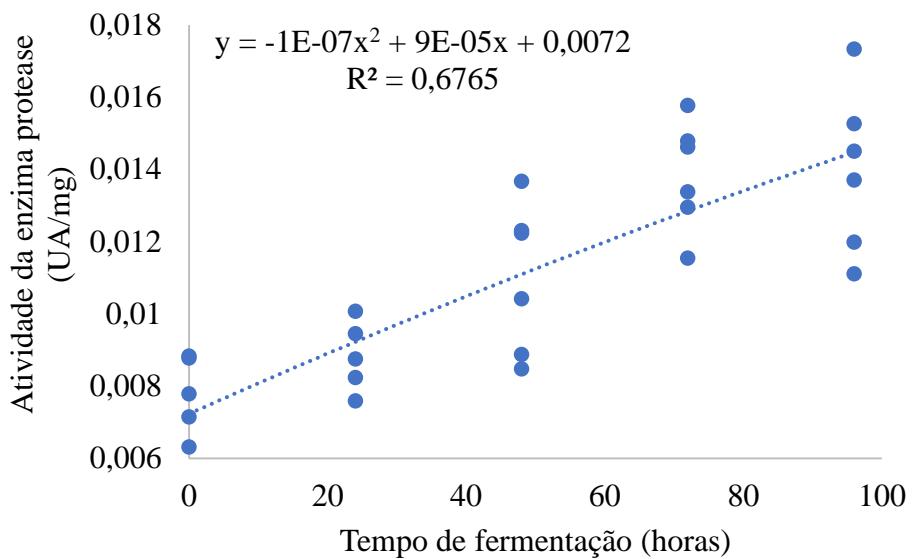


Figura 4. Atividade da enzima protease no farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* em diferentes tempos de fermentação.

Para mensurar a proteína solúvel, o fermentado foi macerado até a obtenção de um pó fino obtido, adicionou-se tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contendo inibidores de proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM, benzamidina 1 mM, tioureia 2 mM e EDTA 10 mM) epolivinilpolipirrolidona 2 % (m/v) foi medida de acordo com a metodologia de Bradford (1976) (Figura 5).

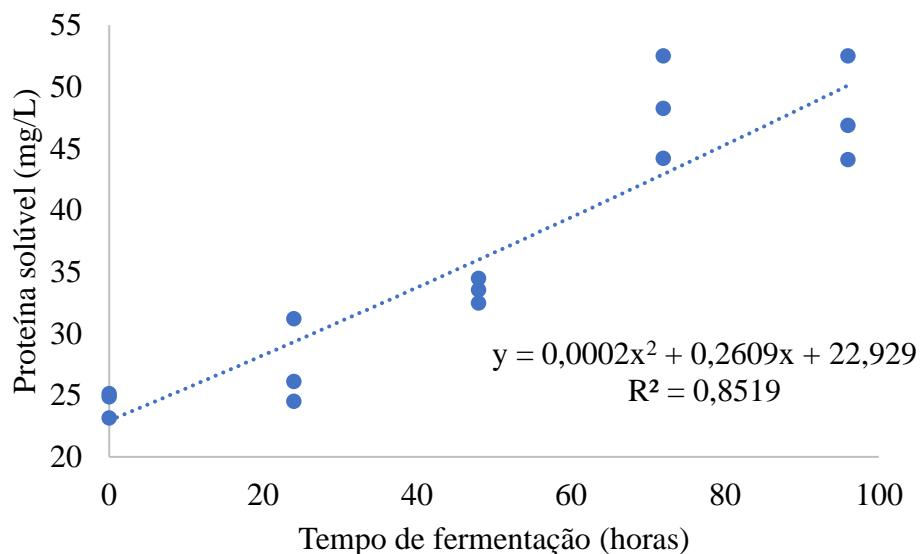


Figura 5. Proteína solúvel (mg/L) de farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* em diferentes tempos de fermentação utilizando o método de Bradford.

Com base na contagem de bactérias láticas e nas outras análises foi determinado o tempo de 48 horas para a fermentação do FSFL. Foram coletadas então amostras antes

e depois da fermentação para as análises bromatológicas (AOAC, 1995) e perfil de aminoácidos (Tabela 1).

Tabela 1. Composição bromatológica e dos aminoácidos da farinha de peixe, farelo de soja e farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* (FSFL).

	Farinha de peixe	Farelo de soja cru	FSFL
<i>Composição centesimal (%)</i>			
Proteína bruta	68	45	41,77
Extrato etéreo	7,5	5,23	4,19
Matéria seca	91,68	88,35	90,64
Matéria mineral	2,67	7,42	7,75
<i>Aminoácidos essenciais (%)</i>			
Arginina	4,43	3,43	3,47
Histidina	1,57	1,17	1,31
Isoleucina	3,29	1,99	2
Leucina	5,36	3,35	3,84
Lisina	3,39	2,87	3,14
Alanina	3,10	1,53	2,33
Metionina	1,17	0,62	0,60
Fenilalanina	3,11	2,21	2,73
Valina	3,79	2,09	2,38
Treonina	2,12	1,82	1,98
<i>Aminoácidos não-essenciais (%)</i>			
Prolina	2,97	2,12	2,63
Cistina	0,77	0,68	0,72
Alanina	3,67	2,08	2,33
Prolina	3,61	2,37	2,63
Ácido aspártico	3,56	4,36	5,86
Ácido glutâmico	5,37	7,54	9,12
Glicina	4,09	1,48	2,15
Serina	2,26	1,80	2,70

Tirosina	1,15	0,96	1,74
----------	------	------	------

2.3 Dietas experimentais

Foram formuladas cinco dietas isoproteicas (39% de proteína bruta) e isoenergéticas (cerca de 4300 kcal de energia bruta/ kg) com cinco níveis de inclusão (0, 7, 14, 21 e 28%) do FSFL (Tabela 2). Além do fermentado as dietas foram formuladas utilizando-se milho e o óleo de soja como fontes energéticas farinha de peixe e farelo de soja como fontes proteicas. A farinha de peixe marinha foi adquirida da Agroforte® (Laguna, Santa Catarina, Brasil). Os ingredientes foram triturados em moinho de faca com peneira de 2 mm de diâmetro de malha, misturados, peletizados com adição de água (30%) e levados à estufa a 45°C por 36 horas. A composição bromatológica das dietas foi analisada usando os métodos descritos em AOAC (2000). As dietas foram armazenadas em potes plásticos e conservadas sob refrigeração (4°C) até o momento da utilização.

Tabela 2. Formulação e composição analisada das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais				
	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFL 21%	FSFL 28%
Farelo de soja	25	25	25	25	25
Milho	9,5	9,0	8,5	8,5	8,5
Farinha de trigo	12	12	12	12	12
Farinha de peixe	46,5	40,5	34,5	28,0	22,0
FSFL	0	7	14	21	28
Óleo de soja	6	5,5	5,0	4,5	3,5
Premix ¹	1	1	1	1	1
Composição centesimal					
PB%	39,19	38,74	38,43	37,93	37,45
EB (kcal kg ⁻¹)	4298,93	4314,77	4205,53	4219,67	4333,41
EE%	11,05	10,38	9,71	7,09	7,87
Aminoácidos essenciais (%)					
Lisina	3,38	3,22	3,08	2,93	2,88

Metionina	1	0,92	0,85	0,77	0,70
Arginina	2,18	2,26	2,36	2,44	2,48
Treonina	1,83	1,82	1,77	1,73	1,71
Leucina	3,51	3,45	3,41	3,36	3,32
Isoleucina	2,46	2,37	2,28	2,19	2,12
Valina	2,51	2,43	2,36	2,27	2,22
Histidina	1,08	1,07	1,06	1,05	1,05

¹ Ácido fólico – 2.400 mg, ácido nicotínico – 48 g, ácido pantotênico – 24 g, biotina – 96 mg, vit. A – 2.400.000 UI, vit. D3 – 400.000 UI, vit. E – 24.000 UI, vit. B1 – 9.600 mg, vit. B2 – 9.600 mg, vit. B6 – 9.600 mg, vit. B12 – 9.600 mg, vit K3 – 4.800 mg, vit. C – 96 g, ferro – 100 g, manganês – 40 g, zinco – 6.000 mg, cobalto – 20 mg, iodo – 200 mg, selênio – 200 mg, antioxidante – 19,6 g.

2.4 Animais e instalação

Os peixes foram adquiridos de piscicultura comercial e previamente aclimatados as condições experimentais. Foram utilizados 240 juvenis de jundiá ($3,0 \pm 0,5$ g) que foram distribuídos em 20 caixas de polietileno volume útil de 80 litros ligadas em sistema de recirculação de água equipado com filtro mecânico, biológico e sistema de aquecimento. Os peixes foram adquiridos de piscicultura comercial e previamente aclimatados as condições experimentais. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente uma vez ao dia as 9 horas da manhã. Diariamente foram retirados os restos de alimentos e verificada a presença de animais mortos A temperatura ($28,5 \pm 0,3$ °C), o pH ($7,12 \pm 0,25$) (Hanna HI98130) e o oxigênio dissolvido ($6,41 \pm 0,54$ mg dl⁻¹) (Hanna HI9147-10) 174 foram monitorados diariamente. Amônia total foi averiguada semanalmente (LabconTest, Alcon Pet, Brasil) ($0,17 \pm 0,2$ mg NH₃ l⁻¹). A salinidade foi mantida em torno de 4 g l⁻¹ (LUZ et al., 2008) em todos os aquários durante todo o período experimental. Os parâmetros mantiveram-se dentro dos parâmetros recomendados para o cultivo do jundiá (BALDISSEROTO; RADÜNZ, 2004).

2.5 Desempenho produtivo e coleta de amostras

O experimento teve duração de 56 dias. No início e no final do experimento foram realizadas biometrias para avaliar o crescimento dos animais. Os peixes foram anestesiados em solução de óleo de cravo (1g 10 L⁻¹ de água), individualmente pesados em balança digital semianalítica com precisão de 0,01 g. Os seguintes parâmetros de desempenho serão avaliados: conversão alimentar aparente (Conversão= consumo de ração / ganho de peso total), consumo (Consumo= alimento consumido período) e ganho

de peso (GP = peso médio final – peso médio inicial). Não houve mortalidade durante o período experimental. No final do experimento foram coletados, anestesiados e eutanasiados dois peixes por repetição para análises de histomorfometria intestinal, dois peixes por repetição para as análises microbiológicas e 2 peixes por repetição para as análises de atividade enzimática.

2.6 Avaliações microbiológicas

Segundo a metodologia de Bairagi et al., (2002), os tratos intestinais foram homogeneizados e diluídos serialmente (1:10), em solução salina estéril a 0,65% (SSE), e semeados nos meios de cultura ágar TCBS (tiosulfato, citrato, bile e sacarose) e ágar MRS, para a contagem de bactérias vibrionáceas e láticas respectivamente. Os intestinos semeados nas placas de Petri foram incubados em estufas e a temperatura será mantida a 36 graus. Foi efetuada as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC), após 24 horas de incubação no ágar TCBS. No meio MRS, as contagens eram efetuadas após 48 horas de incubação.

2.7 Análises enzimáticas

Segundo a metodologia de García-Carreño e Haard (1993). O estomago e intestinos foram extraídos por meio de uma incisão longitudinal no ventre e imediatamente congelados a -80 °C até o momento das análises. No momento das análises os tratos foram pesados e cortados em pequenos pedaços e adicionados em tubos tipo falcon onde foram diluídos em água destilada resfriada (1:6, p/v). Os tubos foram submetidos a banhos ultrassônicos durante 5 min (5 vezes de 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo) para rompimento das células intestinais e liberação das enzimas digestivas e centrifugado por 15 minutos a 4 mil rotações por minuto, e os sobrenadantes foram usados para determinar a atividade das enzimas digestiva. Todos os ensaios foram analisados em duplicata.

A atividade da amilase foi medida a $\lambda = 580$ nm usando amido solúvel dissolvido (0,3%) em solução tampão de Na₂HPO₄ (pH 7,4) como substrato (MÉTAIS e BIETH, 1968). Uma unidade de atividade da amilase (U) foi definida como mg de amido hidrolisado em 30 min a 37 °C por ml de extrato enzimático. A atividade da protease alcalina total foi determinada após 30 min de incubação a 25 °C, utilizando caseína a 0,5% (p/v) como substrato em Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). A reação foi parada com ácido

tricloroacético (20% p/v), o extrato foi centrifugado (5000 rpm, 20 min) e a absorbância do sobrenadante foi medida a $\lambda = 280$ nm à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade da protease (U) por ml foi definida como 1 μmol de caseína hidrolisada por min por ml de extrato enzimático (GARCÍA-CARREÑO e HAARD, 1993). A atividade da lipase foi medida a $\lambda = 410$ nm usando *p*-nitrofenil laurato (3mM) em propanol como substrato (BRABCOVÁ et al., 2013). A reação foi paralisada pela adição de acetona (PASTORE et al., 2003). Uma unidade de atividade da lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a hidrolise de 1 μmol de *p*-nitrofenil laurato em 20 min a 25 °C por ml de extrato enzimático.

2.8 Morfometria intestinal

Após a eutanásia os peixes foram submetidos à incisão longitudinal no ventre para a exposição dos órgãos. Porções de aproximadamente 3 cm de comprimento serão recolhidas do intestino médio (4 cm abaixo da junção do estômago com o intestino), mergulhadas em solução fixadora de formalina tamponada 10% por 24 horas, sendo este substituído por álcool 70%, permanecendo conservadas até o momento da inclusão.

Foram confeccionadas duas lâminas de cada amostra e os cortes, com cerca de 5 micrômetros, serão corados de acordo com a técnica de coloração hematoxilina de Harris-Eosina (BEHMER et al., 2003). As lâminas eram fotografadas, utilizando-se uma câmera digital acoplada a um microscópio (objetiva 4 vezes). Foram medidas 15 vilosidades de cada peixe, os valores de altura total, altura e largura das vilosidades foram medidos usando o software analisador de imagens TouTek TouView-x64, versão 2270/07/03.

2.9 Análises estatísticas

Todos dados foram submetidos a testes para a verificação da normalidade dos erros e homocedasticidade das variâncias. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo Teste de Dunnet usando o programa estatístico SAS, versão 9.0. Quando houve diferença estatística os dados foram submetidos à análise de regressão.

3. Resultados

A inclusão de até 21% de FSFL não afetou ($P>0,05$) o desempenho dos juvenis de jundiá (Tabela 3). Os peixes alimentados com a dieta contendo 28% de FSFL tiveram menor ($P<0,05$) ganho de peso em relação ao tratamento controle.

Tabela 3. Desempenho zootécnico de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FSFL.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFL 21%	FSFL 28%	P
GP	28,71±4,98	29,81±3,40	29,03±5,35	28,24±2,72	19,15±3,8**	0,0141
Consumo	32,80±2,66	32,56±5,58	31,84±2,74	31,41±1,91	27,46±4,34	0,2866
CA	1,16±0,16	1,09±0,10	1,08±0,08	1,12±0,07	1,28±0,16	0,1834

GP= ganho de peso; CA= conversão alimentar; FSFL= farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus*. Médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo teste de Dunnet ($P<0,05$). Ganho de peso: $y = -2,0687x + 33,196$; $R^2 = 0,5479$.

A inclusão de 14% de FSFL diminuiu ($P<0,05$) a concentração de bactérias vibrionáceas presentes no intestino de juvenis de jundiá em relação ao tratamento controle (Tabela 4). A quantidade de bactérias lácticas e bactérias heterotróficas totais não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos avaliados.

Tabela 4. Concentração de vibrionáceas, bactérias heterotróficas totais e total microrganismos lácticos (UFC.g⁻¹ intestino) de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fermentado de soja.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFL 21%	FSFL 28%	P
TCBS	3,99±0,17	2,88±0,20	1,99±0,43**	3,69±0,82	3,47±0,53	0,0043
TSA	3,23±1,43	3,21±0,49	3,22±1,26	3,46±0,96	3,46±0,92	0,9947
MRS	2,62±1,00	3,82±0,42	3,21±0,98	2,45±0,87	2,49±1,02	0,2340

TCBS= ágar tiosulfato, citrato, sais biliares e sacarose (bactérias vibrionáceas); TSA= ágar triptona de soja (bactérias heterotróficas totais); MRS: ágar Man, Rogosa e Sharpe (bactérias lácticas); Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$). TCBS: $y = 0,0274x + 3,089$; $R^2 = 0,0036$. Médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo teste de Dunnet ($P<0,05$)

A inclusão de FSFL não alterou a atividade da amilase, protease alcalina e lipase no trato digestório de juvenis de jundiá (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade enzimática intestinal de juvenis de jundiá jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FSFL.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFL 21%	FSFL 28%	P
Amilase*	-1,7±3,68	-0,30±1,57	-1,94±2,39	-0,29±1,09	-0,19±0,73	0,2973
PAT	347,4±356,5	173,02±112,9	426±260,83	286,5±230,78	400,02±374,4	0,4162
Lipase	1,47±1,01	1,59 ±0,8	1,73 ±0,74	1,36 ±0,8	1,03± 0,75	0,7380

PAT= protease alcalina total. *A atividade da protease alcalina (U) foi definida como 1 µmol de caseína hidrolisada por min por ml de extrato enzimático. A atividade da amilase (U) foi definida como mg de amido hidrolisado em 30 minutos a 37°C por ml de extrato enzimático. Uma unidade de atividade da lipase foi definida como quantidade de enzima necessária para a hidrolise de 1 µmol de laurato em 20 min por ml de extrato enzimático.

A inclusão de FSFL não alterou ($P>0,05$) a largura, altura total e parcial das vilosidades intestinais de juvenis de jundiá (Tabela 6).

Tabela 6. Histologia intestinal de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FSFL.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFL 21%	FSFL 28%	P
AT	606,83 ±54,6	614,74±199,4	570,46±148,1	548,21±137,9	668,65±119,1	0,3832
AP	614,74±199,4	491,04±142,1	459,16±134,6	455,53±117,7	518,48±127,8	0,4816
L	92,59±3,8	89,1±14,5	79,49±12,9	90,24±10,5	93,82±16,3	0,5165

AT= altura total; AP= altura parcial; L= largura

4. Discussão

No presente estudo a inclusão de até 21% de FSFL não afetou o desempenho zootécnico do jundiá. O jundiá tem o hábito alimentar onívoro com tendência à carnivoria, considerado um peixe exigente quanto à qualidade da proteína (OLIVEIRA FILHO E FRACALOSSI, 2006). Estudos anteriores mostraram que a inclusão acima de 35% de farelo de soja cru foi prejudicial ao crescimento desta espécie (LAZARI et al., 2008). Neste estudo foi possível um alto nível de inclusão de subprodutos da soja, um total de 46% considerando a inclusão do farelo de soja cru e fermentado. O que pode ter possibilitado a substituição da farinha de peixe pelo FSFL, foi o processo de fermentação que aumenta o valor nutricional, diminui o teor de fibra bruta, aumenta as proteínas de baixo peso molecular e a digestibilidade e inativa fatores antinutricionais (HE et al., 2020). Estes resultados demonstram que o FSFL pode substituir uma proporção elevada da farinha de peixe nas dietas de jundiá, ajudando assim a mitigar a crescente demanda por farinha de peixe resultante do crescimento da aquicultura.

O nível mais alto de inclusão de FSFL (28%) reduziu ganho de peso dos juvenis de jundiá. O resultado obtido neste experimento corrobora com outros estudos que obtiveram resultados semelhantes, ao incluir níveis entre 24 e 30% de FSF (SEONG et al., 2018; LIANG et al., 2017; LEE et al., 2016; SHIU et al., 2015). Uma possível explicação é pelo o aumento da proteína solúvel presente no fermentado, o que indica maior proporção de peptídeos de baixo peso molecular (JIANG et al., 2018). O excesso de peptídeos pode comprometer a absorção e o desempenho dos animais devido a saturação dos mecanismos de transporte (SIDDIK et al., 2018; WEI et al., 2016; XU et al., 2016; KHOSRAVI et al., 2015). Além disso, pode ocorrer o aumento da oxidação dos aminoácidos e redução da retenção de proteína dietética devido ao grande número de peptídeos livres presentes no fermentado utilizado neste estudo (WEI et al., 2020).

A inclusão de 14% de FSFL promoveu a diminuição de bactérias vibrionáceas no intestino dos jundiás, quando comparado ao grupo controle. Outros autores já demonstram que o farelo de soja fermentado pode melhorar a composição da microbiota intestinal (CATALÁN et al., 2018; HE et al., 2020; LI et al., 2020). A maioria das bactérias dos fermentados morre durante o processo de secagem, entretanto os resíduos de bactérias mortas e os metabólitos produzidos podem ter contribuído para os resultados (HE et al., 2020). Polissacarídeos prebióticos são encontrados na parede celular dos *Lactobacillus* utilizados na fermentação (Dawood e Koshio, 2019), mas no caso de uma atividade prebiótica seria esperado também aumento das bactérias benéficas. Uma explicação para a diminuição das bactérias vibrionáceas são os peptídeos bioativos β -conglicinina e glicinina que possuem atividades antimicrobiana e estão presentes em abundância na soja (VASCONCELLOS, 2014). Mais estudos com análises qualitativas dos microrganismos são necessários para comprovar estes resultados.

A atividade enzimática e a morfometria intestinal dos juvenis de jundiá não foram afetadas com a inclusão do FSFL. A fermentação pode proteger o epitélio intestinal contra danos provocados por compostos antinutricionais e alérgenos presentes no farelo de soja cru (WANG et al., 2016; CHOI et al., 2020; HE et al., 2020). Devido a inativação dos fatores antinutricionais pode haver aumento da atividade enzimática (DAWOOD et al., 2020; PHULIA et al. 2017; SOTOUDEH et al., 2016) e das vilosidade intestinais (DAWOOD 2021; DAWOOD et al., 2020; WU et al., 2020; CHACHAJ et al., 2019; FENG et al., 2007). No presente estudos a ausência destes resultados pode indicar que os fatores não estavam ativos, ou que nos níveis incluídos eles não provocaram problemas para os juvenis de jundiá. Ranjan et al., (2018) e Azarm et al., (2014) também não

observaram alterações nas enzimas digestivas de *Labeo rohita* e *Acanthopagrus schlegeli* alimentados com farelo de soja fermentado.

5. Conclusão

Conclui-se que a inclusão de até 21% de fermentado de soja não prejudica o desempenho zootécnico, morfologia intestinal e atividade enzimática de juvenis de jundiá. A quantidade de bactérias patogênicas no intestino diminuí com a inclusão de 14% de fermentado de soja.

6. Referências

Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis, 389 17th ed. Gaithersburg, MD, USA. 2000.

ZARM, H. M., & LEE, S. M. Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. **Aquaculture Research**, 45(6), 994-1003. 2014.

BAIRAGI, A.; GHOSH, K. S.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2002.

BEHMER, O.H.; E.M.C. TOLOSA; A.G. FREITAS NETO. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 477–484. 2003.

BRABCOVÁ, J.; PRCHALOVÁ, D.; DEMIANOVÁ, Z.; BUČÁNKOVÁ, A.; VOGEL, H.; VALTEROVÁ, I.; PICHOVÁ I.; ZAREVÚCKA, M. Characterization of neutral lipase BT-1 isolated from the labial gland of *Bombus terrestris* males. **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 477–484. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CATALÁN, N.; VILLASANTE, A.; WACYK, J.; RAMÍREZ, C.; ROMERO, J. Fermented soybean meal increases lactic acid bacteria in gut microbiota of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 3, p. 566-576, 2018.

CHACHAJ, R.; SEMBRATOWICZ, I.; KRAUZE, M.; OGNIK, K. The effect of partial replacement of soybean meal with fermented soybean meal on chicken performance and immune status. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 28, n. 3, 2019.

CHOI, D. G.; HE, M.; FANG, H.; WANG, X. L.; LI, X. Q.; LENG, X. J. Replacement of fish meal with two fermented soybean meals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, 26, 37-46. 2020.

DAWOOD, M. A. O. Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 642-663, 2021.

DAWOOD, M. A. O.; EWEEDAH, N. M.; KHALAFALLA, M. M.; KHALID, A.; ASELY, A. E.; FADL, S. E.; AHMED, H. A. *Saccharomyces cerevisiae* increases the acceptability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to date palm seed meal. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100314, 2020.

DAWOOD, M. A.; KOSHIO, S. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 987-1002, 2020.

FENG, J.; LIU, X.; XU, Z. R.; LU, Y. P.; LIU, Y. Y. The effect of *Aspergillus oryzae* fermented soybean meal on growth performance, digestibility of dietary components and activities of intestinal enzymes in weaned piglets. **Animal feed science and technology**, v. 134, n. 3-4, p. 295-303, 2007.

FRÍAS, J.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. Fermented Foods in Health and Disease Prevention, 1ed.; Academic Press: Boston. 2016.

GARCÍA-CAREÑO, F.L.; HAARD N.F. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. **J Food Biochem**, v. 17, p. 97–113. 1993.

HA, N.; JESUS, G. F. A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S.; SUGAI, J. K.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture**, v. 500, p. 99-106. 2019.

HE, M.; YU, Y.; LI, X.; POOLSAWAT, L.; YANG, P.; BIAN, Y.; LENG, X. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diets of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, nutrition utilization and intestinal histology. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 10, p. 4302-4314, 2020.

JIANG, Y.; ZHAO, P. F.; LIN, S. M.; TANG, R. J.; CHEN, Y. J.; LUO, L. Partial substitution of soybean meal with fermented soybean residue in diets for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n.4, p. 1213-1222. 2018.

LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B. Nitrogen and phosphorus waste in fish farming. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 591-600, 2008.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A.; BERGAMIN; MANTZOURANI, I.; NOUSKA, C.; TERPOU, A.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLOU; PANAYIOTIDIS, MI; GALANIS, A.; PLESSAS, S. Production of a Novel Functional Fruit Beverage Consist of Cornelian Cherry Juice and Probiotic Bacteria. **Antioxidants**, v. 7, n. 163. 2018.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; PEDRON, F. D. A.; LORO, V. L.; PRETTO, A.; GIODA, C. R. Protein sources and digestive enzyme activities in jundiá (*Rhamdia quelen*). **Scientia Agricola**, v. 67, n. 3, p. 259-266, 2010.

LEE, S.M.; AZARM, H.M.; CHANG, K.H. Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture**, v. 459, p. 110–116, 2016.

LI, C.; ZHANG, B.; LIU, C.; ZHOU, H.; WANG, X.; MAI, K.; HE, G. Effects of dietary raw or Enterococcus faecium fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **Fish & shellfish immunology**, v. 100, p. 261-271, 2020.

MÉTAIS P.; BIETH J. (1968) Détermination de l'a-amylase. Ann Biol Clin 26:133–142.

MUKHERJEE, R.; CHAKRABORTY, R.; DUTTA, A. Role of fermentation in improving nutritional quality of soybean meal—a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 11, p. 1523. 2016.

NOVRIADI, R.; RHODES, M.; POWELL, M.; HANSON, T.; DAVIS, D. A. Effects of soybean meal replacement with fermented soybean meal on growth, serum biochemistry and morphological condition of liver and distal intestine of Florida pompano *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 1066-1075. 2018.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C. D.; FRACALOSSI, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1581-1587. 2006.

PASTORE, G.A M.; COSTA, V. S.S R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PHULIA, V.; SARDAR, P.; SAHU, N. P.; FAWOLE, F. J.; SHAMNA, N.; GUPTA, S. Substitution of soybean meal with fermented *Jatropha* kernel meal: effect on growth performance, body composition, and metabolic enzyme activity of *Labeo rohita*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 475-487, 2018.

SEONG, M.; LEE, S.; LEE, S.; SONG, Y.; BAE, J.; CHANG, K.; BAI, S. C. The effects of different levels of dietary fermented plant-based protein concentrate on growth, hematology and non-specific immune responses in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 483, p. 196-202, 2018.

SHARAWY, Z.; GODA A.M.S.; HASSAAN M.S. Partial or total replacement of fish meal by solid state fermented soybeanmeal with *Saccharomyces cerevisiae* in diets for Indian prawnshrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Post larvae. **Animal Feed science and Technology**, v. 212, p. 90–99. 2016.

SHIU, Y. L.; HSIEH, S. L.; GUEI, W. C.; TSAI, Y. T.; CHIU, C. H.; LIU, C. H. Using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*, H amilton). **Aquaculture Research**, v. 46, n. 6, p. 1403-1416, 2015.

SIDDIK, M.A; HOWIESON, J.; PARTRIDGE, GJ.; FOTEDAR, R.; GHOLIPOURKANANI, H. O hidrolisado dietético de atum modula o desempenho de crescimento, resposta imune, morfologia intestinal e resistência a *Streptococcus iniae* em juvenis de barramundi, *Lates calcarifer*. **Relatórios científicos**, v. 8, n. 1, p. 1-13. 2018.

SOTOUDEH, E.; MOGHADDAM, J. A.; SHAHHOSSEINI, G.; ARAMLI, M. S. Effect of dietary Gamma-irradiated and fermented soybean meal on the growth performance, body composition, and digestive enzymes activity of Caspian brown

trout, *Salmo trutta caspius*, 575 juvenile. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, p. 830-842. 2016.

UCZAY, J.; BATTISTI, E. K.; LAZZARI, R.; PESSATTI, M. L.; SCHNEIDER, T. L. S.; HERMES, L. B.; FABREGAT, T. E. H. P. Fish meal replaced by hydrolysed soybean meal in diets increases growth and improves the antioxidant defense system of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Research**, v. 50, n. 5, p. 1438-1447, 2019.

VASCONCELLOS, F.C.S. Produção e caracterização de um isolado proteico de soja, avaliação das atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das proteínas glicinina e β -conglicinina e produção de um fitocosmético. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. 2014.

WANG, P.; ZHOU, Q.; FENG, J.; HE, J., LOU, Y.; ZHU, J. Effect of dietary fermented soybean meal on growth, intestinal morphology and microbiota in juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 3, 748-757. 2019.

WEI, Y.; LIANG, M.; XU, H. O hidrolisado de proteína de peixe afetou a absorção de aminoácidos e as expressões gênicas relacionadas das vias IGF-1 / AKT no pregado (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 145-155. 2020.

WU, P.; GOLLY, M.K.; GUO, Y.; MA, H.; HE, R.; LUO, X; ZHU, J. Efeito da substituição parcial do farelo de soja por farelo de soja fermentado em alta temperatura em dietas livres de promotores de crescimento sobre o desempenho de crescimento, peso dos órgãos, índices séricos, flora intestinal e histomorfologia de frangos de corte. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114616, 2020.

XU, H.; MU, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; LIANG, ; ZHENG, K. Graduated levels of fish protein hydrolyzate in diets rich in plants for turbot (*Scophthalmus maximus*): effects on growth performance and lipid accumulation. **Aquaculture**, v. 454, p. 140 - 147, 2016.

ZHANG, S.; RAHIMNEJAD, Y.-R.; WANG, K.; LU, K.; SONG, L.; WANG, K. MAI, Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes, **Aquaculture**, v. 483, p. 173-182. 2018.

Capítulo 3- O enriquecimento do farelo de soja fermentado pode melhorar a saúde intestinal de juvenis de jundiá?

RESUMO

Diversos microrganismos tem sido utilizados para a fermentação incluindo bactérias, leveduras e fungos. A escolha do microrganismo pode resultar em diferentes características do fermentado. o objetivo deste trabalho é comparar o efeito de dietas contendo farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) com farelo de soja fermentado por *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* (FSFA) sobre o desempenho zootécnico e saúde intestinal de juvenis de jundiá. O experimento teve duração de 56 dias e foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado.com cinco tratamentos e quatro repetições, e os tratamentos corresponderam à adição de 0, 7 e 14% FSFL e 7 e 14% FSFA às dietas. Foram utilizados 240 juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) com $17,44 \pm 4,08$ g distribuídos em 20 caixas de polietileno. Os seguintes parâmetros de desempenho serão avaliados: peso médio final, ganho de peso (GP, g = peso médio final – peso médio inicial), conversão alimentar aparente (CA= consumo de ração/ ganho de peso), e sobrevivência. No final do experimento foram coletados dois peixes por repetição para análises de histomorfometria intestinal e 2 peixes por repetição para as análises de atividade enzimática. Os valores médios para peso final, ganho de peso e conversão alimentar não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos avaliados. As vilosidades intestinais de juvenis de jundiá não foram alteradas com a inclusão de farelo de soja fermentado na dieta. A inclusão de FSFL e FSFS aumentou o número de células caliciformes. A atividade da amilase no tratamento FSFL7% aumentou. As enzimas protease alcalina e lipase não foi alterada pela inclusão de farelo de soja fermentado. Podemos concluir que a inclusão de até 14% de farelo de soja fermentado tanto pela bactéria *Lactobacillus acidophilus* quanto pela combinação de microrganismos do Aquate®, não tem efeitos adversos no desempenho zootécnico e nas vilosidades intestinais de juvenis de jundiá. A inclusão de FSFL e FSFS aumenta o número de células caliciformes. A inclusão de 7% de farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* aumenta a atividade da amilase intestinal de juvenis de jundiá

Palavras chave: *Rhamdia quelen*; enzimas; células caliciformes; nutrição de peixes.

ABSTRACT

Several microorganisms have been used for fermentation including bacteria, yeasts and fungi. The choice of the microorganism can result in different characteristics of the fermentate. The objective of this work is to compare the effect of diets containing soybean meal fermented by *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) with soybean meal fermented by *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* (FSFA) on the zootechnical performance and intestinal health of juveniles of silver catfish. The experiment lasted 56 days and was carried out in a completely randomized design with five treatments and four repetitions, and the treatments corresponded to the addition of 0, 7 and 14% FSFL and 7 and 14% FSFA to the diets. 240 juveniles of silver catfish (*Rhamdia quelen*) with 17.44 ± 4.08 g were used, distributed in 20 polyethylene boxes. The following performance parameters will be evaluated: final average weight, weight gain (GP, g = final average weight - initial average weight), apparent feed conversion (CA = feed intake / weight gain), and survival. At the end of the experiment, two fish were collected per repetition for analysis of intestinal histomorphometry and 2 fish per repetition for analyzes of enzymatic activity. The mean values for final weight, weight gain and feed conversion did not show any significant difference between the treatments evaluated. The intestinal villi of juveniles of silver catfish were not altered with the inclusion of fermented soybean meal in the diet. The inclusion of FSFL and FSFS increased the number of goblet cells. Amylase activity in the FSFL7% treatment increased. The enzymes alkaline protease and lipase were not altered by the inclusion of fermented soybean meal. We can conclude that the inclusion of up to 14% of soybean meal fermented both by the bacteria *Lactobacillus acidophilus* and by the combination of microorganisms from Aquate®, does not have adverse effects on the zootechnical performance and intestinal villi of juveniles of silver catfish. The inclusion of FSFL and FSFS increases the number of goblet cells. The inclusion of 7% soybean meal fermented by *Lactobacillus acidophilus* increases the intestinal amylase activity of juvenile silver catfish.

Keywords: *Rhamdia quelen*; enzymes; goblet cells; fish nutrition.

1. Introdução

A rápida expansão da população global impulsionou a demanda por proteínas aumentando o consumo de peixes em todo o mundo (DELGADO et al., 2020). A redução dos estoques naturais de pescado, fez com que a piscicultura seja responsável pela produção de mais da metade dos peixes utilizados para consumo humano (FAO, 2020). Para atender a essa demanda, tornou-se necessária a expansão e intensificação da produção, produzindo mais em menos tempo (CALIXTO et al., 2020). No entanto, essas práticas podem levar a uma depressão imunológica e fisiológica e, consequentemente, alta mortalidade, fazendo com que o setor busque por rações de qualidade (NEDAEI et al., 2019).

Diferentes ingredientes têm sido estudados a fim de garantir que os animais possuam um desempenho satisfatório, e que também melhore seu sistema imunológico aumentando sua resistência e patógenos (SHAO et al., 2019). A utilização de alimentos fermentados na alimentação de peixes melhorou as respostas imunes inespecíficas e a atividade de enzimas digestivas também foram observadas (CHOI et al., 2020; HE et al., 2020; SEONG et al., 2018; LEE et al., 2016; SOTOUDEH et al., 2016; SHIU et al., 2015). Também houve melhora nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, do metabolismo lipídico e da saúde hepato-intestinal, bem como, efeito antioxidante (CHOI et al., 2020; HE et al.; 2020; WANG et al., 2019; NOVRIADI et al., 2018; JIANG et al., 2018; SEONG et al., 2018; WANG et al., 2016).

Diversos microrganismos tem sido utilizados para a fermentação incluindo bactérias (HASSAAN et al., 2017; NGUYEN et al., 2017; JIANG et al., 2017; LEE et al., 2016; WANG et al., 2016), leveduras (ILHAM; FOTEDAR 2017; SHARAWY et al., 2016) e fungos (JANNATHULLA et al., 2019; DOSSOU et al., 2018) A escolha do microrganismo pode resultar em diferentes características do fermentado, como perfil de aminoácidos e degradação de fatores que podem atrapalhar a absorção de nutrientes (MUKHERJEE et al., 2016). Ao realizar uma fermentação utilizando bactérias e fungos pode-se obter um produto mais rico nutricionalmente, unindo os benefícios da fermentação microbiana e fúngica. Existem poucos estudos sobre a fermentação do farelo de soja usando microrganismos combinados, alguns deles observaram resultados positivos como a prevenção alterações histológicas no fígado e a melhora no desempenho (LI et al., 2020; XU et al., 2020; NOVRIADI et al., 2017; JIANG et al., 2018; DING et al., 2015).

Neste estudo o jundiá (*Rhamdia quelen*) foi utilizado como modelo biológico. Esta espécie já foi utilizada na avaliação do efeito do farelo de soja fermentado por uma cepa bacteriana no estudo anterior, porém ainda são necessários mais estudos com diferentes tipos de fermentados. Assim, o objetivo deste trabalho é comparar o efeito de dietas contendo farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com farelo de soja fermentado por Aquate® sobre o desempenho zootécnico e saúde intestinal de juvenis de jundiá.

2. Material e métodos

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, e os tratamentos corresponderam à uma dieta controle e à adição de dois níveis de inclusão (7 e 14%) de FSFL e FSFA. Os dois níveis de inclusão foram escolhidos devido a estudo anterior, onde foram obtidos melhores resultados.

2.2 Produção e caracterização do fermentado

O FSFL foi fermentado utilizando inóculos da bactéria *Lactobacillus acidophilus* da marca Aché® e o FSFA foi com o Aquate®, fabricado pela Alltech®, composto por minerais, levedura *Saccharomyces cerevisiae* na concentração mínima de 8×10^7 UFC/g e pelas bactérias *Enterococcus faecium*, concentração mínima de 1×10^7 UFC/g e *Lactobacillus acidophilus*, concentração mínima de 1×10^7 UFC/g (Tabela 1). Os dois fermentados foram preparados da mesma forma com a metodologia adaptada de Azarm e Lee (2014). O farelo de soja foi autoclavado a 100°C por 20 minutos. Após esfriar, foi inoculado 15 gramas de Aquate® para o FSFA por quilo de farelo de soja conforme a recomendação do fabricante, e para o FSFL foram 44 gramas de bactéria (10^9 UFC) a cada um quilo de farelo de soja e misturado uniformemente. Em seguida adicionou-se 50% do peso do farelo de soja, em água deionizada. A mistura foi colocada em uma bandeja esterilizada com álcool 70°, mantendo-a com uma altura de dois centímetros. Logo depois, colocou-se a bandeja na estufa a 36°C. A cada 12 horas o farelo de soja era pesado e a água evaporada reposta, mantendo a umidade em 50%. Após o tempo de fermentação, o fermentado foi seco em estufa a 36°C até atingir peso constante, posteriormente mantido no freezer.

Tabela 1. Níveis de garantia do Aquate®.

	Concentração
Mananas	26,3 g/kg
Cobre	2133 mg/kg
Zinco	1249 mg/kg
Selênio	75 mg/kg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8×10^7 UFC/g
<i>Enterococcus faecium</i>	de 1×10^7 UFC/g
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1×10^7 UFC/g

Levedura seca de cana de açúcar, Levedura hidrolisada desidratada, Levedura seca de cervejaria, Carbonato de cálcio, *Saccharomyces cerevisiae*, Levedura enriquecida com selênio, Proteinato de cobre, Aluminosilicato de sódio e cálcio , Produto seco de fermentação de *Aspergillus niger*, Proteinato de zinco, Ácido ascórbico (Vitamina C), Farinha da alga *Schizochytrium* sp., *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, Produto seco de fermentação de *Trichoderma longibrachiatum*, Cloreto de sódio (sal comum), Farinha da alga *Chlorella vulgaris*.

Para as avaliações das bactérias ácido lácticas (Figura 1), o farelo de soja foi homogeneizado na bandeja e coletou-se um grama de cada repetição (três), no início da incubação (hora zero), 24, 48, 72 e 96 horas. Posteriormente diluídos serialmente (1:10), em solução salina estéril a 0,65% (SSE), e semeados no meio de cultura ágar MRS, para a contagem de bactérias lácticas. Os fermentados semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa e a temperatura mantida a 35°C. Foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC), após 48 horas de incubação no ágar.

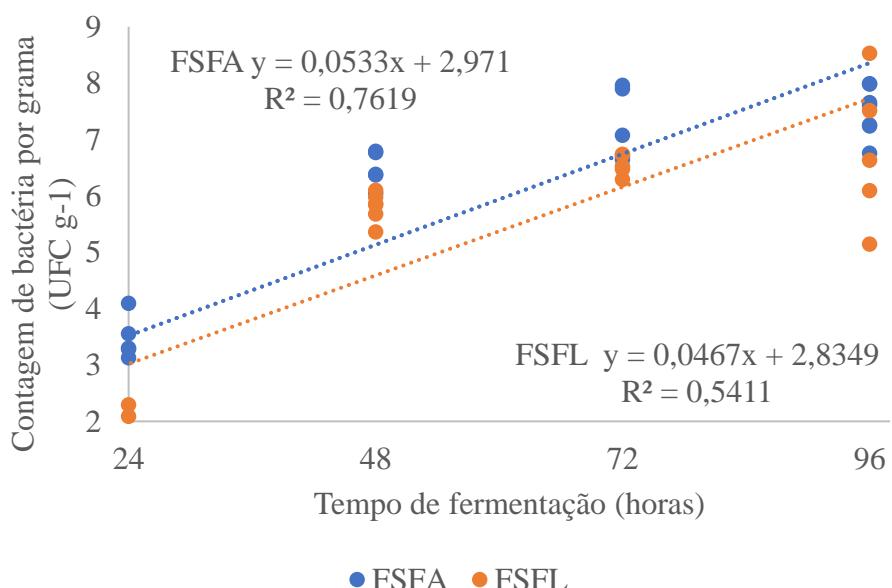


Figura 1. Análise microbiológica de farelo de soja fermentado com Aquate®(FSFA) e farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* (FSFL) em diferentes tempos de fermentação.

Foram coletadas amostras do farelo de soja logo após a inoculação dos microrganismos (zero hora), e às 48 horas de incubação, de cada repetição para as análises bromatológicas de composição nutricional em matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo segundo metodologia recomendada por AOAC (1995) (Tabela 2). O pH foi medido em solução, de acordo com o método potenciométrico, descrito pela Association of Official Analytical Chemists (LANE, 1995). Onde foram coletados das três repetições 10 g de fermentado de soja no início do experimento (zero hora) e 48 horas de incubação de ambos fermentados, em um erlenmeyer, onde foi adicionado 100 ml de água destilada a 25°C. Após adição de água, o conteúdo foi misturado em um agitador eletrônico por 30 minutos. O conteúdo foi alocado em um becker, ficou em descanso por 10 minutos e, em seguida, mediu-se o pH (Tabela 2). O tempo de fermentação escolhido nos dois fermentados foi o de 48 horas devido à maior regularidade. As composições aproximadas e de aminoácidos das farinhas da farinha de peixe, farelo de soja e farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* são mostradas na Tabela 1. As composições eram semelhantes entre si.

Tabela 2. Composição bromatológica do farelo de soja, farelo de soja fermentado com Aquate® e farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus*.

	Farinha de peixe	Farelo de soja cru	FSFL	FSFA
Composição centesimal (%)				
Proteína bruta	68	45	41,77	42,05
Matéria seca	91,68	88,35	90,64	90,82
Matéria mineral	2,67	7,42	7,75	7,09
pH	5,68	6,64	6,53	6,07
Aminoácidos essenciais (%)				
Arginina	4,43	3,43	3,47	3,09
Histidina	1,57	1,17	1,31	1,15
Isoleucina	3,29	1,99	2	2,14
Leucina	5,36	3,35	3,84	3,57
Lisina	3,39	2,87	3,14	2,89
Alanina	3,10	1,53	2,33	2,13
Metionina	1,17	0,62	0,60	0,51
Fenilalanina	3,11	2,21	2,73	2,50
Valina	3,79	2,09	2,38	2,28
Treonina	2,12	1,82	1,98	1,75
Aminoácidos não-essenciais (%)				

Prolina	2,97	2,12	2,63	2,34
Cistina	0,77	0,68	0,72	0,64
Alanina	3,67	2,08	2,33	2,13
Prolina	3,61	2,37	2,63	2,34
Ácido aspártico	3,56	4,36	5,86	5,06
Ácido glutâmico	5,37	7,54	9,12	8,15
Glicina	4,09	1,48	2,15	1,94
Serina	2,26	1,80	2,70	2,30
Tirosina	1,15	0,96	1,74	1,57

FSFA= Farelo de soja fermentado com Aquate®; FSFL= Farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus*

2.3 Dietas experimentais

Foram avaliadas cinco dietas isoproteicas (39% de proteína bruta) e isoenergéticas (cerca de 4300 kcal de energia bruta/ kg) (Tabela 3). As cinco dietas foram compostas por dois tipos de farelo de soja fermentado em dois níveis de inclusão (7 e 14%) mais o controle (sem adição de fermentado). Todas as dietas atenderam as exigências de aminoácidos essenciais. Além do fermentado as dietas foram formuladas utilizando-se milho e o óleo de soja como fontes energéticas farinha de peixe e farelo de soja como fontes proteicas. Os ingredientes foram triturados em moinho de faca com peneira de 2 mm de diâmetro de malha, misturados, peletizados com adição de água (30%) e levados à estufa a 36°C por 48 horas. As dietas eram armazenadas em potes plásticos e conservadas sob refrigeração (4°C) até o momento da utilização.

Tabela 3. Composição das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais				
	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFA 7%	FSFA 14%
Farelo de soja	25	25	25	25	25
Milho	9,5	9,0	8,5	9,0	8,5
Farinha de trigo	12	12	12	12	12
Farinha de peixe	46,5	40,5	34,5	40,5	34,5
FSFL*	-	7	14	-	-
FSFA**	-	-	-	7	14
Óleo de soja	6	5,5	5,0	5,5	5,0
Premix ¹	1	1	1	1	1
Composição centesimal					

PB%	39,19	38,74	38,43	38,76	38,47
EB (kcal kg ⁻¹)	4298,93	4314,77	4205,53	4286,21	4211,93
EE%	11,05	10,38	9,71	9,96	7,86
Aminoácidos essenciais (%)					
Lisina	3,38	3,22	3,08	3,2	3,05
Metionina	1	0,92	0,85	0,92	0,83
Arginina	2,18	2,26	2,36	2,24	2,3
Treonina	1,83	1,82	1,77	1,78	1,74
Leucina	3,51	3,45	3,41	3,44	3,37
Isoleucina	2,46	2,37	2,28	2,38	2,31
Valina	2,51	2,43	2,36	2,42	2,34
Histidina	1,08	1,07	1,06	1,06	1,04

*FSFL= Farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus*; **FSFA= Farelo de soja fermentado com Aquate®

1 Ácido fólico – 2.400 mg, ácido nicotínico – 48 g, ácido pantotênico – 24 g, biotina – 96 mg, vit. A – 2.400.000 UI, vit. D3 – 400.000 UI, vit. E – 24.000 UI, vit. B1 – 9.600 mg, vit. B2 – 9.600 mg, vit. B6 – 9.600 mg, vit. B12 – 9.600 mg, vit K3 – 4.800 mg, vit. C – 96 g, ferro – 100 g, manganês – 40 g, zinco – 6.000 mg, cobalto – 20 mg, iodo – 200 mg, selênio – 200 mg, antioxidante – 19,6 g.

2.4 Animais e instalações

Foram utilizados 240 juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), provenientes de piscicultura comercial com aproximadamente 17,44 gramas \pm 4,08 g distribuídos em 20 caixas de polietileno com volume útil de 80 litros ligadas em sistema de recirculação de água equipado com filtro mecânico, biológico e sistema de aquecimento. Os peixes foram adquiridos de piscicultura comercial e previamente aclimatados as condições experimentais. A qualidade da água foi monitorada diariamente com instrumentos portáteis (YSI PROPLUS, Amarelo Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EUA) para determinar: oxigênio dissolvido ($6,37 \pm 0,72$ mg dl⁻¹), temperatura ($27,88 \pm 0,4$ °C), pH ($7,14 \pm 0,39$) e amônia total (LabconTest, Alcon Pet, Brasil) ($0,17 \pm 0,2$ mg NH3 l⁻¹). Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente uma vez ao dia. Diariamente foram retirados os restos de alimentos e verificada a presença de animais mortos.

2.5 Desempenho produtivo e coleta de amostras

Os peixes foram anestesiados em solução de óleo de cravo (1g 10 L⁻¹ de água), individualmente pesados em balança digital semianalítica com precisão de 0,01 g, no

início do estudo, aos 30 e aos 60 dias. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 60 dias até a saciedade aparente, uma vez ao dia. Os seguintes parâmetros de desempenho serão avaliados, segundo Tacon (1990): peso médio final, ganho de peso (GP= peso médio final – peso médio inicial), conversão alimentar aparente (CA= consumo de ração/ ganho de peso), e sobrevivência.

2.6 Morfometria intestinal

Lâminas histológicas do intestino dos animais foram confeccionadas para determinação do tamanho das vilosidades intestinais. Para avaliação da morfologia intestinal foi colhida a porção média do intestino de dois peixes por aquário. Os peixes eram anestesiados e eutanasiados por seção medular e, posteriormente, submetidos à incisão longitudinal no ventre para a exposição dos órgãos. Porções de aproximadamente 3 cm de comprimento serão recolhidas do intestino médio (4 cm abaixo da junção do estômago com o intestino), mergulhadas em solução fixadora de formalina tamponada 10% por 24 horas, sendo este substituído por álcool 70%, permanecendo conservadas até o momento da inclusão.

Foram confeccionadas duas lâminas de cada amostra e os cortes, com cerca de 5 micrômetros, serão corados de acordo com a técnica de coloração hematoxilina de Harris-Eosina (BEHMER et al., 2003). As lâminas eram fotografadas, utilizando-se uma câmera digital acoplada a um microscópio (aumento 4 vezes). Os valores de altura total, altura e largura das vilosidades foram medidos usando o software analisador de imagens TouTek TouView-x64, versão 2270/07/03.

2.7 Análises enzimáticas

Para as atividades das enzimas digestivas amilase, protease alcalina total e lipase, foi amostrado dois peixes por aquário, após 60 dias. O trato digestivo foi extraído por meio de uma incisão do estômago ao ânus e imediatamente congelados a -80 °C até o momento das análises. O trato foi pesado e cortados em pequenos pedaços e adicionados em tubos tipo falcon onde foram diluídos em água destilada resfriada (1:6, p/v). Os tubos foram submetidos a banhos ultrassônicos durante 5 min (5 vezes de 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo) para rompimento das células intestinais e liberação das enzimas digestivas e centrifugado por 15 minutos a 4 mil rotações por minuto, e os

sobrenadantes foram usados para determinar a atividade das enzimas digestiva. Todos os ensaios foram analisados em duplicata.

A atividade da amilase foi medida a $\lambda = 580$ nm usando amido solúvel dissolvido (0,3%) em solução tampão de Na₂HPO₄ (pH 7,4) como substrato (MÉTAIS; BIETH, 1968). Uma unidade de atividade da amilase (U) foi definida como mg de amido hidrolisado em 30 min a 37 °C por ml de extrato enzimático. A atividade da protease alcalina total foi determinada após 30 min de incubação a 25 °C, utilizando caseína a 0,5% (p/v) como substrato em Tris-HCl 50 mM (pH 8.0). A reação foi parada com ácido tricloroacético (20% p/v), o extrato foi centrifugado (5000 rpm, 20 min) e a absorbância do sobrenadante foi medida a $\lambda = 280$ nm à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade da protease (U) por ml foi definida como 1 μ mol de caseína hidrolisada por min por ml de extrato enzimático (GARCÍA-CARREÑO; HAARD, 1993). A atividade da lipase foi medida a $\lambda = 410$ nm usando *p*-nitrofenil laurato (3mM) em propanol como substrato (BRABCOVÁ et al., 2013). A reação foi paralisada pela adição de acetona (PASTORE et al., 2003). Uma unidade de atividade da lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a hidrolise de 1 μ mol de *p*-nitrofenil laurato em 20 min a 25 °C por ml de extrato enzimático.

2.8 Análises estatísticas

Todos dados foram submetidos a testes para a verificação da normalidade dos erros e homocedasticidade das variâncias. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo Teste de Dunnet usando o programa estatístico SAS, versão 9.0.

3. Resultados

Os resultados do desempenho zootécnico estão apresentados na Tabela 4 e como pode ser observado, os valores médios para peso final, ganho de peso e conversão alimentar não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos avaliados. Não houve mortalidade durante o experimento.

Tabela 4. Desempenho (médias \pm desvio padrão) de juvenis de jundiá alimentados com dietas farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e Aquate®.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFA 7%	FSFA 14%	P
GP	35,5 \pm 8,4	33,54 \pm 8,2	31,96 \pm 6,13	32,92 \pm 6,13	32,49 \pm 11,48	0,6890
Consumo	63,22 \pm 4,9	66,88 \pm 1,78	63,73 \pm 4,94	64,76 \pm 1,85	62,68 \pm 1,1	0,0978
CA	1,84 \pm 0,37	1,90 \pm 0,32	1,88 \pm 0,23	1,91 \pm 0,23	1,83 \pm 0,40	0,0049

GP= ganho de peso; CA= conversão alimentar. FSFL= Farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus*; FSFA= Farelo de soja fermentado com Aquate®

As vilosidades intestinais de juvenis de jundiá não foram alteradas com a inclusão de farelo de soja fermentado na dieta (Tabela 5). Houve aumento na quantidade de células caliciformes com a inclusão de FSFL e FSFA.

Tabela 5. Histologia intestinal de juvenis de jundiá jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fermentado de soja com *Lactobacillus acidophilus* e Aquate®.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFA 7%	FSFA 14%	P
T	2874,3 \pm 148,5	2832,6 \pm 403,6	2798,3 \pm 265,8	2988,4 \pm 308,45	2346,4 \pm 285,1	0,38
P	2313,66 \pm 222,1	2234,18 \pm 280,1	2256,52 \pm 224,0	2358,86 \pm 246,6	1741,49 \pm 306,1	0,48
L	221,40 \pm 5,76	207,55 \pm 8,78	207,03 \pm 21,21	234,27 \pm 23,51	229,42 \pm 28,40	0,65
E	113,84 \pm 5,83	113,78 \pm 11,07	107,33 \pm 10,13	121,55 \pm 11,66	121,31 \pm 19,04	0,51
C	41,67 \pm 4,34	56,54 \pm 8,95*	60,28 \pm 6,3*	59,53 \pm 10,59*	61,37 \pm 8,51**	0,01

T= Altura total; P= Altura parcial; L= Largura; E.= espessura; C= célula caliciforme. FSFL= Farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus*; FSFA= Farelo de soja fermentado com Aquate®

A atividade da amilase no tratamento FSFL7% aumentou ($p>0,05$). As enzimas protease alcalina e lipase não foi alterada pela inclusão de farelo de soja fermentado (tabela 6).

Tabela 6. Atividade enzimática intestinal de juvenis de jundiá jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fermentado de soja com *Lactobacillus acidophilus* e Aquate®.

	0%	FSFL 7%	FSFL 14%	FSFA 7%	FSFA 14%	P
A*	0,29 \pm 0,56	1,81 \pm 0,84*	0,67 \pm 0,49	0,17 \pm 0,22	0,03 \pm 1,27	0,002
PAT	825 \pm 310,49	831,6 \pm 357,3	576,1 \pm 352,6	447,9 \pm 406,3	808,4 \pm 442,5	0,008
L	1,39 \pm 0,77	1,27 \pm 0,78	1,34 \pm 0,45	1,62 \pm 0,38	1,58 \pm 0,53	0,795

A= Amilase; PAT= Protease alcalina total; L= Lipase.

FSFL= Farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus*; FSFA= Farelo de soja fermentado com Aquate®. *A atividade da amilase (U) foi definida como mg de amido hidrolisado em 30 minutos a 37°C por ml de extrato enzimático. A atividade da protease alcalina (U) foi definida como 1 mol de caseína hidrolisada por minuto por ml de extrato enzimático. Médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo teste de Dunnet ($P<0,05$)

4. Discussão

Não houve diferença no desempenho de juvenis de jundiá alimentados com farelo de soja fermentado com *Lactobacillus acidophilus* isolado ou combinado com outros microrganismos. Eram esperados resultados positivos, uma vez que estudos anteriores obtiveram melhor desempenho com a utilização de fermentados com combinações de microrganismos (LI et al., 2020; XU et al., 2020; JIANG et al., 2018; DING et al., 2015). De acordo com os autores a melhora no desempenho foi em função da eliminação dos fatores antinutricionais do farelo de soja e o aumento da proteína bruta, peptídeos de pequeno tamanho e de aminoácidos essenciais do farelo de soja ao ser fermentado com múltiplas cepas de microrganismos (CHI E CHO 2016; TENG et al., 2012; SONG et al., 2008; FRIAS et al., 2008). No presente estudo a composição de aminoácidos não foi alterada com a combinação de microrganismos em relação ao uso de *Lactobacillus* isolados, o que pode explicar a falta de resultados positivos sobre o desempenho. Outros autores também não observaram melhora no desempenho ao utilizar dietas com farelo de soja fermentado com mais de um microrganismo (NOVRIADI et al., 2017; CHOI et al 2020; HE et al., 2020).

Além dos microrganismos, também haviam outros componentes no Aquate como zinco, selênio, cobre e farinha de *Chlorella vulgaris* que poderiam contribuir para a saúde dos animais. O zinco está envolvido na formação e mineralização óssea, é antioxidante, sua deficiência pode causar taxas de crescimento mais lentas em várias espécies de peixe (KAZEMI et al., 2020). O selênio tem papel importante na redução do estresse oxidativo e sua suplementação pode aumentar o crescimento nos peixes (DOMÍNGUEZ et al., 2017). Foi relatado que a suplementação de cobre melhora o desempenho do crescimento, o estado oxidativo e as respostas imunológicas em espécies aquáticas (BASUINI et al., 2016). *Chlorella vulgaris* é uma microalga rica em aminoácidos essenciais e outras biomoléculas que melhoram o desempenho dos peixes, imunidade, tolerância ao estresse e microbiota intestinal (AHMAD et al., 2018). O efeito dos fermentados sobre a resposta antioxidante ainda precisa ser avaliada com a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo.

Houve aumento no número de caliciformes nos dois níveis de inclusão de FSFL e FSFA. Estas células produzem muco e são secretoras de glicoproteínas (KNOOP; NEWBERRY., 2018). Sua função no intestino é criar uma barreira contra patógenos intestinais e proteger o epitélio da ação de enzimas digestivas (DAWOOD, 2020). Assim é possível que essa alteração afete positivamente a função intestinal geral. A utilização de microrganismo isolado ou combinados não causou alteração nas vilosidades intestinais nos jundiás. Não foi encontrado estudos que que utilizassem microrganismos combinados e avaliaram as vilosidades intestinais. Cabe destacar que a dietas continham níveis elevados de proteína da soja, considerando o farelo de soja cru e fermentado. Nestas condições podem haver alterações negativas na saúde intestinal em decorrência dos fatores antinutricionais (RAHIMNEJAD et al., 2019). Já foi demonstrado que a inclusão de níveis elevados de farelo de soja fermentado na alimentação de peixes pode ter impactos prejudiciais sobre a integridade intestinal, diminuindo a altura e largura das vilosidades (CHOI et al, 2019; HE et al., 2019; RAHIMNEJAD et al., 2019; SHIU et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2010). É importante salientar também que algumas espécies de beneficiaram com a inclusão de fermentado e seus peptídeos bioativos e tiveram melhora na sua morfometria intestinal (DAWOOD 2021; DAWOOD et al., 2020; WU et al., 2020; CHACHAJ et al., 2019; FENG et al., 2007). Mais estudos são necessários para compreender como diferentes tipos e combinações de microrganismos afetam a saúde intestinal dos peixes.

A atividade da amilase intestinal dos jundiás aumentou com a inclusão de 7% de FSFL. Em um estudo ainda não publicado deste laboratório, a inclusão de 21 e 28% de FSFL também aumento atividade da amilase de kinguio. Ainda não existem estudos avaliando o efeito da combinação de microrganismos sobre a atividade enzimática dos peixes. Alterações na atividade de enzimas podem ser provocadas por enzimas exógenas (GOMES et al., 2016) ou por um incremento na saúde intestinal (RICARDO, 2020)). No presente estudo a atividade enzimática dos fermentados não foi medida, mas resultados anteriores já demonstram que a atividade de amilase foi maior no fermentado com *Lactobacillus*. No entanto não foi observado o aumento da atividade desta enzima nos peixes que receberam um nível de inclusão mais elevado. Assim sendo, a melhora na atividade possivelmente está relacionada com melhora na saúde intestinal.

A quantidade de lipase e protease não foram alteradas com a suplementação com fermentados. Ranjan et al., (2018) e Azarm et al., (2014) também não observaram alterações. Alguns autores notaram o aumento da protease, devido a grande quantidade

de pequenos peptídeos presentes no farelo de soja fermentado que pode aumentar as atividades desta enzima, melhorando a digestão e absorção de proteínas (DAWOOD et al., 2020; XU et al., 2020; SOTOUDEH et al., 2016). Nosso resultado obtido é positivo, uma vez que em alguns estudos a fermentação possivelmente não eliminou completamente os fatores antinutricionais e a inclusão de fermentado diminuiu as enzimas, prejudicando a digestão (CHOI t al., 2019; RAHIMNEJAD et al., 2019; ZHANG et al., 2018; DOSSOU et al., 2018; SHIU et al., 2015).

5. Conclusão

Podemos concluir que a inclusão de até 14% de farelo de soja fermentado tanto pela bactéria *Lactobacillus acidophilus* quanto pela combinação de microrganismos do Aquate®, não tem efeitos adversos no desempenho zootécnico e nas vilosidades intestinais de juvenis de jundiá. A inclusão de 7% de farelo de soja fermentado por *Lactobacillus acidophilus* aumenta a atividade da amilase intestinal. A inclusão de FSFL e FSFS aumenta o número de células caliciformes de juvenis de jundiá.

6. Referências

- AHMAD, M. T., SHARIFF, M., MD. YUSOFF, F., GOH, Y. M., BANERJEE, S. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. 2018.
- AZARM, H. M.; LEE, S. Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 994-1003, 2014
- BASUINI, M. F.; EL-HAIS, A. M.; DAWOOD, M. A. O.; ABOU-ZEID, A. E.-S.; EL-DAMRAWY, S. Z.; KHALAFALLA, M. M. E.-S.; DOSSOU, S. Effects of dietary copper nanoparticles and vitamin C supplementations on growth performance, immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p.1329–1340. 2017.
- BEHMER, O.H.; E.M.C. TOLOSA; A.G. FREITAS NETO. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 477–484. 2003.
- BERGAMIN, G. T.; LIMA, R. L.; STEFFENS, C Performance and fillet composition of jundiá (*Rhamdia quelen*) submitted to different diets in the rearing. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 477–484. 2008.
- BRABCOVÁ, J.; PRCHALOVÁ, D.; DEMIANOVÁ, Z.; BUČÁNKOVÁ, A.; VOGEL, H.; VALTEROVÁ, I.; PICHOVÁ I.; ZAREVÚCKA, M. Characterization of neutral lipase BT-1 isolated from the labial gland of *Bombus terrestris males*. **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 477–484. 2013.
- CALIXTO, E. S.; SANTOS, D. F. B.; LANGE, D.; GALDIANO, M. S.; RAHMAN, I. U. Aquaculture in Brazil and worldwide: overview and perspectives. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v.5, n. 1, p. 98-107. 2020.
- CHACHAJ, R.; SEMBRATOWICZ, I.; KRAUZE, M.; OGNIK, K. The effect of partial replacement of soybean meal with fermented soybean meal on chicken performance and immune status. **J. Anim. Feed Sci**, v. 28, p. 263-271, 2019.
- CHI, C.; CHO, S. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 619-625, 2016.
- CHOI, D. G.; HE, M.; FANG, H.; WANG, X. L.; LI, X. Q.; LENG, X. J. Replacement of 425 fish meal with two fermented soybean meals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, 26, 37-46. 2020.
- DAWOOD, M. A. O. Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 642-663, 2021.

DELGADO, C. L.; WADA, N.; ROSEGRANT, M. W.; MEIJER, S.; AHMED, M. The future of fish. **Issues and Trends to**. 2020.

DING, Z.; ZHANG, Y.; YE, J.; DU, Z.; KONG, Y. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 44, n. 1, p. 295-301, 2015.

DOMÍNGUEZ, D.; RIMOLDI, S.; ROBAINA, L.E.; TORRECILLAS, S.; TEROVA, G.; ZAMORANO, M.J.; KARALAZOS V.; HAMRE, K.; IZQUIERDO, M. Minerais inorgânicos, orgânicos e encapsulados em dietas à base de farinha de vegetais para *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). **Peer**, n. 5, 2017

DOSSOU, S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; DAWOOD, M. A.; EL BASUINI, M. F.; OLIVIER, A. Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 490, p. 228-235, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Meeting the sustainable development goals**. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acesso em: 10 dez. 2020

FENG, J.; LIU, X.; XU, Z. R.; LU, Y. P.; LIU, Y. Y. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Digestive diseases and sciences**, v. 52, n. 8, p. 1845-1850, 2007.

FRIAS, J.; SONG, Y.S.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; DE MEJIA E.G.; VIDAL-VALVERDE, C. Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 99–105. 2008.

GARCÍA-CAREÑO, F.L.; HAARD N.F. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. **J Food Biochem**, v. 17, p. 97–113. 1993.

GOMES, V. D. S.; SILVA, J. H. V.; CAVALCANTI, C. R.; FONSECA, S. B. ; JORDÃO FILHO, J.; SILVA NETO, M. R.; SILVA, F. B. da. Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes - revisão de literatura. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 259-264, out./dez. 2016.

HASSAAN, M. S.; SOLTAN, M. A.; ABDEL-MOEZ, A. M. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 89-98. 2015.

HE, M.; YU, Y.; LI, X.; POOLSAWAT, L.; YANG, P., BIAN, Y.; LENG, X. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diets of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, nutrition utilization and intestinal histology. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 10, p. 4302-4314, 2020.

ILHAM, I.; FOTEDAR, Ravi. Growth, enzymatic glutathione peroxidase activity and biochemical status of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) fed dietary fermented soybean meal and organic selenium. **Fish physiology and biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 775-790, 2017.

JANNATHULLA, R.; RAJARAM, V.; KALANJIAM, R.; AMBASANKAR, K.; MURALIDHAR, M.; DAYAL, J. S. Fishmeal availability in the scenarios of climate change: inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 12, p. 3493-3506, 2019.

JIANG, Y.; ZHAO, P. F.; LIN, S. M.; TANG, R. J.; CHEN, Y. J.; LUO, L. Partial substitution of soybean meal with fermented soybean residue in diets for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n.4, p. 1213-1222. 2018.

KAZEMI, E.; SOURINEJAD, I.; GHAEDI, A.; JOHARI, S. A.; GHASEMI, Z. Effect of different dietary zinc sources (mineral, nanoparticulate, and organic) on quantitative and qualitative semen attributes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 515, p. 734529, 2020.

KHOSRAVI, S.; BUI, H. T. D.; RAHIMNEJAD, S.; HERAULT, M.; FOURNIER, V., KIM, S. S.; LEE, K. J. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 435, p. 371-376, 2015.

KNOOP, K.A., Newberry RD Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunology** 11: 1551–1557. 2018.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A.; LEE, S.M.; AZARM, H.M.; CHANG, K.H. Effects of dietary inclusion of fermented soybean meal on growth, body composition, antioxidant enzyme activity and disease resistance of rockfish (*Sebastodes schlegeli*). **Aquaculture**, v. 459, p. 110–116, 2016.

LI, C.; ZHANG, B.; LIU, C.; ZHOU, H.; WANG, X.; MAI, K.; HE, G. Effects of dietary raw or Enterococcus faecium fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish & shellfish immunology**, v. 100, p. 261-271, 2020.

LUZ, R.K.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M.; DE PEDRO, N.; DELGADO, M.J. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. **Aquaculture**, 276, 171-178. 2008.

MÉTAIS P.; BIETH J. Détermination de l'a-amylase. Ann Biol Clin 26:133–142. 1968.

MUKHERJEE, R.; CHAKRABORTY, R.; DUTTA, A. Role of fermentation in improving nutritional quality of soybean meal—a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 11, p. 1523. 2016.

- NEDAEI, S.; NOORI, A.; VALIPOUR, A.; KHANIPOUR, A. A.; HOSEINIFAR, S. H. Effects of dietary galactooligosaccharide enriched commercial prebiotic on growth performance, innate immune response, stress resistance, intestinal microbiota and digestive enzyme activity in Narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). **Aquaculture**, v. 499, p. 80-89. 2019.
- NGUYEN, T. L.; PARK, C. I.; KIM, D. H. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. **Aquaculture**, v. 471, p. 113-120. 2017.
- NOVRIADI, R.; RHODES, M.; POWELL, M.; HANSON, T.; DAVIS, D. A. Effects of soybean meal replacement with fermented soybean meal on growth, serum biochemistry and morphological condition of liver and distal intestine of Florida pompano *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 1066-1075. 2018.
- PASTORE, G.A M.; COSTA, V. S.S R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003
- PHULIA, V.; SARDAR, P.; SAHU, N. P.; FAWOLE, F. J.; SHAMNA, N.; GUPTA, S. Substitution of soybean meal with fermented *Jatropha* kernel meal: effect on growth performance, body composition, and metabolic enzyme activity of *Labeo rohita*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 475-487, 2018.
- RAHIMNEJAD, S.; LU, K., WANG, L.; SONG, K.; MAI, K.; DAVIS, D. A.; ZHANG, C. Replacement of fish meal with *Bacillus pumillus* SE5 and *Pseudozyma aphidis* ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 84, p. 987-997, 2019.
- RANJAN, A.; SAHU, N. P.; DEO, A. D.; KUMAR, H. S.; KUMAR, S.; JAIN, K. K. Comparative evaluation of fermented and non-fermented de-oiled rice bran with or without exogenous enzymes supplementation in the diet of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Fish physiology and biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1037-1049, 2018.
- RICARDO, A. C. D. A. **Blend de ácidos orgânicos no desempenho zootécnico, na histomorfologia intestinal e na atividade de enzimas digestivas de juvenis de peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (CUVIER, 1830)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2020.
- SEONG, M.; LEE, S.; LEE, S.; SONG, Y.; BAE, J.; CHANG, K.; BAI, S. C. The effects of different levels of dietary fermented plant-based protein concentrate on growth, hematology and non-specific immune responses in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 483, p. 196-202, 2018.
- SHAMNA, N.; SARDAR, P.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; JAIN, K. K.; PHULIA, V. Nutritional evaluation of fermented *Jatropha* protein concentrate in *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2015.
- SHAO, J.; WANG, B.; LIU, M.; JIANG, K.; WANG, L.; WANG, M. Replacement of fishmeal by fermented soybean meal could enhance the growth performance but not

significantly influence the intestinal microbiota of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 504, p. 354-360. 2019.

SHARAWY, Z.I; GODA, A. M.S.; HASSAAN, M. S. Partial or total replacement of fish meal by solid state fermented soybean meal with *Saccharomyces cerevisiae* in diets for Indian prawn shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Postlarvae. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 90-99, 2016.

SONG, Y.S.; PÉREZ, V.G.; PETTIGREW J.E.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; DE MEJIA E.G. Fermentation of soybean meal and its inclusion in diets for newly weaned pigs reduced diarrhea and measures of immunoreactivity in the plasma. **Anim Feed Sci Technol**, v.159, p. 41–49. 2010.

SOTOUDEH, E.; MOGHADDAM, J. A.; SHAHHOSSEINI, G.; ARAMLI, M. S. Effect of dietary 573 Gamma-irradiated and fermented soybean meal on the growth performance, body 574 composition, and digestive enzymes activity of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, 575 juvenile. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, p. 830-842. 2016.

TENG, D.; GAO M.; YANG Y.; LIU, B.; TIAN, Z.; WANG, J. Bio-modification of soybean meal with *Bacillus subtilis* or *Aspergillus oryzae*. **Biocatal Agric Biotechnol.**; v.1, p. 32–38, 2012.

WANG, L.; ZHOU, H.; HE, R.; XU; W., MAI, K.; HE, G. Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 464, p. 87-94. 2016.

WANG, P.; ZHOU, Q.; FENG, J.; HE, J., LOU, Y.; ZHU, J. Effect of dietary fermented soybean meal on growth, intestinal morphology and microbiota in juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 3, 748-757. 2019.

WU, P.; GOLLY, M.K.; GUO, Y..; MA, H.,; HE, R.; LUO, X; ZHU, J. Effect of partial replacement of soybean meal with soybean meal fermented at high temperature in diets free of growth promoters on growth performance, organ weight, serum indexes, intestinal flora and histomorphology of broilers. **Animal Feed Science and Technology** , v. 269 , p. 114616, 2020.

XU, C.; LIU, W.; ZHANG, D.; LIU, J.; ZHENG, X.; ZHANG, C.; CHI, C. Effects of partial fish meal replacement with two fermented soybean meals on the growth of and protein metabolism in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100328, 2020.

YAMAMOTO, T.; IWASHITA, Y.; MATSUNARI, H.; SUGITA, T.; FURUITA, H.; AKIMOTO, A.; SUZUKI, N. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 309, n. 4, p. 173-180. 2010.

ZHANG, S.; RAHIMNEJAD, Y.-R.; WANG, K.; LU, K.; SONG, L.; WANG, K. MAI, Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax*

japonicus): Effects on 519 growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and 520 transporter genes, **Aquaculture**, v. 483, p. 173-182. 2018.

7. Considerações finais

Os estudos mostraram que o farelo de soja ao ser fermentado tem sua composição alterada. No FSFL ocorreu um aumento nas enzimas amilase e protease alcalina o que facilitaria a sua digestão. Houve aumento também da proteína solúvel, mostrando maior proporção de peptídeos de baixo peso molecular, que são aqueles que possuem propriedade bioativas.

Foi demonstrado que o farelo de soja fermentado traz benefícios à saúde intestinais de juvenis de jundiá é um ingrediente promissor. No primeiro experimento foi evidenciado que a inclusão de 14% de FSFL diminuiu a concentração de bactérias vibrionáceas presentes no intestino. Este resultado é benéfico uma vez que o uso de antibióticos na aquicultura tem sido cada vez mais restrito. Também foi comprovado que o FSFL substituiu até 21% da farinha de peixe sem prejuízos para o desempenho zootécnico. Este é uma questão de grande importância, visto que a farinha de peixe é um ingrediente caro e a alimentação representa cerca de 70% do custo da produção. Também

No segundo experimento a inclusão de FSFL e FSFA na dieta e aumentou no número de caliciformes, afetando positivamente a saúde intestinal pois aumenta a barreira contra patógenos intestinais. Houve aumento da amilase com a inclusão de 7% de FSFL, que pode estar relacionado com o aumento das atividades enzimáticas no FSFL. Mais estudos são necessários para esclarecer a redução das bactérias patogênicas, e entender como a melhora na saúde intestinal afetaria os peixes em condições de desafio.